

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

ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE
***Eleutherine plicata* Herb.**

Natasha Costa da Rocha Galucio

BELÉM-PA

2014

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

**ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE
DE *Eleutherine plicata* Herb.**

Autora: Natasha Costa da Rocha Galucio

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Fâni Dolabela

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

Dissertação 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 a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Galucio, Natasha Costa da Rocha, 1986-
Estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de
eleutherine plicata herb. / Natasha Costa da Rocha
Galucio. - 2014.

Orientadora: Maria Fâni Dolabela;
Coorientador: Marcelo de Oliveira Bahia.
Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Belém, 2014.

1. Eleutherine plicata. 2. Naftoquinonas. 3.
Ensaio cometa. 4. Genotoxicidade. 5. Plantas
Medicinais - Toxicologia. I. Título.

CDD 22. ed. 615.321|

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natasha Costa da Rocha Galucio

Estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de *Eleutherine plicata* Herb.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de mestre

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: 30/09/2014

Banca Examinadora

1 Prof^a. Dr^a. Maria Fâni Dolabela

Instituição: PPGCF, UFPA

Assinatura: _____

2 Prof. Dr. André Salim Khayat

Instituição: PPGBM, UFPA

Assinatura: _____

3 Prof. Dr^a. Adriana Costa Guimarães

Instituto: ICB, UFPA

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, que é minha rocha de sustentação emocional que permite minha evolução pessoal e intelectual, principalmente em momentos conflituosos.

A minha mãe, Cláudia Nunes Costa, meu avô Edson Rodrigues Sousa da Rocha (*in memoriam*) e minha avó Terezinha Liomar Sousa da Rocha, maiores incentivadores da minha formação pessoal e profissional e ao meu esposo Geremias Farias Galucio, sempre tão paciente e sempre me fazendo acreditar que tudo ia dar certo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Maria Fâni Dolabela que acreditou em mim e me deu oportunidade de participar do mestrado e me ensinou muitas coisas importantes, inclusive, contribuiu em meu crescimento pessoal.

Ao meu co-orientador Marcelo Bahia que com sua calma, paciência e dedicação me ensinou como eu deveria proceder nos ensaios, e ainda vibrava junto comigo quando os resultados iam surgindo, muito obrigada por ser assim com seus alunos.

A minha paciente amiga Andreza Veiga que repassou seu conhecimento de extração e fracionamento da *Eleutherine plicata*, sempre muito atenciosa e calma.

Ao meu amigo Jailton Nascimento que com muito carinho e paciência me ajudou com a CCD nas instalações do Laboratório de Fitoquímica, com a autorização do professor Wagner Barbosa.

A minha amiga e parceira de peripécias laboratoriais, Regianne Correa, que com muita alegria me ajudou e me fez acreditar que os resultados seriam obtidos dentro do prazo.

A minha amiga Luana Lopes, que foi parceira nos ensaios de cometa e micronúcleo, bendita hora que você veio do Piauí.

Ao meu amigo Jorge Rissino, que me ajudou muito com as culturas celulares, obrigada por ajudar.

Ao meu amigo Guilherme Carvalho que me ajudou em muitos momentos, principalmente momentos estatísticos, agradeço pela paciência e por me alegrar em momentos de descontração.

Aos meus amigos Adreanne Oliveira, Tatiane Mota, Raimundo Miranda Júnior, Valdicley Vale, Marcus Lima, Taylon Aguiar que foram companheiros, cúmplices, uma verdadeira família acadêmica, fico muito feliz por ter pessoas assim em minha vida.

Ao professor Rommel Burbano que me recebeu muito bem em seu laboratório e disponibilizou toda sua estrutura para que minha pesquisa fosse realizada.

A todos os professores e laboratórios que contribuíram com meu trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

A minha família, principalmente minha mãe que mesmo a mais de 2000 km de distância estava participando sempre das minhas derrotas e vitórias, sempre me dando carinho e atenção.

Ao meu esposo Geremias Galucio que foi um herói, pois controlava minha ansiedade, foi meu anjinho que Deus mandou exatamente no período do meu mestrado, para que eu suportasse as batalhas. Ajudou até nas mudanças do laboratório, na confecção de equipamento, na busca de produtos impossíveis, realmente fui abençoada.

Aliviei as angústias do meu coração, e livrai-me das aflições. Sl 24.17

(...) Não diga que a canção está perdida, tenha fé em Deus, tenha fé na vida. Tente outra vez!(...)

(...) Tente! Levante sua mão sedenta, e recomece a andar, não pense que a cabeça aguenta se você parar (...)

(...) Tente! E não diga que a vitória está perdida, se é de batalhas que se vive a vida (...)

Autor: Raul Seixas

RESUMO

GALUCIO, N.C.R. **Estudos fitoquímicos, citotoxicidade e genotoxicidade de *Eleutherine plicata* Herb.** 2014, 95f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

O objetivo do presente trabalho foi realizar estudos fitoquímicos de *E. plicata*, bem como avaliar a citotoxicidade, o papel do estresse oxidativo e a genotoxicidade. O pó dos bulbos de *E. plicata* foi submetido à maceração com etanol, a solução concentrada até resíduo em rotaevaporador. O extrato etanólico foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta de sílica gel, sendo utilizado como fase móvel solventes de polaridade crescente. A fração diclorometano foi submetida ao refracionamento em cromatografia em camada preparativa, utilizando como fase móvel o diclorometano, sendo obtidas 3 subfrações. O extrato etanólico, suas frações e subfrações foram submetidos a análises cromatográficas e espectrofotométricas. Todas as amostras foram submetidas aos ensaios: viabilidade celular (MTT), da capacidade antioxidante (DPPH), cometa e micronúcleo. A partir do extrato etanólico obteve-se uma fração rica em naftoquinona (Fração diclorometano). O fracionamento desta levou ao isolamento da isoeleuterina (fração S2 e majoritária), sendo a fração S3 minoritária (não identificada e não testadas). Estudos cromatográficos e espectrofotométricos permitiram a identificação de S2 (isoeleuterina). O fracionamento contribuiu positivamente para citotoxicidade em células VERO, sendo a amostra mais citotóxica a S1. Para células HepG2, a citotoxicidade foi concentração dependente, sendo que o fracionamento não contribuiu positivamente para esta. Também, em relação ao tempo, quanto maior o tempo de exposição, menor foi a citotoxicidade para as células HepG2. A capacidade antioxidante máxima foi observada para subfração S1, sendo que esta possuiu baixa genotoxicidade em ambos os métodos e foi a mais citotóxica. A fração diclorometano possui uma capacidade antioxidante intermediária, porém apresentou uma elevada genotoxicidade no ensaio do micronúcleo. A isoeleuterina (S2) mostrou-se menor capacidade antioxidante, menor citotoxicidade e resultados conflitantes na genotoxicidade. O extrato etanólico possuiu a menor capacidade antioxidante, genotoxicidade moderada e menor citotoxicidade. Ao se analisar os resultados verifica-se que: a subfração S1 é a mais promissora como candidato a

fármaco antimalárico, visto possuir taxas de citotoxicidade e genotoxicidade em níveis aceitáveis. A isoeleuterina necessita de investigações complementares sobre a genotoxicidade. Em relação à fração diclorometano desaconselha-se seu uso para o desenvolvimento do medicamento antimalárico, visto ser a mais genotóxica.

Palavras chave: *Eleutherine plicata*, isoeleuterina, citotoxicidade e genotoxicidade.

ABSTRACT

GALUCIO, N.C.R. **Phytochemical studies, cytotoxicity and genotoxicity *Eleutherine plicata* Herb.** 2014, 95f. Dissertation (Master) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

The purpose of this study was phytochemical studies of *E. plicata*, and to evaluate the cytotoxicity, the role of oxidative stress and genotoxicity. The powder of *E. plicata* bulbs underwent maceration with ethanol, the solution concentrated to residue in rotaevaporator. The ethanol extract was subjected to fractionation by open column chromatography over silica gel, being used as the mobile phase solvents of increasing polarity. The dichloromethane fraction was subjected to fractionation by preparative layer chromatography using dichloromethane as mobile phase, and 3 subfractions obtained. The ethanol extract, fractions and subfractions were subjected to chromatographic and spectrophotometric analysis. All samples were subjected to the tests: cellular viability (MTT), the antioxidant capacity (DPPH), comet and micronucleus assays. From the ethanol extract obtained a rich fraction naphthoquinone (dichloromethane fraction). Fractionation of this led to the isolation of: S1, S2 (major fraction), and fraction of minority S3 (unidentified, not tested). Chromatographic studies and spectrophotometric allowed the identification of S2 (isoeleuterin). Fractionation contributed positively to cytotoxicity on VERO cells, the sample being more cytotoxic to S1. The cytotoxicity in HepG2 cells was concentration dependent, being the fractionation did not contribute positively to this. Also, over time, the longer the exposure time, the lower the cytotoxicity to HepG2 cells. The maximum antioxidant activity was observed for subfraction S1, and this low genotoxicity possessed by both methods and it was the most cytotoxic. The dichloromethane fraction has an intermediate antioxidant capacity, but had a high genotoxicity in micronucleus assay. The isoeleuterin (S2) was lower antioxidant capacity, lower cytotoxicity and genotoxicity conflicting results. The ethanol extract possessed the lowest antioxidant capacity, moderate genotoxicity and lower cytotoxicity. When analyzing the results occur that: a subfraction S1 is the most promising candidate as the antimalarial drug, as have cytotoxicity and genotoxicity rates at acceptable levels. The isoeleuterin needs additional research on

genotoxicity. Regarding the dichloromethane fraction was not advisable to use for the development of an antimalarial drug, since it is more genotoxic.

Keywords: *Eleutherine plicata*, isoeleuterin, cytotoxicity and genotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estruturas químicas de naftoquinonas isoladas no gênero <i>Eleutherine</i>	19
Figura 2: Bulbos e folhas de <i>Eleutherine plicata</i>	20
Figura 3: Estruturas químicas de naftoquinonas isoladas no gênero <i>Eleutherine</i> ..	24
Figura 4: Estruturas químicas de naftoquinonas isoladas no gênero <i>Eleutherine</i> ..	25
Figura 5: Representação do ciclo redox e a geração dos metabólitos de quinonas.....	31
Figura 6: Redução do MTT por enzimas mitocondriais.....	34
Figura 7: Ensaio cometa alcalino.....	37
Figura 8: Desenho esquemático ilustrando a origem do micronúcleo.....	39
Figura 9: Esquema da placa 1 desenvolvida para o ensaio do MTT.....	52
Figura 10: Esquema da placa 2 desenvolvida para o ensaio do MTT.....	52
Figura 11: Plotagem do gráfico com as absorbâncias do padrão, gerando a equação da reta que possibilita o cálculo da capacidade antioxidante em mM.....	54
Figura 12: Demonstração do padrão de escores para análise do ensaio cometa..	56
Figura 13: Fotomicrografias de células de ensaio micronúcleo.....	59
Figura 14: Perfis cromatográficos e espectros em ultravioleta do extrato etanólico obtido dos bulbos de <i>E. plicata</i>	62
Figura 15: Perfis cromatográficos e espectros em ultravioleta da fração diclorometânica.....	63
Figura 16: Perfis cromatográficos e espectros em ultravioleta da fração acetato de etila.....	64
Figura 17: Perfis cromatográficos e espectros em ultravioleta da fração metanólica.....	65

Figura18: Cromatografia em camada preparativa da fração diclorometano de <i>E. plicata</i>	66
Figura 19: Ensaio de viabilidade celular - MTT com células HepG2 do extrato etanólico obtido de bulbos de <i>E. plicata</i> , fração diclorometano e subfrações.....	70
Figura 20: Gráficos com o Índice de Dano (ID), resultados do ensaio cometa com suas respectivas análises estatísticas – ANOVA.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima e relação entre CBM/CIM do Extrato Etanólico dos bulbos de <i>E. plicata</i> , suas frações e subfrações.....	26
Tabela 2: Comparação das atividades biológicas de extrato de <i>Eleutherine plicata</i> e suas frações.....	27
Tabela 3: Gradiente de eluição empregado no CLAE.....	48
Tabela 4: Rendimentos do extrato etanólico obtido dos bulbos de <i>E.plicata</i> e de suas frações.....	61
Tabela 5: Comparação dos fatores de retenção dos constituintes químicos presentes na fração diclorometano de <i>Eleutherine plicata</i>	67
Tabela 6: Concentração Citotóxica 50% (CC ₅₀) em µg/mL de extrato etanólico de <i>E.plicata</i> , fração diclorometano e subfrações com seus respectivos Desvios Padrão (DP).....	71
Tabela 7: Comparação da concentração citotóxica 50% a concentração inibitória 50% para o <i>P.falciparum</i> resistente a cloroquina.....	72
Tabela 8: Capacidade antioxidante das amostras obtidas a partir de <i>Eleutherine plicata</i>	75
Tabela 9: Resultado do Índice de Dano encontrado pelo Ensaio Cometa com seus respectivos Desvios Padrão (DP) nas amostras obtidas a partir de <i>Eleutherine plicata</i>	76
Tabela 10: Resultado do Teste do Micronúcleo nas amostras obtidas a partir de <i>Eleutherine plicata</i> : frequência de micronúcleos e o Índice de Divisão Nuclear – IDN e seus respectivos Desvios Padrão (DP).....	80
Tabela 11: Síntese dos resultados obtidos em células HepG2 expostas as amostras.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Trifosfato de adenosina
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CBMN	Micronúcleos com bloqueio de citocinese
CC _{50%}	Concentração Citotóxica 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cit-B	Citocalasina B
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Gás Carbônico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato Etanólico de <i>Eleutherine plicata</i>
FAC	Fração acetato de etila de <i>Eleutherine plicata</i>
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
FC	Fração clorofórmica de <i>Eleutherine plicata</i>
FDM	Fração diclorometanólica de <i>Eleutherine plicata</i>
FH	Fração hexânica de <i>Eleutherine plicata</i>
FM	Fração metanólica de <i>Eleutherine plicata</i>
GSH	Glutathione
HepG2	Linhagem de hepatoblastoma humano
ID	Índice de Dano
IDN	Índice de Divisão Nuclear
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
KCL	Cloreto de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo

MDA	Malondialdeído
MNs	Micronúcleos
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
Na ⁺	Íon Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NCR	Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos
NMU	N-metil-N-nitrosureia
NO	Nitric Oxide
OD	Densidade óptica
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute médium</i>
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TEAC	Capacidade antioxidante total
VERO	Linhagem celular de rim de <i>Cercopithecus aethiops</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Quinonas	27
2.2 Técnicas <i>in vitro</i> utilizadas para o estudo da citotoxicidade e genotoxicidade.	32
2.2.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	34
2.2.2 ENSAIO COMETA	35
2.2.3 MICRONÚCLEO	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 MATERIAL	41
4.1.1 EQUIPAMENTOS	41
4.1.2 SOLVENTES E REAGENTES	42
4.1.3 MATERIAIS DIVERSOS.....	42
4.1.4 MEIOS DE CULTIVO E SUA OBTENÇÃO.....	43
4.1.5 OUTRAS SOLUÇÕES.....	44
4.1.6 MATERIAL BIOLÓGICO	47
4.1.7 AQUISIÇÃO, SECAGEM E MOAGEM DE <i>ELEUTHERINE PLICATA</i>	47
4.2 MÉTODOS	48
4.2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>ELEUTHERINE PLICATA</i>	48
4.2.2 FRACIONAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	48
4.2.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	49
4.2.3.1 Cultivo Celular	49
4.2.3.2 Ensaio de viabilidade celular	50
4.2.3.3 Dosagem da capacidade antioxidante pela redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH)	53
4.2.4 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE	55
4.2.4.1 Método Cometa (versão alcalina).....	55

4.2.4.2 Técnica de Micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN, de <i>cytokinesis-block micronucleus</i>)	57
4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 ESTUDOS FITOQUÍMICOS	60
5.2 ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR	67
5.3 ESTUDOS DE GENOTOXICIDADE	75
5.3.1 ENSAIO COMETA	75
5.3.2 ENSAIO DO MICRONÚCLEO	79
6 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins medicinais pelas comunidades tradicionais é bem disseminado, muitos usuários acreditam que a terapia com plantas não tem efeitos colaterais e toxicidade. Em Belém, capital do estado do Pará (Brasil), não é diferente e no mercado público Ver-o-Peso inúmeras espécies vegetais são comercializadas e com diversas indicações terapêuticas, porém em nenhum momento é informado ao usuário os cuidados, contra indicações e reações comuns que o consumo destas plantas pode causar. Inclusive, para a maioria das plantas ainda não foi estabelecida a dose adequada de utilização, nem foram identificados os eventos adversos.

Quando se fala do Brasil, em especial a região amazônica, a maioria das plantas medicinais não possuem estudos científicos completos. Algumas espécies possuem um ou dois estudos nas áreas de: botânica, fitoquímica, farmacológica ou toxicidade aguda (BOCHNER et al. 2012; BALBINOT et al. 2013) Estudos que avaliem seu potencial citotóxico e mutagênico são raros. Um exemplo de planta medicinal que possui estudos incompletos é a *Eleutherine plicata* herb.

A *E. plicata* é encontrada na região amazônica onde é conhecida por marupazinho, coquinho, marupaú, marupari, nambu-tutano; e popularmente é utilizada para combater a dor de estômago, cólicas, diarreia, amebíase (MARTINS et al. 2005; OLIVEIRA NETO et al. 2007). Esta espécie (Figura 1) é caracterizada como erva perene, bulbosa possuindo folhas simples, laminares, paralelinérveas e bifaciais medindo cerca de 30 cm, apresentam ainda cristais estiloides, ovários inferiores, e flores com três estames (REEVES et al. 2001; GOLDBLATT et al. 2008; BORGES, 2012).



Figura 1: Bulbos e folhas de *Eleutherine plicata*.
Legenda: A - bulbos; B – folhas.
Fonte: Borges, 2012.

Estudos fitoquímicos do extrato etanólico de *E. plicata*, as Frações Hexânica (FH) e Clorofórmica (FC) apresentaram resultado positivo para naftoquinonas, antraquinonas, esteroides e triperpenos, além de conduzirem ao isolamento da naftoquinona isoeleuterina (Figura 2; MALHEIROS, 2008). Em outro estudo a prospecção fitoquímica do Extrato Etanólico (EE) apresentou resultado positivo para taninos, cumarinas, triterpenos, antraquinonas e quinona, além de também chegar ao isolamento da naftoquinona isoeleuterina (BORGES, 2012).

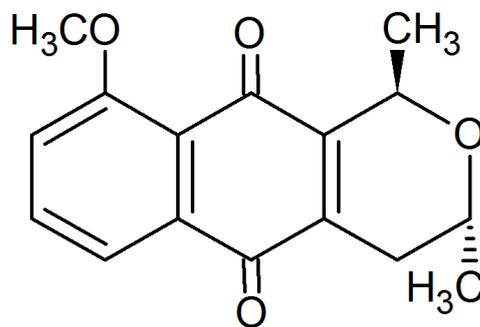


Figura 2: Estrutura química da naftoquinona Isoeleuterina isolada no gênero Eleutherine.

Esta planta já possui estudos para avaliar a atividade antimicrobiana, dentre eles, pode-se citar o teste de disco difusão em ágar do EE, frações acetato de etila (FAC) e diclorometano (DFM) onde se observou que na concentração de 500 µg/mL foram ativas em *Staphylococcus aureus* (BORGES, 2012). Esta atividade antimicrobiana já havia sido demonstrada anteriormente pelo mesmo teste de disco difusão em ágar com amostra do EE, FH e FC, porém com concentrações mais elevadas 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL e 62,5 mg/mL que apresentou resultado positivo perante *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (MALHEIROS, 2008).

Outros ensaios com o EE demonstraram uma baixa citotoxicidade em células HepG2 A16 pelo método do MTT ($CC_{50} = 61,55 \mu\text{g/mL}$). No bioensaio em *Artemia salina*, a concentração letal média (CL_{50}) foi de 1808 µg/mL para 24h e 1004 µg/mL após 48h de exposição ao EE. A toxicidade oral aguda com uma dose única de 5000 mg/Kg do EE em camundongos não apresentou sinal clínico evidente de toxicidade. Na avaliação subcrônica deste extrato houve alterações estatísticas significantes de alguns parâmetros hematológicos, mas que não foram clinicamente importantes, do

ponto de vista toxicológico. Ainda realizou-se avaliação do EE sobre as alterações oxidativas na malária murina em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* onde se verificou redução da parasitemia (60,5%) e alterações nos níveis de MDA (Malondialdeído) cerebral e TEAC (Capacidade antioxidante total) pulmonar (SILVA, 2012). Entretanto, esta espécie carece de estudos de genotoxicidade e mutagenicidade. Vale ressaltar que todos os estudos de toxicidade se limitaram ao EE, porém frações enriquecidas de quinonas e isoeleuterina (marcador farmacológico) ainda não foram estudadas.

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, portanto, é necessário investigar o potencial estresse oxidativo sob as células que esta espécie pode ocasionar (SILVA et al. 2003, BORGES, 2012).

Esta espécie é amplamente utilizada na medicina popular, sendo as principais alegações de uso: desordens reumáticas, tonturas (LEE et al. 2008), tratamento de amebíase, doenças hepáticas, hemorragias e anemia (PINTO e BARBOSA, 2009), vermífugo, diarreia e hemorroida (COELHO-FERREIRA, 2009; COSTA et al. 2010); o suco do bulbo é indicado para dificuldade de urinar, e elefantíase (RAHMATULLAH et al. 2009). Estudos biológicos buscam validar a ação de *E. plicata* e já foi observada a ação antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* (MALHEIROS, 2008; BORGES, 2012) e *Candida albicans* (MALHEIROS, 2008), antiparasitária em formas promastigota de *Leishmania chagasi* (VEIGA, 2013) e em *Plasmodium falciparum* (BORGES, 2012).

Conforme dito anteriormente, em *Eleutherine plicata* já foi identificada a presença de quinonas, em especial naftoquinonas. As quinonas têm sido relacionadas a elevada citotoxicidade, e uma das justificativas é a possibilidade de ocasionar estresse oxidativo (THOR et al. 1982). Com as validações das atividades biológicas desta espécie e o conhecido potencial citotóxico das quinonas, torna-se imprescindível a realização de ensaios que possam verificar a citotoxicidade e genotoxicidade de *E. plicata* para estabelecer a segurança do uso desta planta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A *E. plicata* pertence à família monocotiledônea Iridaceae e de acordo com o estudo de filogenia agrupa mais de 2030 espécies. Iridaceae é uma das maiores famílias da superordem Liliales (conforme o sistema taxonômico de Dahlgren), esta família segundo a hierarquia taxonômica está inserida no grupo de plantas das angiospermas. *E. plicata* faz parte da subfamília Iridoideae, tribo Tigridieae BM Kittel (GOLDBLATT et al. 2008). A *E. plicata* pode ser considerada sinônimo da *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urban (REEVES et al. 2001).

