

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMODIFICADOR DE SUBSTÂNCIAS
LIQUÊNICAS**

(DEFESA DE DISSERTAÇÃO)

FELIPE TIAGO JOSÉ DOS SANTOS

Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria M. de Albuquerque Melo

Recife, PE
Outubro, 2013

FELIPE TIAGO JOSÉ DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMODIFICADOR DE
SUBSTÂNCIAS LIQUÊNICAS**

Defesa de Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria M. de Albuquerque Melo

Recife, PE

Outubro, 2013

Catálogo na fonte
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

- S237a Santos, Felipe Tiago José dos.
Avaliação do efeito radiomodificador de substâncias
líquênicas. / Felipe Tiago José dos Santos. - Recife: O Autor,
2013.
57 f. : il., gráfs., tabs.
- Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva.
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria M. de A. Melo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em
Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2013.
Inclui referências bibliográficas.
1. *Biomphalaria glabrata*. 2. Ácido barbático.
3. Ácido úsnico. 4. Atranorina. 5. Radiomodificação.
6. Radiossensibilização. I. Silva, Edvane Borges da
(orientadora). II. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque
(coorientadora). III. Título.
- CDD 571.45 (21. ed.) UFPE
BDEN/2013-26

AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMODIFICADOR DE SUBSTÂNCIAS LIQUÊNICAS

Felipe Tiago José dos Santos

APROVADO EM: 08.10.2013

ORIENTADORA: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Claudia Sampaio de Andrade Lima – Biofísica e Radiobiologia/UFPE

Prof. Dr. Francisco Fernandes Amâncio – Biofísica e Radiobiologia/UFPE

Profa. Dra. Mônica Cristina Barroso Martins – Bioquímica/UFPE

Visto e permitida a impressão

Coordenadora(o) do PROTEN/DEN/UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família, em especial aos meus pais: Amaro (*in memorian*) e Jarina, e Sylvio e Walderes, pelo valioso exemplo de vida, minhas maiores riquezas.

À minha namorada Gerlane, meu filho Mateus e ao meu sobrinho Gabriel por toda dedicação e carinho.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo pelos preciosos esclarecimentos, dedicação e pela amizade.

À Prof^a. Dr^a. Edvane Borges da Silva pela confiança, empenho e pela amizade.

Ao meu amigo para todas as horas, Williams Nascimento de Siqueira, pelo apoio e companheirismo.

Aos amigos do laboratório: Edvaldo, Hianna, Juanna, Luanna, Luís, Máira e Mariana.

RESUMO

Os efeitos danosos da radiação podem ser minimizados por substâncias radioprotetoras, ou podem ser potencializados por substâncias radiosensibilizadoras sendo estas substâncias denominadas radiomodificadores. O estudo de substâncias com estes potenciais pode conduzir a entre outras possibilidades, oferecer melhor proteção a trabalhadores ocupacionalmente ou acidentalmente expostos às radiações ionizantes, bem como na utilização terapêutica (quimiorradioterapia) em pacientes. Os líquens e seus metabólitos secundários têm apresentado atividade que estão relacionadas com a capacidade radiomodificadora. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação radiomodificadora do ácido barbático, ácido úsnico e atranorina extraídos dos líquens *Cladonia salzmanni* Nyl, *Cladonia substellata*, e *Cladonia kalbii*. A extração e purificação das substâncias liquênicas foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, UFPE. Foi realizado teste de toxicidade aguda com embriões de *Biomphalaria glabrata* no estágio de blástula afim de, determinar a toxicidade das substâncias liquênicas não irradiadas e irradiadas, bem como determinar a CL₅₀ das substâncias liquênicas não irradiadas. A cromatografia em camada delgada foi realizada para avaliar estabilidade das substâncias liquênicas submetidas à radiação gama, na dose de 4 Gy. Para avaliar a atividade antioxidante foi realizado o ensaio utilizando o radical DPPH. Posteriormente foi estimada a capacidade radiomodificadora das substâncias por meio da análise da toxicidade aguda, utilizando embriões de *B. glabrata* divididos nos seguintes grupos: Grupo controle, mantidos com água filtrada; Grupo controle-irradiado: primeiramente irradiados e depois mantidos com água; Grupo substância liquênica (1) onde os embriões foram primeiramente expostos as substâncias liquênicas em seguida submetidos a irradiação; e Grupo substância liquênica (2) onde os embriões foram submetidos a irradiação e posteriormente expostos as substâncias liquênica. Como resultado, foi obtido a CL₅₀ do ácido barbático de 242,7 µg/mL; do ácido úsnico igual a 1,3 µg/mL; a atranorina não apresentou toxicidade para o modelo experimental utilizado. As substâncias liquênicas irradiadas não apresentaram alteração na quantidade de embriões inviáveis quando comparado com as substâncias não irradiadas. As substâncias analisadas por meio do ensaio com o radical DPPH, não apresentaram atividade antioxidante. A avaliação da capacidade radiomodificadora das substâncias liquênicas demonstrou que a irradiação aumentou a quantidade de embriões inviáveis quando comparado com o grupo controle. Adicionalmente, foi observado que os embriões expostos ao ácido barbático (100,0 µg/mL) e ao ácido úsnico (0,6 µg/mL) antes da irradiação apresentaram uma quantidade de embriões inviáveis, maior do que o grupo controle irradiado. Os resultados sugerem que o ácido barbático e o ácido úsnico tornaram as células mais sensíveis aos efeitos danosos da radiação, ou seja, apresentaram ação radiosensibilizante.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*; ácido barbático; ácido úsnico; atranorina; radiomodificação; radiosensibilização.

ABSTRACT

The damaging effects of radiation can be avoided by radioprotective agent or can be potentiated by radiosensitizer agent, these substances are called radiomodifier. The importance of studying substances with this potential is the protection of workers exposed to radiation as well as use therapy (chemoradiotherapy) in patients. Lichens and their secondary metabolites have shown activity that is related to the ability radiomodifier. Therefore, the aim of this study was to evaluate the radiomodifying effect barbatic acid, usnic acid and atranorin extracted from lichens *Cladonia salzmanni* Nyl, *Cladonia substellata* and *Cladonia kalbii*. The extraction and purification of lichens substances was accomplished at the Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, UFPE. Acute toxicity test was conducted with embryos of *Biomphalaria glabrata* in the blastula stage in order to determine the toxicity of lichens substances non-irradiated and irradiated as well as determine the LC₅₀ of lichens substances non-irradiated. The thin layer chromatography was performed to assess the stability of lichen substances subjected to γ radiation at a dose of 4Gy. To evaluate the antioxidant activity test was performed using the DPPH radical. Later the radiomodifier capacity was estimated through the analysis of acute toxicity embryos of *B. glabrata* divided into the following groups: control group, maintained with filtered water; - irradiated control group: first, embryos was irradiated and then maintained with water; lichen substance group (1) where the embryos were first exposed lichens substances and then subjected to irradiation and lichen substance group (2) where the embryos were subjected to irradiation and subsequently exposed lichens substances. As a result was obtained, the LC₅₀ of barbatic acid of 242.7 $\mu\text{g/mL}$; usnic acid equal to 1.3 $\mu\text{g/mL}$, the atranorin showed no toxicity to the used experimental model, irradiated substances showed no change in the number of non-viable embryos when compared to non-irradiated substances. Substances analyzed using assay with DPPH showed no antioxidant activity. The radiomodifier assessing the ability of lichens substances shown that irradiation increased the amount of non-viable embryos when compared with the control group. Additionally, it was observed that embryos exposed to barbatic acid (100.0 $\mu\text{g mL}$) and usnic acid (0.6 $\mu\text{g/mL}$) before irradiation showed a quantity of non-viable embryos higher than the irradiated control group, the results suggest that usnic acid and barbatic acid cells become more sensitive to the damaging effects of radiation, ie showed radiosensitizer activity.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*; barbatic acid; usnic acid; atranorin; radiomodifier; radiosensitivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Aspectos morfológicos do talo líquênico.....	21
Figura 2 - Estrutura molecular do ácido barbático.	23
Figura 3 - Estrutura do ácido úsnico.	25
Figura 4 - Estrutura molecular da atranorina.....	27
Figura 5 - Embriões no estágio de blástula do desenvolvimento.	31
Figura 6 - Desovas no estágio de véliger do desenvolvimento.	32
Figura 7 - Representação esquemática da Cromatografia em Camada Delgada.....	41
Figura 8 - Embriotoxidade das substâncias líquênicas após irradiação.	42
Figura 9 - Efeito radiomodificador do ácido barbático a 50,0 µg/mL.....	43
Figura 10 - Efeito radiomodificador do ácido barbático a 100,0 µg/mL.	44
Figura 11 - Efeito radiomodificador do ácido úsnico.	45
Figura 12 - Efeito radiomodificador da atranorina.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Embriotoxidade do etanol.	36
Tabela 2 – Embriotoxidade Dimetilsulfóxido	36
Tabela 3 – Embriotoxidade Tween 80.	37
Tabela 4 – Toxicidade aguda do ácido barbático	38
Tabela 5 – Embriotoxidade do ácido úsnico.	39
Tabela 6 – Embriotoxidade da atranorina	39
Tabela 7 – Atividade antioxidante das substâncias liquênicas.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Radiação.....	13
2.1.1 Radiação ionizante	14
2.2 Interação da radiação γ com a matéria.....	15
2.2.1 Transferência Linear de Energia (LET)	16
2.2.2 Eficiência Biológica Relativa (RBE)	16
2.3. Radiomodificadores.....	17
2.3.1 Radioprotetores	17
2.3.2 Radiossensibilizadores	19
2.4 Líquens.....	20
2.5.1 Metabólitos líquênicos	22
2.5.1.1 Ácido barbático	23
2.5.1.2 Ácido úsnico.....	24
2.5.1.3 Atranorina.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Extração e obtenção das substâncias líquênicas.....	30
3.2 Animais experimentais	30
3.3 Teste de toxicidade aguda.....	31
3.4 Avaliação da toxicidade dos solventes sobre embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i>..	32
3.5 Análise da toxicidade aguda das substâncias líquênicas sobre embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i>	32
3.6 Determinação da atividade antioxidante das substâncias líquênicas.....	33
3.7 Análise da estabilidade das substâncias líquênicas após exposição à radiação ionizante.....	33

3.8 Avaliação da capacidade radiomodificadora das substâncias liquênicas sobre embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i>	34
3.9 Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Análise da toxicidade aguda para os solventes etanol, dimetilsulfóxido e Tween 80.	36
4.2 Análise da toxicidade aguda das substâncias liquênicas	37
4.3 Determinação da atividade antioxidante das substâncias liquênicas.....	40
4.4 Análise da estabilidade das substâncias liquênicas após exposição à radiação ionizante.....	41
4.5 Avaliação da capacidade radiomodificadora das substâncias liquênicas sobre embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i>	43
5. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

A radiação é caracterizada pela propagação de energia através do meio material ou no vácuo. Pode ocorrer por meio de mecanismos ondulatórios ou por emissão de partículas, a partir de um núcleo instável. Do ponto de vista físico as radiações podem ser classificadas em: corpusculares (partículas α , β e nêutrons), ou eletromagnéticas (Raios-X e radiação γ). Dependendo da energia da radiação e a forma de interação com a matéria, podem ser classificadas como: radiação não ionizante e radiação ionizante. As radiações ionizantes (radiação γ , Raios X) ao fornecerem energia para um elétron orbital possuem a capacidade de “arrancá-lo” do átomo formando assim um íon, a este fenômeno dá-se o nome de ionização (CEMBER; JOHNSON, 2008).

As consequências biológicas à exposição das radiações ionizantes dependem de uma série de fatores físicos, químicos, bioquímicos e celulares, iniciados após a absorção da radiação pelo sistema biológico (SUNTHARALINGAM et al., 2002). Nos organismos vivos a incidência de radiação ionizante pode comprometer o funcionamento de uma célula. Ao interagir com o sistema biológico ocorre frequentemente a formação de radicais livres que por serem instáveis e altamente reativos são considerados os principais responsáveis pelo dano celular provocado pela radiação. Na célula estes radicais podem interagir com a membrana plasmática, organelas e proteínas citoplasmáticas, bem como com a molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), levando a alterações celulares que poderão tornar-se irreversíveis, ocasionando mutações e até mesmo a morte celular caso não ocorra um reparo adequado (BITELLI, 2006; HUNT et al., 2013).

Atualmente as radiações ionizantes têm sido utilizadas em grande escala em diferentes áreas do conhecimento: I) Na medicina, por exemplo, é muito difundida a sua utilização para o radiodiagnóstico (ZRADZINSKI et al., 2013), e para a radioterapia (AHN et al., 2013); II) Na agricultura pode ser utilizada para irradiar defensivos agrícolas para diminuir sua toxicidade (BEN SALEM et al., 2013) e na irradiação de alimentos para aumentar o tempo de prateleira (HUSSAIN et al., 2012), IV) Na indústria, a radiação ionizante pode ser utilizada para acompanhamento do processo de fabricação e avaliação do controle de qualidade em metalúrgica (GIUGNI, 2012.).

Com o aumento da utilização da radiação surge o interesse e a necessidade de encontrar substâncias que possam modificar a resposta celular ao dano induzido pela radiação,

sendo estas substâncias denominadas de radiomodificadores e dependendo da aplicação podem proteger a célula do dano provocado pela radiação (radioprotetores), ou tornar as células mais sensíveis aos danos provocados pela radiação (radiossensibilizadores) (HOSSEINIMEHR, 2009).

