



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

SÂMIA DAYANA LEMOS DE LACERDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
EXTRATOS ORGÂNICOS DE *Pseudociphelaria aurata* (LÍQUEN).**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
para obtenção do título de mestre
em Saúde Humana e Meio
Ambiente, área de concentração
Biotechnologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. EMERSON PETER DA SILVA FALCÃO

CO-ORIENTADOR: PROFa. DRA. NOEMIA PEREIRA DA SILVA SANTOS

Vitória de Santo Antão
Novembro, 2012

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lúcia Feliciano dos Santos, CRB4: 1650

L131a Lacerda, Sâmia Dayana Lemos de.

Avaliação da atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* de extratos orgânicos de *Pseudociphellaria aurata* (líquen). / Sâmia Dayana Lemos de Lacerda. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2012.

59 folhas: il.; fig.

Orientador: Emerson Peter da Silva Falcão.

Co-orientador: Noemia Pereira da Silva Santos.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Antitumoral. 2. Atividade antineoplásica. 3. *Pseudociphellaria aurata* (líquen). I. Falcão, Emerson Peter da Silva (Orientador). II. Santos, Noemia Pereira da Silva (Co-orientador). III. Título.

589.1 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-003/2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - MESTRADO ACADÊMICO



Dissertação de Mestrado apresentada por **Sâmia Dayana Lemos de Lacerda** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA IN VITRO E IN VIVO DE EXTRATOS ORGÂNICOS DE *PSEUDOCIPHALARIA AURATA* (LÍQUEN)", orientada pelo Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, aprovada no dia 30 de novembro de 2012, pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. ANDRÉ MAURÍCIO MELO SANTOS
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

Dra. IDJANE SANTANA DE OLIVEIRA
Núcleo de Enfermagem – CAV/UFPE

Dr. LEANDRO FINKLER
Núcleo de Nutrição – CAV/UFPE

Autora

Sâmia Dayana Lemos de Lacerda

*Dedico aos meus pais
Dorivaldo Correia de Lacerda (in memoria)
e Maria Sônia Lemos de Lacerda; ao meu
marido Rafael Augusto e meu filho Cauã Raoni.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Emerson Peter e Noemia Pereira, pela compreensão e ensinamentos durante esse percurso.

Ao Dr. Nicácio Henrique pelo apoio no laboratório.

Ao Prof. Francisco Amanajás, pelo apoio na histopatologia dos tumores.

Ao técnico de laboratório Sr. João Virginio, pela disponibilidade em ajudar.

Aos colegas de laboratórios e de turma pela troca diária de experiências.

A Rafael Albuquerque, pelo apoio científico e psicológico em todas as horas.

Aos meus familiares, pela presença mesmo na minha ausência.

A Deus, que me concedeu forças.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1	13
1. Introdução	13
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. Revisão da Literatura	16
CAPÍTULO 2	28
Avaliação da atividade Antineoplásica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de extratos orgânicos de <i>Pseudociphalaria aurata</i> (líquen)	
Resumo	29
Abstract	29
Introdução	30
Material e Métodos	31
Resultados e Discussão	35
Conclusões	44
Referências	44
REFERÊNCIAS GERAIS	46
ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	53

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1	Modelo esquemático da microestrutura do talo liquênico. (A) Fotobionte, ou camada gonidial; (B) Hifas medulares ou medula; (C) Hifas corticais ou córtex superior.....	22
Figura 2	Estruturas moleculares das principais substâncias de <i>Pseudocyphellaria aurata</i> , segundo Huneck e Yoshimura (1996): a. calicina, b. lactona do ácido pulvínico e c. ácido pulvínico.....	27