E. plicata (Figura 1) é uma erva perene, rizomática e bulbosa, de bulbos visivelmente avermelhados (purpúreo) que são constituídos por várias camadas de folhas modificadas sobrepostas, denominadas catafilos; suas folhas são simples, laminares, paralelinérveas e bifaciais medindo cerca de 30 cm; possui inflorescência em panículas de flores rosa, no ápice de um escapo, com flores bissexuadas, trímeras e ovário ínfero. O estudo, a fresco, das epidermes dos catafilos de *E. plicata* observou em ambas as faces, idioblastos com vacúolos contendo uma substância de coloração rosa sugestiva de antocianinas, nos mesófilos destes catafilos foram visualizados idioblastos com cristais prismáticos de oxalato de cálcio (CORRÊA, 1926; VIEIRA, 1992; BORGES, 2012).

Esta espécie possui ampla distribuição, sendo encontrada na América do Sul e Central, oeste da Índia (GOLDBLATT et al. 2008), no sudoeste da China (LEE et al, 2008 e em Bangladesh (RAHMATULLAH et al. 2009). No Brasil habita os campos cobertos e enxutos do Pará (CORRÊA, 1926). Possui vários nomes populares, como: lírio folha de palmeira, lagrimas de La Virgen (Cuba), marupá-miri, marupai, marupá-piranga (CORRÊA, 1926), alho do mato, tong-krai-choi (Bangladesh), chikra-choi (Bangladesh; RAHMATULLAH et al. 2009), guanyincao (China; LEE et al, 2008); marupazinho, nambu-tutano, anajai (COELHO-FERREIRA, 2009), coquinho, marupa-ú, marupari (OLIVEIRA NETO et al. 2007), marupa e palmeirinha (COSTA et al. 2010).

O extrato etanólico, obtido por percolação, do pó dos bulbos de *E. plicata* (rendimento de 12,6%) foi submetido a uma partição líquido/líquido utilizando-se os seguintes solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila. A abordagem fitoquímica detectou no EE a presença de esteroides, triterpenoides,

azulenos, antraquinonas, naftoquinonas e açúcares redutores. Este fracionamento obteve os seguintes rendimentos: fração hexano (7%), fração clorofórmica (11%) e fração acetato de etila (18%). A partir da fração clorofórmica foram isolados a isoeleuterina e isoeleuterol, estruturas químicas estão na figura 3 (MALHEIROS, 2008).

Em outro estudo, o EE do pó dos bulbos de *E. plicata* (2,84%) foi fracionado em coluna cromatográfica com sílica gel, utilizando como eluente solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Este fracionamento obteve os seguintes rendimentos: fração hexano (3,14%), fração diclorometano (19,6%), fração acetato de etila (10,2%) e fração metanol (61,9%). A prospecção fitoquímica detectou no extrato etanólico a presença de quinonas, triterpenoides, esteroides, cumarinas, taninos (taninos condensados) e antraquinonas (BORGES, 2012).

O extrato diclorometano obtido dos bulbos de *E. bulbosa* foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica utilizando gradientes de hexano-acetato de etila resultando em dezenove frações. A fração 11 foi submetida ao refracionamento (187:7:6) resultando no isolamento da eleuterinona (Figura 3). A fração 10 também foi submetida a novo fracionamento, sendo isolados: eleuterol, eleuterina (Figura 3) e isoeleuterina (ALVES et al. 2003).

As naftoquinonas do extrato etanólico obtido dos bulbos de *Eleutherine americana* Merr. apresentaram atividade no tratamento de doença cardíaca, angina pectoris, por sua atividade vasodilatadora (KOMURA, 1983).

O extrato diclorometano obtido dos bulbos de *E. bulbosa* e suas naftoquinonas (isoeleuterina, eleuterol, eleuterinona e eleuterina) foram submetidos avaliou-se a atividade antifúngica pela técnica da bioautografia, sendo utilizado os esporos de *Cladosporium sphaerospermum*. O extrato diclorometano de *E. bulbosa* mostrou ativo na concentração de 100 µg, sendo observado halos de inibição do crescimento do fungo. Dentre as quatro naftoquinonas, apenas eleuterol não apresentou atividade inibitória. Enquanto que, a isoeleuterina, eleuterinona e eleuterina foram ativas em concentração semelhante do extrato (ALVES et al. 2003).

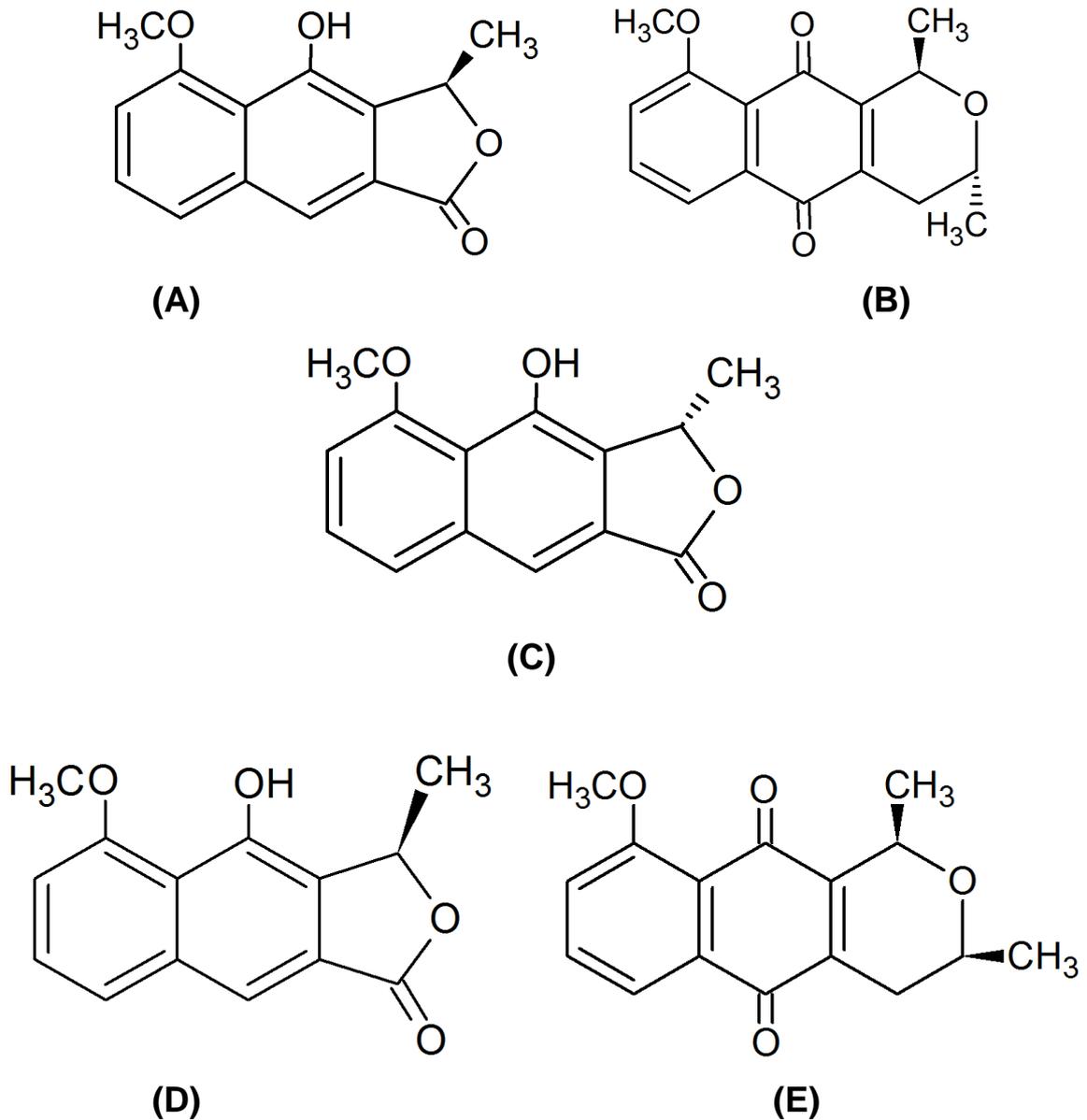


Figura 3: Estruturas químicas de naftoquinonas isoladas no gênero *Eleutherine*.
 Legenda: A - Isoeleuterol; B - Isoeleuterina; C - Eleuterol; D - Eleuterinona; E - Eleuterina.

A partir do extrato etanólico dos bulbos de *E. americana* foram isolados: isoeleuterol, isoeleuterina, eleuterina e elecanacina – estrutura química na figura 4 (HARA et al. 1997). O extrato etanólico de *E. americana* foi concentrado para redução do volume de solvente, o eleuterol precipitou, este extrato foi submetido a coluna cromatográfica com sílica gel e como eluente foi utilizado o diclorometano, resultou em três frações A, B e C. A fração A foi recristalizada, resultando no eleuterol; a fração B foi recristalizada, resultando na eleuterina e a fração C foi recristalizada, rendendo a isoeleuterina. Do material de partida foi submetido a novo

fracionamento em coluna cromatográfica obtendo-se a hongconina (Figura 4; ZHENGXIONG et al. 1986). Ainda no extrato de *E. americana*, foi isolada a naftoquinona eleuterinona (JINZHONG et al. 2006).

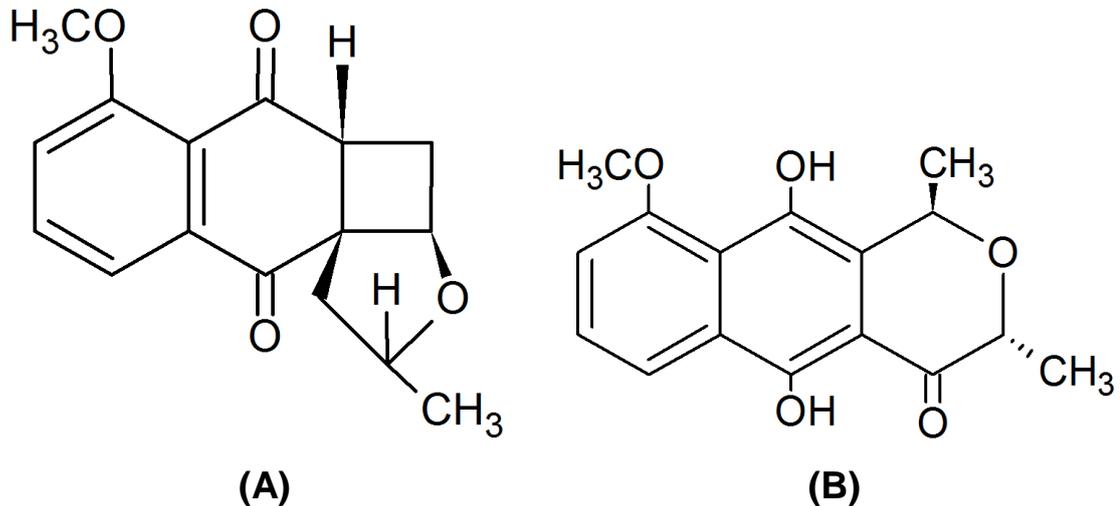


Figura 4: Estruturas químicas de naftoquinonas isoladas no gênero *Eleutherine*.
Legenda: A - Elecanacina; B - Hongconina.

O extrato etanólico dos bulbos de *E. plicata*, suas frações: hexano, clorofórmica e acetato de etila. Estas amostras foram submetidos a avaliação da atividade antimicrobiana através da técnica de difusão de disco frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231). Todas as amostras foram inativas em *P. aeruginosa* e *E. coli*. Para as cepas de *S. aureus* e *C. albicans* apenas o extrato etanólico e fração clorofórmica, apresentaram melhor atividade antimicrobiana, apresentando como CIM de 62,5 mg/mL, e 31,25 mg/mL, respectivamente. Foi sugerido que estes resultados deveriam ser decorrentes da presença de naftoquinonas (MALHEIROS, 2008). Este ensaio utilizou concentrações muito elevadas, logo o efeito inibitório observado pode estar relacionado a efeitos tóxicos, quando se trata de atividade antimicrobiana amostras com CIM > 1000µg/mL são consideradas inativas, entre de 500 a 1000 µg/mL fraca atividade, e CIM < 500 µg/mL ativas (HOLETZ et al. 2002; BORGES, 2012)

Visando esclarecer se *E. plicata* possui atividade antimicrobiana, através do teste de difusão em Agar, realizou-se novo estudo onde o extrato etanólico obtido

dos bulbos de *E. plicata*, de suas frações e subfrações: fração hexano, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração metanol. Nesta avaliação utilizaram-se as cepas: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25318); *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *C. albicans* (ATCC 14053). O extrato etanólico e as frações diclorometano e acetato de etila mostraram-se inativos para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, porém inibiram o crescimento de *S. aureus*. A fração metanólica não apresentou atividade frente a nenhuma cepa testada. As amostras ativas foram submetidas ao teste da microdiluição, ainda foram testadas as subfrações S2 (isoeleuterina) e S3 (naftoquinona não identificada). A melhor atividade antimicrobiana ocorreu da fração diclorometano (CIM= 125 µg/mL; Tabela 1). Também foi sugerido que esta atividade antimicrobiana possivelmente deve-se a presença de naftoquinonas (BORGES, 2012). Vale ressaltar que amostras ativas apresentaram atividade bacteriostática.

Tabela 1: Determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima e relação entre CBM/CIM do Extrato Etanólico dos bulbos de *E. plicata*, suas frações e subfrações.

Amostras	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CBM/CIM
EE	500	> 1000	> 2
FDM	125	> 1000	> 8
FAC	250	> 1000	> 4
S ₂	250	> 1000	> 4
S ₃	250	> 1000	> 4

Legenda: EE (extrato etanólico), FDM (fração diclorometano), FAC (fração acetato de etila), CIM (concentração inibitória mínima), CBM (concentração bactericida mínima).

Fonte: BORGES, 2012.

A pesquisa da atividade de *E. plicata* em protozoários vem demonstrando resultados muito satisfatórios, principalmente no extrato etanólico e nas frações deste extrato, que têm em sua composição as naftoquinonas, conforme a tabela 2 (BORGES, 2012; VEIGA, 2013). O Extrato etanólico e a fração diclorometano foram ativos em formas promastigota de *Leishmania chagasi*. Enquanto que, a fração metanólica mostrou-se inativo frente aos parasitos. Já a fração acetato de etila mostrou discreta atividade no *P. falciparum* (Tabela 2; VEIGA, 2013).

Tabela 2: Comparação das atividades biológicas de extrato de *Eleutherine plicata* e suas frações.

Amostras	Antipromastigota (CIM µg/mL)	Anti-plasmódica (CI ₅₀ µg/mL)
Extrato etanólico	Ativa 25	Ativa 6,57
Fr. Diclorometano	Ativa 12,5	Ativa 2,87
Fr. acetato de etila	Inativa >200	Moderada 16,38
Fr. Metanólica	Inativa >200	Inativa >50

Fonte: VEIGA, 2013.

Estudo da citotoxicidade do extrato etanólico obtido dos bulbos de *Eleutherine plicata* sobre as células HepG2 (ensaio de viabilidade celular, MTT), demonstrou que este extrato possui baixa citotoxicidade (CC₅₀= 61,55µg/mL). A toxicidade oral aguda em camundongos, com uma dose única de 5000 mg/Kg, não apresentou sinal evidente de toxicidade. No ensaio de toxicidade subcrônica demonstrou que este extrato altera de forma estatisticamente significativa alguns parâmetros hematológicos - eritrograma, leucograma, hemoglobina, hematócritos, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e contagem de plaquetas - mas que não foram clinicamente importantes, do ponto de vista toxicológico, corroborado pela ausência de quaisquer alterações histopatológicas. Ainda realizou-se avaliação do EE sobre as alterações oxidativas na malária murina em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* onde se verificou redução da parasitemia, ou seja, efeito antimalárico com a dose de 300 mg/kg (SILVA, 2012).

2.1 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 trazem um otimismo muito grande à pesquisa, 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 (naftoquinonas) mostraram-se ativos no vírus HIV, onde se observou inibição da replicação do vírus (HARA et al. 1997). A isoeleuterina mostrou-se ativa 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, 2001).

Os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) e do nitrogênio (RNS) são gerados *in vivo*, alguns por acidentes da química e outros para efeitos metabólicos úteis. Seus níveis são modulados por uma rede de sistemas de defesa antioxidantes, assistidos por sistemas de reparo. Estes sistemas de defesa

antioxidante limpam e/ou minimizam a formação de espécies reativas, mas eles não são 100% eficazes, então, existem sistemas de reparação capazes de lidar com as moléculas que foram oxidativamente danificadas (HALLIWELL, 2001; CHATTERJEE et al. 2005). Os sistemas de defesa são constituídos por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. O sistema de reparo com a função de reparar a lesão ocorrida é constituído pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O termo estresse oxidativo refere-se à situação de grave desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e da defesa antioxidante, ou seja, a queda na concentração da capacidade antioxidante pode resultar em estresse oxidativo. Este desequilíbrio pode levar a possíveis danos. O estresse oxidativo pode ocorrer devido à diminuição de antioxidantes, que pode ser o resultado de mutações que influenciem no sistema de defesa antioxidante, ou agentes tóxicos que destroem ou esgotam estas defesas. A diminuição de antioxidantes também pode ser resultado de uma dieta baixa em substâncias antioxidantes (HALLIWELL, 2001).

Outra origem do estresse oxidativo seria o aumento de ROS e RNS resultado da exposição a elevados níveis de toxinas que são espécies reativa, por exemplo, o gás dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\bullet$); ou da metabolização destas espécies; ou ainda pelo aumento da produção de ROS/RNS natural decorrente de um desequilíbrio do organismo vivo, por exemplo, aumento excessivo de células fagocitárias em doenças inflamatórias como a artrite reumatoide (HALLIWELL, 2001).

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 tricarbóxicos, 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 5). Todas estas espécies reativas podem reagir com o DNA, proteínas, lipídios e ocasionar danos celulares (PINTO e CASTRO, 2009).

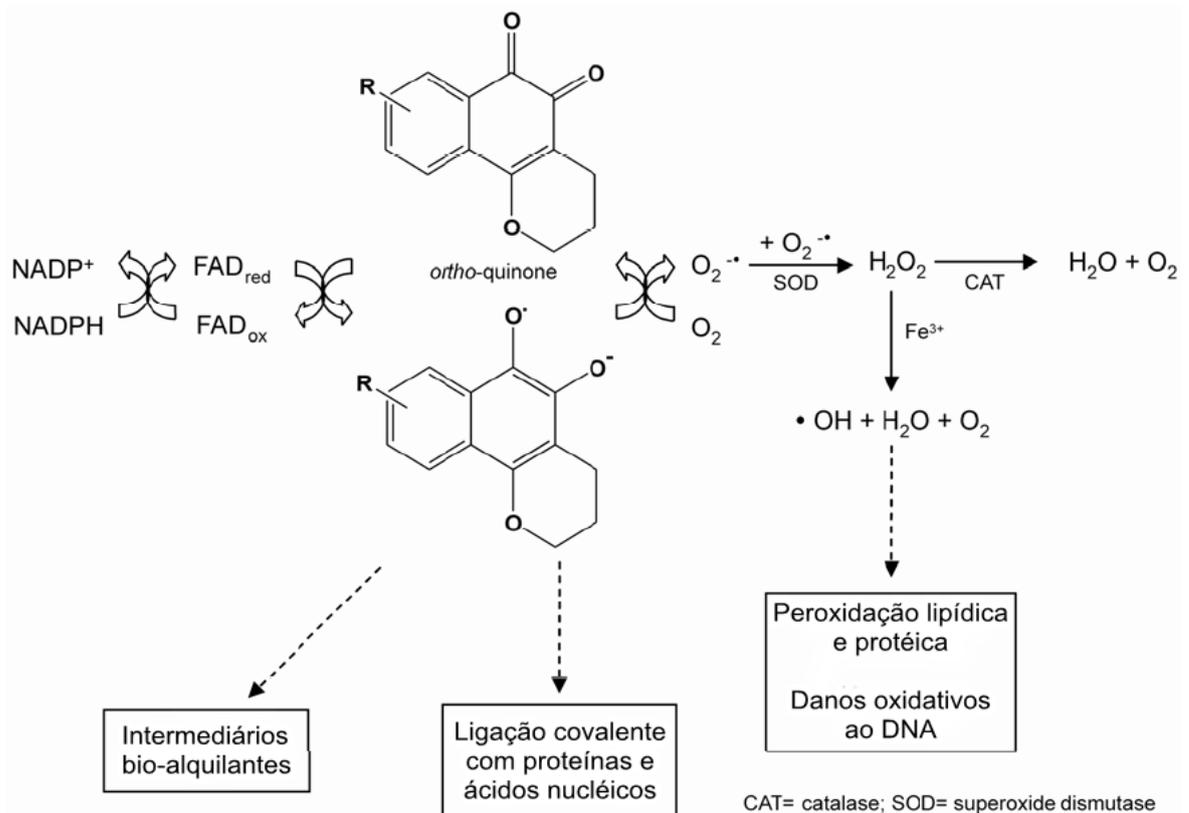


Figura 5: Representação do ciclo redox e a geração dos metabólitos de quinonas.

Legenda: Oxigênio molecular (O_2), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido dismutase (SOD), radical hidroxila (OH^{\cdot}).

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 nas 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).

A apoptose 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 ciclismo redox das naftoquinonas é uma manifestação de despolarização mitocondrial.

2.2 Técnicas *in vitro* utilizadas para o estudo da citotoxicidade e genotoxicidade

Estudos toxicológicos *in vitro* se tornam uma opção na triagem em busca de plantas que possuam efeitos tóxicos, além de diminuir custos, obter respostas rápidas e colaborar com o princípio dos 3 “erres” (reduction, refinement e replacement) - redução, refinamento e substituição (BEDNARCZUK et al. 2010). Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como: poder limitar o número de variáveis experimentais; obter dados significativos mais facilmente; além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto o que permite um maior número de repetições dos ensaios; utiliza menor quantidade da substância a ser testada; inúmeros tipos celulares que possibilitam os testes em praticamente todos os tecidos e diferentes espécies animais (ROGERO et al. 2003; HARTUNG e DASTON, 2009). Vale ressaltar que o Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos (NCR) em seu relatório de ensaios de toxicidade no século 21, propôs uma alternativa aos tradicionais ensaios de altas dosagens com animais, que seriam os estudos que realizam a perturbação de respostas celulares, ou seja, os ensaios *in vitro* (NCR, 2007; BHATTACHARYA et al. 2011).

Os ensaios *in vitro* possuem limitações, dentre elas: o fato de algumas culturas celular não realizarem biotransformação e ausência de mecanismos de defesa. Mas mesmo nessas condições, estes ensaios ainda são recomendados em combinação com ensaios *in vivo*, para otimizar e diminuir variáveis experimentais (HARTUNG e DASTON, 2009).