Investigar substâncias de origem natural que possam desempenhar função radioprotetora ou radiossensibilizadora é de grande interesse, pois as mesmas podem apresentar menor toxicidade e maior eficácia (TUNG-KWANG et al., 2010). Dentre as substâncias de origem natural, estudadas atualmente, podemos ressaltar as substâncias liquênicas. Particularmente as substâncias provenientes de seu metabolismo secundário, pois diferentes estudos têm demonstrado que essas substâncias possuem diversas atividades biológicas, como: antibacteriana, antifúngica, antiviral, inseticida, anti-helmíntico, anti-inflamatória, além de propriedades que possivelmente estão diretamente relacionadas com mecanismos radiomodificadores como atividade antiproliferativa, fotoproteção e antioxidante (SEGATORE et al., 2012; PIRES et al., 2011; SOKOLOV et al., 2012; CETIN et al., 2011; LAUINGER et al., 2013; VIJAYAKUMAR et al., 2000; EINARSDÓTTIR et al., 2010; KOHLHARDT-FLOEHR et al., 2010; MANOJLOVIC et al., 2012; ODABASOGLU et al., 2006).

Tendo em vista as propriedades atribuídas às substâncias liquênicas, nos propusemos a avaliar a ação radiomodificadora do ácido barbático, ácido úsnico e atranorina extraídos dos líquens *Cladonia salzmanni* Nyl, *C. substellata*, e *C. kalbii*; com os objetivos específicos de:

- Obter os extratos orgânicos a partir do talo *in natura* dos líquens *Cladonia salzmanni* Nyl, *C. substellata*, e *C. kalbii*, por meio de extrações sucessivas com solventes;
- A partir do extrato bruto dos líquens *Cladonia salzmanni* Nyl, *C. substellata*, e *C. kalbii*, isolar e purificar os ácidos barbático, úsnico e atranorina;
- Analisar a toxicidade aguda sobre embriões de *Biomphalaria glabrata* dos solventes: etanol, dimetilsulfóxido e Tween 80 e determinar a melhor concentração a ser utilizada para dissolver as substâncias liquênicas;
- Realizar testes de toxicidade aguda, em embriões de *B. glabrata* para determinar a CL₅₀ das substâncias liquênicas e obter a concentração com menor toxicidade, para o teste de radiomodificação;

- Avaliar a atividade antioxidante das substâncias liquênicas, por meio da captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH);
- Determinar a estabilidade das substâncias liquênicas após exposição à radiação ionizante através da análise de cromatografia em camada delgada e avaliação da atividade biológica da substância liquênica irradiada através teste de toxicidade aguda;
- Analisar a ação radiomodificadora do ácido barbático, ácido úsnico e atranorina, sobre embriões de *Biomphalaria glabrata*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Radiação

A propagação de energia de um ponto a outro, tanto no vácuo como em um meio material é conhecida como radiação. Pode ser produzida por meio de um rearranjo de elementos presentes no núcleo ou nas camadas eletrônicas, bem como da interação de outra radiação com o átomo. As radiações podem ser classificadas - quanto a sua natureza - em corpusculares, partículas α , β e nêutrons; ou eletromagnéticas, luz visível, ultravioleta, infravermelho, Raio-X e radiação γ . No que diz respeito à radiação eletromagnética, esta é definida como uma energia que se propaga na forma de campos elétricos e magnéticos oscilantes (ondas eletromagnéticas). De acordo com estudo teórico desenvolvido por James Clerk Maxwell, em 1873, foi possível demonstrar a relação existente entre duas grandezas, frequência e comprimento de onda, que caracterizam a onda eletromagnética, de acordo com a equação a seguir (Eq. 1) (CEMBER; JOHNSON, 2008):

$$c = \lambda \cdot f \text{ (Eq. 1)}$$

Onde: c = velocidade da luz;

f = frequência

λ = comprimento de onda.

A radiação γ é caracterizada por apresentar um pequeno comprimento de onda e alta frequência, quando comparado com as outras radiações eletromagnéticas como, ultravioleta e infravermelho; proporcionando desta forma uma capacidade de ionização, além de um alto poder de penetração. A radiação eletromagnética ao interagir com a matéria pode ainda se comportar como uma partícula, sendo a energia da onda eletromagnética caracterizada como um fóton e para expressar esse fenômeno foi determinado por Max Planck a seguinte fórmula (Eq. 2):

$$E = h \cdot f \text{ (Eq. 2)}$$

Onde: E = energia;

h = constante de Plank;

f = frequência.

A radiação também pode ser classificada de acordo com a sua energia e a forma como interage com a matéria em: i) **radiação não ionizante**, quando a energia interage com os elétrons dos átomos provocando excitação dos mesmos, ou seja, deslocando-os de sua camada de origem para uma camada mais externa e posterior retorno deste elétron para a camada de origem, ocasionando liberação de energia; e ii) **radiação ionizante**, quando possui energia capaz de retirar elétrons de átomos, formando consequentemente íons (ALPEN, 1998; TURNER, 2007).

2.1.1 Radiação ionizante

Radiações ionizantes são aquelas que possuem energia maior que a energia de ligação do elétron com o núcleo do átomo, ou seja, apresenta a possibilidade de retirar elétrons de átomos, formando assim os íons. São exemplos deste tipo de radiação: partículas α , partículas β , nêutrons, raios X e radiação γ , ou seja, tanto as radiações corpusculares, como as eletromagnéticas podem apresentar esta característica. Dentre essas radiações podemos destacar a radiação γ , que além de possuir a capacidade de ionizar moléculas, apresenta um alto poder de penetração (ALPEN, 1998; CEMBER; JOHNSON, 2008).

No sistema biológico a incidência de radiação ionizante promove dano celular por meio de dois mecanismos: direto ou indireto. O mecanismo direto corresponde à deposição da energia da radiação ionizante diretamente nas moléculas alvo, como lipídios, proteínas, ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA), provocando alterações que muitas vezes não podem ser reparadas. No mecanismo indireto, a radiação ao interagir com moléculas de água provoca ionização ou lise das mesmas (processo denominado radiólise da

água), ocorrendo desta forma, a produção de radicais livres que podem interagir com as biomoléculas causando dano celular. Os radicais livres são moléculas altamente reativas, pois apresentam um elétron na camada de valência não pareado (SHIRAZI et al., 2007; DARTNELL, 2011).

Os principais produtos da radiólise da água são: elétrons livres hidratados (e^-_{aq}); radical hidroxil ($OH^\bullet$); radical hidrogênio ($H^\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A vida média desses radicais é extremamente curta (10^{-6} a 10^{-10} segundos) (BITELLI, 2006; SHIRAZI et al., 2007; DARTNELL, 2011).

2.2 Interação da radiação γ com a matéria

A radiação γ ao interagir com a matéria orgânica, dependendo do número atômico do material absorvedor e da energia do fóton incidente, pode dar origem a 3 efeitos: efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares.

1) No efeito fotoelétrico a energia da radiação (ou fóton incidente) é totalmente transferida para um elétron ligado a um átomo, provocando a sua ejeção da camada eletrônica;

2) No efeito Compton ocorre uma interação da radiação com um elétron de baixa energia de ligação este é ejetado e o fóton incidente é espalhado perdendo energia e alterando a sua direção;

3) Na produção de pares, o fóton (com energia superior a 1,022 MeV) ao passar próximo ao núcleo atômico interage com o campo elétrico dando origem a um par elétron-pósitron (ALPEN, 1998; TAUHATA et al., 2003).

A interação do fóton de radiação γ irá produzir elétrons de alta energia. Esses elétrons irão se mover através do tecido produzindo radicais livres, que por sua vez serão responsáveis pela quebra de ligações químicas, como na molécula de DNA cujas alterações irão resultar no dano celular (SUNTHARALINGAM et al., 2002).

A quantidade de radiação necessária para provocar determinado dano celular é um evento probabilístico, porém foram desenvolvidos fatores que possam estimar este dano. A Transferência Linear de Energia (do inglês “Linear Energy Transfer” - LET) é um importante fator para estimar, indiretamente, a resposta celular, pois através desta pode-se mensurar a quantidade de energia depositada pela radiação ao interagir com o sistema biológico em

determinado comprimento de tecido. Outro importante fator que está diretamente relacionado com o LET e é utilizado para estimar a resposta celular ao dano provocado pela radiação é a Eficiência Biológica Relativa (do inglês “Relative Biological Effectiveness” – RBE) (TURNER, 2007).

2.2.1 Transferência Linear de Energia (LET)

O LET é a quantidade de energia da radiação transferida para um meio material (dE), avaliada por unidade de comprimento da trajetória da radiação (keV/μm).

$$\text{LET} = \frac{\text{ENERGIA MEDIA CEDIDA}}{\text{ESPAÇO PERCORRIDO}} \quad \Longrightarrow \quad \text{LET} = \frac{dE}{dX}$$

O LET está diretamente relacionado com a probabilidade de ocorrer interação da radiação com o organismo. As radiações corpusculares (radiação α e β) são as que apresentam alto LET quando comparadas com as radiações eletromagnéticas (radiação γ). O alto valor do LET está relacionado, com a maior probabilidade de interação, além de uma rápida perda de energia para o meio, bem como numerosa produção de ionizações em uma distância curta (SUNTHARALINGAM et al., 2002).

2.2.2 Eficiência Biológica Relativa (RBE)

É definida pela razão D_x/D , onde D_x é a dose de Raio-X necessária para produzir um determinado nível de resposta e D a dose de radiação necessária para produzir igual resposta, considerando todas as variáveis tanto física como biológica, constantes (CEMBER; JOHNSON, 2008).

2.3. Radiomodificadores

A utilização de substâncias químicas para proteção contra os efeitos danosos da radiação começou a ter maior atenção após a segunda guerra mundial. Patt et al (1949), foram os primeiros a investigar os efeitos do aminoácido cisteína em ratos expostos a uma dose letal de raio-X. Atualmente, os estudos estão voltados a pesquisas que auxiliem na proteção dos indivíduos contra os efeitos danosos da radiação, bem como no combate a células cancerígenas sendo, portanto denominadas radiomodificadores.

Os radiomodificadores podem ser classificados em: **radioprotetores**, substâncias que possuem a capacidade de proteger as células dos efeitos danosos da radiação ou **radiossensibilizadores** que possuem a capacidade de tornar as células suscetíveis aos efeitos danosos da radiação. Estas substâncias são importantes fontes de estudo, uma vez que apresentam importantes aplicações na prática clínica, tanto na proteção de trabalhadores expostos a radiação, como na proteção ou utilização terapêutica (quimiorradioterapia) em pacientes (HOSSEINIMEHR, 2007; RALEIGH; HAAS-KOGAN, 2013).

2.3.1 Radioprotetores

Os radioprotetores são substâncias que possuem a capacidade de proteger o tecido vivo ou pelo menos, diminuir os danos a eles causados pela radiação. Gerschman et al (1954), demonstraram que o mecanismo de lesão celular provocada pela interação da radiação com o sistema biológico ocorre por meio da produção de espécies reativas de oxigênio.

Como citado anteriormente, a radiação ionizante, ao interagir com o sistema biológico irá produzir radicais livres, que irão agir sobre os constituintes celulares, danificando-os, podendo agir sobre os lipídeos de membrana, causando a peroxidação lipídica ou atuando sobre as ligações químicas de proteínas, resultando em oxidação das mesma. Pelo fato do dano celular ser atribuído, principalmente, aos efeitos lesivos dos radicais livres (em torno de 60 a 70% do dano), as substâncias com propriedade de capturar esses radicais, ou seja, aquelas que possuem atividade antioxidante são consideradas promissores compostos radioprotetores (WEISS; LANDAUER, 2000).

São demonstrados na literatura diversos compostos, como as vitaminas A, E e C, os flavonoides e os compostos fenólicos, que possuem ação antioxidante, portanto promissores

agentes radioprotetores (KUMAR et al., 2002; SONGTHAVEESIN et al., 2004). O mecanismo de ação desses compostos, não está completamente elucidado, porém estudos sugerem que a nível molecular, além da captura de radicais livres, esses compostos fornecem ainda átomos de hidrogênio, além de participar na formação de dissulfeto misto (COPELAND, 1978).

Arora et al (2005), propôs mecanismos fisiológicos e bioquímicos que estão relacionados com a radioproteção, como as propriedades antiheméticas, antiinflamatórias, antibacteriano, quelante, estimulante do sistema imunológico e hematopoiético, ou seja, substâncias que apresentem estas características juntamente com uma atividade antioxidante, possuem grande potencial de serem radioprotetoras eficientes.

O desenvolvimento de radioprotetores efetivos, e fármacos utilizados para recuperação após radiação têm grande importância, devido sua potencial aplicação em exposição à radiação planejada, radioterapia, por exemplo, ou naquela não planejada como na indústria nuclear (ARORA et al., 2005).

Entre as substâncias radioprotetoras o WR-2721 [ácido S-2-(3 aminopropilamino) etilfosforotioico], também conhecido como amifostina, é a droga mais estudada, desenvolvida no Walter Reed Army Institute of Research, nos EUA, no “antiradiation drug development program”(Programa de desenvolvimento de drogas antirradiação) do exército americano. O WR-2721, Azul da Prússia, Ca-DTPA, Zn-DTPA e iodeto de potássio, são os únicos compostos aprovados pela Administração de Alimentos e Drogas dos EUA (FDA). Estudos têm demonstrado que essas substâncias, largamente utilizadas atualmente como radioprotetores, possuem efeitos adversos graves, como náusea, vômito, hipotensão, hipocalcemia, infecção por bactéria e febre, em doses clinicamente efetivas, além de possuírem alta hepatotoxicidade e neurotoxicidade (SOUZA et al., 2000). Além disso, o WR-2721 é efetivo somente quando administrado intravenosamente ou subcutâneamente, o que limita a sua utilização fora das situações clínicas controladas.