CAPITULO 2

Figura 1	Cristais obtidos da extração com éter de <i>Pseudocyphellaria aurata</i>	36
Figura 2	Cromatografia de Camada Delgada dos extratos orgânicos de <i>P. aurata</i> , Lact – Lactona, Cal – Calicina, Pul – ácido pulvínico, Et- extrato etéreo, Cl- extrato clorofórmico, Ac – extrato o acetônico	37
Figura 3	Cromatogramas em CLAE dos padrões de <i>P. aurata</i> (a), extrato orgânico etéreo (b), extrato orgânico acetônico (c), extrato orgânico clorofórmico (d) de <i>P. aurata</i> .	38
Figura 4	Atividade citotóxica com células HeLa dos extratos orgânicos etéreo e clorofórmico da <i>P. aurata</i>	39
Figura 5	Massa Tumoral Média dos grupos experimentais.	41
Figura 6	Micrografia em Hematoxilina - Eosina (HE) do Sarcoma 180 a 100x (A) e carcinoma de Ehrlich a 100x (B) tratados com extrato etéreo da <i>P. aurata</i> , do grupo controle tratado com solução salina a 0,9% a 400x (C) e Micrografia AgNor do sarcoma 180 a 400x (D).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alterações nos parâmetros de marcação de AgNORs em células neoplásicas de Tumor de Ehrlich de animais tratados com extrato etéreo de <i>P. aurata</i> em comparação com controle, média $\pm$ desvio padrão.....	43
Tabela 2	Alterações nos parâmetros de marcação de AgNORs em células neoplásica de Sarcoma 180 de animais tratados com extrato etéreo de <i>P. aurata</i> em comparação com controle, média $\pm$ desvio-padrão.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
MTT	brometo (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KB	Carcinoma nasofaríngeo
a.C.	antes de Cristo
PB	Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
DL₅₀	Dose Letal 50 %
AgNOR	Regiões organizadoras nucleolares com Prata Coloidal
UV	Ultravioleta
Rf	Relação de Frente
HeLa	Carcinoma Epidermóide de Colo de Útero
MEM	Meio Essencial Mínimo
PBS	Tampão fosfato-salino
DMSO	Dimetilsulfóxido
s.c	via sub-cutânea
NaCl	Cloreto de sódio
v/v	volume : volume
NBF	Formolina neutra tamponada
H.E.	Hematoxilina – Eosina
Tr	Taxa de retenção

RESUMO

Os metabólitos secundários liquênicos são amplamente descritos na literatura por suas propriedades biológicas, citando-se: antimicrobiana, antiinflamatória, indutora de interferon, cicatrizante, antineoplásica e citotóxica, entre outras. O presente estudo descreve a avaliação da atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* dos extratos orgânicos da *Pseudociphellaria aurata*. O material botânico foi coletado no município de Saloá - PE. Os extratos orgânicos foram obtidos através do método de esgotamento a quente em aparelho de soxlet, seguindo-se a série eluotrópica dos solventes, éter, clorofórmio e acetona. Os extratos foram então rotaevaporados e mantidos em dissecador até peso constante. Foram realizadas análises cromatográficas utilizando-se técnicas em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE). Em seguida, os extratos etéreo e clorofórmico foram utilizados em testes de citotoxicidade, utilizando-se as células HeLa (carcinoma epidermoide do colo uterino) e o método de MTT. Em seguida foram realizados ensaios de toxidez aguda e a determinação da DL50. Por fim, realizou-se a avaliação da atividade antitumoral, utilizando-se os tumores sólidos de Erlich e Sarcoma 180. Os tecidos tumorais foram ainda submetidos à análise histopatológica utilizando-se a técnica de marcação das regiões organizadoras de nucléolos com prata coloidal (AgNOR). O processo de obtenção dos extratos mostrou-se bastante eficiente, sendo obtidos rendimentos de 3,75% de cristais na extração com éter. A análise cromatográfica em camada delgada demonstrou a presença de calicina, ácido pulvínico e sua lactona. Estes dados foram confirmados pelos estudos em CLAE que demonstraram a maior concentração do ácido pulvínico nos extratos etéreo, seguido pelo clorofórmico e sua ausência no extrato acetônico. Os testes de atividade citotóxica mostraram as concentrações inibitórias a 50% (IC50) de $3,75\mu\text{g mL}^{-1}$ e $17\mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos etéreo e clorofórmico, respectivamente, frente as células. Os ensaios de toxidez demonstraram que os extratos apresentaram ausência de toxidez, entretanto não foi possível se determinar a DL50, pois, até a concentração de 2000mg kg^{-1} não se verificou letalidade dos animais testados. O extrato etéreo apresentou relevante atividade antitumoral com uma redução do crescimento tumoral de 67% frente ao sarcoma 180 e de 56,4% frente ao carcinoma de Erlich, em relação ao grupo