No decorrer deste estudo serão apresentados os testes de citotoxicidade *in vitro* que consistem em expor direta ou indiretamente uma cultura de células de mamíferos a uma determinada substância, observando-se posteriormente as alterações causadas, como por exemplo, lise celular, inibição da formação de colônias celulares, descolamento do tecido, entre outros (ROGERO et al. 2003; MACHADO, 2008).

A linhagem celular HepG2, originalmente isolada por Aden et al. em 1972 a partir do hepatoblastoma de um garoto argentino de 11 anos, é muito versátil. Esta linha de células mantém muitas das funções especializadas normalmente perdidas pelos hepatócitos primários em cultura, tais como a secreção de proteínas principais do plasma (MERSCH-SUNDERMANN et al, 2004).

Ela tem sido usada por muitos anos de estudos de antimutagenicidade, esta linhagem celular apresenta uma importante vantagem quando comparada a outras linhagens que é a capacidade de expressar as enzimas citocromo P450 (CYP) 1A1, 1A2, 2B, 2C, 3A e 2E1, nitroredutase, N-desmetilase, catalase, peroxidase, NADPH: citocromo c redutase, citocromo P450 redutase, e NADPH, quinona oxidoredutase de Fase I; e as enzimas epóxido hidrolase, sulfotransferase, glutathione S-transferase (GST), a uridina glucuronosilo, e N-acetil-transferase de Fase II responsáveis por desempenhar um papel essencial na ativação/desintoxicação de pró-mutagenos ou pró-carcinógenos (KNASMÜLLER et al. 1998; MERSCH-SUNDERMANN et al, 2004).

Portanto, as células HepG2 são consideradas um bom modelo para o estudo *in vitro* do metabolismo xenobiótico e toxicidade para o fígado, uma vez que elas retêm muitas das funções especializadas que caracterizam os hepatócitos humanos normais (KNASMÜLLER et al. 1998; LAOHAVECHVANICH et al. 2010).

As células VERO representam uma linhagem imortalizada bem caracterizada de células de rim de macaco verde Africano (African green monkey kidney - AGMK) que é susceptível a uma ampla variedade de vírus. Essas células são usadas como reagentes de substrato celular para o fabrico de vacinas virais, incluindo várias

vacinas contra a poliomielite, a raiva, rotavírus, varíola, da gripe (TEFEREDEGNE et al. 2014). As células Vero são susceptíveis a diversos tipos de micróbios e toxinas e têm contribuído amplamente, não só para microbiologia, mas também a produção de vacinas para uso humano. Têm cariótipos pseudo diploide e são não tumorigênica. Análise genômica de células Vero revelou uma origem *Chlorocebus sabaues* feminino (OSADA et al. 2014).

2.2.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Um ensaio citotóxico colorimétrico muito aplicado é o ensaio com o sal de tetrazólio MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] – um teste que mede a viabilidade celular e sua leitura é realizada em espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços, este ensaio é versátil e quantitativo. Avalia a atividade oxidativa mitocondrial, ou seja, o sal é reduzido nas mitocôndrias das células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, de coloração púrpura (Figura 6); estes cristais são extraídos através da adição de um solvente apropriado. A variável contínua resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

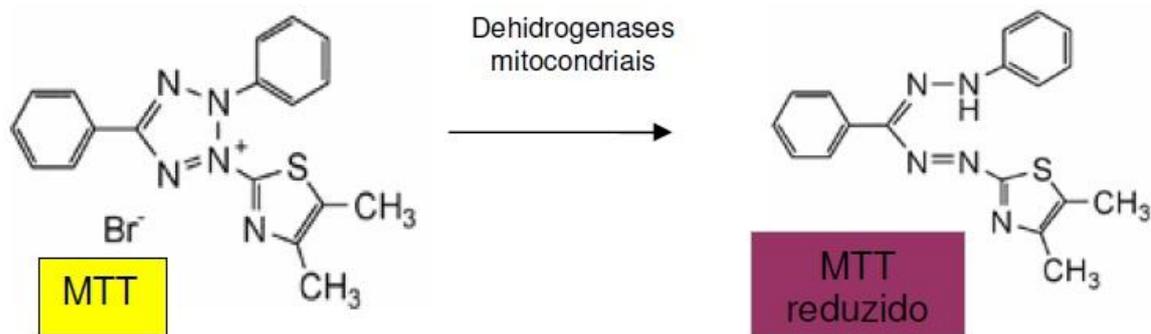


Figura 6: Redução do MTT por enzimas mitocondriais.
Fonte: GOMES, 2008.

A densidade óptica (OD) resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983; TEMPONE et al. 2008). A densidade óptica de cada diluição é lida e comparada com controle negativo de células (100%) o que

evidenciará o percentual de sobrevivência em cada diluição. A partir da análise do percentual de sobrevivência das células x diluição das amostras em teste é possível calcular concentração citotóxica 50% ($CC_{50\%}$) que mata 50% das células (DAGUANO et al. 2007).

O ensaio MTT tem limitações como falta de linearidade frente a densidades celulares elevadas. Esta situação é corrigida mediante padronização da técnica de acordo com a linhagem celular a ser utilizada. Outra limitação está no fato de diferentes linhagens diferirem na capacidade de reduzir o corante. Porém uma grande vantagem, as células mortas não podem interferir nos níveis de absorvância porque apenas as células metabolicamente ativas podem reduzir o sal de tetrazólio ao seu produto formazan. Todavia, pode ocorrer redução do MTT em células em apoptose em estágios iniciais visto que as mitocôndrias permanecem intactas (LOTZE e THOMSON, 2005).

Apresenta como vantagens: simplicidade da técnica, o curto prazo de execução e é um ensaio reprodutível. Citado inclusive como teste adequado para o rastreamento e modulação da resistência aos medicamentos em casos clínicos individualizados, como em tratamento de tumores. Neste ensaio as células destes tumores são expostas a diferentes concentrações dos antitumorais, estabelecendo a concentração inibitória mínima. Pode-se inferir que é um excelente teste de triagem que norteia os demais ensaios de toxicidade (KEEPERS et al. 1991; SARGENT, 2003; LOTZE e THOMSON, 2005).

2.2.2 ENSAIO COMETA

Em 1984 foi proposto o ensaio cometa ou teste do cometa com objetivo de pré-determinar a eficiência da radioterapia e quimioterapia em células de tumores humanos *in vivo*, com a vantagem de não precisar utilizar marcadores radioativos e precisar de um pequeno número de células para execução do ensaio (ÖSTLING e JOHANSON, 1984). A migração de DNA foi quantificada através da coloração com brometo de etídio (agente intercalante fluorescente) e o uso de microscópio de fluorescência, porém as condições neutras utilizadas limitava consideravelmente a utilidade geral do ensaio (TICE et al. 2000).

Em 1988 esta mesma técnica foi adaptada para uma versão alcalina, melhorando a desnaturação e a migração do DNA de cadeia simples, permitindo a avaliação de quebras de fitas simples e sítios álcali lábeis no DNA, além das quebras de dupla fita (SINGH et al. 1988; TICE et al. 2000). O teste do cometa, também chamado de eletroforese alcalina em gel de célula única (Single-Cell Gel – SCG), é utilizado para detectar lesões genômicas que podem gerar mutações após serem processadas, mas estas lesões são passíveis de correção (TICE et al. 2000; GONTIJO e TICE, 2003; AYCICEK et al. 2008).

Para a execução desta técnica, as células são adicionadas em agarose, suas membranas são lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares são extraídas com altas concentrações de sais. O resultado deste procedimento é que o DNA ocupa o espaço da célula no gel em uma estrutura semelhante ao núcleo, recebendo o nome de nucleóide. Ou seja, o nucleóide é composto por alças superenoveladas de DNA (desprovido de histonas), aderidas à matriz nuclear residual. A lesão genômica é percebida quando há quebras na molécula de DNA ocasionando o desenovelamento das alças de DNA, formando um halo, desta forma, percebem-se mudanças na estrutura do nucleóide (COOK e BRAZELL, 1976; 1978; GONTIJO e TICE, 2003; COLLINS et al. 2008).

Após a lise das membranas celulares, o DNA embebido em agarose é exposto à indução eletroforética, quando ocorre dano no DNA, observa-se um aumento na migração de DNA cromossomal do nucleóide em direção ao ânodo, que se assemelha à forma de um cometa, isto é, com cabeça (região nuclear) e cauda (Figura 7; SINGH et al. 1988; BRIANEZI et al. 2009).

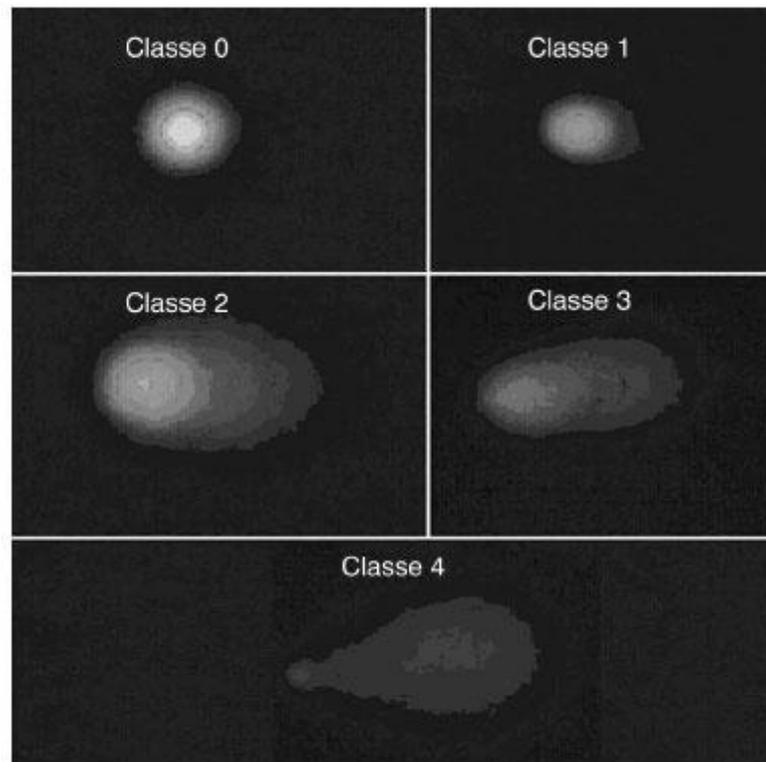


Figura 7: Ensaio cometa alcalino.

Legenda: Imagens classificadas de acordo com intensidade de fluorescência na cauda do cometa e receberam um valor de 0 a 4 (classe 0 = sem danos, classe 4 = dano máximo).

Fonte: AYCICEK et al. 2008.

É possível que uma substância, mesmo em doses não citotóxicas, possa ocasionar alterações importantes ao DNA (VIEIRA et al. 2002). A genotoxicidade é ocasionada pela lesão do genoma seja pela mudança no conjunto da estrutura do gene, seja pela ocorrência de mutação gênica e estes danos podem ser repassados à próxima geração celular quando ocorre em células germinativas (MOUTSCHEN, 1985; LAU, 2002).

Além da genética toxicológica, com aplicações *in vitro* e *in vivo* em células de animais e plantas, o ensaio cometa também é aplicado em biomonitoramento de populações humanas quanto à exposição ocupacional/ambiental a agentes genotóxicos; biomonitoramento de outras espécies animais e de plantas (por exemplo, no monitoramento ecológico); na avaliação do dano de DNA e do estresse oxidativo em relação a inúmeras doenças e avaliação da proteção ao DNA pela atuação de antioxidantes; investigação do dano e do reparo de DNA em diferentes tipos celulares quando expostos a potenciais agentes genotóxicos como radiações e

radicais livres; na investigação de xenobióticos alimentares, farmacêuticos e outros (BRENDLER et al. 2005; DUSINSKA e COLLINS, 2008; LOVELL e OMORI, 2008; BAGATINI e MALUF, 2011).

A execução do teste do cometa é considerada simples, rápida e flexível, de baixo custo e requer pouco material para análise. Também é considerada uma técnica confiável, sensível para a detecção de baixos níveis de danos de DNA e é necessário um período de tempo relativamente curto para completar um experimento (TICE et al. 2000; DUSINSKA e COLLINS, 2008; COLLINS et al. 2008). Outras vantagens deste ensaio são: pode ser realizado em células não proliferativas e a partir de células individuais de diferentes tecidos (LOVELL e OMORI, 2008; BAGATINI e MALUF, 2011).

Os cometas podem ser avaliados pela medição do comprimento da cauda do cometa por microfotografia. Dessa maneira, a escala útil do ensaio; pela classificação dos cometas por inspeção visual, tipicamente em cinco classes: 0 (zero) representa células sem dano (cometas sem cauda ou com caudas pouco detectáveis), e de 1 a 4 representam um aumento relativo na intensidade das caudas. O somatório dos valores (de 0 a 4) dos 100 núcleos analisados resulta no valor individual, que poderia variar, dessa forma, de 0 a 400 unidades arbitrárias; pela análise de imagens, através de uma câmera acoplada a um computador com programa apropriado, disponível comercialmente ou via internet. As imagens do cometa são, então, selecionadas pelo operador; e por sistemas automatizados, os quais procuram os cometas e realizam a análise com mínima intervenção humana (Figura 7; COLLINS et al. 2008; BAGATINI e MALUF, 2011).

2.2.3 MICRONÚCLEO

Outro ensaio de genotoxicidade é o teste do micronúcleo, um teste citogenético que realiza a identificação de danos cromossômicos. Esta técnica visualiza a presença ou ausência de micronúcleos (MNs)(Figura 8; NORPPA e FALCK, 2003). Podem ser utilizados vários tipos de células, quando o objetivo for a monitorização da população de dano genético, e o rastreamento de produtos químicos com potencial genotóxico.

Em 1985, a técnica de MNs foi adaptada utilizando citocalasina B para bloquear a citocinese, sem bloqueio da mitose, e diferenciar as células que passaram por um ciclo de divisão (células binucleadas), este método ficou conhecido como técnica de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN, de *cytokinesis-block micronucleus*). CBMN pode proporcionar, através de simples critérios morfológicos, as seguintes medidas de genotoxicidade e citotoxicidade: quebra cromossômica, perda de cromossomo, rearranjo cromossômico (pontes citoplasmáticas), inibição da divisão celular, necrose e apoptose (FENECH e MORLY, 1985; FENECH, 2000; GONTIJO e TICE, 2003).

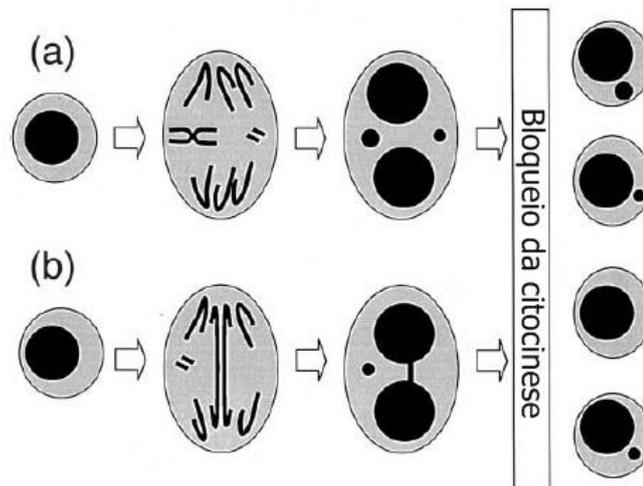


Figura 8: Desenho esquemático ilustrando a origem do micronúcleo.

Legenda: Em (a), dois micronúcleos, um proveniente de fragmento cromossômico acêntrico e outro oriundo de cromossomo inteiro; e em (b), a formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de fragmento cromossômico. Também é mostrada a função da citocalasina B, bloqueando a citocinese celular, resultando em diferenciação das células que passaram por um ciclo de divisão (células binucleadas).

Legenda: FENECH, 2000.

Ainda sobre micronúcleo, pode-se defini-lo como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal, que é formado durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos de células filhas. São formados a partir de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal após o ciclo de divisão celular (FENECH, 1997; NORPPA e FALCK, 2003; GONTIJO e TICE, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial citotóxico e genotóxico do extrato etanólico obtido de bulbos de *Eleutherine plicata*, de sua fração diclorometânica e subfrações (naftoquinonas).

3.2 Específicos

- Realizar estudos fitoquímicos e identificar as substâncias puras isoladas;
- Determinar a citotoxicidade, pelo ensaio de viabilidade celular com MTT, do extrato etanólico de *E. plicata*, fração diclorometano e subfrações;
- Avaliar o potencial genotóxico do extrato etanólico de *E. plicata*, fração diclorometano e subfrações a partir dos ensaios cometa e micronúcleo;
- Verificar se o estresse oxidativo está relacionado à citotoxicidade utilizando a dosagem da capacidade antioxidante pela redução do DPPH;
- Investigar qual substância apresentar maior potencial de uso, considerando menor citotoxicidade e genotoxicidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 EQUIPAMENTOS

Agitador magnético - Quimis

Autoclave

Balança analítica - Shimadzu Modelo AUY220

Banho-maria - Sieger

Bomba de vácuo - Prismatec

Capela de exaustão – Quimis

Capelas de fluxo laminar classe II - Labconco

Chapa de aquecimento – Quimis

Dessecador

Espectrômetro Varian Mercury 300

Estufa bacteriológica - Quimis

Estufa de circulação de ar forçado – Quimis

Evaporador rotativo - Buchi

Evaporador rotativo - Fisoton

Forno mufla

Incubadora de CO₂ - Laboven

Lavadora ultra - Cleane

Microscópio – Leica MD 500

Microscópio invertido – Zeiss

Microscópio invertido – Medilux

Micrótomo rotativo - Leica RM-2245

Moinho de facas de aço inoxidável

Phmetro de bancada - Quimis

Tamizador

4.1.2 SOLVENTES E REAGENTES

Acetato de etila - Isofar

Água ultrapurificada Milli-Q

Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) - Dinâmica

Citocalasina-B - Sigma

Cloreto de sódio - Dinâmica

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's médium* - Sigma

Diclorometano - Êxodo

Dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma

Estreptomicina - Sigma

Etanol – Migako

Hepes - Dinâmica

Hexano – Nuclear

Metanol - Êxodo

Penicilina - Sigma

Sílica gel para cromatografia em coluna - Sigma, 35-70 mesh

Sílica gel cromatografia em camada delgada – Macherey -Nagel

Soro fetal bovino (SFB) - Laborclin

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) – Sigma

Tripsina – Gibco

4.1.3 MATERIAIS DIVERSOS

Balões de fundo chato capacidade para 125, 250 500 e 1000mL - Vidrolabor

Barra magnética

Cadinhos de porcelana

Câmara de Neubauer

Coluna cromatográfica de vidro borossilicato 35x500mm

Cuba cromatográfica

Eppendorf

Espátulas de aço inox

Funil de vidro

Garrafas de cultura celular

Kitassato

Lâminas

Lamínulas

Lâmpada de álcool

Micropipeta HTL Discovery Comfort 0,5 - 10 μ L

Micropipeta HTL Discovery Comfort 20 - 200 μ L

Micropipeta HTL Discovery Comfort 100 - 1000 μ L

Papel de filtro

Pinça

Placa de vidro preparativa 20x15cm

Placas com 96 poços de fundo chato – TTP

Sistema de filtração com membrana de 0,22 μ m

Tubo Cônico - Tipo Falcon 15 e 50mL

4.1.4 MEIOS DE CULTIVO E SUA OBTENÇÃO

- Meio de cultura DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's* médium, foram utilizados:

DMEM	10 g
NaHCO ₃	1,2 g
Hepes	2,38 g
Penicilina (1,650 U/mg)	0,06 g \cong 99 U
Streptomomicina	0,1 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Após a mistura destes compostos em agitador magnético, foi ajustado o pH deste meio para a faixa de 7,2 a 7,4. Depois foi filtrado em membrana de 0,22 μ m, em condições estéreis.

- Meio de cultura RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute* médium (Sigma), foram utilizados:

RPMI	10 g
------	------

NaHCO ₃	2 g
Penicilina (1,650 U/mg)	0,06 g \cong 99 U
Estreptomicina	0,1 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Após a mistura destes compostos em agitador magnético, foi ajustado o pH deste meio para a faixa de 7,2 a 7,4. Depois foi filtrado em membrana de 0,22 μ m, em condições estéreis.

4.1.5 OUTRAS SOLUÇÕES

- Solução de Hanks:

Para o preparo desta solução, a glicose foi autoclavada com 500 mL de água e os demais componentes foram autoclavados separadamente. Depois foram misturados em condições estéreis.

KCl	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Na ₂ HPO ₄	0,04 g
NaHCO ₃	0,35 g
Glicose	1 g
NaCl	8 g
H ₂ O destilada q.s.p	1000 mL

- Tripsina

Estes componentes foram misturados em 100 mL de solução de Hanks, e esta solução foi filtrada em membrana de 0,22 μ m, em condições estéreis.

Tripsina	0,125 g
EDTA	0,02 g

- Solução de PBS 10x (dez vezes)

Os componentes foram misturados e após total dissolução dos sais, a solução foi autoclavada.

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	21,07 g
KH ₂ PO ₄	6 g
H ₂ O destilada	1000 mL

- Solução de lise (estoque)

Dissolver primeiro o NaCl e o Tris em uma parte da água e posteriormente adicionar o EDTA. Acertar o pH para 10 usando NaOH. Transferir a solução para um balão volumétrico e completar o restante da água para 1L. Conferir novamente o pH e abrigar em um frasco protegido da luz devidamente identificado.

NaCl	146,1 g
EDTA	37,2 g
Tris	1,2 g
H ₂ O destilada	1000 mL

- Solução de lise (uso)

Misturar todos os reagentes e manter essa solução protegida da luz.

Triton-X 100	4 mL
DMSO	40 mL
Solução de lise estoque	356 mL

- Solução de EDTA para eletroforese

Misturar o EDTA e a água e acertar o pH para 10 utilizando NaOH.

EDTA	14,89 g
H ₂ O destilada	200 mL

- Solução de NaOH para eletroforese

Adicionar o NaOH à água vagarosamente até dissolver por completo, guardar em local protegido da luz.

NaOH	200 g
H ₂ O destilada	500 mL

- Solução de eletroforese (uso)

Misturar 5 mL da solução de EDTA para eletroforese com 30 mL da solução de NaOH para eletroforese, completando para 1000mL de H₂O destilada. Conferir o pH que deve estar maior ou igual a 13.

- Solução de coloração (estoque)

Adicionar o brometo à água, homogeneizar e abrigar protegido da luz.

Brometo de etídio	10 mg
H ₂ O destilada	50 mL

- Solução de coloração (uso)

Diluir 100 µL da solução estoque de brometo em 900 µL de H₂O destilada. Proteger da luz.