Até o presente momento, não existe um agente que preencha todos os requisitos para ser considerado um radioprotetor ideal, isto é, que não produza toxicidade e ofereça proteção por longo período, tenha uma vida de prateleira de 2 a 5 anos e possa ser facilmente administrado (COLEMAN; TURRISI, 1990). Tendo isso em vista, continua a procura por agentes radioprotetores novos, menos tóxicos e mais eficazes.

Estudos têm apontado que substâncias obtidas de líquens possuem diversas atividades biológicas dentre elas as de maior importância para um radioprotetor, como: anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, bem como atividade antioxidante (GULÇIN et al., 2002; ODABASOGLU et al., 2005).

2.3.2 Radiossensibilizadores

Tem sido estudada por diversos pesquisadores, nos últimos 20 anos, a utilização de substâncias quimioterápicas na radioterapia, no tratamento de diversos tumores (SAZGARNIA et al., 2013). Foram identificadas substâncias quimioterápicas que aumentam a sensibilidade das células à radiação, estas foram denominadas radiossensibilizadores. Os radiossensibilizadores podem atuar pelo mecanismo de afinidade eletrônica, ligando-se aos tióis, bem como podem ligar-se diretamente a molécula de DNA (BRABEC; NOVÁKOVÁ, 2006; HARTINGER et al., 2008). Adicionalmente, Folkes e Neill (2013) utilizando células V79-4, irradiadas e submetidas a anoxia, demonstraram que o óxido nítrico, contribui para a radiossensibilização da célula, por meio de danos ao DNA.

Adams e Cooke (1969) demonstraram que algumas substâncias possuem a capacidade de mimetizar o efeito do oxigênio e isto está diretamente relacionado a afinidade eletrônica, onde recebe destaque o nitroimidazol. Após a descoberta deste composto diversos estudos clínicos foram realizados, no entanto, os resultados não foram satisfatórios, uma vez que a biodisponibilidade desta droga é pequena, ou seja, após a administração seu nível plasmático é baixo, além disso, apresenta como efeito adverso a neurotoxicidade (RIDDER et al., 2008).

Outro mecanismo proposto em que os radiossensibilizadores podem agir é através da inibição do receptor do fator do crescimento epidermal (do inglês “epidermal growth factor receptor” – EGFR) onde é observado a capacidade de tornar células tumorais mais sensíveis à radiação, esta é a via pela qual age a substância radiossensibilizadora utilizada atualmente denominada cetuximabe (BONNER et al., 2006).

O 5-Fluoracil é um radiossensibilizador comumente usado no tratamento de tumores, sendo uma substância inibidora da enzima timidilato sintase, cuja inibição irá diminuir os níveis de timidina 5'-monofosfato (TMP) e timidina 5'-trifosfato (TTP) e consequentemente interferir na síntese do DNA, além de incorporar na molécula de RNA degradando-a (GREM, 2000).

Outro fármaco comumente utilizado no tratamento tumoral é a cisplatina. A utilização desta substância concomitantemente com a radioterapia, proporciona um aumento na quantidade de intermediários tóxicos na presença de radicais livres gerados pela radiação, e inibição do reparo da molécula de DNA (TIPPAYAMONTRI et al., 2013).

O tratamento com drogas radiosensibilizadoras apresenta sucesso terapêutico limitado, pois é sabido que algumas drogas utilizadas para auxiliar o tratamento radioterápico apresentam alta toxicidade e baixa especificidade (NELIUS et al., 2010; XU et al., 2012).

2.4 Líquens

Líquens são seres que constituem um parasitismo controlado de um organismo composto por um fungo (micobionte), aclorofilado e heterotrófico e um ou mais participantes clorofilados, portanto, fotossintéticos (fotobionte), que pode ser alga verde ou cianobactéria (COCCHIETTO et al., 2002). Esta natureza simbiótica é amplamente discutida, pois há aqueles pesquisadores que consideram os líquens como um caso clássico de mutualismo. Por outro lado a maioria dos estudos considera esta relação como um exemplo de parasitismo controlado por parte dos micobiontes, uma vez que estes se alimentam dos nutrientes gerados pelos fotobiontes; outro fator que dá suporte a este embasamento é que as algas ou cianobactérias crescem mais lentamente no estado liquenizado do que no estado de vida livre (AHMADJIAN, 1993). O micobionte proporciona ao fotobionte um ambiente físico adequado (luz e umidade) para sua sobrevivência e repassa os nutrientes minerais que absorve. Por sua vez o fotobionte fornece carboidratos e compostos nitrogenados, para a nutrição do micobionte e produção dos metabólitos essenciais para a sobrevivência tanto do micobionte, como do fotobionte (HONDA; VILEGAS, 1998).

Taxonomicamente, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, os líquens são tratados dentro do Reino Fungi, uma vez que, aproximadamente 95% da estrutura liquênica é constituída pelo micobionte. Desta forma, na literatura de cunho taxonômico os líquens são chamados de fungos liquenizados (RAVEN et al., 1996).

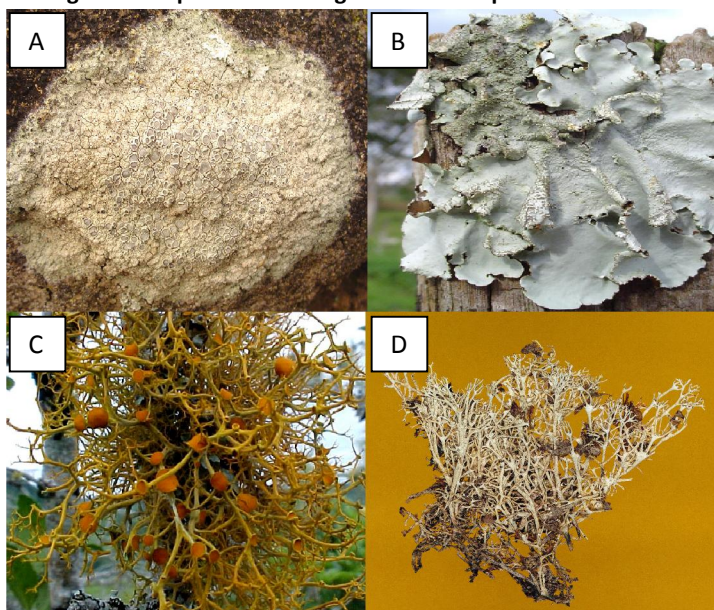
Os líquens apresentam uma distribuição cosmopolita, podendo ser encontrados nos mares, montanhas, desertos e regiões polares. Podem desenvolver-se em diferentes substratos, uma vez que sua nutrição independe deste, crescendo no córtex de árvores, rochas, folhas, entre outros (MEEBEN et al., 2013). Em resposta a situações de estresse, a produção de

elevadas concentrações de componentes fenólicos, principalmente depsídeos e depsidonas, são importantes para a sobrevivência dos líquens nestes ambientes diversos (PIOVANO et al., 2002; BOUSTIE et al., 2011).

No que diz respeito a morfologia dos líquens, são formados pelo talo, onde o fotobionte e o micobionte se posicionam em camadas sucessivas. O talo é subdividido em: i) córtex superior, composto por hifas entrelaçadas firmemente para proteger o líquen de outros organismos e reduzir a intensidade da luz que poderia causar danos às células das algas; ii) medula, camada frouxa de hifas, desta forma facilitando a troca gasosa e iii) córtex inferior, presente em líquens foliosos e fruticulosos (PRITCHARD; BRADT, 1984).

Os líquens podem ser classificados quanto a forma do talo líquênico em; crostoso, folioso, frutico e dimórfico (Figura 1). Este último possui como representante os líquens da espécie *Cladonia salzmanni* Nyl, *C. substellata*, e *C. kalbii*. O talo das espécies deste gênero também podem ser denominados cladoniforme, possuindo na parte basal primária pequenas esquâmulas, e na parte secundária talo fruticoso (Figura 1D) (BATISTA; BENATTI, 2011).

Figura 1 - Aspectos morfológicos do talo líquênico.



A – crostoso; B – folioso; C – fruticoso e D – dimórfico.

Fonte: modificado de Spielman e Marcelli, 2006 (A, B e C); Sipman e Ahti, 2012 (D).

Em relação a sua importância econômica os líquens são utilizados na alimentação em algumas culturas como, a asiática e em países frios, como iguarias. Também podem ser empregados na fabricação de bebidas alcoólicas, substituindo o lúpulo da cerveja por *Lobaria pulmonaria* (LEGAZ et al., 2006). Podendo ainda ser utilizados como corantes (RANKOVIC

et al., 2011). Diversos estudos demonstram a aplicação dos líquens como biomonitores da qualidade do ar, devido a sua capacidade de absorverem e acumularem metais pesados e radionuclídeos. (SHUKLA et al., 2012; SERT et al., 2011). Diversas substâncias líquênicas estão sendo utilizadas na fabricação de cosméticos, e ainda estudos apontam para sua utilização como protetor solar, uma vez que podem absorver a radiação ultravioleta do tipo B (RANCAN et al., 2002); podem ainda ser utilizados como fixadores na fabricação de perfumes (RANKOVIC et al., 2011).

Além disso, os líquens também vêm sendo utilizados na medicina popular de diversas culturas há vários anos, por exemplo, no tratamento de artrite, alopecia, constipação, doenças renais, faringite e infecções provocadas por parasitas e bactérias. Esses efeitos estão em sua maioria relacionados com os metabólitos líquênicos (MALHOTRA et al., 2008).

2.5.1 Metabólitos líquênicos

Os líquens produzem aproximadamente 1050 substâncias oriundas do seu metabolismo, denominados substâncias líquênicas ou ácidos líquênicos (MOLNAR; FARKAS, 2010). A produção destas substâncias podem variar de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo líquênico, dependendo das condições ambientais. Os metabólitos líquênicos podem ser classificados em: metabólitos primários e metabólitos secundários (NASH, 1996; PIOVANO et al., 2002).

Os compostos do metabolismo primário consistem nos aminoácidos, proteínas, carboidratos, carotenóides e vitaminas, são considerados produtos intracelulares ligados na parede celular e ao protoplasma, são produzidos principalmente pelo fotobionte, sendo a principal fonte de nutrição para o micobionte (HONDA; VILEGAS, 1998).

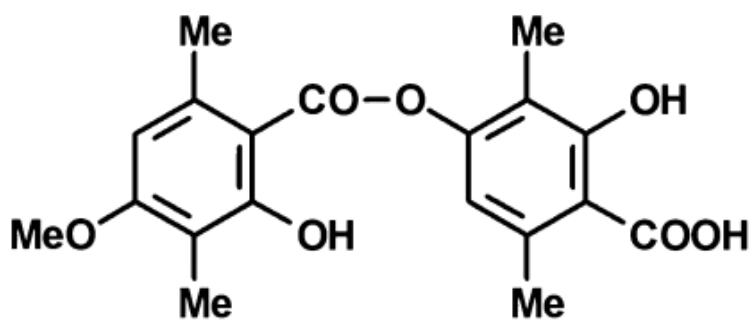
A partir do transporte de carboidratos fornecidos pelo fotobionte, o micobionte sintetiza dentro de suas hifas os metabólitos secundários. Esses são considerados produtos extracelulares encontrados na medula ou no córtex, provenientes das vias: i) acetato polimalonato, que produz, quinonas, depsídeos, depsidonas, ácidos graxos, ácidos úsnico e derivados; ii) ácido mevalônico, que forma, os terpenóides e esteróides e iii) ácido chiquímico, onde os produtos finais são, os derivados do ácido pulvínico, essas substâncias servem para a defesa e manutenção do “organismo” (HONDA; VILEGAS, 1998).

Os metabólitos liquênicos têm demonstrado diversas ações farmacológicas importantes: antibacteriano, antifúngica, antiviral, inseticida, anti-helmíntico, anti-inflamatória, antiproliferativa, fotoproteção, inibição da síntese de óxido nítrico e antioxidante. Estes resultados tem despertado interesse sobre o potencial dessas substâncias (SEGATORE et al., 2012; PIRES et al., 2011; SOKOLOV et al., 2012; CETIN et al., 2011; LAUINGER et al., 2013; VIJAYAKUMAR et al., 2000; EINARSDÓTTIR et al., 2010; KOHLHARDT-FLOEHR et al., 2010; RABELO et al., 2012; MANOJLOVIC et al., 2012; ODABASOGLU et al., 2006).

2.5.1.1 Ácido barbático

O ácido barbático, é denominado 2-hidroxi-4-[(2-hidroxi-4-metoxi-3,6-dimetilbenzoi) oxi]-3,6-dimetilbenzoico pela “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC), possui fórmula molecular $C_{19}H_{20}O_7$ e massa molecular de 360,36 g, é classificado como um depsídeo (Figura 2). Produzido pelo córtex do líquen, estudos mostram que ocorre aumento da síntese deste composto, quando o líquen encontra-se em condições de estresse, por exemplo: ao serem expostos a baixa temperatura, bem como a radiação ultravioleta C (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2001; HAGER et al., 2008).

Figura 2 - Estrutura molecular do ácido barbático.



O símbolo “Me” diz respeito a um grupamento metil ($-CH_3$).

Fonte: Hager et al., 2008.

Diversas ações biológicas foram observadas e os estudos com ácido barbático mostraram excelentes resultados contra o *Bacillus subtilis* (PERRY et al., 1999).

Kumar e Muller (1999a) analisaram os efeitos do ácido barbático, ácido difractáico e uma série de substâncias análogas destes compostos, e observaram que ocorre inibição da síntese de leucotrienos B₄. Além disso, demonstraram que o ácido barbático é capaz de inibir o crescimento de células de queratinócitos (HaCaT) na concentração de 4,1 µM, demonstrando assim a capacidade antiproliferativa desta substância.