controle. Os resultados dos ensaios com a técnica de AgNOR demonstraram que no caso do carcinoma de Erlich houve uma significativa inibição do ritmo mitótico e no Sarcoma 180 maior área de necrose tumoral. Em adição a isto, pode-se sugerir que o principal responsável pelas atividades observadas é o ácido pulvínico, encontrado em maior concentração no extrato mais ativo. O conjunto de dados obtidos foi bastante relevante uma vez que os extratos analisados apresentaram significativa atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* e cujo mecanismo de ação parece estar relacionado com a inibição do processo mitótico e não somente a ação citotóxica propriamente dita.

Palavras – chave: antitumoral; líquen; *Pseudociphellaria aurata*.

ABSTRACT

The secondary metabolites of lichens are widely described in the literature by its biological properties, citing: antimicrobial, anti-inflammatory, inducing interferon, healing, cytotoxic and anticancer, among others. The present study describes the in vitro and in vivo evaluation of antineoplastic activity of organic extracts from *Pseudociphellaria aurata*. The plant material was collected in the city of Saloá, State of Pernambuco, Brazil. The organic extracts were obtained by the method of heat exhaustion in soxlet apparatus, followed by solvents' eluotropic series, ether, chloroform and acetone. The extracts were then rotavaporated and kept in a desiccator until constant weight. Chromatographic analyzes were performed using techniques thin layer (TLC) and high performance liquid (HPLC), in order to determine its phenolic composition. Then, ether and chloroform extracts were used in cytotoxicity assays using HeLa cells (epidermoid carcinoma of the cervix) the MTT method. Then tests and the determination of acute toxicity LD50 were performed. Finally the evaluation of antitumor activity was made, by the use of Ehrlich of solid tumors and Sarcoma 180. The tumor tissues were also subjected to histopathological analysis using the technique of marking of nucleolar organizer regions with colloidal silver (AgNOR). The process of obtaining the extracts proved to be very efficient and it obtained yields of 3.75% of crystal extraction with ether. The thin layer chromatographic analysis demonstrated the presence of calycin, pulvinic acid and its lactone. These data were confirmed by HPLC studies which showed that the highest concentration of pulvinic acid in extracts ether, followed by chloroform and its absence in acetone extract. The tests of cytotoxic activity showed the IC50 of extracts and ethereal chloroform forward cells were respectively 3.75 mg mL⁻¹ and 17 mg mL⁻¹. The toxicity tests showed that extracts showed absence of toxicity, however it was not possible to determine the LD50 for until the concentration of 2000mg kg⁻¹ was not observed lethality of animals tested. The ether extract showed significant antitumor activity and it was observed a reduction of tumor growth of 67% compared with sarcoma 180 and 56.4% against the Ehrlich carcinoma, compared to the control group. The results of tests with AgNOR technique demonstrated that in the case of Ehrlich carcinoma was a significant inhibition of the mitotic rate and the

greater field Sarcoma 180 Tumor necrosis. In addition to this, it can be suggested that the principal responsible for the observed activities is the pulvinic acid, found in highest concentration in the most active extract. The data set was quite relevant since the analyzed extracts showed significant anticancer activity in vitro and in vivo and whose mechanism of action appears to be related to inhibition of the mitotic process and not only to the cytotoxic action itself.

Keywords: antitumor; lichen, *Pseudocyphellaria aurata*.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

Os líquens são organismos que se originam a partir da associação simbiótica entre uma ou mais algas e um fungo, resultando na formação de um talo de estrutura específica, com características morfológicas peculiares que os distinguem das formas que lhes deram origem (HALE, 1983; CARRAZONI, 1983; COCCHIETTO et al., 2002).