- Gel de agarose para cobertura das lâminas

Misturar a agarose e o PBS e levar ao microondas até que a agarose esteja totalmente dissolvida.

Agarose <i>standart</i>	1,5 g
PBS 1x	100 mL

- Gel de agarose de baixo ponto de fusão

Misturar a agarose e o PBS e levar ao micro-ondas até que a agarose esteja totalmente dissolvida.

Agarose de baixo ponto de fusão	0,5 g
---------------------------------	-------

PBS 1x

100 MI

4.1.6 MATERIAL BIOLÓGICO

Para os testes citotóxicos foram utilizadas a linhagem celular permanente de células VERO, oriunda do rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*, estas células foram cedidas pelo professor Marcelo Bahia do Laboratório de Citogenética Humana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará - UFPA; e a linhagem celular permanente HepG2, oriunda de fígado humano, que foram cedidas pela professora Alaíde Braga do Laboratório de Bioensaios da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Para os testes de genotoxicidade foram utilizados linhagem celular permanente HepG2.

4.1.7 AQUISIÇÃO, SECAGEM E MOAGEM DE *Eleutherine plicata*

Os bulbos *Eleutherine plicata* foram coletados em setembro de 2012 na localidade de Vila Fátima, município de Traquateua - PA, Brasil, BR 318, Lat. 1.1436°, Long. 46.95511°, Alt. 88 pés. A identificação botânica havia sido realizada pela Dra. Márlia Coelho; e a amostra testemunho pertence ao Herbário João Murça Pires (MG) do Museu Paraense "Emílio Goeldi" sob o registro MG. 202631.

Os bulbos foram lavados em água corrente, higienizados com álcool 70°, e seccionados para facilitar a secagem. Este material vegetal foi mantido em estufa de circulação forçada de ar a 40° C por uma semana, sendo que diariamente o material era revolvido no interior da estufa para garantir a eliminação da umidade de forma homogênea e avaliação visual da presença de microrganismos contaminantes. Este material seco fora submetido à moagem em moinho de facas e foi obtido um quilo de pó (BORGES, 2012).

4.2 Métodos

4.2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Eleutherine plicata*

Quinhentos gramas deste pó foram submetidos à maceração em etanol 96°GL por sete dias na proporção de 1:10, e após esta extração, a solução etanólica foi filtrada e concentrada em rotaevaporador até resíduo (98,75g). O extrato permaneceu em estufa até peso constante (43,23g; BORGES, 2012).

4.2.2 FRACIONAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Cinco gramas do extrato etanólico obtido dos bulbos de *E. plicata* foi fracionado por coluna cromatográfica aberta (35x500mm) utilizando como fase estacionária a sílica gel (Sigma, 35-70 mesh), utilizando solventes de polaridade crescente (1000mL de hexano, 3000mL de diclorometano, 1000mL de acetato de etila e 1000mL metanol). As frações foram concentradas em rotaevaporador e submetidas, assim como extrato etanólico.

Após, as amostras foram submetidas a análises em Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a Arranjos Diódos (DAD). Para esta análise utilizou-se 20mg EE e 10mg das frações, foram solubilizados em metanol grau CLAE (1 mL), com o auxílio do banho de ultrassom até a máxima dissolução. Após a solubilização, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi transferido ao frasco para CLAE. A detecção dos picos ocorre entre 220-240 nm, o fluxo foi de 1 mL/min e a coluna foi mantida a 40° C (coluna LiChrospher 100 RP-18; partículas de 5 µm, 250 x 45 mm d.i). Na eluição utilizou-se gradiente linear de Acetonitrila: Água tamponada (pH 2,6; BORGES, 2012). A Tabela 3 sumariza as condições de eluição.

Tabela 3: Gradiente de eluição empregado no CLAE.

TEMPO (min.)	H2O %	ACN (%)
0	95	5
65	5	95
70	5	95
75	95	5

Legenda: ACN - acetonitrila

As subfrações foram obtidas a partir de cromatografia em camada delgada preparativa, com sílica gel para cromatografia em camada fina (Machery-Nagel) como fase estacionária e o solvente diclorometano como fase móvel (BORGES, 2012). Em uma placa de sílica gel de 20x15cm, foi aplicada 20mg da fração diclorometanólica, solubilizada diclorometano (1mL; BORGES, 2012).

4.2.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Após os estudos fitoquímicos de *E. plicata*, verificou-se a necessidade de avaliar a influência do extrato etanólico, sua fração diclorometânica e subfrações (*Eleutherine plicata*) na viabilidade celular em linhagens celulares de mamíferos e a influência do estresse oxidativo na citotoxicidade. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método com MTT, além deste método, verificou-se a participação da atividade antioxidante (DPPH).

4.2.3.1 Cultivo Celular

As células VERO foram cultivadas em meio DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's* médium (Sigma) - suplementado com 10% de soro fetal bovino – SFB (Laborclin), 100µg/mL de estreptomicina (Sigma) e 60µg/mL de penicilina (Sigma). Esta linhagem foi cultivada em garrafas de cultura, armazenadas em incubadora de gás CO₂ (Laboven), a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

As células HepG2 foram cultivadas em meio RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute medium* (Sigma) - suplementado com 10% de soro fetal bovino – SFB (Laborclin), 100µg/mL de estreptomicina (Sigma) e 60µg/mL de penicilina (Sigma). Esta linhagem foi cultivada em garrafas de cultura, armazenadas em incubadora de gás CO₂ (Laboven), a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

As passagens celulares eram realizadas quando se verificava em microscopia ótica a propagação de células por toda superfície de crescimento da garrafa de cultivo; para o procedimento de passagem a cultura era lavada com PBS (*Phosphate Buffered Saline*), com o objetivo de retirar os resíduos do SFB, e adicionada tripsina-EDTA para que as células se desprendessem da garrafa de cultivo; após este

procedimento adicionava-se novo meio de cultura para ressuspender as células e distribuiu-se em outras garrafas de cultura.

O processo de congelamento precisa ser feito de forma lenta para evitar a morte celular. Previamente as células foram cultivadas e quando estavam na concentração de 1×10^6 células/mL, podiam ser congeladas. Para isso o sobrenadante nas garrafas de cultura eram desprezados, as células eram tripsinizadas, e centrifugadas a 1200 rpm por 10 min ou a 2000 rpm por 5 min. O sobrenadante era descartado e o pellet foi ressuscitado delicadamente em solução de congelamento gelada. A solução usada foi SFB 95% com DMSO 5%.

Então o volume foi distribuído em tubos de criopreservação identificados (ampolas). Os tubos foram colocados em freezer (-20°C), depois foram colocados rapidamente em cooler apropriado para congelamento e este foi armazenado em freezer (-80°C) *over night*. Depois deste congelamento gradual, os tubos foram armazenados em tanque de nitrogênio líquido.

O descongelamento das linhagens geralmente ocorre de forma rápida, por isso, previamente uma garrafa de cultura pequena foi preparada para receber a linhagem, com o meio de cultura suplementado com SFB 20%. Ao retirar-se o tubo de criopreservação do tanque de nitrogênio líquido, em temperatura ambiente, o conteúdo do tubo fica na forma líquida. Este conteúdo foi aspirado e depositado na garrafa de cultura que estava preparada.

A garrafa foi imediatamente armazenada em incubadora de gás CO₂, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Apesar de todo o cuidado durante o congelamento, o processo de criopreservação é danoso para as células, por isso, após 24h, era observado se ocorria aderência das células à garrafa. Quando as células estavam aderidas, retirava-se o meio com resíduo de crioprotetor e células soltas (mortas), lavava-se a cultura com PBS, e colocava-se novo meio de cultura suplementado com SFB. Então a garrafa era novamente armazenada a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

4.2.3.2 Ensaio de viabilidade celular

O método foi desenvolvido conforme Mosmann (1983). Utilizando placa de 96 poços foram distribuídas as células VERO (8×10^3 células/mL meio DMEM

suplementado com 10% de SFB) ou HepG2 (1×10^4 células/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB). As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Depois de 24h de incubação, realizou-se a inspeção visual dos poços para verificar a viabilidade da continuidade do teste. Após isso, realizou-se o tratamento com cinco concentrações crescentes (12,5µg/mL; 25µg/mL; 50µg/mL; 100µg/mL e 200µg/mL) do Extrato Etanólico (EE), Fração Diclorometano (FDM), e das subfrações S1 e S2 de *Eleutherine plicata* e do controle positivo com NMU (N-metil-N-nitrosureia; Figuras 9 e 10), estas concentrações foram selecionadas a partir dos trabalhos de Borges (2012) e Veiga (2013). As placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Após 24h de tratamento, o sobrenadante foi desprezado e adicionado o MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]); a uma concentração de 500µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ durante 4 horas. Após este tempo, foi adicionado o DMSO (dimetilsulfóxido) a todos os poços para dissolver os cristais azuis escuros. Após 1 hora, para garantir que todos os cristais fossem dissolvidos, as absorbâncias dos poços foram lidas em um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços, utilizando um comprimento de onda de referência de 570 nm. Esta mesma metodologia foi aplicada com um tratamento de 48h.

Os valores de CC₅₀ (concentração citotóxica 50%) foram calculados utilizando-se curvas de dose-resposta a partir de três experimentos independentes. Também foi realizado o MTT para células HepG2 expostas a *E. plicata* por 48h.

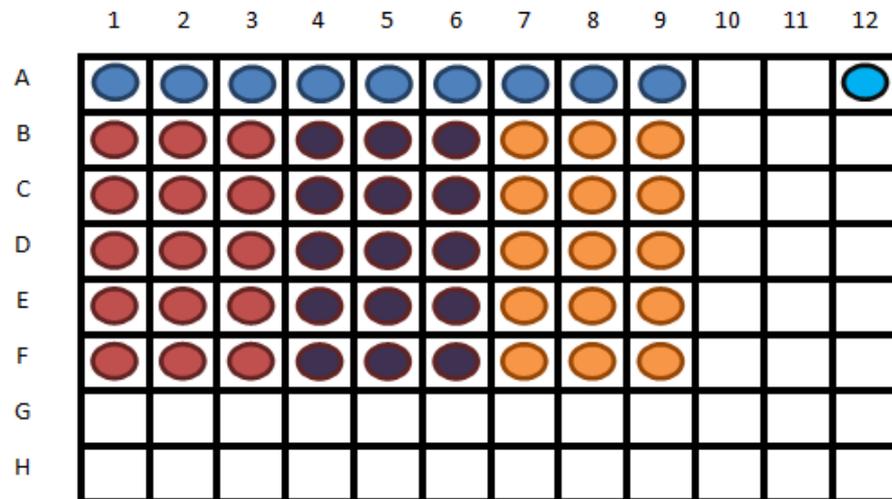


Figura 9: Esquema da placa 1 desenvolvida para o ensaio do MTT.

Legenda:  Apenas células /  Apenas DMSO (branco)
 Extrato etanólico concentrado (EE)
 Fração diclorometano concentrada (FDM)
 Subfração S1.

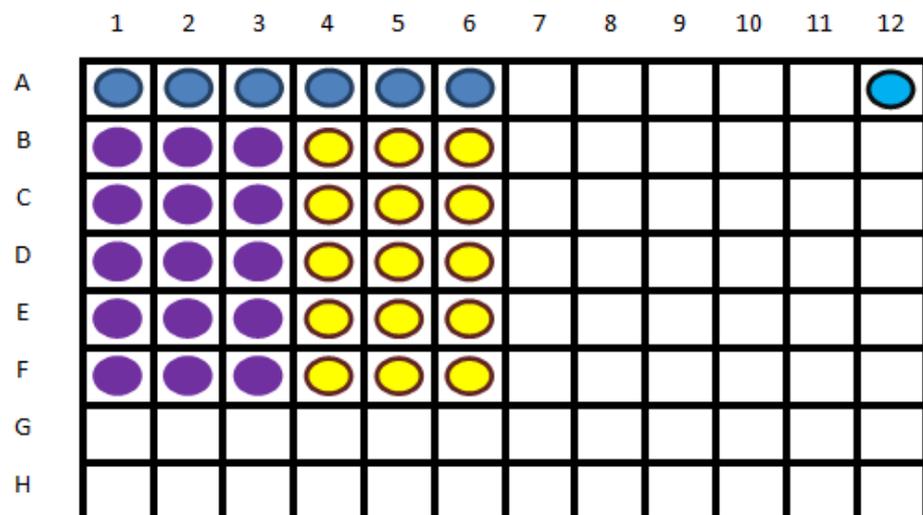


Figura 10: Esquema da placa 2 desenvolvida para o ensaio do MTT.

Legenda:  Apenas células /  Apenas DMSO (branco)
 Subfração S2 (Isoeuterina)
 Controle positivo com NMU (N-metil-N-nitrosureia).

Para o cálculo da viabilidade celular:

$$\% \text{células vivas} = \frac{\text{Absorbância das células tratadas}}{\text{Absorbância das células sem tratamento}} \times 100$$

(1)

Ou seja, para o cálculo das células mortas:

$$\% \text{células mortas} = \frac{\text{Absor. das céls. sem tratamento} - \text{absor. Das céls. Tratadas}}{\text{Absor. das céls. sem tratamento}} \times 100$$

(2)

4.2.3.3 Dosagem da capacidade antioxidante pela redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH)

DPPH é um radical livre e estável (cor violeta) que na presença de antioxidantes é reduzido, resultando em uma coloração amarela. Esta mudança de cor é proporcional à capacidade antioxidante da amostra (LAOHAVECHVANICH et al. 2010).

Este método foi proposto por Blois (1958). Utilizando placa de 12 poços, foram semeadas 3×10^5 células/mL (HepG2) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. As células foram cultivadas a 37°C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após 24h em cultura, as células foram tratadas com três concentrações de cada amostra a seguir: Extrato Etanólico (9,8µg/mL, 4,9µg/mL e 2,45µg/mL), Fração Diclorometanólica (9,5µg/mL, 4,75µg/mL e 2,375µg/mL) e Subfrações de *Eleutherine plicata*. (S1 – 7,685µg/mL, 3,842µg/mL e 1,921µg/mL; e S2 - 15,55µg/mL, 7,77µg/mL e 3,88µg/mL). Além deste tratamento foi feito um controle negativo com células e meio de cultura.

Após 24h o conteúdo dos poços foi desprezado, as células foram tripsinizadas e 50µL de cada poço foram transferidos para tubos de ensaio que continham 950µL de solução de DPPH 0,1 mM em etanol. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Realizaram-se as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro em 517nm. Foram subtraídos os valores encontrados de absorbância de cada amostra do valor de absorbância inicial do DPPH.

Realizou a construção da curva padrão (Figura 11) em triplicata, encontrando desta forma, a equação de reta que possibilitou a obtenção dos valores da capacidade antioxidante das amostras testadas. Na construção desta curva, utilizou-se PBS pH 7,2 e Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico) para a confecção das soluções de Trolox 0,125mM, 0,25mM, 0,375mM, 0,50mM,

0,625mM, 0,75mM, 0,875mM e 1mM. Assim como foi realizado nas amostras das células, 50 μ L de cada concentração de Trolox foram transferidos para tubos de ensaio que continham 950 μ L de solução de DPPH 0,1 mM em etanol. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 $^{\circ}$ C por 30 minutos. Realizaram-se as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro em 517nm. Foram subtraídos os valores encontrados de absorvância de cada concentração de Trolox do valor de absorvância inicial do DPPH.

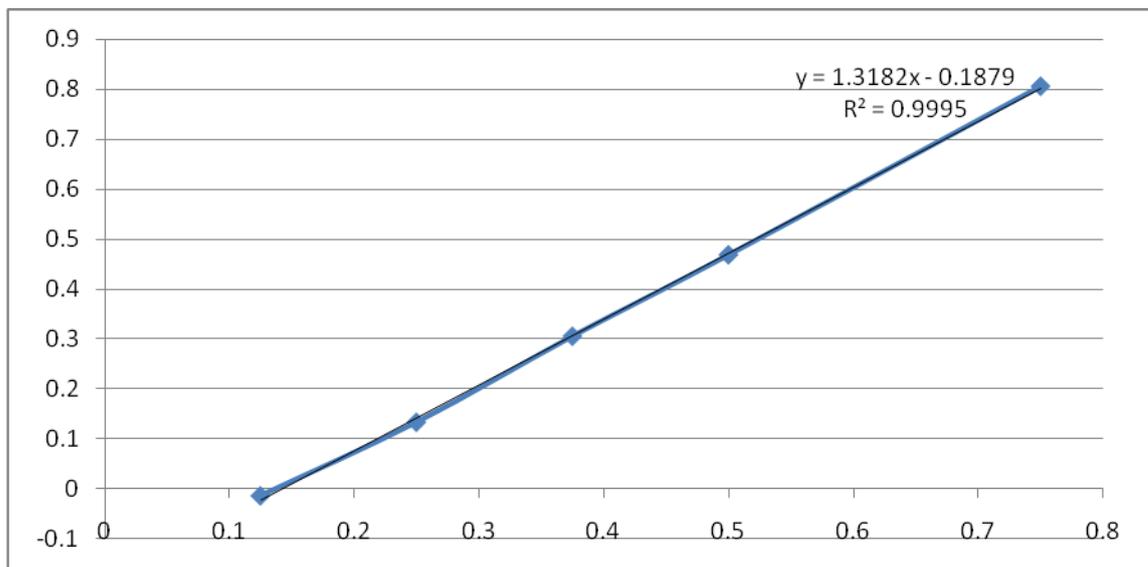


Figura 11: Plotagem do gráfico com as absorvâncias do padrão, gerando a equação da reta que possibilita o cálculo da capacidade antioxidante em mM.

O cálculo do valor da capacidade antioxidante foi encontrado a partir da substituição de Y (encontrado pela equação da reta; Figura 11) pelo resultado da subtração dos valores encontrados de absorvância de cada amostra do valor de absorvância inicial do DPPH. A resolução desta equação informa o valor de X, que é a capacidade antioxidante da amostra em mM.

4.2.4 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

4.2.4.1 Método Cometa (versão alcalina)

O ensaio cometa foi desenvolvido conforme Singh et al. (1988). Previamente são confeccionadas as lâminas cobertas por solução de agarose (ponto de fusão normal - 1,5%), elas são mantidas em temperatura ambiente para que ocorra a solidificação da agarose.

Utilizando placa de 12 poços, foram semeadas $1,5 \times 10^5$ células/mL (HepG2) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, as células foram cultivadas a 37°C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO². Após 21h em cultura, as células foram tratadas com três concentrações de cada amostra a seguir: Extrato Etanólico (9,8µg/mL, 4,9µg/mL e 2,45µg/mL), Fração Diclorometanólica (9,5µg/mL, 4,75µg/mL e 2,375µg/mL) e Subfrações de *Eleutherine plicata*. (S1 – 7,685µg/mL, 3,842µg/mL e 1,921µg/mL; e S2 - 15,55µg/mL, 7,77µg/mL e 3,88µg/mL). Além deste tratamento foi feito um controle negativo com células e meio de cultura, e um controle positivo no qual as células foram tratadas com 0,02µg/mL de doxorubicina, devido sua genotoxicidade previamente conhecida. A exposição das células dura 3h.

Depois da exposição, o sobrenadante foi desprezado e as células foram tripsinizadas. Foram coletados 450µL de amostra de cada grupo para submeter à centrifugação de 1000rpm por 5min em micro centrífuga. Depois da centrifugação o sobrenadante foi descartado deixando 100µL para a ressuspensão. Deste conteúdo, 30µL foram acrescentados em 300µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,8%). Fez-se a homogeneização, e 100µL deste conteúdo foram distribuídos por lâmina (coberta anteriormente por solução de agarose com ponto de fusão normal).

Cada lâmina foi coberta com uma lamínula (24 x 60mm) e mantidas a 4°C por 5min até a solidificação da agarose. Após a solidificação, as lamínulas foram removidas cuidadosamente, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1 % Triton X-100 e 10 % DMSO; pH:10) e mantidas a 4 °C protegidas da luz, por 24h.

Quando as lâminas foram retiradas da solução de lise, foram colocadas em posição horizontal na cuba de eletroforese, previamente preenchida com a solução de eletroforese. A eletroforese foi realizada a uma tensão (ddp: diferença de potencial) de 34V em corrente de 300mA por um período de 20 min. Depois deste

procedimento, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas rapidamente em H₂O destilada gelada (4°C), e em seguida foram transferidas para um novo mergulho em H₂O destilada gelada por 5min. As lâminas foram fixadas com etanol 100% por 3min e posteriormente coradas com 50µL de solução de Brometo de Etídio (20µg/mL). Em seguida, estas foram cobertas com lamínula (24 X 60mm) para a realização das análises (SINGH et al. 1988).

Para a visualização das lâminas foi utilizado microscópio de fluorescência em aumento de 400X, analisando-se 100 células por grupo. A análise foi realizada pelo padrão de escores de acordo com Mota et al. (2011) onde avaliou-se o grau de lesão sofrido pela célula de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa, que representa o nível de fragmentação de DNA (Figura 12).

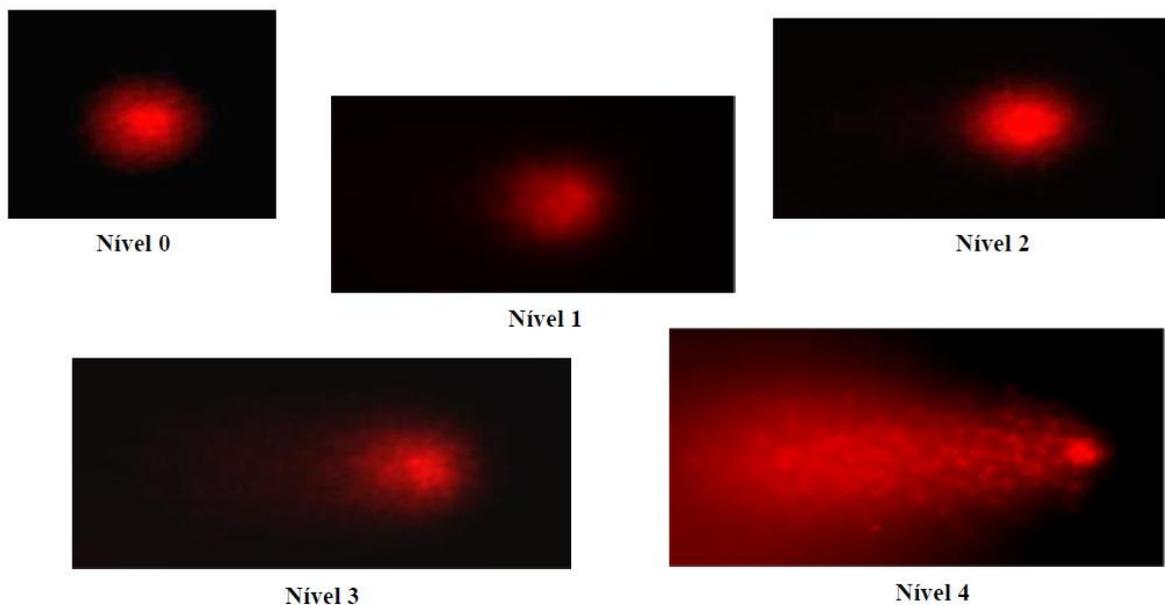


Figura 12: Demonstração do padrão de escores para análise do ensaio cometa.