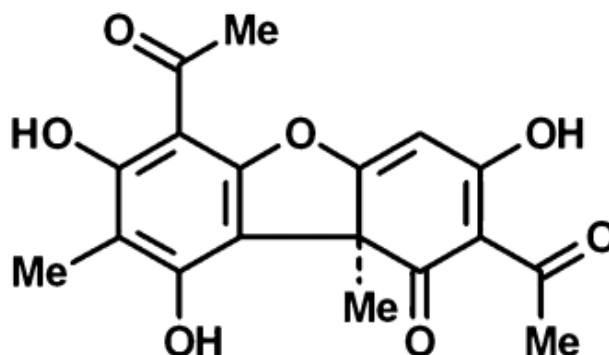
Hager et al (2008), desenvolveram estudo para avaliar se as substâncias líquênicas (extrato de *Heterodea muelleri* e o metabólito secundário ácido barbático) protegem os líquens do estresse ambiental e controlam o seu crescimento. Além de demonstrar que em situações de estresse como exposição a radiação ultravioleta do tipo B, a síntese de ácido barbático é aumentada. Outro resultado importante foi obtido utilizando a concentração de 0,5 mg.cm⁻² onde ficou demonstrado que o ácido barbático agiu diminuindo a taxa de divisão celular de algas.

Estudo desenvolvido por Martins et al (2010), avaliou a atividade antibacteriana de extrato de *Cladia aggregata* Nyl. e a substância purificada, ácido barbático frente a quatro linhagens de *Staphylococcus aureus* multi-resistentes. Foi observado que tanto o extrato como a substância purificada foram capazes de inibir a proliferação bacteriana.

2.5.1.2 Ácido úsnico

O ácido úsnico é um metabólito secundário, sintetizado por líquens de diversos gêneros como *Usnea*, *Cladonia*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia*, *Parmelia* e *Alectoria*. Este composto natural obtido da região cortical é denominado 2,6-diacetil - 7,9 – dihiroxi - 8,9b – dimetil - 1,3 (2H, 9bH) – dibenzeno - furadiona, pela “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC), com fórmula molecular C₁₈H₁₆O₇ e massa molecular de 344,31 g, apresenta duas formas enantioméricas (+) e (-), dependendo da posição angular do grupamento metil localizado no carbono 9b. Estas formas irão determinar os efeitos biológicos, de importante significado farmacológico e clínico (Figura 03). Este composto caracteriza-se por ser uma substância hidrofóbica, parcialmente solúvel em água e glicerol e solúvel em solventes orgânicos (INGOLFSDOTTIR, 2002).

Figura 3 - Estrutura do ácido úsnico.



O símbolo “Me” diz respeito a um grupamento metil (-CH₃).
Fonte: Hager et al., 2008.

Dentre os metabólitos secundários liquênicos, o ácido úsnico é o mais estudado apresentando diversos efeitos biológicos. Entre eles destacam-se as atividades antibacteriana (GUPTA et al., 2012) antifúngica, antiviral (SOKOLOV et al., 2012) e antiinflamatória, além de propriedades que possivelmente estão relacionadas com o mecanismo de radioproteção como, proteção contra radiação ultravioleta, inibição da síntese de óxido nítrico e ação antioxidante. Também é observado uma atividade antiproliferativa *in vitro*, sendo esta relacionada com o mecanismo de radiosensibilização. O ácido úsnico vem sendo utilizado também em diversos produtos medicinais e não medicinais, como composto ativo ou preservante. (VIJAYAKUMAR et al., 2000; CAMPANELLA et al., 2002; MAYER et al., 2005; ODABASOGLU et al., 2006; KOHLHARDT-FLOEHR et al., 2010; PIRES et al., 2011; SEGATORE et al., 2012).

Boehm et al (2009) demonstraram que substâncias extraídas de líquens dentre eles o ácido úsnico possuem atividade fotoprotetora, contra a radiação ultravioleta dos tipos A e B. Adicionalmente, estudo desenvolvido por Kohlhardt-Floehr et al (2010), utilizando células de linfócito humano (Jurkat-cells) e radiação ultravioleta do tipo B, demonstrou que a atividade fotoprotetora depende da intensidade da radiação e da dose do ácido úsnico, podendo desta forma apresentar comportamento antioxidante, nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-6} molar, e ou pro-oxidante.

Segundo Odabasoglu et al (2006), e Rabelo et al (2012), dentre as diversas atividades biológicas desempenhadas pelo ácido úsnico, essa substância é capaz de diminuir os níveis de peroxidação lipídica, de forma semelhante a substâncias sabidamente radioprotetoras, além

disso, inibe a síntese de óxido nítrico. Estudo utilizando macrófagos (RAW 246.7) examinaram o efeito do ácido úsnico nos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico, foi observado que o ácido úsnico foi capaz de diminuir os níveis de TNF- α , e a expressão de óxido nítrico, substâncias que estão envolvidas na via do dano celular (JIN et al., 2008).

Na literatura há diversos estudos demonstrando a atividade antiproliferativa (antitumoral) do ácido úsnico, Burlando et al (2009), analisaram a ação de 6 substâncias liquênicas entre elas o ácido úsnico, frente células de mesotelioma maligno (MM98), carcinoma vulvar (A431) e de queratonócitos (HaCaT). O ácido úsnico apresentou alta toxicidade sobre as células e em doses subtóxicas apresentou capacidade de regenerar lesões em células HaCaT.

Einarsdóttir et al (2010), utilizando duas linhagens de células do carcinoma mamário (T-47D) e carcinoma pancreático (Capan-2), demonstraram que o ácido úsnico apresentou concentração inibitória (IC₅₀) de 4.0 $\mu\text{g/mL}$ contra células da linhagem T-47D, e 5.0 $\mu\text{g/mL}$ contra células Capan-2, através da diminuição do potencial de membrana da mitocôndria.

A utilização de ácido úsnico a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ é responsável pela inibição da proliferação de células das linhagens de carcinoma mamário (T47D e MCF7) e carcinoma pancreático (Capan-2), a atividade antiproliferativa está relacionada com a liberação de H⁺ não somente das mitocôndrias, mas também de lisossomos, resultando na formação de autofagossomos (BESSADOTTIR et al., 2012).

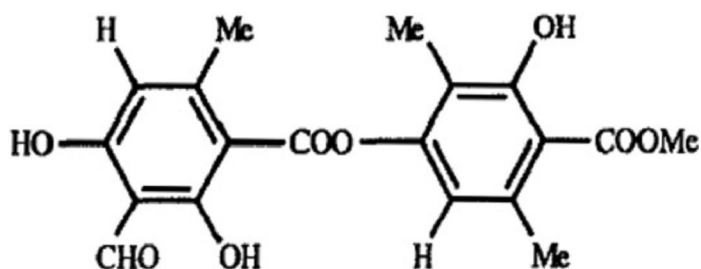
Em estudo desenvolvido por Singh et al (2013), a utilização de ácido úsnico na concentração de 25 e 100 μM inibiu o crescimento de células de carcinoma pulmonar (A549) *in vitro*, através da inibição da expressão da quinase dependente de ciclina (CDK)4, CDK6, e ciclina D1, e aumentou a expressão da proteína p21 (CIP1) inibidor de CDK. Além disso, foi observado que o ácido úsnico induz a despolarização da membrana mitocondrial.

2.5.1.3 Atranorina

Atranorina é classificada como um depsídeo, com fórmula molecular C₁₉H₁₈O₈ e peso molecular 374,34 g, é denominado pela “International Union of Pure and Applied Chemistry”

(IUPAC) de ácido 3-hidroxi-4-(metoxicarbonil)-2,5-dimetilfenil 3-formil-2,4-dihidroxi-6-metilbenzoato (Figura 4) (KONIG; WRIGHT, 1999).

Figura 4 - Estrutura molecular da atranorina.



O símbolo “Me” diz respeito a um grupamento metil (-CH₃).
Fonte: Melo et al., 2011.

Ingolfssdottir et al., em 1998, demonstraram que a atranorina possui atividade contra *Mycobacterium aurum*, onde a concentração inibitória mínima foi de 32 µg/mL. Estudos avaliando a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos cloroformico, etílico, acetônico e etanólico de *Cladonia foliacea* e metabólitos liquênicos secundários, ácido úsnico, ácido fumarprotocetrárico, bem como a atranorina, demonstraram que essas substâncias apresentam atividade contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Candida albicans*, e *Candida glabrata* (YILMAZ et al., 2004).

Turk et al., em 2006, avaliaram a capacidade antibacteriana e antifúngica de extratos cloroformico, etílico e acetônico de *Pseudevernia furfuracea* (var. *furfuracea* e var. *ceratea*), e ácido fisódico, ácido olivetórico, cloroatranorina e atranorina, os resultados mostram que esses compostos apresentaram atividade frente a *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Alternaria alternata*, *Ascochyta rabiei*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, e *Penicillium notatum*.

Em estudo desenvolvido por Kumar e Muller (1999b) com diversos metabólitos liquênicos extraídos de *Parmelia nepalensis* e *Parmelia tinctorum*, foi demonstrado que a

atranorina inibe a síntese de leucotrieno B₄ em leucócitos polimorfonucleares, porém foi observado que esta não possui atividade antioxidante. Bugni et al. (2009) observaram que a atranorina extraída de *Parmotrema saccatilobum* possui atividade antiinflamatória sendo sua ação dependente da inibição das enzimas cicloxigenase-1 (pela atranorina) e cicloxigenase-2 (pela cloroatranorina).

Estudo desenvolvido por Melo et al (2011a), avaliou a capacidade antiinflamatória da atranorina, em ratos Wistar utilizou modelo de edema de pata traseira induzida. Foi observado que a atranorina apresentou importante papel na atividade antiinflamatória (nas concentrações de 100 e 200 mg/Kg), no entanto não apresentou atividade citotóxica sobre a linhagem de células de fibroblastos (L929).

Fernandez et al. (1998), demonstraram a capacidade fotoprotetora de três compostos fenólicos panarina, 1-cloropanarina e atranorina, nas concentrações de 3,5; 7,0 e 10,0 mM, avaliado através da diminuição da formação de ligação entre um composto fotossensibilizante utilizado no experimento (8-Metoxipsoraleno) e a albumina irradiados a 310 nm e 360nm. Foi observado que o percentual de inibição da ligação do fotossensibilizante à albumina sérica humana foi de 20,1% para a atranorina na concentração de 10 mM, quando a amostra foi irradiada a 360 nm.

Melo et al (2011b), demonstraram em seu estudo que a atranorina apresentou atividade antioxidante na concentração de 100 µg/mL, além de capacidade de capturar ânions superóxido, no entanto, aumentou a formação de peróxido de hidrogênio *in vitro* e óxido nítrico substâncias pró-oxidativas e não foi capaz de inibir a peroxidação lipídica. O estudo também demonstrou que a atranorina sozinha não apresenta efeito citotóxico em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) e que confere citoproteção contra danos provocados por peróxido de hidrogênio, substâncias antioxidantes podem auto-oxidar e gerar substâncias reativas e desta forma agir como pró-oxidantes (MOURE et al., 2001).

Backorová et al (2011), em estudo utilizando 4 metabólitos secundários liquênicos (parietina, ácido úsnico, ácido girofórico e atranorina) avaliaram a ação destes em diversas linhagens de células (A2780, HeLa, MCF-7SK-BR-3, HT-29, HTC-116P53^{+/+}, HCT116p53^{-/-}, HL-60 e Jurkat). Foi observado que o ácido úsnico, bem como a atranorina são os compostos mais efetivos contra as células cancerígenas (nas concentrações de 100 e 200 µM), ao agirem ativando a caspase-3 (em células HT-29), induzem a produção de espécies reativas de oxigênio, bem como ativam a apoptose.

Estudo desenvolvido por Kristmundsdottir et al (2005), avaliou a solubilidade e atividade antiproliferativa da atranorina em células de carcinoma mamário (T-47D), carcinoma pancreático (Panc-1) e carcinoma de próstata (PC-3) e concluiu que a atranorina apresentou uma solubilidade limitada, o melhor solvente para diluir foi o 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) em pH 7,4. A atranorina não apresentou atividade antiproliferativa, a atividade inibitória foi semelhante ao solvente utilizado, não foi informada a concentração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração e obtenção das substâncias liquênicas

A extração, isolamento e purificação dos líquens foram realizadas no laboratório de Produtos Naturais, do departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Amostras dos líquens *Cladonia salzmanni* Nyl, *Cladonia substellata*, e *Cladonia kalbii*, foram maceradas, e submetidas a extrações sucessivas por esgotamento à temperatura ambiente (28 ± 3 °C), com éter dietílico, sob agitação mecânica por 1 h, deixada em repouso a 4 °C por 24 h e posteriormente filtradas em papel de filtro Whatman (No. 1). Este procedimento foi repetido 5 vezes. Posteriormente o extrato etéreo foi evaporado até secar em rotaevaporador (Buchler Instruments, Fort Lee, NJ, USA) acoplado em banho-maria a 40 °C (PEREIRA et al., 1996).