A maior parte dessa simbiose é composta de filamentos de fungos (hifas), mas entre os filamentos vivem células de algas, geralmente representantes de clorófitas (verdes) e cianobactérias (azuis), (ALEXOPOULOS et al., 1996). A alga e o fungo associam-se simbioticamente, mas podem também ocorrer na natureza sem seu parceiro. A associação entre a alga e o fungo propicia a transferência de nutrientes entre os organismos, mantendo o equilíbrio de carbono, hidrogênio e outros elementos vitais (SEAWARD, 1977).

Os líquens produzem um grande número de substâncias, intra e extracelulares. Os produtos intracelulares são os carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas, que estão ligados à parede celular e aos protoplastos, sendo frequentemente solúveis em água. A maioria destes compostos não é específica dos líquens, podendo ocorrer em fungos e algas de vida livre, bem como em plantas superiores (NASH, 1996). Os produtos extracelulares são resultantes do metabolismo secundário dos líquens, podendo ser corticais ou medulares. A maioria é de natureza fenólica, insolúvel em água. Estima-se que estas substâncias só ocorrem nos líquens e a elas se credita a utilidade econômica desses seres (DUARTE, 2002).

Investigações biológicas revelam que os metabólitos secundários específicos de líquens exercem atividades fisiológicas interessantes (MOURA, 2008). Como: analgésicos, antipiréticos, antitumorais (WANDERLEY, 2004) antivirais, antioxidantes (BEHERA *et al.* 2005), antinociceptiva, antiinflamatória (OLIVEIRA, 2003), tripanocida (SILVA, 2009), expectorante (WESSEN, 2007), antimicrobianos e citotóxica (MARTINS, 2005).

Os carboidratos liquênicos são mencionados como potentes agentes antitumorais. Em estudos realizados por NISHIKAWA *et al.* (1969) foi verificado uma notável ação antitumoral de heteroglicanos de *Lasallia pensylvanica*, *Usnea rubescens*, *Cladonia crispata*, *C. mitis*, *Cladina ranfigeferina* e *C. squamosa*, algumas dessas espécies apresentando até 99% de inibição tumoral.

A citotoxicidade de metabolitos secundários liquênicos tem sido avaliada, ensaios com o ácido úsnico revelaram que, sendo este sozinho ou como componente de uma formulação oral contra cárie, em células de câncer de epidermóide humana (KB), queratinócitos gengival e fibroblastos de biopsia humana, não apresentaram nenhum sinal de citotoxicidade, através das determinações feitas pelos testes de MTT [brometo (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), vermelho neutro e vermelho neutro modificado. (Lodetti *et al.*, 2000)

Quando a formulações contendo o ácido úsnico foi testado em humanos, efeitos adversos foram reportados como: irritação local e dermatite de contato alérgica. Testes realizados em humanos revelaram que, administrando 0,1-1 g /dia de solução de usnato de sódio não provocaram efeitos tóxicos. Aumentando-se a dose para 3 g/dia, observou-se que os pacientes apresentaram dores no fígado (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Pesquisas demonstraram que modificações estruturais na molécula de ácido úsnico não provocaram alterações na sua atividade antimicrobiana. Porém, produziram um aumento na citotoxicidade, inibindo completamente o crescimento de linfócitos de fígado em cultura. (Correché *et al.*, 1998)

A realização de testes *in vitro* e *in vivo*, para detectar a atividade antitumoral de novas substâncias, é de vital importância para descoberta de novos quimioterápicos. Alguns estudiosos recomendam os testes *in vivo* aplicados à cancerologia experimental, apesar de serem dispendiosos, e com respostas não muito rápidas. Os ensaios *in vitro* eliminam estes problemas, mas exigem confirmação *in vivo*. Não obstante, a necessidade da resposta *in vivo*, os testes *in vitro* auxiliam a triagem de substâncias naturais com potencial ação antineoplásica. Estes ensaios permitem a análise de um grande número de amostras, viabilizando a localização dos princípios ativos em determinadas frações obtidas durante o processo de extração de produtos de origem natural (SANTOS, 2003).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* de extratos orgânicos de ***Pseudociphelaria aurata*** (LÍQUEN).