Legenda: Considera-se nível 0 = sem danos (<5%), nível 1 = baixo nível de danos (5-20%), nível 2 = médio nível de danos (20-40%), nível 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%).

Fonte: MOTA et al. 2011.

4.2.4.2 Técnica de Micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN, de *cytokinesis-block micronucleus*)

Além do ensaio cometa foi realizado o teste do micronúcleo. Ambos os ensaios são utilizados para verificar a genotoxicidade de substâncias e extratos vegetais.

A versão alcalina do teste cometa permite a avaliação do efeito imediato que um xenobiótico pode induzir em células, ocasionando quebras de fitas simples e sítios álcali lábeis no DNA, além das quebras de dupla fita. Mas estas lesões genômicas são passíveis de correção (SINGH et al. 1988; TICE et al. 2000). Então, de modo a ampliar as informações sobre a genotoxicidade de *E. plicata* optou-se em utilizar técnica de micronúcleos com bloqueio de citocinese que pode proporcionar a análise das seguintes medidas de genotoxicidade e citotoxicidade: quebra cromossômica, perda de cromossomo, rearranjo cromossômico (pontes citoplasmáticas), inibição da divisão celular (FENECH, 2000), ou seja, permite detectar agentes clastogênicos e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) em células em divisão (NORPPA e FALCK, 2003).

Utilizando placa de 12 poços, foram semeadas 2×10^5 células/mL (HepG2) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, as células foram cultivadas a 37°C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Após 20h em cultura, as células foram tratadas com três concentrações de cada amostra a seguir: Extrato Etanólico (9,8µg/mL, 4,9µg/mL e 2,45µg/mL), Fração Diclorometanólica (9,5µg/mL, 4,75µg/mL e 2,375µg/mL) e Subfrações de *Eleutherine plicata* (S1 – 7,685µg/mL, 3,842µg/mL e 1,921µg/mL; e S2 - 15,55µg/mL, 7,77µg/mL e 3,88µg/mL). Além deste tratamento foi feito um controle negativo com células e meio de cultura, e um controle positivo no qual as células foram tratadas com 0,02µg/mL de doxorrubicina, devido sua genotoxicidade previamente conhecida.

Depois de 24h do tratamento, ou seja, 44h de incubação após o início da cultura, foram adicionados à cultura 3µg/mL de citocalasina-B (CitB). Após 24h com CitB (72h de incubação após o início da cultura), as células foram tripsinizadas e transferidas para tubos de centrifuga para serem centrifugadas a 1000rpm por 5min. O sobrenadante foi descartado deixando 0,5mL para leve homogeneização. Cuidadosamente, foram adicionados 5mL de solução hipotônica gelada (KCl

0,075M), em seguida, realizou-se a homogeneização e centrifugação a 1000rpm por 5min. O sobrenadante foi descartado deixando 0,5ml para homogeneização, em seguida, foi adicionado 5mL de fixador 5:1 (5 partes de metanol: 1 parte de ácido acético) recém preparado e 3 gotas de formaldeído, o qual auxilia na preservação do citoplasma. Após a homogeneização e centrifugação a 1000rpm por 5min, o sobrenadante foi descartado deixando 0,5mL para a ressuspensão e adicionado em leve agitação, 5mL de fixador 3:1 recém preparado (3 partes de metanol: 1 parte de ácido acético).

O conteúdo foi novamente homogeneizado e centrifugado a 1000rpm por 5min. Por fim, o sobrenadante foi descartado deixando aproximadamente 400µL de suspensão no tubo para a preparação das lâminas. Para cada lâmina utiliza-se 3 a 4 gotas dependendo da quantidade de material. As lâminas secaram a temperatura ambiente e foram coradas com Giemsa 5% por 5min (FENECH e MORLEY, 1985). Por fim, a análise de diversos parâmetros como o micronúcleo convencional e o Índice de Divisão Nuclear (IDN) foi realizada em microscópio óptico de luz em aumento de 1000X.

Para a análise do micronúcleo, os critérios para seleção das células foram 1000 células binucleadas com núcleos e membrana celular intactos, com micronúcleos de morfologia idêntica à dos núcleos principais e com diâmetro entre 1/16 até, no máximo, 1/3 dos núcleos principais. Os micronúcleos não podiam apresentar refringências e nem estar ligado ou conectado a um dos núcleos principais, deveriam apresentar a mesma coloração dos núcleos e poderiam estar encostado, mas não sobreposto a um dos núcleos (Figura 13; Fenech, 2000; GONTIJO e TICE, 2003).

Para o cálculo do Índice de Divisão Nuclear (IDN) verificou-se a proporção de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos em 500 células viáveis, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{IDN} = [\text{M1} + 2 (\text{M2}) + 3 (\text{M3}) + 4 (\text{M4})] / \text{N} \quad (3)$$

Onde M1 a M4 correspondem ao número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente; e N é número total de células viáveis, neste caso, as 500 células analisadas (Figura 13; Fenech, 2000; GONTIJO e TICE, 2003).

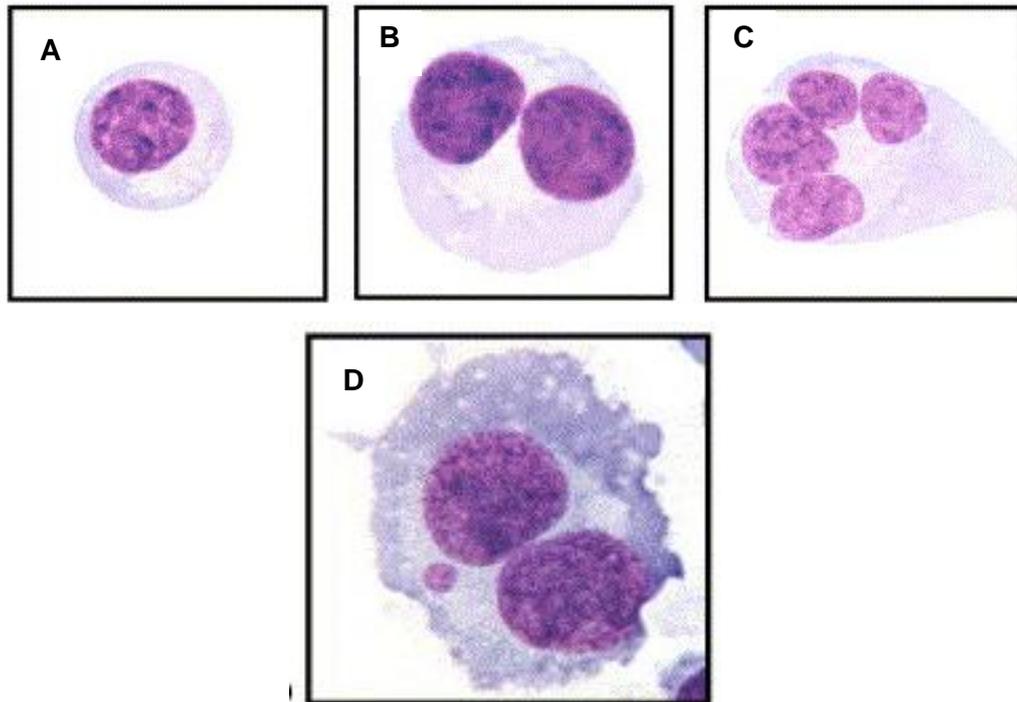


Figura 13: Fotomicrografias de células de ensaio micronúcleo.

Legenda: A, célula mononucleada; B, célula binucleada; C, célula multinucleada; D, célula binucleada com um micronúcleo.

Fonte: FENECH, 2006.

4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes foram realizados em triplicata e a análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey para as comparações múltiplas. As análises foram realizadas por intermédio do programa GraphPad Prism 6.0[®]. Os valores de p inferior ou igual a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos fitoquímicos

Nosso extrato etanólico obtido através da maceração do pó dos bulbos de *E.plicata* resultou em um rendimento de 8,65%. Estudo anterior, realizado por Borges (2012) o rendimento do extrato obtido através da maceração do pó dos bulbos de *E. plicata* resultou em um rendimento de 2,84% (Tabela 4; BORGES, 2012). Vários fatores podem interferir no rendimento do extrato, dentre estes a granulometria do pó. Pós-classificados como grosso e moderadamente grossos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV ed., 1988) apresentam uma menor superfície de adsorção do solvente, logo o processo extrativo torna-se menos eficiente (LIST e SCHMIDT, 2000; COSTA et al. 2009). No estudo de Borges (2012) foi utilizado um pó moderadamente grosso, isto pode ter influenciado negativamente no processo extrativo.

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), porém tal informação não foi descrito no estudo de Borges (2012).

Em um segundo estudo, o extrato etanólico obtido do pó dos bulbos de *E.plicata* foi obtido por percolação, obtendo-se um maior rendimento (12,6%). Os extratos obtidos de plantas são, normalmente, misturas complexas constituídas quase sempre por diversas classes de produtos naturais, contendo diferentes grupos funcionais (MIYAKE, 2013), logo o método utilizado no processo extrativo pode influenciar na eficácia deste processo. 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). 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

o meio extrator e o interior da célula (BARRETO JUNIOR et al. 2005). Isto pode ter influenciado negativamente no rendimento do extrato obtido no presente estudo.

No trabalho de Malheiros (2008) foi utilizada a percolação, 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 (NAVARRO, 2005). No presente estudo, as naftoquinonas são metabolitos mais abundantes na espécie, por isso optou-se pela maceração.

O extrato etanólico de *E.plicata* foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica, obtendo-se 4 frações: hexânica (rendimento= 2,97%), diclorometânica (rendimento de 15,66%), acetato de etila (rendimento= 9,31%) e metanólica (56,87%). Apesar de ter sido utilizada a mesma metodologia descrita por Borges (2012), observou-se um menor rendimento para todas as frações (Tabela 4). Fatores metodológicos (tipo de sílica utilizada na coluna e qualidade do solvente) podem ter influenciado nestes rendimentos.

Tabela 4: Rendimentos do extrato etanólico obtido dos bulbos de *E.plicata* e de suas frações.

Amostras	Rendimentos (%)	
	Borges, 2012	Presente estudo
Extrato etanólico	2,84	8,65
Fração hexânica	3,14	2,97
Fração diclorometânica	19,6	15,66
Fração acetato de etila	10,2	9,31
Fração metanólica	61,9	56,87

Visando traçar o perfil cromatográfico do extrato e suas frações fez-se uma análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O extrato etanólico de *E. plicata* mostrou um perfil cromatográfico complexo, apresentado compostos de alta e média polaridade. Os picos com tempos de retenções 24 a 27 minutos apresentaram espectros em ultravioleta sugestivo de naftoquinona e dados cromatográficos sugerem que estas sejam as substâncias majoritárias deste extrato (Figura 14).

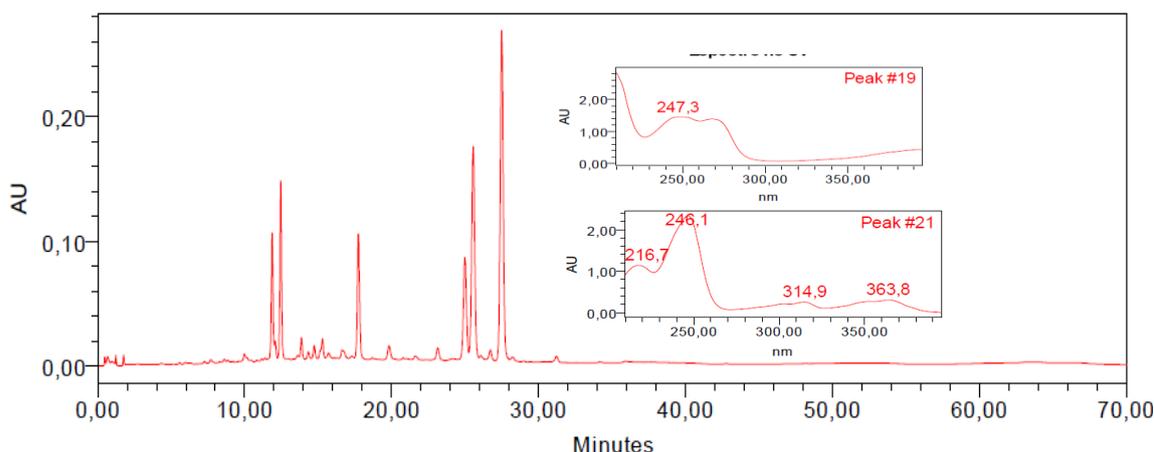


Figura 14: Perfis cromatográficos e espectros em ultravioleta do extrato etanólico obtido dos bulbos de *E. plicata*.

Condições de eluição: Coluna RP-18, fase móvel: tempo 0 min- 95% água e 5% de acetonitrila; tempo de 65 min- 55% de água e 95% de acetonitrila; tempo de 70 min- 5% de água e 95% de acetonitrila; temperatura= 40° C, fluxo= 1mL/min, comprimento de onda= 350nm

Infelizmente, devido o baixo rendimento, não foi possível realizar os estudos cromatográficos da fração hexânica. A fração diclorometânica foi submetida aos estudos cromatográficos, sendo observados 3 picos majoritários (tempos de retenção= 24,013; 25,569 e 27,519 minutos) e os espectros em ultravioleta sugerem se tratar de naftoquinonas. O composto com $R_t=25,013$ min. (área= 19,00; pico #5) possui 3 bandas de absorção no UV em 210,8; 247,3 e 268,6 nm (Figura 15). O composto com $RT= 25.569$ min. (área=38%; pico #6) possui 2 bandas de absorção no UV em 216,7 e 247,4 nm (Figura 14). O composto $RT= 27,519$ min. (área= 32,77%; pico #7) possui 3 bandas de absorção no UV de 236,7; 314,9 e 363,8 nm. (Figura 15).

O primeiro pico ($RT= 25,013$ min.) possui 3 bandas de absorção no ultravioleta (Figura 15), sendo os máximos de absorbância semelhantes ao de Lausona (BABULA et al. 2006) , sugerindo ser uma 1,4-naftoquinona. De espécies de *Eleutherine* já foram isoladas as seguintes 1,4-naftoquinonas: eleuterina e eleuterinona.

Resultados semelhantes foram obtidos nos estudo de Borges (2012), onde foram observados 3 picos com os mesmos tempos de retenção e perfis em espectrofotometria em ultravioleta semelhantes aos do presente estudo (Figura 15). Vale ressaltar que todos os estudos anteriores do gênero *Eleutherine* relatam o

isolamento de naftoquinonas (ZHENGXIONG et al. 1986; HARA et al. 1997; JINZHONG et al. 2006; ALVES et al. 2003)

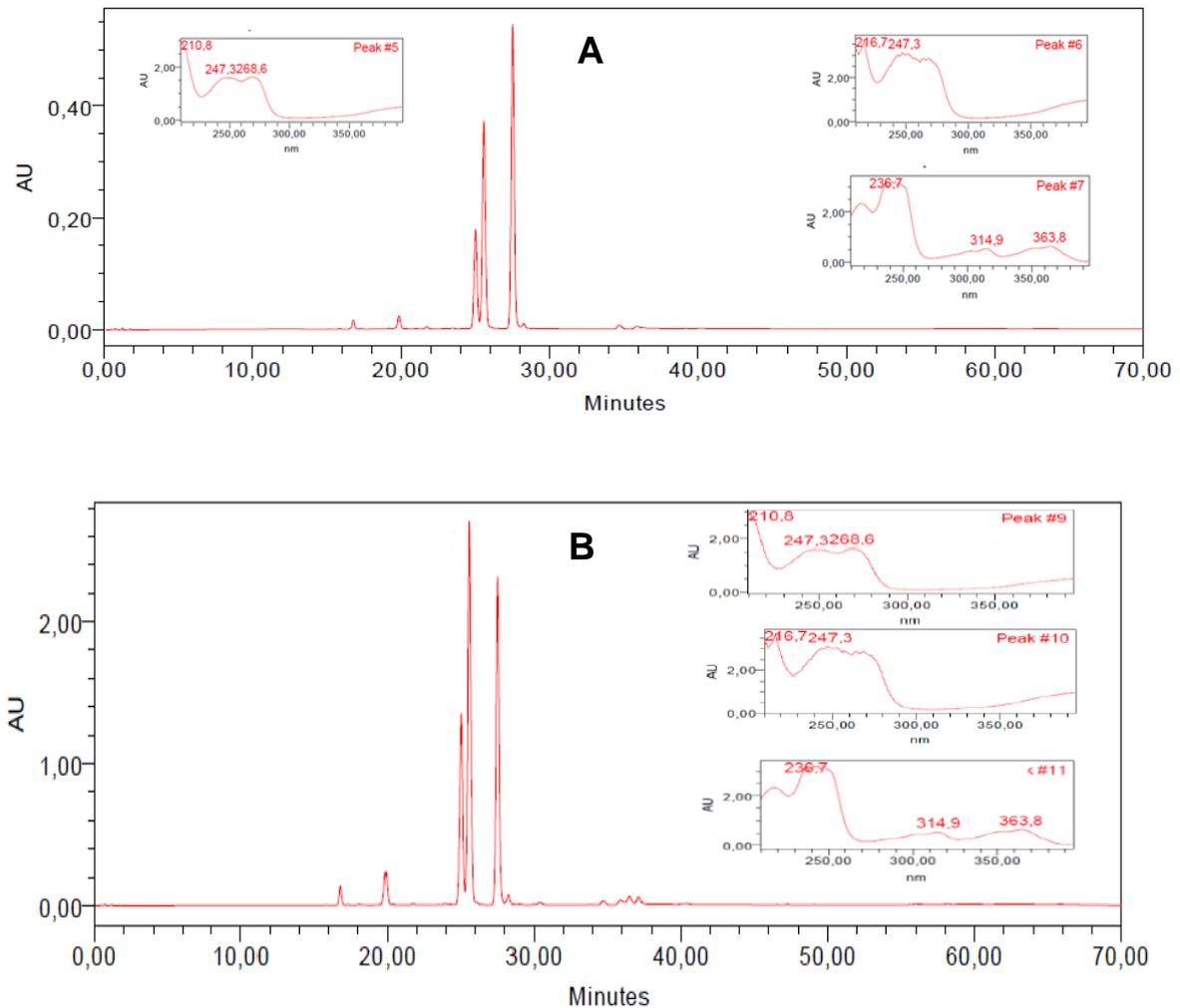


Figura 15: Perfis cromatográficos e espectros em ultravioleta da fração diclorometânica.

Legenda: A- obtido no presente estudo; B- Borges, 2012.

Condições de eluição: Coluna RP-18, fase móvel: tempo 0 min- 95% água e 5% de acetonitrila; tempo de 65 min- 55% de água e 95% de acetonitrila; tempo de 70 min- 5% de água e 95% de acetonitrila; temperatura= 40° C, fluxo= 1mL/min. Em A o comprimento de onda foi de 350nm e em B- 220nm.

A fração acetato de etila apresentou um pico majoritário (RT= 17,763 min.; área de 89,85) no comprimento de onda 350 nm (Figura 16), resultado semelhante foi encontrado em estudo anterior, porém a área foi menor (69,16; BORGES, 2012). Quando se compara os cromatogramas da fração acetato de etila (Figura 16) aos da fração diclorometânica (Figura 15) observa-se que os tempos de retenção dos

compostos majoritários e os espectros em ultravioleta são diferentes, sugerindo que a composição química seja diferente.

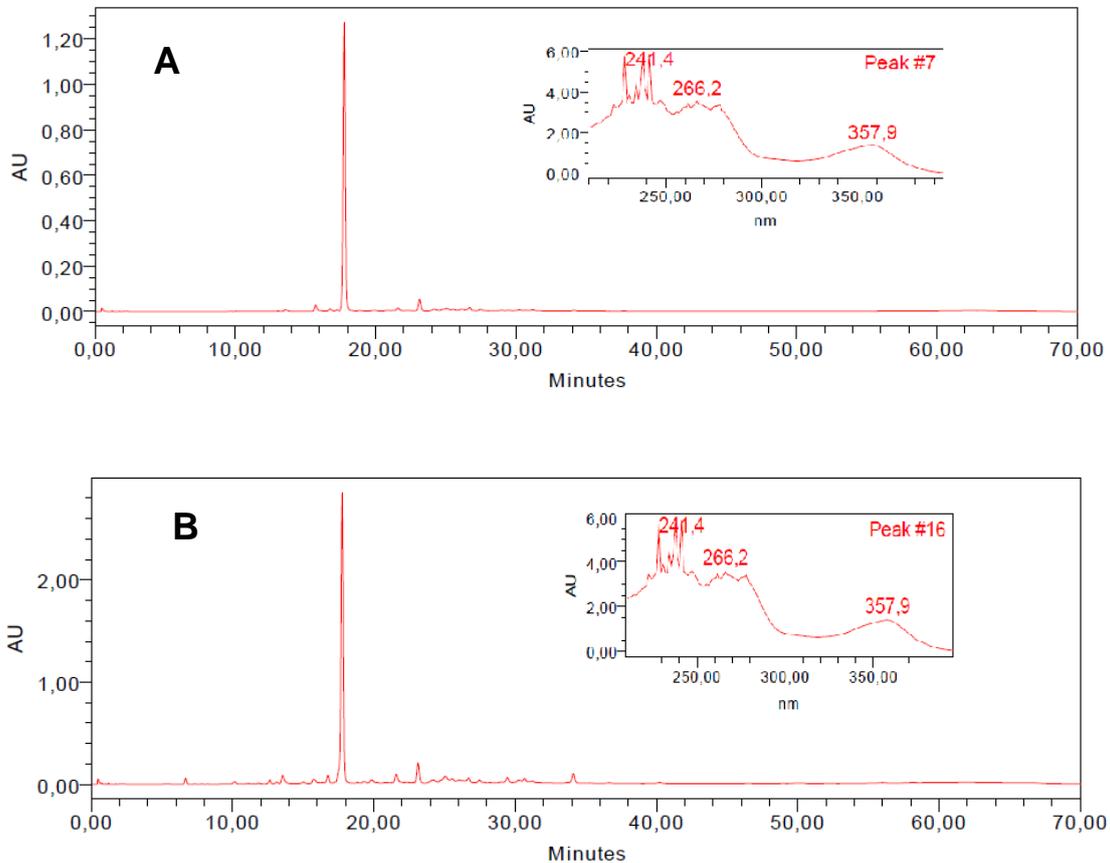


Figura 16: Perfis cromatográficos e espectros em ultravioleta da fração acetato de etila.