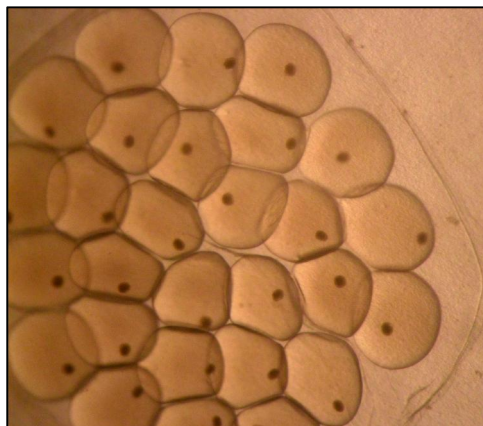
Após obtenção dos extratos etéreos foi realizada a purificação para obtenção das substâncias liquênicas, foi obtido o ácido barbático, ácido úsnico e atranorina, dos líquens *Cladonia salzmanni* Nyl, *Cladonia substellata*, e *Cladonia kalbii*, respectivamente. O ácido barbático foi purificado por meio de repetidas lavagens com clorofórmio em funil G4 de fundo poroso. A atranorina foi purificada através do aquecimento do extrato em banho Maria (60°C) e posteriormente foram realizadas repetidas lavagens com etanol absoluto e clorofórmio, em seguida foi filtrado em funil G4 de fundo poroso. O material assim obtido foi analisado por meio de cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (ASAHINA; SHIBATA, 1954). Para purificação do ácido úsnico, o extrato etéreo da *C. substellata* foi fracionado em coluna de sílica gel (porosidade 70-230) e eluído com o sistema de solvente clorofórmio: n-hexano (80:20 v/v) (ODABASOGLU et al., 2006).

3.2 Animais experimentais

Foram utilizados embriões de moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* – pigmentados, provenientes do moluscário do departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Para a coleta dos embriões, foram colocados nos aquários coletivos de *B. glabrata*, tiras de polietileno incolor (5x5 cm) na superfície da água. Após 24 horas, as tiras foram coletadas e as desovas observadas ao microscópio estereoscópico (Tecnival-SQZ) para ser realizada a individualização e identificação do estágio embrionário. Após a identificação, os embriões no estágio de blástula, foram separados em grupos com 100 espécimes e submetidos ao ensaio de toxicidade aguda (Figura 5).

Figura 5 - Embriões no estágio de blástula do desenvolvimento.



3.3 Teste de toxicidade aguda

Para realização dos ensaios de toxicidade aguda os embriões na fase de blástula foram colocados em placas de 24 poços de poliestireno (TPP®). Para cada concentração da substância testada foram utilizados aproximadamente 200 embriões.

Os embriões dos grupos experimentais foram expostos à substância a ser analisada, por um período de 24 horas. Após esse tempo de exposição, os embriões foram lavados para total remoção da substância, em seguida foram mantidos com água filtrada e analisados quanto à viabilidade por mais sete dias consecutivos, totalizando oito dias. O grupo controle foi formado por embriões mantidos com água filtrada nas mesmas condições dos embriões experimentais. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A análise da viabilidade foi realizada segundo metodologia descrita por Okazaki et al (1996). Foram registrados os embriões que apresentaram desenvolvimento normal (durante o

período experimental), estes foram considerados **viáveis** (Figura 06 – seta preta), já aqueles que apresentavam malformações ou que estavam mortos foram considerados **inviáveis** (Figura 06 – seta verde e vermelha, respectivamente). Os resultados foram expressos como a média percentual de embriões inviáveis $\pm$ erro padrão da média (% Embriões inviáveis).

Figura 6 - Desovas no estágio de véliger do desenvolvimento.



Embriões viáveis (seta preta) e embriões inviáveis - malformados (seta verde) e mortos (seta vermelha).

3.4 Avaliação da toxicidade dos solventes sobre embriões de *Biomphalaria glabrata*

Foi avaliada a toxicidade dos solventes: etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80; a fim de determinar a concentração que apresenta a menor toxicidade para os embriões e que melhor dissolve as substâncias liquênicas. Primeiramente, os solventes foram solubilizados em água filtrada nas concentrações de (v/v %): 0,75; 1,25; 2,5 e 5,0% para etanol, 0,5; 1,0 e 1,5% para DMSO e 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0% para Tween 80. Em seguida foi realizado o teste de toxicidade aguda, e análise da viabilidade dos embriões, como descrito previamente no item 3.3.

3.5 Análise da toxicidade aguda das substâncias liquênicas sobre embriões de *Biomphalaria glabrata*

Para avaliação da toxicidade das substâncias liquênicas (ácido barbático, ácido úsnico e atranorina), foi realizado teste de toxicidade aguda, descrito no item 3.3. Foi avaliada a toxicidade das substâncias liquênicas a fim de determinar a concentração que apresenta menor toxicidade para os embriões. Foram testadas as seguintes concentrações: ácido barbático – 6,25; 12,5; 25,0; 50; 100,0; 200,0 e 300,0 µg/mL; ácido úsnico – 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL e atranorina – 100; 200; 500 e 1000 µg/mL. Foi calculada a concentração da substância que causa 50% de mortalidade na população (CL₅₀) para cada uma das substâncias.

3.6 Determinação da atividade antioxidante das substâncias liquênicas

A atividade antioxidante foi determinada por meio da reação com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), de acordo com método descrito por Brand-Williams et al (1995). Em uma microplaca de 96 poços de fundo chato (Global plast ®), foram colocados 40 µl da substância liquênica em cada poço e 250 µl de DPPH. Foram utilizadas as seguintes concentrações das substâncias liquênicas: ácido barbático - 50, 100, 500, 750 e 1000 µg/mL; ácido úsnico – 06 µg/mL e atranorina - 1000 µg/mL. Para controle positivo foi utilizado o ácido gálico nas concentrações de 0,6; 50; 100; 500; 750 e 1000 µg/mL. Em seguida a placa foi incubada por 25 minutos em uma câmara escura, posteriormente foi realizada a leitura na absorbância em 517 nm, no analisador de microplacas (Bio-Rad xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer). A atividade antioxidante (%AA) foi expressa utilizando a fórmula a seguir:

$$\%AA = \frac{(A_{DPPH} - A_{amostra})}{A_{DPPH}} \times 100$$

Onde A_{DPPH} é a absorbância dos poços que contêm apenas o DPPH e A_{amostra} é a absorbância dos poços que contêm a substância liquênica mais o DPPH.

3.7 Análise da estabilidade das substâncias liquênicas após exposição à radiação ionizante

Amostras de substâncias liquênicas foram irradiadas em uma fonte GammaCell ⁶⁰Co (Radionics Labs, taxa de dose=2,906 Gy/h) no Departamento de Energia Nuclear da UFPE,

na dose de 4 Gy. Em seguida foi realizada a cromatografia em camada delgada e teste de toxicidade aguda.

Para evidenciar alterações estruturais, foi realizada a análise de cromatografia em camada delgada (CCD). Amostras das substâncias liquênicas irradiadas e não irradiadas foram dissolvidas em éter dietílico (ácido barbático e ácido úsnico) e clorofórmio (atranorina), em seguida foram aplicadas em placa de sílica Gel 60 F254+ 366 Merk de 20 x 20 cm, e desenvolvida, de forma ascendente, no sistema de solventes A (tolueno/ dioxano/ ácido acético, 90:25:4, v/v/v). Em seguida, a placa foi borrifada com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 50° C por 20 minutos, para serem evidenciadas as bandas por reação de coloração (CULBERSON, 1972).

Foi realizado teste de toxicidade aguda (de acordo com item 3.3) utilizando soluções das substâncias liquênicas irradiadas comparando os resultados com as substâncias liquênicas não irradiadas. Foram utilizadas as concentrações de 100,0 µg/mL para o ácido barbático; 0,6 µg/mL para o ácido úsnico e 1000,0 µg/mL para a atranorina.

3.8 Avaliação da capacidade radiomodificadora das substâncias liquênicas sobre embriões de *Biomphalaria glabrata*

A avaliação da capacidade radiomodificadora das substâncias liquênicas foi realizada com a concentração que apresentou a menor toxicidade. Os embriões foram divididos nos seguintes grupos:

- Embriões mantidos com água filtrada durante todo o período experimental (8 dias) - grupo controle (C);
- Embriões irradiados (4 Gy) e mantidos com água filtrada durante todo o experimento - grupo controle irradiado (CI);
- Embriões que foram expostos a substância liquênica **antes** de serem submetidos a irradiação (BA, UA e AA, para ácido barbático, ácido úsnico e atranorina, respectivamente), após 24 horas de exposição as substâncias foram removidas e os embriões mantidos em água filtrada até o término do experimento;
- Embriões que foram expostos a substância liquênica **depois** da irradiação (BD, UD e AD, para ácido barbático, ácido úsnico e atranorina, respectivamente) e após 24 horas de

exposição às substâncias foram removidas e os embriões mantidos em água filtrada até o término do experimento.

3.9 Análise estatística

Os dados da estabilidade das substâncias liquênicas foram analisados pelo Teste t; a determinação da CL_{50} foi analisada pela regressão Probit, utilizando o Microsoft Excel 2007. As demais análises foram realizadas utilizando o teste de variância (ANOVA one-way) seguido pelo pós-teste Newman-Keuls, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 4.02. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da toxicidade aguda para os solventes etanol, dimetilsulfóxido e Tween 80.

Foi avaliada a toxicidade dos solventes: etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80, a fim de determinar a concentração que não apresenta toxicidade para os embriões, bem como aquela que melhor solubiliza as substâncias liquênicas. O resultado do teste de toxicidade aguda para o solvente etanol está apresentado na Tabela 1. Foi observado que as concentrações de 0,5% e 1,0% apresentaram quantidade de embriões inviáveis iguais ao grupo controle, a partir da concentração de 2,5% de etanol houve aumento na quantidade de embriões inviáveis quando comparado com o grupo controle ($39,2 \pm 1,8\%$ vs $2,0 \pm 1,0\%$).

Tabela 1 – Toxicidade aguda do etanol.

Concentração (v/v %)	Controle		Etanol		
		0,5 %	1,0 %	2,5 %	5,0 %
%Embriões inviáveis	$2,0 \pm 1,0$	$3,0 \pm 0,6$	$5,4 \pm 1,5$	$39,2 \pm 1,8^*$	$99,5 \pm 0,5^*$

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $P < 0,05$; * vs grupo Controle.

Os experimentos realizados com DMSO, nas concentrações testadas de 0,5%; 1,0% e 1,5% a quantidade de embriões inviáveis não apresentou diferença ao ser comparado com o grupo controle, ou seja, as concentrações analisadas, não apresentaram atividade tóxica para os embriões de *Biomphalaria glabrata* (Tabela 2).

Tabela 2 – Toxicidade aguda do Dimetilsulfóxido (DMSO).

Concentração (v/v %)	Controle		DMSO	
		0,5 %	1,0 %	1,5 %
% Embriões inviáveis	$2,0 \pm 1,0$	$1,5 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,3$

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $P < 0,05$.

Resultados semelhantes foram encontrados em estudo de Geraldino (2004), em que foi testada a toxicidade aguda e crônica de diversos solventes entre eles o etanol e DMSO frente a embriões de *B. glabrata*, e foi observado que em uma exposição aguda para o etanol, bem

como para o DMSO nas concentrações de 0,5% e 1,0% apresentaram um percentual de embriões inviáveis menor do que 1%. Já para as concentrações de 2,5% e 5,0%, apresentaram um percentual de embriões inviáveis de 28,3% e 84,9%, respectivamente.

Os resultados do teste de toxicidade aguda para o solvente Tween 80 (Tabela 3), demonstram que as concentrações analisadas deste solvente não apresentaram toxicidade frente aos embriões de *B. glabrata*, uma vez que não foi observado diferença na quantidade de embriões inviáveis ao comparar com o grupo controle.

Tabela 3 – Toxicidade aguda do Tween 80.

Concentração (v/v %)	Controle	Tween 80			
		0,5 %	1,0 %	2,0 %	5,0 %
% Embriões inviáveis	2,0 ± 1,0	1,5 ± 0,5	5,5 ± 1,6	5,4 ± 0,5	5,0 ± 1,0

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média, P<0,05.

Após os testes de toxicidade aguda foi avaliada a solubilidade das substâncias líquênicas nas concentrações dos solventes que não apresentaram toxicidade para os embriões. Foi observado que o etanol na maior concentração, ou seja, 1% não solubilizou satisfatoriamente as substâncias líquênicas. O solvente que melhor solubilizou o ácido barbático e o ácido úsnico foi o DMSO na concentração de 0,5%, enquanto o Tween 80 na concentração de 2% foi escolhido para dissolver a atranorina, uma vez que a mesma apresentou material suspenso ao ser dissolvida com DMSO.

4.2 Análise da toxicidade aguda das substâncias líquênicas

As substâncias líquênicas foram avaliadas quanto à sua toxicidade frente aos embriões de *Biomphalaria glabrata*, com o objetivo de determinar a concentração letal que mata 50% (CL₅₀) da população embrionária, bem como a concentração com menor toxicidade. Com este resultado será realizada a análise da ação radiomodificadora das substâncias líquênicas.

Os resultados da toxicidade aguda do ácido barbático, testado nas concentrações de 6,2; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 300,0 µg/mL estão presentes na Tabela 4. Foi observado que as concentrações de 6,2; 12,5; 25,0 e 50,0 µg/mL não apresentaram diferença na quantidade de embriões inviáveis quando comparadas com o grupo controle. As concentrações de 100,0; 200,0 e 300,0 µg/mL apresentaram uma quantidade de embriões

inviáveis maiores do que o grupo controle e do que as concentrações de 6,2 a 50,0 µg/mL de ácido barbático. A CL_{50} do ácido barbático foi de 242,7 µg/mL. Com base nestes resultados, foi escolhida a concentração de 50,0 µg/mL para avaliação da capacidade radiomodificadora.

Os experimentos foram realizados na fase mais sensível de desenvolvimento dos embriões (fase de blástula), onde o metabolismo encontra-se muito elevado devido as constantes divisões celulares que estão ocorrendo. Estudo desenvolvido por Hager et al. (2008) demonstrou que o ácido barbático é responsável pela inibição da divisão celular no líquen. Kumar e Muller (1999a), também demonstraram a atividade antiproliferativa do ácido barbático na concentração de 4,1 µM, utilizando células da linhagem de queratinócitos (HaCat).