Legenda: A- obtido no presente estudo; B- Borges, 2012.

Condições de eluição: Coluna RP-18, fase móvel: tempo 0 min- 95% água e 5% de acetonitrila; tempo de 65 min- 55% de água e 95% de acetonitrila; tempo de 70 min- 5% de água e 95% de acetonitrila; temperatura= 40° C, fluxo= 1mL/min. Em A o comprimento de onda foi de 350nm e em B- 220nm

A fração metanólica é constituída, predominantemente por compostos de maior polaridade (tempo de retenção menor que 16 minutos). Fato semelhante foi observado em estudo anterior (BORGES, 2012; Figura 17). Prospecção fitoquímica realizadas por Malheiros (2008) e Borges (2012) detectou a presença de curumarinas. Talvez, essa fração contenha cumarinas, porém até o presente não foi descrito o isolamento de cumarina dessa espécie.

Testes histoquímicos de *E. plicata* detectou a presença de antocianinas que são flavonoides amplamente distribuídos na natureza e responsáveis pela maioria

das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (MARKAKIS, 1982; VINSON et al. 1999). Alguns flavonoides possuem grupos glicona (açúcares) o que confere alta polaridade, podendo se concentrar em frações de maior polaridade, como a fração metanólica. Outro estudo isolou glicosídeos (SHIBUYA et al. 1997) de *Eleutherine palmifolia*, talvez, a *E. plicata* possa conter estes glicosídeos e estes estejam presentes na fração metanólica.

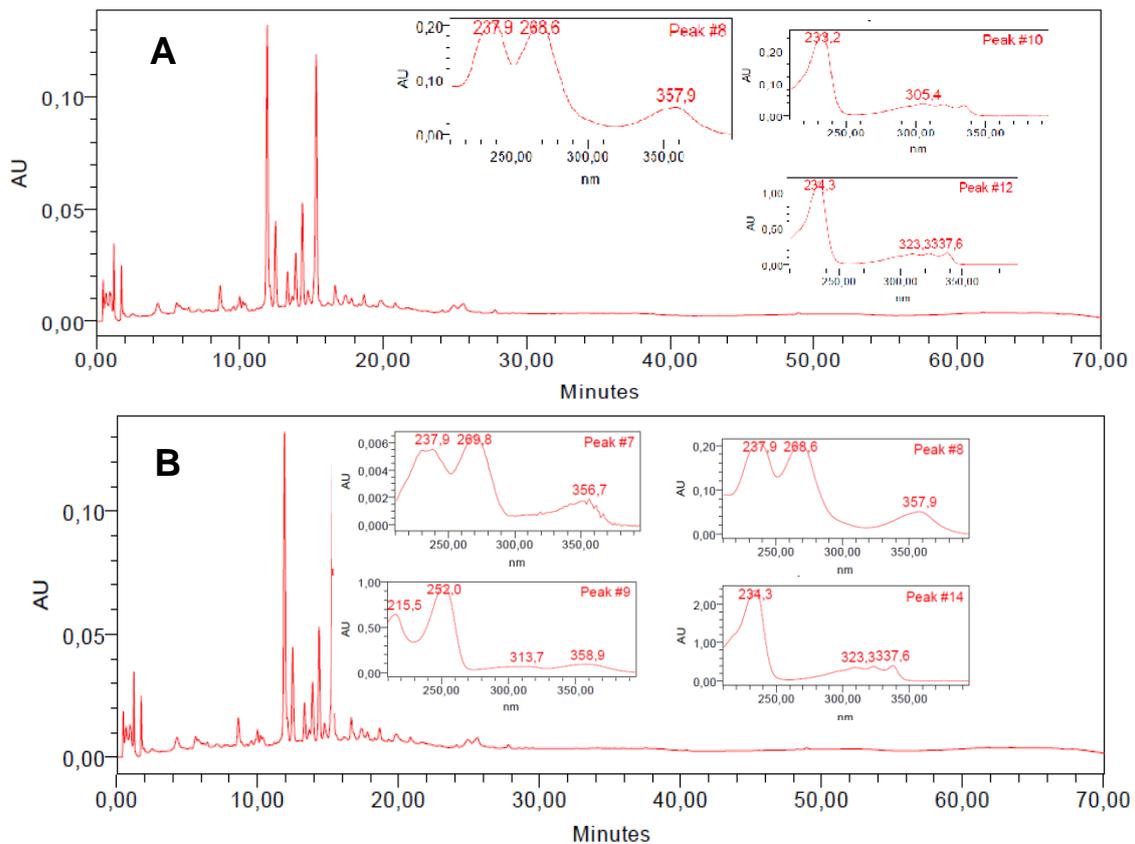


Figura 17: Perfis cromatograficos e espectros em ultravioleta da fração metanólica.

Legenda: A- obtido no presente estudo; B- Borges, 2012.

Condições de eluição: Coluna RP-18, fase móvel: tempo 0 min- 95% água e 5% de acetonitrila; tempo de 65 min- 55% de água e 95% de acetonitrila; tempo de 70 min- 5% de água e 95% de acetonitrila; temperatura= 40° C, fluxo= 1mL/min. Em A o comprimento de onda foi de 280nm e em B- 220nm

Vários estudos demonstraram que as atividades antimicrobianas (BRONDANI et al. 2003; IFESAN, 2009; BORGES, 2012), antiplasmódica (DOLABELA, 2007) de *Eleutherine* estão relacionadas as naftoquinonas. Em virtude disso, a fração rica em naftoquinonas (fração diclorometânica) foi submetida ao fracionamento em

cromatografia em camada preparativa (Figura 18), sendo isoladas 3 subfrações com os seguintes fatores de retenção: (Figura 18;Tabela 5).

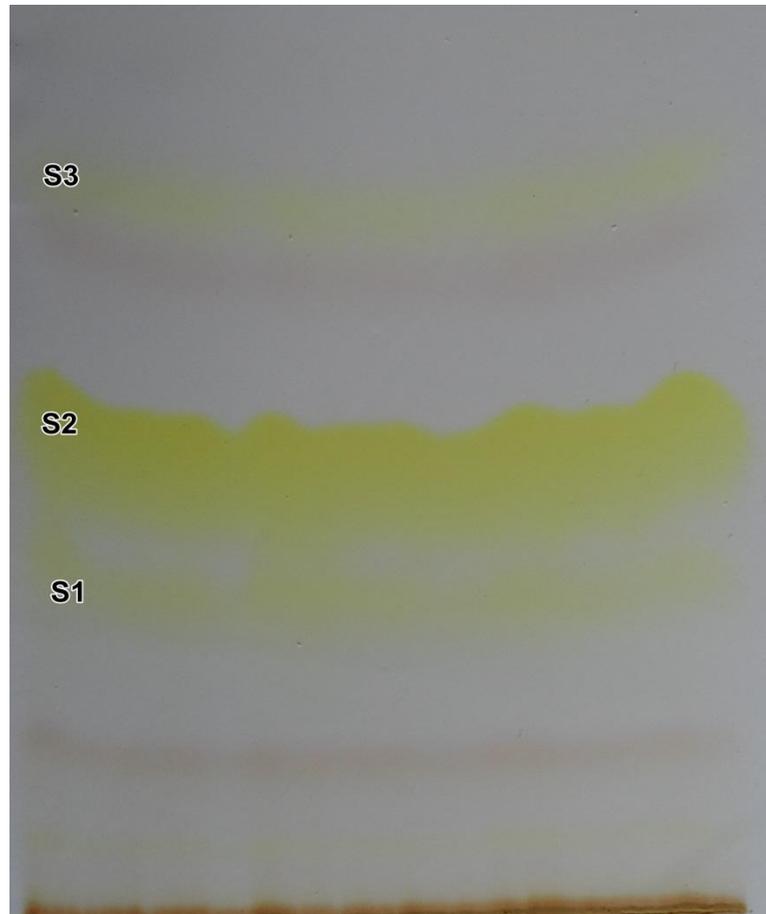


Figura18: Cromatografia em camada preparativa da fração diclorometano de *E. plicata*.
Legenda: As três bandas destacadas correspondem as subfrações S1, S2 e S3, conforme podemos visualizar, com tempos de retenção diferentes. Condições cromatográficas: Fase móvel- diclorometano; fase estacionária- sílica gel.

A subfração S1 (fator de retenção= 0,2864) apresentou um rendimento de 18,67%, a subfração S2 (fator de retenção= 0,5000) o rendimento foi de 61,7% e Subfração S3 (fator de retenção=0,7727) o rendimento foi de 3,64%. Logo, a substância majoritária da fração diclorometânica deve ser S2 e talvez esta seja responsável pelas atividades biológicas. Quando se compara ao estudo anterior, também foram identificados 3 amostras distintas com os seguintes fatores de retenção: 0,2857; 0,5461 e 0,7692. A amostra S2, obtida por Borges (2012) foi

submetida aos estudos em RMN, sendo identificada como isoeleuterina (BORGES, 2012).

Comparando os fatores de retenção obtidos neste estudo e Borges (2012) observa-se que estes são muito próximos, sugerindo que as naftoquinonas isoladas neste estudo sejam as mesmas do estudo anterior (Tabela 5). No presente estudo, as amostras (S1, S2 e S3) ainda não foram submetidas aos estudos de RMN.

Tabela 5: Comparação dos fatores de retenção dos constituintes químicos presentes na fração diclorometano de *Eleutherine plicata*.

Naftoquinona	Borges, 2012	Presente estudo
S1	0,2857	0,2864
S2	0,5461 (isoeleuterina)	0,5000
S3	0,7692	0,7727

Também ao se comparar os dados cromatográficos (CLAE-DAD e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa; dados não mostrados), verifica-se que a S2 obtida no presente estudo é semelhante à de Borges (2012), isto é, é a isoeleuterina.

5.2 Estudos de viabilidade celular e dosagem da capacidade antioxidante

Apesar de ter sido obtido 4 frações no estudo fitoquímico, optou-se pela avaliação da citotoxicidade/genotoxicidade apenas da fração de diclorometano e suas subfrações. Tal fato se deve a informações obtidas em outros estudos (BORGES, 2012; VEIGA, 2013), onde as atividades antimicrobianas, antileishmania e antimalárica foram observadas nesta fração e subfrações. Também, visando avaliar se o fracionamento contribui na toxicidade inclui-se o extrato.

Então, inicialmente o extrato etanólico, a fração diclorometano e suas subfrações foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular (MTT) em células VERO e HepG2. Devido as características químicas das naftoquinonas (capacidade de redox ciclo), avaliou-se as alterações oxidativas promovidas pelas amostras em células HepG2.

O extrato etanólico foi submetido à avaliação da citotoxicidade (ensaio MTT 24h) utilizando células VERO, onde observou-se que a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) foi de 28,71µg/mL. Para as células HepG2 a CC₅₀ foi de 19,61µg/mL em 24h e 48,96µg/mL em 48h. Quando se compara a citotoxicidade em células VERO e HepG2, apesar das diferenças de CC₅₀, o extrato foi considerado citotóxico em ambas linhagens (Tabela 6).

Em geral, a citotoxicidade é diretamente proporcional à concentração da amostra e ao tempo de exposição (KUMAR et al. 2009). No presente estudo, quando se utilizou a HepG2, observou-se uma correlação direta entre a concentração e citotoxicidade. Porém, em relação ao tempo de exposição, observou-se que quanto maior o tempo menor a citotoxicidade (CC₅₀ 24h < CC₅₀ 48h). Este fato sugere que o evento envolvido na citotoxicidade possa ser revertido no decorrer do tempo. Para compreender melhor este processo realizaram-se dois ensaios de genotoxicidade, o cometa (avalia o dano imediato) e o ensaio do micronúcleo (efeito tardio).

Estudo anterior avaliou a citotoxicidade, utilizando a mesma metodologia, em células da linhagem HepG2 A16, onde se obteve uma CC₅₀ = 61,55µg/mL, sendo considerado pouco citotóxico, porém observou-se que a leitura do MTT foi realizada com filtro a 570 nm, e *background* em 630 nm (SILVA, 2012).

Conforme dito anteriormente, o extrato etanólico possui como constituintes majoritários as naftoquinonas. Estudos onde se avaliou a toxicidade de extratos obtidos de espécies vegetais ricas em naftoquinonas obtiveram resultados semelhantes. Extratos obtidos de 15 diferentes espécies de Bignoneaceae, cujo principal marcador químico é a naftoquinona, foram submetidos ao ensaio em *Artemia salina*, sendo observada Concentração letal 50% > 50µg/mL em 14 espécies (DOLABELA, 1997).

De extratos obtidos de diferentes partes de *Julgans regia*, *J. cinerea* e *J. nigra* (Juglandaceae) foi isolada a naftoquinona juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona). Esta naftoquinona mostrou-se citotóxica para as linhagens celulares tumorais, HL-60 (leucemia), MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (cérebro), HCT-8 (côlon). A citotoxicidade parece ser decorrente de apoptose por uma via extrínseca independente de despolarização mitocondrial. Além disso, verificou-se que a adição de um grupo metoxi ao carbono 5 desta naftoquinona elevava a citotoxicidade (MONTENEGRO et al. 2010).

Outra naftoquinona importante é o lapachol, que é extraído da *Tabebuia avellanedae* Lor (Bignoniaceae), apresentou as seguintes propriedades farmacológicas: anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antimalária, antitripanossoma e antiulcerogênica (ARAUJO et al. 2002). Constataram que o uso desta naftoquinona para o tratamento de cervicites e cervicovaginites, é um tratamento de baixo custo e ausente de efeitos colaterais.

O lapachol apresentou efeito inibitório sobre os seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *M. flavus*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *E. coli* e ao gênero *Brucella*. A atividade antineoplásica do lapachol foi comprovada em 1962, portanto ele é bem utilizado como modelo experimental de neoplasias (LIMA et al. 1956; LIMA et al. 1962; RAO, et al. 1968; WANICK et al. 1970; ARAUJO et al. 2002).

Dentre as naftoquinonas, o lapachol e beta-lapachona possuem elevado número de estudos *in vitro* e *in vivo* onde se avaliou a toxicidade. Estudo *in vivo*, verificou que a toxicidade aguda intraperitoneal do lapachol é reduzida (DL₅₀ em 1600mg/Kg; SANTANA et al. 1968; ARAUJO et al. 2002). Porém, foram observadas as seguintes alterações clínicas nos animais tratados com doses elevadas: depressão do SNC, dificuldade respiratória, trombocitopenia e epistaxis (MORRISON et al. 1970; ARAUJO et al. 2002).

Quando utilizado o lapachol no homem, em doses de 1,5 g/dia, foram observadas as seguintes reações adversas medicamentosas: náuseas e vômitos. Entretanto, não foram observadas alterações laboratoriais, em nível, hematológico, hepático ou renal, apesar da coloração escura da urina. Com doses a partir de 2 g/dia se observam aumento do tempo de protrombina, que pôde ser corrigido pelo uso da vitamina K, também voltando ao normal com a suspensão do lapachol (BLOCK et al. 1974; ARAUJO et al. 2002). Estes resultados sugerem que a elevada citotoxicidade do extrato etanólico de *E. plicata* esteja relacionada as naftoquinonas. Então, avaliou-se a citotoxicidade da fração rica em naftoquinonas (fração diclorometano).

De forma semelhante, avaliou-se a citotoxicidade da Fração Diclorometano em células VERO, onde se obteve CC₅₀ = 26,19µg/mL (24h) e em células HepG2, onde se obteve CC₅₀ = 19,04µg/mL (24h) e 25µg/mL (48h). Observou-se menor toxicidade em células VERO. Semelhante ao extrato, quando se aumenta o tempo de exposição celular ocorre uma redução da citotoxicidade (Tabela 6).

Quando se compara os resultados obtidos para o extrato em relação à fração observa-se aumento da citotoxicidade (Figura 19, Tabela 6). Este aumento pode estar relacionado ao fato da Fração Diclorometano conter maiores concentrações de naftoquinonas. Sabe-se que a citotoxicidade das naftoquinonas pode estar relacionada à produção de radicais superóxidos (DUBIN et al. 1990).

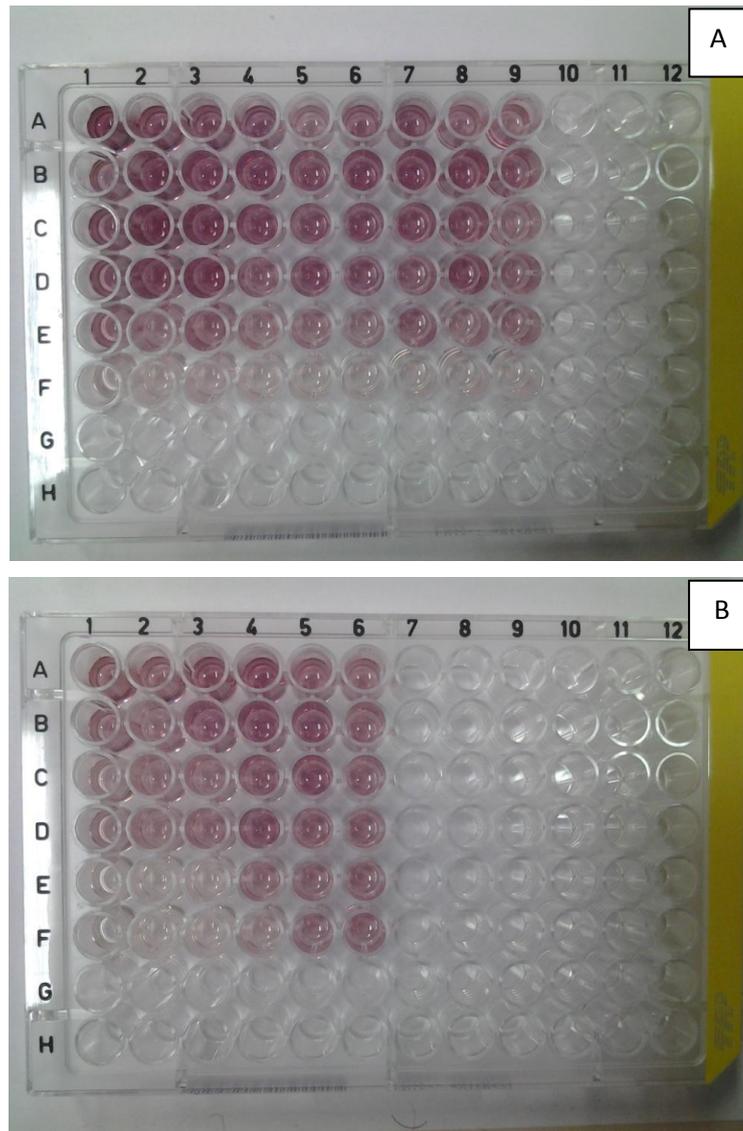


Figura 19: Ensaio de viabilidade celular - MTT com células HepG2 do extrato etanólico obtido de bulbos de *E. plicata*, fração diclorometano e subfrações.

Legenda: Placa A- Linha A corresponde ao controle negativo; os poços 1B a 1F, 2B a 2F e 3B a 3F correspondem ao tratamento com as concentrações crescentes do extrato etanólico; os poços 4B a 4F, 5B a 5F e 6B a 6F correspondem ao tratamento com as concentrações crescentes da fração diclorometano; os poços 7B a 7F, 8B a 8F e 9B a 9F correspondem ao tratamento com as concentrações crescentes da subfração S1;

Placa B- Linha A corresponde ao controle negativo; os poços 1B a 1F, 2B a 2F e 3B a 3F correspondem ao tratamento com as concentrações crescentes da subfração S2 (isoeleuterina); os poços 4B a 4F, 5B a 5F e 6B a 6F correspondem ao tratamento com as concentrações crescentes do controle positivo com NMU (N-metil-N-nitrosureia).

Segundo O'Brien (1991) o alto potencial redox da naftoquinonas é citotóxico provavelmente devido a alta eletrofilicidade e/ou porque quando as quinonas são reduzidas a semiquinonas ativam o oxigênio.

O ensaio de citotoxicidade da subfração S1 em células VERO obteve $CC_{50} = 14,36\mu\text{g/mL}$ (24h). Nas células HepG2, obteve-se $CC_{50} = 15,37\mu\text{g/mL}$ (24h) e $29,59\mu\text{g/mL}$ (48h). Ao avaliar a citotoxicidade da subfração S2 em células VERO, obteve-se $CC_{50} = 18,67\mu\text{g/mL}$ (24h). Nas células HepG2, obteve-se $CC_{50} = 31,11\mu\text{g/mL}$ (24h) e $32,50\mu\text{g/mL}$ (48h).

Para as duas subfrações S1 e S2, verificou-se menor toxicidade em células HepG2, do que em células VERO (24h). E assim como no extrato e na Fração Diclorometano, quando se aumenta o tempo de exposição celular ocorre uma redução da citotoxicidade (Tabela 6).

Análise estatística ANOVA do ensaio de viabilidade celular – MTT nas linhagens VERO e HepG2, demonstrou significância estatística ($p < 0,05$) em todas as concentrações ($12,5\mu\text{g/mL}$; $25\mu\text{g/mL}$; $50\mu\text{g/mL}$; $100\mu\text{g/mL}$ e $200\mu\text{g/mL}$) do Extrato Etanólico, Fração Diclorometano, subfração S1 e subfração S2 de *E. plicata*.

Através do teste de Tukey para as comparações múltiplas verificou-se que houve diferença significativa entre o controle negativo e todas as amostras de *E. plicata* testadas em HepG2 em 24h e 48h. Em células VERO houve diferença significativa entre o controle negativo e as amostras de *E. plicata* testadas, com exceção das concentrações $12,5\mu\text{g/mL}$ e $25\mu\text{g/mL}$ do Extrato Etanólico e da subfração S2 que não houve diferença significativa em relação ao controle negativo.

Tabela 6: Concentração Citotóxica 50% (CC_{50}) em $\mu\text{g/mL}$ de extrato etanólico de *E. plicata*, fração diclorometano e subfrações com seus respectivos Desvios Padrão (DP).

Amostras	VERO (24h)	HEPG2 (24h)	HEPG2 (48h)
Extrato etanólico	$28,71 \pm 1,054$	$19,61 \pm 0,7853$	$48,96 \pm 1,266$
Fração diclorometano	$26,19 \pm 1,670$	$19,04 \pm 1,147$	$25 \pm 1,843$
Subfração S1	$14,36 \pm 1,124$	$15,37 \pm 1,125$	$29,59 \pm 1,690$
Subfração S2	$18,67 \pm 1,253$	$31,11 \pm 1,639$	$32,50 \pm 2,883$

Em síntese, o fracionamento contribuiu positivamente para citotoxicidade em 24h, sendo a naftoquinona S1 a mais citotóxica. Entretanto, na exposição de células

HepG2 por 48, a fração diclorometano apresentou maior citotoxicidade. Com o objetivo de compreender se o estresse oxidativo esta envolvido neste aumento de citotoxicidade, realizou-se o teste DPPH.

De forma geral, quanto maior a concentração da amostra utilizada no tratamento da linhagem HepG2, menor a capacidade antioxidante observada. A capacidade antioxidante do extrato etanólico obtido de bulbos *E. plicata* é inferior a observada para a fração diclorometano. Enquanto que, a subfração S1 apresentou maior capacidade antioxidante que o Extrato e a fração diclorometano (Tabela 7). A análise estatística demonstrou que todas as amostras tiveram diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), inclusive superaram a capacidade antioxidante deste controle.

Quando se relaciona a CC_{50} do extrato etanólico de *E. plicata* obtida em células HepG2 ($CC_{50} = 19,61 \mu\text{g/mL}$) a concentração inibitória 50% para o *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina ($CI_{50} = 6,57 \mu\text{g/mL}$), observa-se uma seletividade de 2,98 (Tabela 7), e a relação da CC_{50} da fração diclorometano de *E. plicata* obtida em células HepG2 ($CC_{50} = 19,04 \mu\text{g/mL}$) a concentração inibitória 50% para o *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina ($CI_{50} = 2,87 \mu\text{g/mL}$), observa-se uma seletividade de 6,63 (Tabela 7). Quando se compara este índice de seletividade ao índice de seletividade da cloroquina (WRIGHT et al. 1993, 1994; LIKHITWITAYAWUID et al. 1993) observa-se uma menor seletividade deste extrato para o *P. falciparum* (Tabela 7). Apesar do baixo índice de seletividade, outros estudos de genotoxicidade são necessários para avaliação do benefício: risco deste extrato no tratamento da malária. Vale ressaltar que o ensaio do MTT é considerado uma avaliação de citotoxicidade preliminar (LOTZE e THOMSON, 2005).

Tabela 7: Comparação da concentração citotóxica 50% a concentração inibitória 50% para o *P.falciparum* resistente à cloroquina.

Amostras	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
HepG2			
Extrato etanólico	19,61	6,57	2,98
F. diclorometano	19,04	2,87	6,63
Cloroquina	-	-	376-981 (WRIGHT et al. 1993 e 1994)
Cloroquina	-	-	8000 (LIKHITWITAYAWUID et al. 1993)

A avaliação do extrato etanólico de *Eleutherine americana* como aditivo alimentar natural (IFESAN et al. 2009) utilizando o radical DPPH, revelou que este extrato tinha alta capacidade de eliminação de radicais, retardando a oxidação lipídica em amostras de carne de porco. Esta capacidade pode estar relacionada com a alta atividade antioxidante do extrato de *E. americana* em saciar o radical hidroxila – radical capaz de remover átomos de hidrogênio de lipídios de membrana, ocasionando a peroxidação de lipídeos. Desta forma, ocorre a prevenção da oxidação lipídica; provavelmente esta capacidade antioxidante foi decorrente da presença de compostos bioativos tais como naftoquinonas. Baseado neste estudo pode-se sugerir que o aumento da capacidade antioxidante das amostras de *E. plicata*, em relação ao controle negativo, está relacionada as naftoquinonas (SHADYRO et al. 2007).

Quando se correlaciona estes resultados ao ensaio de viabilidade celular (MTT), observa-se que o fracionamento contribuiu positivamente para citotoxicidade em 24h (S1 mais tóxica que FD, FD mais tóxico que EE; Tabela 6), enquanto que a capacidade antioxidante foi favorecida com o fracionamento (Tabela 8). Uma hipótese seria a tentativa celular em aumentar o sistema de defesa antioxidante com o objetivo de balancear espécies reativas, diminuindo assim, o estresse oxidativo (HALLIWELL, 2001). Em estudo anterior verificou-se que as células podem responder ao estresse oxidativo com o aumento de glutathiona (GSH; antioxidante) sugerindo que mecanismos relacionados com a GSH pode ser a primeira linha de defesa celular contra produtos químicos tóxicos que incluem oxidantes. Inclusive, neste estudo foi utilizada a menadiona, uma 1,4-naftoquinona (OCHI, 1996).

Um fato interessante observado foi: a isoeleuterina (Subfração S2), apesar de ser a naftoquinona majoritária, possui um baixo potencial citotoxicidade em HepG2 (24h). Muitos efeitos patológicos do NO são considerados decorrentes da sua interação com os radicais de oxigênio, produzindo peroxinitrito; o NO (óxido nítrico) interage rapidamente com o radical livre superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para produzir um potente oxidante peroxinitrito ($ONOO^-$) e seu ácido conjugado, o ácido peroxinitroso ($OHOOH^-$; REITER et al. 2000).

Sabe-se que a citotoxicidade das naftoquinonas está relacionada à sua estrutura química, isto é, as para-naftoquinonas (1,4-naftoquinonas) são menos

eficientes na produção de radicais superóxidos quando comparadas as orto-naftoquinonas. Provavelmente, a produção de superóxido e suas subseqüentes alterações no metabolismo celular seja um dos fatores envolvidos na citotoxicidade das naftoquinonas (BOOTHMAN et al. 1989; DUBIN et al. 1990; DOLABELA, 1997). Em geral, de *E.plicata* foi isolada a isoeleuterina (1,4-naftoquinona), logo devem ser pouco eficientes na produção de radicais superóxidos.

A isoeleuterina inibe lipopolissacarídeo (LPS) e estimula a indução de óxido nítrico de um modo dependente da dose ($CI_{50} = 7,4 \text{ uM}$), também suprime a expressão da proteína iNOS e mRNA. Além disso, a (-)-isoeleuterina inibe a expressão de diversas citocinas, tais como interleucina- 1β e interferon- β . A atividade transcricional de NF- κ B por LPS também foi inibida por tratamento com isoeleuterina, sugerindo que a supressão da expressão de iNOS está associada com a regulação do factor de transcrição NF- κ B (SUHYN et al. 2009). A inibição da LPS e a indução do NO podem estar relacionadas à elevada citotoxicidade deste composto. Outra naftoquinona, eleuterina possui atividade inibitória sobre a topoisomerase II (HARA et al. 1997).

A peroxidação lipídica é a principal responsável por alterações funcionais e estruturais da membrana plasmática, resultando, geralmente, em morte celular (PERCÁRIO, 2008). Ela é iniciada pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e é propagada por radicais peroxilas. Esta cadeia de reações leva a formação de hidrorperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como malondialdeído (MDA), que pode ser detectado em amostras biológicas e usado para avaliação do estresse oxidativo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Tabela 8: Capacidade antioxidante das amostras obtidas a partir de *Eleutherine plicata*.

Amostras	Concentração das amostras ($\mu\text{g/mL}$)	Dosagem da capacidade antioxidante (mM)
Controle Negativo	-	0,142 \pm 0,00639
Extrato Etanólico	9,80	0,127 \pm 0,00692
	4,90	0,264 \pm 0,00217
	2,45	0,461 \pm 0,00508
Fração Diclorometano	9,52	0,250 \pm 0,00265
	4,76	0,424 \pm 0,00381
	2,38	0,495 \pm 0,00628
Subfração S1	7,70	0,541 \pm 0,00791
	3,80	0,688 \pm 0,01310
	1,90	0,809 \pm 0,01741
Subfração S2	15,55	0,159 \pm 0,00580
	7,77	0,278 \pm 0,00174
	3,88	0,428 \pm 0,00395

* $P \leq 0,05$

5.3 Estudos de Genotoxicidade

5.3.1 ENSAIO COMETA

A partir dos resultados da Concentração Citotóxica 50% de extrato etanólico de *E.plicata*, fração diclorometano e subfrações (Tabela 6) foi possível definir três concentrações de cada substância para os ensaios genotóxicos. Decidiu-se utilizar como maior concentração a metade da CC_{50} (24h, linhagem HepG2) de cada amostra, para evitar que a morte celular prejudicasse a análise do ensaio. A partir desta concentração foram realizadas 2 diluições sucessivas (Tabela 9). Vale ressaltar que o objetivo dos ensaios genotoxicidade (cometa e micronúcleo) é observar o dano do genoma e não a morte celular.

O teste do cometa é utilizado para detectar lesões genômicas que podem gerar mutações após serem processadas, mas estas lesões são passíveis de correção (TICE et al. 2000; GONTIJO e TICE et al. 2003). A versão alcalina deste teste permite a avaliação de quebras de fitas simples e sítios álcali lábeis no DNA, além das quebras de dupla fita (SINGH et al. 1988; TICE et al. 2000).

Em relação à genotoxicidade, avaliada pelo ensaio cometa, observou-se que o índice de dano celular está relacionado à concentração utilizada. Isto é, quanto maior a concentração do extrato, da fração e subfrações, maior o índice de dano. Também foi observado que o fracionamento contribuiu positivamente nesta genotoxicidade. A fração diclorometano causou maior dano genômico que o extrato etanólico (Tabela 9).

Tabela 9: Resultado do Índice de Dano encontrado pelo Ensaio Cometa com seus respectivos Desvios Padrão (DP) nas amostras obtidas a partir de *Eleutherine plicata*.

Amostras	Concentração em µg/mL	Índice de Dano
Controle Negativo	—	0,77 ± 0,13
Controle Positivo = Doxorrubicina	CP = 0,02	2,22 ± 0,04
Extrato Etanólico	EE1 = 9,80	1,48 ± 0,05
	EE2 = 4,90	1,41 ± 0,01
	EE3 = 2,45	1,10 ± 0,08
Fração Diclorometano	FD1 = 9,52	1,96 ± 0,06
	FD2 = 4,76	1,78 ± 0,02
	FD3 = 2,38	1,69 ± 0,02
Subfração S1	S1-1 = 7,70	1,76 ± 0,04
	S1-2 = 3,80	1,52 ± 0,04
	S1-3 = 1,90	1,24 ± 0,08
Subfração S2	S2-1 = 15,55	2,07 ± 0,02
	S2-2 = 7,77	2,05 ± 0,02
	S2-3 = 3,88	1,84 ± 0,03

*P≤0,05

Quando se relaciona os resultados da genotoxicidade (teste cometa) obtidos com o extrato etanólico e fração diclorometano e os resultados do ensaio de viabilidade celular (MTT) não se observa uma correlação, assim como não há relação proporcional ao resultado de dosagem da capacidade antioxidante (Tabela 8). Isto se deve, provavelmente, ao tempo de exposição do ensaio cometa ser de 3h, pois foi possível observar no ensaio de viabilidade celular que quando se aumenta o tempo de exposição celular às amostras de *E. plicata* ocorre uma redução da citotoxicidade (Tabela 6).

A subfração S1 apresentou um menor Índice de Dano quando comparada a Fração Diclorometano (Tabela 8). Porém, esta subfração mostrou-se mais citotóxica em linhagens VERO e HepG2 (24h; Tabela 6). Logo, não foi possível relacionar a citotoxicidade a genotoxicidade do ensaio cometa (dano imediato).

Em relação à capacidade antioxidante, esta subfração S1 foi mais eficaz como antioxidante em relação à fração diclorometano (Tabela 8). Esta melhor capacidade antioxidante pode ter contribuído na redução do Índice de Dano (Tabela 9). Há a hipótese de que a genotoxicidade pode estar relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que ocasionam estresse oxidativo grave no interior das células através de alterações nas macromoléculas celulares, incluindo lipídios oxidados, proteínas e DNA (BOLTON et al. 2000). A melhora na capacidade antioxidante, observada na subfração S1, pode ter contribuído para redução da genotoxicidade (Tabela 8 e 9).

De todas as amostras testadas, a isoeleuterina (Subfração S2) foi a menos genotóxica (Tabela 9). Entretanto, no ensaio de viabilidade celular (MTT) foi a amostra menos citotóxica para a linhagem HepG2 (24h de exposição; Tabela 6). Em relação a capacidade antioxidante desta amostra (Subfração S2- Isoeleuterina), foi inferior a observada para a Subfração S1 e fração diclorometano (Tabela 8). Este menor potencial antioxidante pode explicar a elevação no índice de dano observado para isoeleuterina.

Em relação à fração diclorometano, fração rica em naftoquinonas, não se observou uma relação direta entre a genotoxicidade (Tabela 9) e capacidade antioxidante (Tabela 8). Talvez, constituintes minoritários não quinônicos estejam contribuindo para esta elevação de genotoxicidade. Na ação genotóxica destes constituintes minoritários podem estar envolvidos outros mecanismos, por exemplo, a inibição do sistema de reparo, a ativação da sinalização mitótica e mudanças na modulação dos genes (BEYERSMANN e HARTWIG, 2008).

Em síntese, para as naftoquinonas testadas quanto maior a capacidade antioxidante menor (Tabela 8) a genotoxicidade (Tabela 9), sugerindo que a formação de espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio seja essencial para a genotoxicidade. Quanto maior a capacidade antioxidante, menor será a geração destes radicais e o efeito genotóxico.

É relevante a relação entre a produção de ROS e quebras de DNA, e entre a produção de ROS e o estresse oxidativo em células. Outros fatores observados que

contribuem para a citotoxicidade de naftoquinonas é a intercalação ou alquilação do DNA e a capacidade de agirem como inibidores de topoisomerase (NEVES et al. 2013).

Os resultados obtidos com as amostras testes (extrato, fração diclorometano e subfrações) foram diferentes, em termos estatísticos ($p < 0,05$), em relação ao controle negativo. Também o índice de dano promovido por estas amostras foi inferior ao observado para o controle positivo ($p < 0,05$; Figura 20).

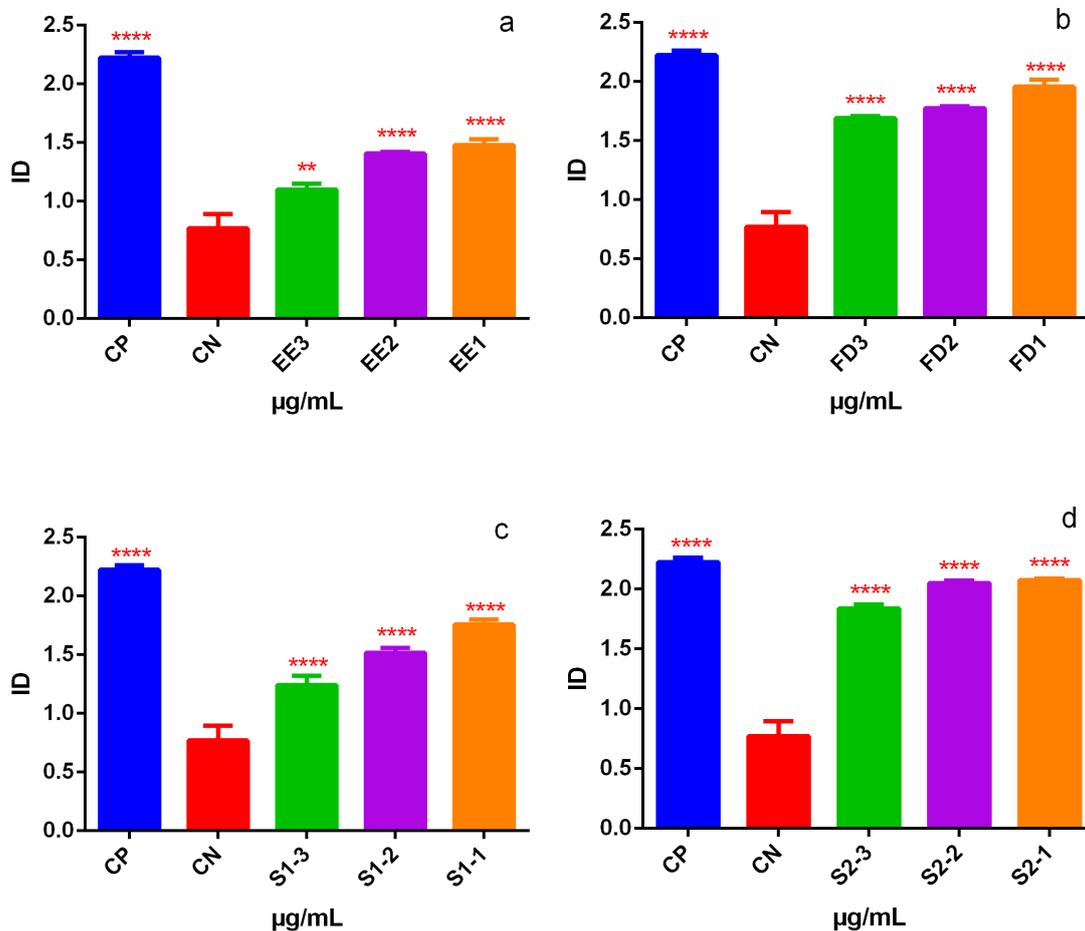


Figura 20: Gráficos com o Índice de Dano (ID), resultados do ensaio cometa com suas respectivas análises estatísticas – ANOVA.

Legenda: a= Representação do ID no Extrato Etanólico de *Eleutherine plicata* ($p < 0,0001$); b= Representação do ID da Fração Diclorometano de *Eleutherine plicata* ($p < 0,0001$); c= Representação do ID da Subfração S1 de *Eleutherine plicata* ($p < 0,0001$); d= Representação do ID da Subfração S2 de *Eleutherine plicata* ($p < 0,0001$).

** Significância em relação ao controle negativo.

**** Significância em relação ao controle negativo.

5.3.2 ENSAIO DO MICRONÚCLEO

Verificou-se que o percentual de micronúcleos foi concentração-dependente, isto é quanto maior a concentração da amostra, maior o percentual de micronúcleo. Também se observou que o Índice de Divisão Nuclear é concentração-dependente (Tabela 10). Estudos anteriores vêm demonstrando que quinonas, frações e extratos contendo este metabolito possuem potencial para induzir danos citogenéticos (SIVAKUMAR et al. 2005; AITHAL et al. 2009; BABULA et al. 2009; KUMAR et al. 2009; CAVALCANTI et al. 2013). Em geral, este índice de dano/percentual de micronúcleo tem uma relação direta com a concentração da amostra.

O extrato etanólico induziu, em menor frequência que o controle positivo, a formação de micronúcleo e índice de divisão nuclear (Tabela 10). Quando se compara estes resultados aos resultados obtidos ao do ensaio do cometa observam-se divergências. No ensaio do cometa o extrato etanólico foi à amostra com menor potencial genotóxico, enquanto que no ensaio do Micronúcleo foi a segunda mais genotóxica (Tabela 11). Este fato pode estar relacionado à diferença de tempo de exposição das células às amostras teste e a principal condição do teste do micronúcleo que tem a capacidade de verificar o dano ao DNA após o ciclo celular.

Quando se correlaciona os dados do micronúcleo ao ensaio de dosagem da capacidade antioxidante, observa-se que o extrato etanólico possui a menor capacidade antioxidante e teve uma genotoxicidade considerável (Tabela 11). Estes resultados sugerem que esta genotoxicidade pode estar relacionada ao estresse oxidativo.

Conforme dito anteriormente, o extrato etanólico de *E. plicata* é rico em naftoquinonas e um estudo anterior demonstrou que naftoquinonas induzem o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e depleção da glutathiona (GSH) em células MCF-7, e subsequente morte celular (LIN et al. 2007), corroborando com a hipótese de que a citotoxicidade e genotoxicidade podem estar relacionados ao estresse oxidativo.

O extrato etanólico apresentou uma citotoxicidade semelhante à Fração Diclorometano (Tabelas 6 e 11), porém esta fração mostrou maior frequência de micronúcleos e menor Índice de Divisão Nuclear (Tabela 10). De todas as amostras,

no ensaio do Micronúcleo, a Fração Diclorometano foi a mais genotóxica e uma das mais genotóxica no ensaio do cometa (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10: Resultado do Teste do Micronúcleo nas amostras obtidas a partir de *Eleutherine plicata*: frequência de micronúcleos e o Índice de Divisão Nuclear – IDN e seus respectivos Desvios Padrão (DP).

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Frequência de micronúcleos (%)	Índice de Divisão Nuclear
Controle Negativo	—	$2,40 \pm 0,56$	$1,94 \pm 0,01$
Controle Positivo = Doxorrubicina	CP = 0,02	$36,07 \pm 1,36$	$1,87 \pm 0,05$
Extrato Etanólico	EE1 = 9,80	$9,13 \pm 0,35$	$1,34 \pm 0,03$
	EE2 = 4,90	$5,30 \pm 0,53$	$1,43 \pm 0,02$
	EE3 = 2,45	$2,87 \pm 0,36$	$1,65 \pm 0,08$
Fração Diclorometano	FD1 = 9,52	$20,43 \pm 0,70$	$1,20 \pm 0,02$
	FD2 = 4,76	$6,83 \pm 0,31$	$1,24 \pm 0,01$
	FD3 = 2,38	$5,20 \pm 0,30$	$1,36 \pm 0,02$
Subfração S1	S1-1 = 7,70	$4,77 \pm 0,42$	$1,44 \pm 0,01$
	S1-2 = 3,80	$3,20 \pm 0,50$	$1,49 \pm 0,02$
	S1-3 = 1,90	$2,27 \pm 0,57$	$1,61 \pm 0,02$
Subfração S2	S2-1 = 15,55	$4,03 \pm 0,25$	$1,36 \pm 0,16$
	S2-2 = 7,77	$2,90 \pm 0,20$	$1,39 \pm 0,15$
	S2-3 = 3,88	$2,10 \pm 0,36$	$1,51 \pm 0,14$

Vale ressaltar que os teores de naftoquinonas na fração diclorometano são superiores ao do extrato. Este aumento de teor de naftoquinona pode explicar o aumento da genotoxicidade. Outro fato interessante foi: as naftoquinonas isoladas mostram-se menos genotóxicas que a Fração Diclorometano (Tabela 10). Talvez, a utilização destes metabolitos, de forma associada, contribua, de forma sinérgica, para a genotoxicidade.

Esta fração mostrou-se promissora para atividade antimalárica e antiestafilocos (BORGES, 2012). Porém, quando se relaciona risco de genotoxicidade à resposta farmacológica, conclui-se que o ideal não é utilizar a fração, mas sim as naftoquinonas de forma isoladas. Estes resultados nortearão os estudos subsequentes, isto é, a partir de agora o objetivo será a obtenção de quantidade suficiente de isoeleuterina (subfração S2) e da subfração S1 para os estudos pré-clínicos de toxicidade aguda, subcrônica e crônica.

Ao se relacionar os resultados da citotoxicidade, dosagem da capacidade antioxidante e genotoxicidade, conclui-se: a fração diclorometano possui maior potencial antioxidante que o extrato etanólico, porém é mais genotóxica (teste cometa e micronúcleo) e possui uma citotoxicidade semelhante (Tabela 11). Neste caso, não fica claro a relação entre o estresse oxidativo e a genotoxicidade, ratificando a hipótese que, talvez, outros mecanismos estejam envolvidos nesta genotoxicidade. Infelizmente, as técnicas utilizadas não permitem a investigação dos mecanismos envolvidos na genotoxicidade.