Tabela 4 – Toxicidade aguda do ácido barbático.

	Concentração (µg/mL)	% Embriões inviáveis
Controle		1,5 ± 0,5
	6,2	2,6 ± 1,3
	12,5	2,6 ± 0,8
	25,0	3,6 ± 0,5
Ácido Barbático	50,0	6,3 ± 1,2
	100,0	19,9 ± 3,5*
	200,0	45,2 ± 0,8*
	300,0	58,2 ± 0,6*

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média, $P < 0,05$; * vs grupo Controle.

O resultado da toxicidade aguda do ácido úsnico está apresentado na Tabela 5. Foram testadas concentrações que variaram de 0,6 a 10,0 µg/mL. A concentração de 0,6 µg/mL não provocou alteração na quantidade de embriões inviáveis, porém a partir da concentração de 1,2 µg/mL ocorreu um aumento na inviabilidade embrionária ($19,3 \pm 0,7\%$) quando comparado ao grupo controle ($1,8 \pm 0,5\%$). As concentrações a partir de 2,5 µg/mL apresentaram uma resposta máxima. O ácido úsnico apresentou uma CL_{50} de aproximadamente 1,3 µg/mL. Desta forma a concentração de 0,6 µg/mL, por ser a maior concentração a não apresentar toxicidade para os embriões, foi escolhida para a análise da capacidade radiomodificadora.

Einarsdóttir et al (2010), utilizando duas linhagens de células de carcinoma mamário (T-47D) e carcinoma pancreático (Capan-2), demonstraram que o ácido úsnico apresentou

atividade antiproliferativa na concentração de 4,0 µg/mL contra células da linhagem T-47D, e 5,0 µg/mL contra células de carcinoma pancreático (Capan-2).

Tabela 5 – Toxicidade aguda do ácido úsnico.

	Concentração (µg/mL)	% Embriões inviáveis
Controle		1,8 ± 0,5
	0,6	4,0 ± 1,7
Ácido Úsnico	1,2	19,3 ± 0,7*
	2,5	99,0 ± 0,1*
	5,0	99,0 ± 1,0*
	10,0	99,5 ± 0,5*

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média, P<0,05; * vs grupo Controle.

No que diz respeito ao teste de toxicidade aguda da atranorina em embriões de *B. glabrata*, as concentrações analisadas até 1000,0 µg/mL, não apresentaram aumento na quantidade embriões inviáveis. Com os resultados obtidos não foi possível determinar a CL₅₀ para a atranorina. Foi escolhida a concentração de 1000,0 µg/mL para avaliar a capacidade radiomodificadora da substância, por esta não apresentar toxicidade frente aos embriões.

Melo et al (2011a), demonstraram que a atranorina nas concentrações de 100 e 200 mg/Kg, não apresentam atividade citotóxica em células de fibroblastos (L929).

Tabela 6 – Toxicidade aguda da atranorina.

	Concentração (µg/mL)	% Embriões inviáveis
Controle		2,3 ± 0,7
	50	2,0 ± 0,9
Atranorina	100	1,7 ± 0,6
	200	3,0 ± 1,0
	500	2,0 ± 0,9
	1000	2,5 ± 1,4

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média, P<0,05.

4.3 Determinação da atividade antioxidante das substâncias liquênicas

Foi realizado o teste com o ácido barbático nas concentrações de 500, 750 e 1000 µg/mL, observou-se uma pequena atividade antioxidante (%AA - 2,2% para concentração de 500 µg/mL) alcançando um percentual de inibição de 15,8 % quando a concentração da substância foi de 1000 µg/mL; o controle positivo utilizado (ácido gálico), apresentou uma atividade antioxidante de 83,7 % na concentração de 500 µg/mL e 80,9 % na concentração de 1000 µg/mL (Tabela 07).

Tabela 7 – Atividade antioxidante do ácido barbático (%AA).

Concentração (µg/mL)	% AA	
	Ácido Barbático	Ácido Gálico
500	2,2	83,7
750	8,1	76,6
1000	15,8	80,9

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média, P<0,05.

As substâncias liquênicas testadas apresentam em comum um grupamento fenol e este muitas vezes está relacionado com atividade antioxidante importante característica em uma substância radioprotetora, porém as substâncias liquênicas utilizadas (ácido barbático, ácido úsnico e atranorina) não apresentaram atividade antioxidante nas concentrações estipuladas para avaliação da capacidade radiomodificadora (ou seja, 50 e 100 µg/mL - ácido barbático; 0,6 µg/mL - ácido úsnico e 1000 µg/mL - atranorina).

Kumar e Muller (1999a), utilizando o teste com o radical DPPH para avaliação da atividade antioxidante, compararam diversos compostos químicos derivados de modificações estruturais do ácido barbático, concluíram que essa substância bem como os seus compostos derivados possuíam uma fraca atividade antioxidante ($0,14 \pm 0,07 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Brisdelli et al. (2013), analisaram a atividade antioxidante, utilizando o DPPH, de seis substâncias liquênicas, entre elas o ácido úsnico, nas concentrações que variaram de 2,5 a 10 µM e não foi encontrada atividade antioxidante nestas concentrações. Adicionalmente, estudo desenvolvido por Mitrovic et al. (2011), mostrou que o extrato de *Cladonia foliacea* - espécie de liquen que possui as substâncias ácido úsnico em grande quantidade (YILMAZ et al., 2004) e atranorina

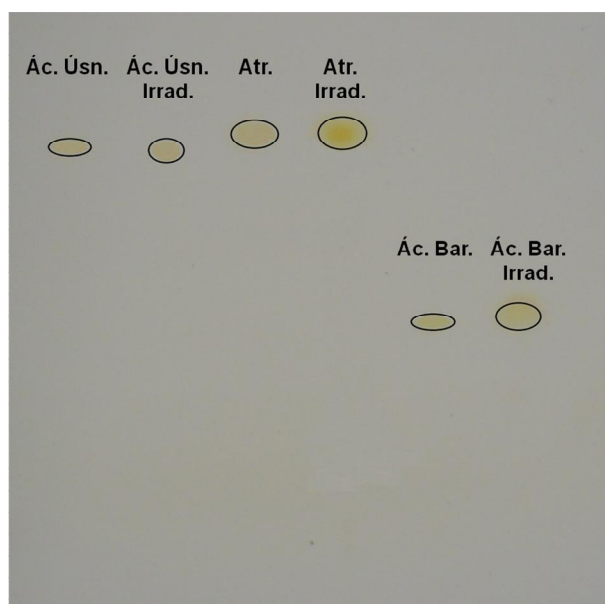
- apresenta uma atividade antioxidante de 50%, quando a concentração do extrato é maior do que 1000,0 µg/mL.

4.4 Análise da estabilidade das substâncias liquênicas após exposição à radiação ionizante

Com o objetivo de analisar possíveis modificações na estrutura química dos metabólitos liquênicos após a irradiação a 4 Gy, foi realizada a cromatografia em camada delgada e o teste de toxicidade aguda.

Os resultados da cromatografia em camada delgada (CCD) estão presentes na Figura 7. A utilização de radiação γ na dose de 4 Gy, não provocou alteração na estrutura das substâncias liquênicas.

Figura 7 – Representação da Cromatografia em Camada Delgada.

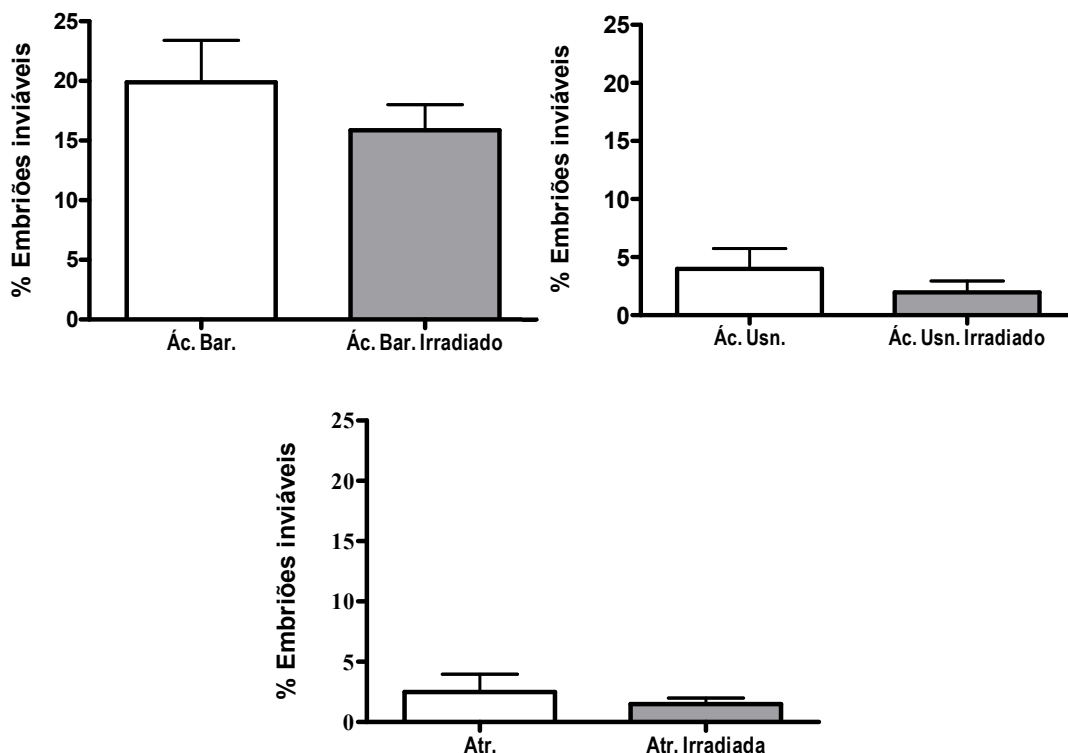


Ácido úsnico (Ác. Úsn.); Atranorina (Atr.) e Ácido barbático (Ác. Bar.). Irradiado (Irrad.).

Para verificação de alterações na atividade biológica das substâncias, foi realizado o teste de toxicidade aguda com soluções irradiadas e não irradiadas das substâncias liquênicas, os resultados estão presentes na Figura 8. A irradiação das três substâncias analisadas (ácido barbático Fig.8a; ácido úsnico Fig. 8b e atranorina Fig. 8c) não provocou alteração em sua toxicidade, uma vez que não houve diferença na quantidade de embriões inviáveis do grupo

de animais que foram expostos às substâncias irradiadas quando comparado com o grupo em contato com a substância não irradiada.

Figura 8 – Embriotoxicidade das substâncias liquênicas após irradiação.



Ácido barbático (Ác. Bar.), ácido úsnico (Ác. Usn.) e atranorina (Atr.). **a** – Toxicidade aguda do ácido barbático; **b** - Toxicidade aguda do ácido úsnico e **c** – Toxicidade aguda da atranorina. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $P < 0,05$.

Cogitou-se a hipótese que a radiação γ poderia alterar a toxicidade das substâncias liquênicas, possivelmente potencializando-a, uma vez que, a radiação ao interagir com as substâncias pode quebrar ligações químicas alterando suas propriedades, o resultado da cromatografia em camada delgada mostrou que não ocorreu alteração na estrutura das substâncias liquênicas irradiadas, corroborando com os resultados do teste de toxicidade aguda em que ficou demonstrado que não houve alteração na atividade biológica destas substâncias (ALPEN, 1998).

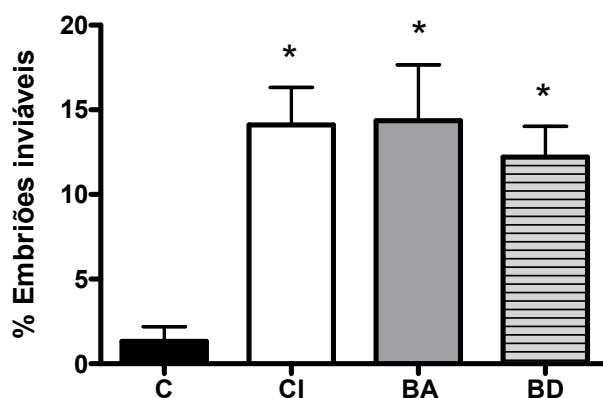
4.5 Avaliação da capacidade radiomodificadora das substâncias liquênicas sobre embriões de *Biomphalaria glabrata*

Os resultados da avaliação da capacidade radiomodificadora das substâncias liquênicas estão apresentados nas Figuras 9, 10, 11 e 12. O grupo controle irradiado (CI) apresentou uma quantidade aumentada de embriões inviáveis ao ser comparado com o grupo controle (CI: $14,1 \pm 2,2\%$ vs C: $1,3 \pm 0,9\%$), indicando que a radiação γ provocou um comprometimento no desenvolvimento dos embriões.

Okazaki et al (1996), estudou a radiosensibilidade dos embriões de *Biomphalaria glabrata* e também observou um aumento na quantidade de embriões inviáveis ao utilizar radiação γ . Na fase de blástula a dose de 5 Gy foi responsável por 24,7% de mortalidade dos embriões.

No que diz respeito ao ácido barbático, primeiramente foi testada a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Os grupos BA e BD apresentaram um aumento na quantidade de embriões inviáveis ($14,4 \pm 3,3\%$ e $12,2 \pm 1,8\%$, respectivamente) quando comparado com o grupo controle (C: $1,3 \pm 0,9\%$). Os grupos BA e BD têm a mesma quantidade de embriões inviáveis do grupo controle irradiado (CI: $14,1 \pm 2,2\%$), portanto estes aumentos nos grupos BA e BD provavelmente não são devido ao ácido barbático na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, mas a radiação γ (Figura 9).