Conforme dito anteriormente, o refração da Fração Diclorometano contribuiu para redução da genotoxicidade, reduzindo a frequência de micronúcleos e o Índice de Divisão Nuclear (Tabela 10). E de acordo com a análise dos resultados, a redução da genotoxicidade pode ser associada a um dos 2 fatores:

1º A naftoquinona mais genotóxica seria a subfração S3, que no presente estudo não foi avaliada;

2º Ao se isolar as naftoquinonas e utilizá-las de forma isolada não ocorre o sinergismo para genotoxicidade.

O refração da fração diclorometano levou ao isolamento da subfração S1, que foi menos citotóxica e genotóxica e apresentou maior capacidade antioxidante (Tabela 11). Estes resultados permitem sugerir que a redução da genotoxicidade e citotoxicidade esta diretamente relacionada com a elevação da capacidade antioxidante desta subfração.

O refração da fração diclorometano levou ao isolamento da subfração S2 (isoeleuterina). Esta foi à fração menos citotóxica e apresentou resultado contraditório em relação a genotoxicidade, isto é no ensaio do cometa foi a amostra mais genotóxica, enquanto que no do MN foi a menos genotóxica (Tabela 11), provavelmente o dano genotóxico imediato observado no ensaio cometa não permaneceu após a divisão celular, refletindo uma menor genotoxicidade no teste do micronúcleo, que pode avaliar o efeito genotóxico tardio.

A isoeleuterina (subfração S2) tem uma capacidade antioxidante inferior à Fração Diclorometano e subfração S1, porém possui uma menor citotoxicidade e frequência de indução de micronúcleo e um maior índice de dano (Tabela 11). Estes resultados não permitem correlacionar o estresse oxidativo aos efeitos tóxicos, sendo necessários estudos complementares de genotoxicidade.

Tabela 11: Síntese dos resultados obtidos em células HepG2 expostas as amostras.

Amostras	CC₅₀ (µg/mL)	Dosagem da capacidade antioxidante	Índice de dano	Frequência de micronúcleos (%)
Doxorrubicina	ND	ND	2,22 ± 0,04	36,07 ± 1,36
Extrato Etanólico	19,61 ± 0,780	0,127 ± 0,007	1,48 ± 0,05	9,13 ± 0,35
F. Diclorometano	19,04 ± 1,147	0,250 ± 0,002	1,96 ± 0,06	20,43 ± 0,70
Subfração S1	15,37 ± 1,125	0,541 ± 0,008	1,76 ± 0,04	4,77 ± 0,42
Subfração S2	31,11 ± 1,250	0,159 ± 0,002	2,07 ± 0,02	4,03 ± 0,25

Legenda: ND – não demonstrado.

6 CONCLUSÃO

Ao se analisar os resultados verificam-se: que a subfração S1 é a mais promissora como candidato á fármaco antimalárico, visto possuir taxas de citotoxicidade e genotoxicidade em níveis aceitáveis. A subfração S2 (isoeleuterina) necessita de mais investigações complementares sobre sua genotoxicidade, visto os resultados obtidos serem contraditórios. Em relação ao uso da Fração Diclorometano, os resultados de citotoxicidade e genotoxicidade obtidos desaconselham seu uso como antimalárico, visto que esta fração possui as maiores taxas de genotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ALMEIDA, E.R.; DA SILVA-FILHO, A.A.; DOS SANTOS, E.R.; LOPES, C.A. Antiinflammatory action of lapachol. **J Ethnopharmacol**, v.29, n.2, p.239-241, 1990.
- ALVES, T. M. A.; KLOOS, H.; ZANI, C. L. Eleutherinone, a novel fungitoxic naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** [online]. v.98, n.5, p. 709-712, 2003.
- ANDOH, T.; ISHIDA, R. Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. **Biochim Biophys Acta**, v. 1400, p.155–171, 1998.
- ARAUJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Rev. bras. farmacogn.**, v.12, p. 57–59, 2002.
- AYCICEK, A; KOCYIGIT, A; EREL, O; SENTURK, H. Fototerapia causa danos ao DNA de leucócitos mononucleares periféricos em recém-nascidos a termo. **J. Pediatr**, v.84, n.2, p.141-146, 2008.
- BABULA, P.; MIKELOVA, R.; ADAM, V.; KIZEK, R.; HAVEL, L; SLADKY, Z. Using of liquid chromatography coupled with diode array detector for determination of naphthoquinones in plants and for investigation of influence of pH of cultivation medium on content of plumbagin in *Dionaea muscipula*. **Journal of Chromatography**, v. 842, p. 28–35, 2006.
- BAGATINI, P.B.; MALUF, S.W. Ensaio Cometa. In: MALUF, S.W. **Citogenética Humana**. 1ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2011. p.194-201.
- BALBINOT, S.; VELASQUEZ, P.G.; DÜSMAN, E. Reconhecimento e uso de plantas medicinais pelos idosos do Município de Marmeleiro – Paraná. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.15, n.4, p.632-638, 2013.
- BARRETO JUNIOR, A.G.; BISCAIA JUNIOR, E.C.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; CARVALHAES, S.F.; MACIEL, M.A.M. Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). **Quím. Nova**, v.28, n.4, p. 719-722. 2005.
- BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Tests *in vitro* an *in vivo* used in the toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.

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.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Arch Toxicol.**, v.82, n.8, p.493-512, 2008.

BHATTACHARYA, S.; ZHANG, Q.; CARMICHAEL, P.L.; BOEKELHEIDE, K.; ANDERSEN, M.E. Toxicity Testing in the 21st Century: Defining New Risk Assessment Approaches Based on Perturbation of Intracellular Toxicity Pathways. **PLoS ONE**, v. 6, n.6, p.1-11, 2011.

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.

BLOCK, J.B.; SERPICK, A.A.; MILLER, W.; WIERNIK, P.H. Early clinical studies with lapachol (NSC-11905). **Cancer Chemother Rep** 2, v.4, n.4, p.27-28, 1974.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, **Nature**, v.181, p.1199-1200, 1958.

BOCHNER, R.1.; FISZON, J.T.; ASSIS, M.A.; AVELAR, K.E.S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. bras. plantas med.**, v.14, n.3, p.537-547, 2012.

BOLTON, J.L.; TRUSH, M.A.; PENNING, T.M.; DRYHURST, G.; MONKS, T.J. Role of quinones in toxicology. **Chem Res Toxicol.**, v.13, n.3, p.135-60, 2000.

BOOTHMAN, D.A.; TRASK D.S.; PARDEEA. B. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by β -lapachone, an activator of topoisomerase I. **Cancer Research**, v.49, p. 605-612.1989.

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.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v.20, n.4, p.245-254, 2005.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J. Bras. Patol**, v.45, n.4, p. 325-334, 2009.

BRONDANI, D.J.; SILVA FILHO, A.A.; LEITE, A.C.L.; NASCIMENTO, C.R.M.; ROLIN NETO, P.J.; BIEBER, L.W. Síntese e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Análogos da Primina 5 e 6 Alquil-Substituídos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 217-21, 2003.

CAVALCANTI, B.C.; CABRAL, I.O.; RODRIGUES, F.A.R.; BARROS, F.W.A.; ROCHA, D.D.; MAGALHÃES, H.I.F.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P.; CARVALHO, T.S.C., MORAES, M.O.; PESSOA, C.; MELO, I.M.M; SILVA JÚNIOR, E.N. Potent antileukemic action of naphthoquinoidal compounds: evidence for an intrinsic death mechanism based on oxidative stress and inhibition of DNA repair. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.24, n.1, p.145-163, 2013.

CHATTERJEE, S.; PODUVAL, T.B.; TILAK, J.C.; DEVASAGAYAM, T.P. A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*). **Clin Chim Acta**, v.352, n.1-2, p.155-63, 2005.

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

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, p.159–175, 2009.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.143-151, 2008.

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A. Conformational constraints in nuclear DNA. **J. Cell Sci**, v.22, p.287-302, 1976.

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A. Spectrofluorometric Measurement of the Binding of Ethidium to Superhelical DNA from Cell Nuclei. **Eur. J. Biochem.**, v.84, p.465-477, 1978.

CORRÊA, M. Pio. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Volume IV. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

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

COSTA, E.S.S.; DOLABELA, M.F.; PÓVOA, M.M.; OLIVEIRA, D.A.; MÜLLER, A.H. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.4, p. 834-838, 2009.

COSTA, F.G.C; NUNES, F.C.P.; PERES, V. Mapeamento etnofarmacológico e etnobotânico de espécies de cerrado, na microrregião de Patos de Minas. **Perquirere. Patos de Minas: UNIPAM**, n. 7, v. 2, p. 93-111, 2010.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. **Revista Matéria**, v. 12, n. 1, p. 134 – 139, 2007.

DOLABELA, M.F 1997. **Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti *Trypanosoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Minas Gerais, 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 1997.

DOLABELA, M.F 2007. **Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *Essenbeckia febrifuga* (A.St.Hil.)Juss. Ex Mart. (Rutaceae) e espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae)**. Minas Gerais, 181f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2007.

DUBIN, M.; FERNANDEZ VILLAMIL, S.H.; STOPPANI, A.O. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450-catalyzed reactions by β -lapachone and related naphthoquinones. **Biochem. Pharmacol.**, v. 39, p. 1151–1160. 1990.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.191–205, 2008.

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.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29-36, 1985.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v. 392, p.11–18, 1997.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p.81–95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v. 600, p.58-66, 2006.

FERNANDES, R.A; CHAVAN, V.P.; INGLE, A.B. A short enantioselective synthesis of (+)-eleutherin, (+)-allo-eleutherin and a formal synthesis of (+)-nocardione B. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 6341–6343, 2008.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.

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.

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. **Sistematic Botany**, v. 33, n. 3, p. 495-508, 2008.

GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica *in vitro* de produtos naturais**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 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.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1ª edição. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. p. 247-279.

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.

HARTUNG, T.; DASTON, G. Are in vitro tests suitable for regulatory use? **Toxicological Sciences**, v. 111, n. 2, p. 233-237, 2009.

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.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTÊS, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; BENEDITO FILHO, P.D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

IFESAN, B.O.T.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Effect of *Eleutherine Americana* Merr. Extract on enzymatic activity and enterotoxin production os *Staphylococcus aureus* in broth and cooked pork. **Foodborne Pathogens and disease**, v. 6, n. 6, 699-704, 2009.

JINZHONG, X.; FENG Q.; WENJUAN, D.; GEXIA, Q.; NAILI, W.; XINSHENG, Y. New bioactive constituents from *Eleutherine americana*. **Front. Chem. China** v. 3, p. 320–323, 2006.

KEEPERS, Y.P.; PIZAO, P.E.; PETERS, G.J.; ARK-OTTE, J.; WINOGRAD, B.; PINEDO, H.M. Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTT) Assays for *in vitro* Chemosensitivity Testing. **Eur J Cancer**, v. 27, n. 7, p.897-900, 1991.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL M.; MERSCH-SUNDERMANN V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v.402, n.1-2, p.185-202, 1998.

KOMURA, H.; MIZUKAWA, K.; MINAKATA, H.; HUANG, H.; QIN, G.; XU, R. New anthraquinones from *Eleutherine americana*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 31, n.11, p. 4206-4208, 1983.

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, α Lapachone, and β Lapachone. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1367–1379, 2000.

KUMAR, M.R.; AITHAL, K.; RAO, B.N.; UDUPA, N.; RAO, B.S. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicol In Vitro**. v.23, n.2, p.242-250, 2009.

LAOHAVECHVANICH P, MUANGNOI C, BUTRYEE C, KRIENGSINYOS W. Protective effect of makrut lime leaf (*Citrus hystrix*) in HepG2 cells: Implications for oxidative stress. **ScienceAsia**, v.36, p.112-117, 2010.

LAU, A. H. **Avaliação múltipla do potencial genotóxico da população urbana de Porto Alegre-RS**. 2002. 139f. Tese (Doutorado em Genética e biologia molecular) – Departamento de genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2002.

LEE, S.; XIAO, C.; PEI, S. Ethnobotanical survey of medicinal plants at periodic markets of Honghe Prefecture in Yunnan Province, SW China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 362–377, 2008.

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.

LIKHITWITAYAWUID, A.J.M. The taxonomic position of some genera in the Loganiaceae, Apocynaceae and Rubiaceae, related families which contain indole alkaloids. In J.D. Phillipson e M.H. Zenk. **Indole and bioenesgetically related alkaloids**. Editora: Academia Press, cap. 1, p.1-9,1980.

LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; MACHADO, M.P. SILVA, E & PINTO, G.P. Primeiras observações sobre a ação antimicrobiana do lapachol. **Separata dos Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco**, v.14, n.1/2, p. 129 – 135, 1956.

LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; LIMA, C.G.; MAIA, M.H.D. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores - Comunicação XX: atividade antimicrobiana de alguns derivados do lapachol em comparação com a xiloidona, nova ortonaftoquinona natural isolada de extratos do cerne do Pau d'Arco rôxo, *Tabebuia avellanadae* Lor. Ex Griseb. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 4, n. ½, p. 03 – 17, 1962.

LIN, C.H.; HUANG, C.C.; WANG, T.W.; WANG, Y.J.; LIN, P.H. Disparity in the induction of glutathione depletion, ROS formation, poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, and apoptosis by quinonoid derivatives of naphthalene in human cultured cells. **Chem Biol Interact**, v.165, n.3, p.200-210, 2007.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**. Flórida: CRC Press, 2000, 374p.

LOTZE, M.T.; THOMSON, A.W. **Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice**. 1ª ed. Elsevier Science. London: p. 344-346, 2005.

LOVELL, D.P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.171–182, 2008.

MACHADO, A. A. **Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae)**. 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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.

MARKAKIS, P. **Stability of anthocyanins in foods**. In: MARKAKIS, P. (Ed.) *Anthocyanins as Food Colors*. New York: Academic Press, 1982, p. 163-180.

MARTINS, A.G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.86, n.1, p.21-30, 2005.

MERSCH-SUNDERMANN, V; KNASMÜLLER, S.; WU, X.J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, v.198, n.1-3, p.329-340, 2004.

MIYAKE, T. **Métodos de Extração e Fracionamento de Extratos Vegetais**. In: Universidade Estadual de Ponta Grossa, Santa Catarina. Disponível em: <<http://www.uepg.br/fitofar/dados/tecnicasextrativas.pdf>> Acesso em: 23 abr. 2013.

MONTENEGRO RC, ARAÚJO AJ, MOLINA MT, MARINHO FILHO JD, ROCHA DD, LOPÉZ-MONTERO E, GOULART MO, BENTO ES, ALVES AP, PESSOA C, DE MORAES MO, COSTA-LOTUFO LV. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. **Chem Biol Interact.** v. 184, n. 3, p:439-48, 2010.

MORRISON, R. K.; BROWN, D. E.; OLESON, J. J. COONEY, D. A. Oral toxicology studies with lapachol. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 17, p. 01 – 11, 1970.

MOSMANN, T. Rapid colorimetry assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTA, T.C.; CARDOSO, P.C.; GOMES, L.M.; VIEIRA, P.C.; CORRÊA, R.M.; SANTANA, P.D.; MIRANDA, M.S.; BURBANO, R.M.; BAHIA, M.O. *In vitro* evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of artesunate, an antimalarial drug, in human lymphocytes. **Environmental and molecular mutagenesis**, v.52, p. 590-594. 2011.

MOUSCHEN, J. Introduction, IN: **Introduction to Genetic Toxicology**, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brismade, Toronto and Singapore, p.11-15, 1985.

NRC. U.S. National Research Council. **Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy**. Washington, DC: The National Academies Press. 2007.

NAVARRO, D. **Estudo Químico, Biológico e Farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico**. 2005. 293f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

NEVES, A.P.; PEREIRA, M.X.; PETERSON, E.J.; KIPPING, R.; VARGAS, M.D.; SILVA-JR, F.P.; CARNEIRO, J.W.; FARRELL, N.P. Exploring the DNA binding/cleavage, cellular accumulation and topoisomerase inhibition of 2-hydroxy-3-(aminomethyl)-1,4-naphthoquinone Mannich bases and their platinum(II) complexes. **J Inorg Biochem.**, v.119, p.54-64, 2013.

NORPPA, H.; FALCK, G.C. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**. v.18, n.3, p.221-233, 2003.

O'BRIEN, P.J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chem.-Biol. Interactions**, v.80, p.1 – 41, 1991.

OCHI, T. Menadione causes increases in the level of glutathione and in the activity of γ -glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells. **Toxicology**, v.112, p.45-55, 1996.

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.

OLIVEIRA NETO, A. R.; PINTO, M. A.; SILVA, I.R.; MORAES, S.C.; GOMES, M.L. O uso de *Eleutherine plicata* no tratamento de doenças gastrointestinais na Amazônia paraense. In: Congresso de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu – MG. **Anais**, Caxambu – MG, 2007.

OSADA, N.; KOHARA, A.; YAMAJI, T.; HIRAYAMA, N.; KASAI, F.; SEKIZUKA, T.; KURODA, M.; HANADA, K. The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. **DNA Res.** v. Sep 28, p.1-11, 2014.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Res. Commun.**, v.123, n.1, p. 291-298, 1984.

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.

PERCÁRIO, S. **Prevenção de aterosclerose em suplementos antioxidantes**. São José do Rio Preto. Tese (livre-docente em Ciências Biológicas)- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 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.

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.

RAHMATULLAH, M., HOSSAN, S., HANIF, A., ROY, P., JAHAN, R., KHAN, M., CHOWDHURY, M. H., RAHMAN, T. Ethnomedicinal Applications of Plants by the Traditional Healers of the Marma Tribe of Naikhongchhari, Bandarban District, Bangladesh. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 392-401, 2009.

RAO, K.V.; MCBRIDE, T.J. OLESON, J.J. Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor Agent. **Cancer Research**, v. 28, p.1952 – 1954, 1968.

REITER, C.D.; TENG, R.J.; BECKMAN, J.S. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 32460-32466, 2000.

REEVES, G.; CHASE, M. W.; GOLDBLATT, P.; RUDALL, P.; FAY, M. F.; COX, A. V.; LEJEUNE, B.; CHIES, T. S. Molecular systematics of Iridaceae: Evidence from four plastid DNA regions. **American Journal of Botany**, v.88, n.11, p.2074–2087, 2001.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDAB, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.6, n3, p.317-320, 2003.

SANTANA, C. F.; LIMA, O.G. D'ALBUQUERQUE, I.L.; LACERDA, A.L.; MARTINS, D.G. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do Pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 8, n,1-2, p. 89 – 94, 1968.

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.

SARGENT, J.M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. **Recent Results Cancer Res**, v. 161, p. 13-25, 2003.

SHADYRO, O.I.; SOSNOVSKAYA, A.A.; EDIMECHEVA, I.P.; OSTROVSKAYA, N.I.; KAZEM, K.M.; HRYNTSEVICH, I.B.; ALEKSEEV, A.V. Effects of quinones on free-radical processes of oxidation and fragmentation of hydroxyl-containing organic compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.17, n.22, p.6383–6386, 2007.

SHIBUYA, H.; FUKUSHIMA, T.; OHASHI, K.; NAKAMURA, A.; RISWAN, S.; KITAGAWA, I. Indonesian medicinal plants.20. Chemical structures of eleuthosides A, B, and C, three new aromatic glucosides from the bulbs of *Eleutherine palmifolia* (Iridaceae). **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, p. 1130-1134, 1997.

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, 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, 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.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, p. 184-91, 1988.

SIVAKUMAR, V.; PRAKASH, R.; MURALI, M.R.; DEVARAJ, H.; NIRANJALI DEVARAJ, S. *In Vivo* Micronucleus Assay and GST Activity in Assessing Genotoxicity of Plumbagin in Swiss Albino Mice. **Drug Chem Toxicol.**, v.28, n.4, p.499-507, 2005.

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.

SUHYUN, S.; HYEYOUNG, M.; AHREUM, H.; JOOWON, N.; EUNKYOUNG, S.; SEOUNGWOO, P.; SANGHYUNG, L.; SANGKOOK, L. Remove from marked Records Suppression of inducible nitric oxide synthase by (-)-isoeleutherin from the bulbs of *Eleutherine americana* through the regulation of NF- κ B activity. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 3, p. 298-302. 2009.

TEFEREDEGNE, B.; MACAULEY, J.; FOSEH, G.; DRAGUNSKY, E.; CHUMAKOV, K.; MURATA, H.; PEDEN, K.; LEWIS JR, A.M. MicroRNAs as potential biomarkers for VERO cell tumorigenicity. **Vaccine**, v.32, p.4799–4805, 2014.

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.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; TEIXEIRA, D.; PRADO, F.O.; CALIXTO, I.A.R.L.; LORENZI, H.; MELHEM, M.S.C. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.103, n.5, p.443-449, 2008.

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.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206 –221, 2000.

VEIGA, A. S. **Atividade antileishmaniana de plantas da Amazônia**. 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.

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

VIEIRA, F.M.A.C.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; MORENO, S.L; CARVALHO, C.F.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PÁDUA, V.L. avaliação do potencial citotóxico e mutagênico do clorofórmio. **XXVIII Congresso interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Cancún, México, 2002.

VINSON, J.A.; JANG, J.; YANG, J.; DABBAGH, Y.; LIANG, X.; SERRY, M.; PROCH, J.; CAI, S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful *in vitro* antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after *ex vivo* spiking in human plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2502-2504, 1999.

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

WANICK, M.C.; BANDEIRA, J.A. FERNANDES, R.V. Ação antiinflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico do líber do pau d'arco rôxo (*Tabebuia avellanedae*) em pacientes portadoras de cervicites e cérvico-vaginites. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.10, n.1-2, p. 41 – 46, 1970.

WRIGHT, C.W.; ALLEN, D.; PHILLIPSON, J.D.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; MAISSOT, G.; MEN-OLIVER, L.L. Alstonia species: are they effective in malaria? **Journal Ethnopharmacology**, v.40, p. 41-45, 1993.

WRIGHT, C.W.; ALLEN, D.; CAI, Y.; CHEN, Z.; PHILLIPSON, J.D.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; TITS, M.; ANGENOT, L. Selective antiprotozoal activity of the Strychnos alkaloids. **Phytotherapy Research**, v.8, p. 149-152, 1994.

ZHENGXIONG, C.; HUIZHU, H.; CHENGRUUI, W.; YUHUI, L.; JIANMI, D.; SANKAWA, U.; NOGUCHI, H.; IITAKA, Y. Hongconin, a new naphthalene derivative from Hong-Cong, the rhizome of *Eleutherine americana* Merr. Et Heyne. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.34, n7, p. 2743–2746, 1986.