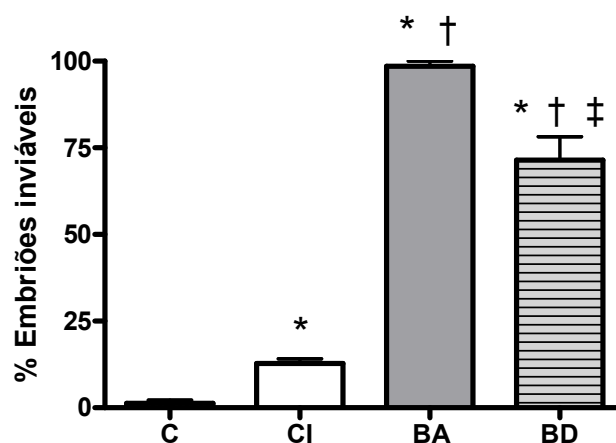
Figura 9 – Efeito radiomodificador do ácido barbático a 50,0 $\mu\text{g/mL}$.



Grupo controle (C), controle irradiado (CI), animais expostos ao ácido barbático antes da irradiação (BA) animais expostos ao ácido barbático depois da irradiação (BD). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $P < 0,05$; * vs C.

Foi realizado então experimento utilizando a concentração de 100,0 µg/mL de ácido barbático. O grupo que foi exposto à substância antes da irradiação (BA) apresentou um aumento na quantidade de embriões inviáveis quando comparado aos grupos controle, bem como ao ser comparado com o grupo controle irradiado (BA: $98,5 \pm 1,5\%$ vs C: $1,3 \pm 0,9\%$ vs CI: $12,8 \pm 1,3\%$). O grupo que foi primeiramente irradiado e depois entrou em contato com a substância líquênica (BD) também apresentou aumento na quantidade de embriões inviáveis quando comparado aos grupos controle e controle irradiado (BD: $71,4 \pm 6,8\%$ vs C: $1,3 \pm 0,9\%$ vs CI: $12,8 \pm 1,3\%$). A administração do ácido barbático antes da irradiação apresentou uma maior quantidade de embriões inviáveis comparado ao grupo que foi exposta a substância depois da irradiação (BA: $98,5 \pm 1,5\%$ vs BD: $71,4 \pm 6,8\%$) (Figura 10).

Figura 10 – Efeito radiomodificador do ácido barbático a 100,0 µg/mL.



Grupo controle (C), controle irradiado (CI), animais expostos ao ácido barbático antes da irradiação (BA) animais expostos ao ácido barbático depois da irradiação (BD). Resultados expressos como média ± erro padrão da média, $P < 0,05$; * vs C; † vs CI e ‡ vs BA.

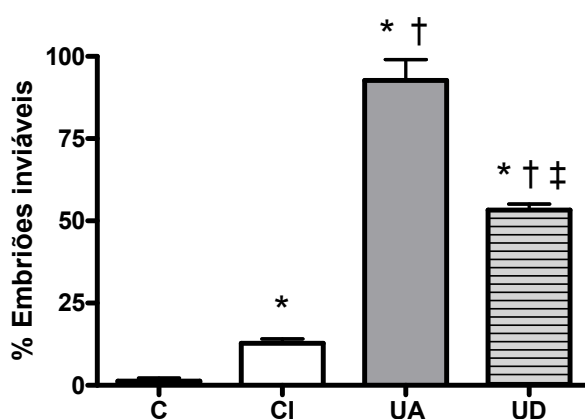
Kumar e Muller (1999a), estudando os efeitos do ácido barbático no desenvolvimento de células de queratinócitos (HaCaT) demonstraram que o ácido barbático na concentração de 4,1 µM possui atividade antimitótica. Atividade também descrita por Hager et al (2008) contra algas na concentração de 0,5 mg.cm⁻². Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que na concentração de 100 µg/mL o ácido barbático apresentou atividade antimitótica para embriões de *Biomphalaria glabrata*.

Os resultados demonstram que o ácido barbático (na concentração de 100 µg/mL) tornou as células embrionárias mais susceptíveis aos efeitos danosos da radiação γ, portanto, apresentou um efeito radiosensibilizador na concentração de 100 µg/mL, uma vez que foi

observado um aumento na mortalidade dos embriões. A exposição dos embriões ao ácido barbático antes da irradiação foi mais eficaz para sensibilizar as células. A substância apresentou efeito radiosensibilizador ao ser utilizada em uma concentração que apresentou baixa toxicidade – possivelmente ocorreu um efeito sinérgico da toxicidade da substância com a “toxicidade” da radiação, uma vez que a concentração utilizada de 100 µg/mL corresponde a aproximadamente 41% da CL_{50} , que foi de 242,7 µg/mL, ou seja, foi responsável pela mortalidade $19,9 \pm 3,5\%$ do embriões, o grupo controle irradiado apresentou $14,1 \pm 2,2\%$, não havendo desta forma um efeito aditivo da toxicidade.

No que diz respeito ao ácido úsnico, a concentração testada para avaliação da capacidade radiomodificadora foi de 0,6 µg/mL. Os embriões expostos à substância antes da irradiação (UA) apresentaram um aumento na quantidade de embriões inviáveis quando comparado aos grupos controle e controle – irradiado (UA: $92,7 \pm 6,3\%$ vs C: $1,3 \pm 0,9\%$ vs CI: $12,8 \pm 1,3\%$). Aqueles embriões que foram primeiramente submetidos a irradiação e logo em seguida expostos ao ácido úsnico (UD), também apresentaram um aumento na quantidade de embriões inviáveis ao comparar com os grupos controle e controle – irradiado (UD: $53,3 \pm 1,8\%$ vs C: $1,3 \pm 0,9\%$ vs CI: $12,8 \pm 1,3\%$), no entanto quando comparado com os animais que foram expostos ao ácido úsnico antes de terem sido irradiados, este último apresentou uma quantidade de embriões inviáveis maior (UD: $53,3 \pm 1,8\%$ vs UA: $92,7 \pm 6,3\%$) (Figura 11).

Figura 11 – Efeito radiomodificador do ácido úsnico.



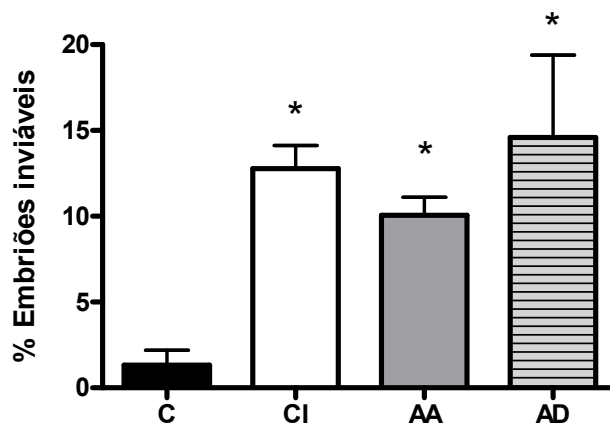
Grupo controle (C), controle irradiado (CI), animais expostos ao ácido úsnico antes da irradiação (UA) animais expostos ao ácido úsnico depois da irradiação (UD). Resultados expressos como média ± erro padrão da média,

$P < 0,05$; * vs C; † vs CI e ‡ vs UA.

Os resultados encontrados para o ácido úsnico são semelhantes àqueles encontrados para o ácido barbático, porém a concentração de ácido úsnico utilizada (0,6 µg/mL) sozinha não apresentou toxicidade para os embriões, possivelmente ocorreu um efeito sinérgico da substância líquênica com a radiação. O resultado demonstra claramente a sensibilização dos embriões de *Biomphalaria glabrata* pelo ácido úsnico, tornando-os mais suscetíveis aos efeitos danosos da radiação γ .

A atranorina foi analisada na concentração de 1000,0 µg/mL, foi observado que ocorreu um aumento na quantidade de embriões inviáveis tanto no grupo de animais que foram expostos à atranorina antes da irradiação (AA), como no grupo de animais que foram expostos à atranorina depois da irradiação (AD), ao comparar esses resultados com o grupo controle (AA: $10,1 \pm 1,0\%$ e AD: $14,6 \pm 4,8$ vs C: $1,3 \pm 0,9\%$). No entanto, este aumento não está relacionado com a utilização da substância, mas sim aos efeitos da radiação γ , uma vez que a quantidade de embriões inviáveis nos grupos AA e AD está semelhante ao grupo controle irradiado (AA: $10,1 \pm 1,0\%$ e AD: $14,6 \pm 4,8$ vs CI: $14,1 \pm 2,2\%$) (Figura 12).

Figura 12 – Efeito radiomodificador da atranorina.



Grupo controle (C), controle irradiado (CI), animais expostos à atranorina antes da irradiação (AA) animais expostos à atranorina depois da irradiação (AD). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $P < 0,05$; * vs C.

Até o presente momento não foi encontrado na literatura estudo avaliando a capacidade radiomodificadora destas substâncias líquênicas. Diversos artigos na literatura demonstram atividades antiproliferativas para as substâncias analisadas (KUMAR; MULLER, 1999a; BESSADOTTIR et al., 2012; SINGH et al., 2013), que estão diretamente relacionadas

com a característica de um radiomodificador, mais precisamente um radiosensibilizador (GREM, 2000).

A atranorina não apresentou uma boa solubilidade, bem como não foi observado atividade antiproliferativa contra embriões de *Biomphalaria glabrata*, corroborando com estudo de Kristmundsdottir et al., (2005), em que a atranorina apresentou solubilidade limitada no solvente Hidroxipropil- β -ciclodextrina e não foi observado atividade antiproliferativa em células de carcinoma mamário (T-47D), carcinoma pancreático (Panc-1) e carcinoma de próstata (PC-3), provavelmente esses são os principais motivos pelo qual a atranorina não apresentou atividade radiomodificadora.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados pode-se concluir que:

- A CL_{50} das substâncias liquênicas foi de: 242,7 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido barbático e 1,3 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido úsnico. A atranorina não apresentou atividade tóxica.
- A maior concentração que não apresentou toxicidade foi: 50,0 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido barbático, 0,6 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido úsnico e 1000,0 $\mu\text{g/mL}$ para a atranorina.
- As substâncias liquênicas não apresentaram atividade antioxidante nas concentrações testadas.
- A radiação γ na dose de 4 Gy, alterou a estrutura química do ácido úsnico, no entanto não alterou a sua atividade biológica.
- O ácido barbático (50,0 $\mu\text{g/mL}$) não alterou a resposta celular.
- A exposição dos embriões ao ácido barbático (100,0 $\mu\text{g/mL}$) e ao ácido úsnico (50,0 $\mu\text{g/mL}$), tanto antes como depois da irradiação, tornou-os mais sensíveis aos efeitos danosos da radiação. Apresentando um efeito radiosensibilizador.
- A atividade radiosensibilizadora foi melhor ao administrar as substâncias antes da irradiação.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.E.; COOKE, M.S. Electron-affinic sensitization. I. A structural basis for chemical radiosensitizers in bacteria. **Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.**, v.15, p.457-471, 1969.
- AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1993.
- AHN, K.J. *et al.* Enhancement of radiation effect using beta-lapachone and underlying mechanism. **Radiat Oncol J.** v.2, p.57-65, 2013.
- ALPEN, E.L. **Radiation Biophysics**. 2nd ed. California, USA: Academic press, 1998.
- ARORA, R. *et al.* Radioprotection by plant products: present status and future prospects. **Phytother. Res.** v.19, p.1-22, 2005.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. Chemistry of Lichen Substances. Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, p.1-240, 1954.
- BACKOROVÁ, M. *et al.* Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology in Vitro.** v.25, p.37-44, 2011.
- BATISTA, G.G.; BENATTI, M.N. Gêneros de macrolíquens do campus da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, município de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v.38, n.2, p.243-255, 2011.
- BELLINI, R. *et al.* The properties of human body phantoms used in calculations of electromagnetic fields exposure by wireless communication handsets or hand-operated industrial devices. **Electromagn Biol Med.** v.32, n.2, p.226-235, 2013.
- BEN SALEM, I. *et al.* Effect of ionising radiation on polyphenolic content and antioxidant potential of parathion-treated sage (*Salvia officinalis*) leaves. **Food Chem.** v.141, n.2, p.1398-1405, 2013.
- BESSADOTTIR, M. *et al.* Proton-shuttling lichen compound usnic acid affects mitochondrial and lysosomal function in cancer cells. **PLoS One.** v.7, n.12, e51296, 2012.
- BITELLI, T. **Física e dosimetria das radiações**. 2^a ed. São Paulo, Brasil: Atheneu, 2006.

BOEHM, F. *et al.* Lichens--photophysical studies of potential new sunscreens. **J Photochem Photobiol B**. v.95, n.1, p.40-45, 2009.

BONNER, J.A. *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N. Engl. J. Med.** v.354, n.6, p.567-578, 2006.

BOUSTIE, J.B.; TOMASI, S.; GRUBE, M. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. **Phytochem Rev.** v.10, p.287-307, 2011.

BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. **Drug Resist Updat.** v.9, n.3, p.111-122, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology.** v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRISDELLI, F. *et al.* Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. **Phytother Res.** v.27, n.3, p.431-437, 2013.

BUGNI, T.S. *et al.* Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. **Fitoterapia.** v.80, n.5, p.270-273, 2009.

BURLANDO, B. *et al.* Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. **Planta Med.** v.75, n.6, p.607-613, 2009.

CAMPANELLA, L. *et al.* Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. **Biochimie** v.84, p.329-334, 2002.

CEMBER, H.; JOHNSON, T.E. **Introduction to Health Physics**. 4th ed. [S.l.]: McGraw-Hill Medical; 2008.

CETIN, H. *et al.* Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae). **Nat. Prod. Res.** 2011.

COCCHIETTO, M. *et al.* A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften.** v.89, n.4, p.137-146, 2002.

COLEMAN, C.N.; TURRISI, A.T. Radiation and chemotherapy sensitizers and protectors. **Crit Rev Oncol Hematol**. v.10, n.3, p.225-252, 1990.

COPELAND, E.S. Mechanisms of radioprotection - a review. **Photochemistry and Photobiology**. v.28, n.5, p.839-844, 1978.

CULBERSON, C.F.J. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. **Chromatog**. v.72, p.133-25, 1972.

DARTNELL, L.R. Ionizing Radiation and Life. **Astrobiology**. v.11, n.6, p.551-582, 2011.

EINARSDÓTTIR, E. *et al.* Cellular Mechanisms of the Anticancer Effects of the Lichen Compound Usnic Acid. **Planta Med**. v.76, n.10, p.969-974, 2010.

FERNANDEZ, E. *et al.* Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein. **J. Photochem. Photobiol**. v.42, p.195-201, 1998.

FOLKES, L.K.; NEILL, P.O. Modification of DNA damage mechanisms by nitric oxide during ionizing radiation. **Free Radic. Biol. Med.**, n., p., 2013.

GERALDINO, B.R. **Estudo dos Efeitos Embriotóxicos de Xenobióticos em *Biomphalaria glabrata***. Rio de Janeiro, ENSP/FIOCRUZ, Laboratório de Toxicologia Ambiental, 2004.

GERSCHMAN, R. *et al.* Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common. **Science**, v.119, p.623-626, 1954.

GIUGNI, U. Use of ionizing radiation sources in metallurgy: risk assessment. **G Ital Med Lav Ergon**. n.34, v.3, p.588-591, 2012.

GREM, J.L. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. **Investigational New Drugs**. v.18, p.299-313, 2000.

GULÇIN, I. *et al.* Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L). **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, n.3, p.325-329, 2002.

GUPTA, V.K. *et al.* Membrane-damaging potential of natural L-(-)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.31, n.12, p.3375-3383, 2012.

HAGER, A. *et al.* Production and bioactivity of common lichen metabolites as exemplified by *Heterodea muelleri* (Hampe) Nyl. **J. Chem. Ecol.** v.34, n.2, p.113-120, 2008.

HARTINGER, C.G. *et al.* Carbohydrate-metal complexes and their potential as anticancer agents. **Curr. Med. Chem.** v.15, n.25, p.2574-2591, 2008.

HONDA, N.K.; VILEGAS, W. A química dos liquens. **Química Nova**, v.21, n.6, 1998.

HOSSEINIMEHR, S.J. Potential utility of radioprotective agents in the practice of nuclear medicine. **Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals**, v.24, n.6, 723-731, 2009.

HOSSEINIMEHR, S.J. Trends in the development of radioprotective agents. **Drug Discov. Today**. v.12, n.19-20, p.794-805, 2007.

HUNT, C.R. *et al.* Histone modifications and DNA double-strand break repair after exposure to ionizing radiations. **Radiat Res.** v.179, n.4, p.383-92, 2013.

HUSSAIN, P.R. *et al.* Effect of post-harvest calcium chloride dip treatment and gamma irradiation on storage quality and shelf-life extension of Red delicious apple. **J Food Sci Technol.** v.4, p.415-26, 2012.

INGOLFSDOTTIR, K. *et al.* Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.6, p.141-144, 1998.

INGOLFSDOTTIR, K. Molecules of Interest Usnic acid. **Phytochemistry**. v.61, p.729-736, 2002.

JIN, J.Q.; LI, C.Q.; HE, L.C. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor-kappa β -dependent tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. **Phytother Res.** v.22, n.12, p.1605-1609, 2008.

KOHLHARDT-FLOEHR, C. *et al.* Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Cornelia Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.101, p.97-102, 2010.

KONIG, G.M.; WRIGHT, A.D. ^1H and ^{13}C -NMR and biological activity investigations of four lichen-derived compounds. **Phytochemical Analysis**. v.10, n.5, p.279–284, 1999.

KRISTMUNDSDOTTIR, T. *et al.* Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.24, p.539–543, 2005.

KUMAR S.; MULLER, K. Depsides as non-redox inhibitors of leukotriene B₄ biosynthesis and HaCaT cell growth. 1. Novel analogues of barbatic and diffractaic acid. **Eur. J. Med. Chem.** v.34, p.1035–1042, 1999a.

KUMAR, K.C.; MULLER, K. Lichen metabolites. 1. Inhibitory action against leukotriene B₄ biosynthesis by a non-redox mechanism. **J. Nat. Prod.** v.62, p.817–820, 1999b.

KUMAR, K.S. *et al.* Nutritional approaches to radioprotection: vitamin E. **Mil. Med.** v.167, n.2, p.57-59, 2002.

LAUINGER, I.L. *et al.* Potential of Lichen Secondary Metabolites against *Plasmodium* Liver Stage Parasites with FAS-II as the Potential Target. **J Nat Prod.** v.76, n.6, p.1064-1070, 2013.

LEGAZ, M. *et al.* Importância Econômica dos Líquens para o Homem. In: XAVIER-FILHO, L. *et al.* Biologia de Líquens. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006, cap. 15.

MALHOTRA, S.; SUBBAN, R.; SINGH, A. Lichens-role in traditional medicine and drug discovery. **Internet. J. Alternative Med.**, v.5, n.2, 2008.

MANOJLOVIC, N. *et al.* Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. **Phytomedicine**. v.19, n.13, p.1166-1172, 2012.

MARTINS, M.C.B. *et al.* *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity. **Braz. arch. biol. technol.** v.53, n.1, p.115-122, 2010.

MAYER, M. *et al.* Usnic acid increases p53 protein expression in MCF7 cancer cells without increasing p53 transcriptional activity. **Anticancer Drugs**. v.16, p.805–809, 2005.

MEEBEN, J. *et al.* Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics. **Orig Life Evol Biosph.** v.3, p.283-303, 2013.

MELO, M.G. *et al.* Anti-inflammatory and toxicity studies of atranorin extracted from *Cladonia kalbii* Ahti in rodents. **Brazilian J. Pharm. Sci.** v.47, n.4, 2011a.

MELO, M.G. *et al.* Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. **Toxicol. In Vitro.** v.25, n.2, p.462-468, 2011b.

MITROVIC, T. *et al.* Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. **Int J Mol Sci.** v.12, n.8, p.5428-5448, 2011.

MOLNAR, K; FARKAS, E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. **Z Naturforsch C.** v.65, n.3-4, p.157-173, 2010.

MOURE, A. *et al.* Natural antioxidants from residual sources. **Food Chem.** v.72, p.145-171, 2001.

NASH, T.H. **Lichen Biology.** 1st ed. [S.l.]: Cambridge University, 1996.

NELIUS, T. *et al.* Clinical outcome of patients with docetaxel-resistant hormone-refractory prostate cancer treated with second line CYC-based metronomic chemotherapy. **Med. Oncol.** v.27, n.2, p.363-367, 2010.

ODABASOGLU, F. *et al.* Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. **Fitoterapia**, v.76, n.2, p.216-219, 2005.

ODABASOGLU, F. *et al.* Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology.** v.103, p.59-65, 2006.

OKAZAKI, K.; ANDRADE, H.F.; KAWANO, T. Effect of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1057-1067, 1996.

PATT, H.M. *et al.* Cysteine protection against X-irradiation. **Science**, v.110, p.213-214, 1949.

PEREIRA, E.C. *et al.* Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos I: *Cladonia corallifera* e *Cladonia substellata*. Ver. UA. Série: Ciências Biológicas, Manaus. v.1, p.65-77, 1996.

PERRY, N.B. *et al.* Antimicrobial, antiviral and citotoxic activity of New Zeland lichens. **Lichenologist**. v.31, p.627-636, 1999.

PIOVANO, M. *et al.* Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. **Bol. Soc. Chil. Quím.**, v.47, p.235-240, 2002.

PIRES, R.H.; LUCARINI, R.; MENDES-GIANNINI, M.J. Effect of Usnic Acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.56, n.1, p.595-597, 2011.

PRITCHARD, H.N.; BRADT, P.T. **Biology of nonvascular plants**. St. Louis: Times mirror/mosby college publishing, 1984.

RABELO, T.K. *et al.* Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Toxicol. In Vitro**. v.26, n.2, p.304-314, 2012.

RALEIGH, D.R.; HAAS-KOGAN, D.A. Molecular targets and mechanisms of radiosensitization using DNA damage response pathways. **Future Oncol**. v.9, n.2, p.219-233, 2013.

RANCAN, F. *et al.* Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. **J. Photoch. and Photob. B: Biology**. v.68, n.2-3, p.133-139, 2002.

RANKOVIC, B.R.; KOSANIC, M.M.; STANOJKOVIC, T.P. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. **BMC Complement Altern. Med.**, v.20, p.11-97, 2011.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, E.S. **Biologia Vegetal**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

RIDDER, M. *et al.* Hypoxic tumor cell radiosensitization: role of the iNOS/NO pathway. **Bull Cancer**. v.95, n.3, p.282-291, 2008.

SAZGARNIA, A. *et al.* Photosensitizing and radiosensitizing effects of mitoxantrone: combined chemo-, photo-, and radiotherapy of DFW human melanoma cells. **Lasers Med. Sci.**, 2013.

SEGATORE, B. *et al.* *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and $[\Delta]E$ model methods. **Phytomed.** v.19, n.4, p.341-347, 2012.

SERT, E. *et al.* Biomonitoring of ^{210}Po and ^{210}Pb using lichens and mosses around coal-fired power plants in Western Turkey. **J. Environ. Radioact.** v.102, n.6, p.535-542, 2011.

SHIRAZI, A.; GHOBADI, G.; GHAZI-KHANSARI, M. A radiobiological review on Melatonin: A novel Radioprotector. **J. Radiant. Res.** v.48, p.263-272, 2007.

SHUKLA, V.; UPRETI, D.K.; PATEL, D.K. Physiological attributes of lichen, *Phaeophyscia hispidula* in heavy metal rich sites of Dehra Dun, India. **J Environ Biol.** v.33, n.6, p.1051-1055, 2012.

SINGH, N. *et al.* Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. **Nutr. Cancer.** v.65, n.1, p.36-43, 2013.

SIPMAN, H.; AHTI, T. Provisional illustrated key to the lichen genus *Cladonia* (incl. *Carassea*) in SW Brazil. 2012. Disponível em: <<http://www.bgbm.fuberlin.de/sipman/Zschackia/Brazil/Cladonia.htm>>. Acessado em: 10 jun. 2013.

SOKOLOV, D.N. *et al.* Anti-viral activity of (-)-and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A (H1N1) **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.22, n.23, p7060-7064, 2012.

SONGTHAVEESIN, C. *et al.* Radio-protective effect of vitamin E on spermatogenesis in mice exposed to gamma-irradiation: a flow cytometric study. **Asian J. Androl.** v.6, n.4, p.331-336, 2004.

SOUZA, C.A. *et al.* Amifostine (WR-2721), a cytoprotective agent during high-dose cyclophosphamide treatment of non-Hodgkin's lymphomas: a phase II study. **Brazilian J. Med. Biological Research.** v.33, p.791-798, 2000.

SPIELMAN, A.A.; MARCELLI, M.P. **Fungos liquenizados: Liquens**. São Paulo, Instituto de Botânica, 2006. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Liquenizados_Spielmann_&_Marcelli.pdf>. Acessado em: 05 jul. 2013.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Experimental studies of the lichen symbiosis: DNA-analyses, differentiation and secondary chemistry of selected mycobionts, artificial resynthesis of two- and tripartite symbioses. **Symbiosis**. v.30, p.207–227, 2001.

SUNTHARALINGAM, N.; PODGORSK, E.B.; HENDRY, J.H. **Basic Radiobiology**. IAEA, 2002. Chapter 14, p.485-504 Disponível em: <http://www-naweb.iaea.org/nahu/dmrp/pdf_files/Chapter14.pdf>. Acessado em: 16 jun. 2013.

TAUHATA, L. *et al.* **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Energia Nuclear, 2003.

TIPPAYAMONTRI, T. *et al.* Efficacy of Cisplatin and lipoplatin™ in combined treatment with radiation of a colorectal tumor in nude mouse. *Anticancer Res.* v.33,n.8, p.3005-3014, 2013.

TUNG-KWANG, L. *et al.* Radioprotective Effect of American Ginseng on Human Lymphocytes at 90 Minutes Postirradiation: A Study of 40 Cases. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 16, n. 5, p. 561-567, 2010.

TURK, H. *et al.* Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin, and olivetoric acid constituents. **Z. Naturforsch C**. v.61, p.499-507, 2006.

TURNER, J.E. **Atoms, Radiation, and Radiation Protection**. 3th ed. [S.l.]:WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 2007.

VIJAYAKUMAR, C.S. *et al.* Anti-inflammatory activity of usnic acid. **Fitoterapia**. v.71, p.564-566, 2000.

WEISS, J.F.; LANDAUER, M.R. Radioprotection by Antioxidants. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.899, n.1, 44-60, 2000.

XU, Y. *et al.* Risk of second malignant neoplasms after cyclophosphamide-based chemotherapy with or without radiotherapy for non-Hodgkin lymphoma. **Leuk. Lymphoma**. v.54, n.7, p.1396-1404, 2013.

YILMAZ, M. *et al.* The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. **Z. Naturforsch., C: Biosci**. v.59, p.249–254, 2004.

ZRADZINSKI, P. Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. **J Med Entomol**. v.50, n.2, p.317-325, 2013.