2.2. Objetivos específicos

- Obter extratos orgânicos de ***Pseudociphelaria aurata***.
- Avaliar a composição fenólica de extratos orgânicos de ***Pseudociphelaria aurata*** através de métodos cromatográficos clássicos, cromatografia em camada delgada (CCD) e de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a atividade Citotóxica de ***P. aurata***, frente a células neoplásicas;
- Avaliar a atividade antitumoral dos extratos frente a tumores experimentais.

3. Revisão da Literatura

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda. (INCA, 2012)

Em países com grande volume de recursos financeiros, predominam os cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon. Em países de baixo e médio recursos, os cânceres predominantes são os de estômago, fígado, cavidade oral e colo do útero. Mesmo na tentativa de se criar padrões mais característicos de países ricos em relação aos de baixa e média rendas, o padrão está mudando rapidamente, e vem-se observando um aumento progressivo nos cânceres de pulmão, mama e cólon e reto, os quais, historicamente, não apresentavam essa importância e magnitude. (INCA, 2012)

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino. (INCA, 2012)

Segundo estatísticas do Instituto Nacional do Câncer, são esperados um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil). (INCA, 2012)

A distribuição dos casos novos de câncer segundo o tipo de tumor e segundo as cinco regiões do país, para o sexo masculino, mostra-se heterogênea entre Estados e capitais do país, o que fica em evidência ao se observar a representação espacial das diferentes 27 taxas brutas de incidência. As regiões Sul e Sudeste, de

maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste, as menores. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário. (INCA, 2012)

O INCA considera o câncer como um nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida.

Estima-se que os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. (INCA, 2012)

Os cânceres podem surgir basicamente através de 3 fatores, a predisposição genética, fatores ambientais e a ingestão de substâncias carcinogênicas através da dieta. Acredita-se que a ingestão de substâncias carcinogênicas através da dieta, é responsável por cerca de 35% de todos os casos de cânceres no mundo. Quando é adicionado um carcinógeno como álcool e cigarro, este percentual aumenta para 60%. A predisposição genética seja responsável aproximadamente por 20% dos casos de câncer, e a maioria desses casos está associada também a exposição ambiental. Os fatores ambientais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. (ADAM *et al.*, 2003).

Os estágios da carcinogênese incluem iniciação, promoção e progressão tumoral. O primeiro estágio envolve uma reação entre as substâncias promotoras do câncer (carcinógeno) e o DNA das células teciduais. Durante este estágio, a suscetibilidade genética é bastante limitante, podendo esta mutação permanecer inativa e o risco de desenvolvimento do câncer ocorre durante o estágio posterior. Este ocorre lentamente por um período de meses a anos (REDDY *et al.*, 2003). No

entanto, acredita-se que a transformação celular é um evento frequente, que em muitos casos, não leva ao desenvolvimento tumoral.

A massa tumoral originada a partir de um único clone celular é constituída por uma população de células heterogêneas. As subpopulações de cânceres diferem em relação a vários atributos fenotípicos, como cariótipo, responsividade hormonal e suscetibilidade a agentes antineoplásicos. Por exemplo, tumores com baixa fração de crescimento como o câncer de mama e de colo do útero possuem uma menor suscetibilidade à quimioterapia, bem como a ausência de antigenicidade das células proporciona uma maior resistência ao ataque (DUNN et al., 2004).

Devido a diversidade biológica do câncer, a associação de diferentes tipos de terapias utilizadas atualmente no tratamento do câncer e a busca de novas estratégias de intervenção têm surgido com uma perspectiva de se atingir uma grande eficácia terapêutica. (SOUSA, 2006)

Existem quatro principais modalidades terapêuticas para o câncer: a cirurgia, a radioterapia, a terapia biológica e a quimioterapia.

A cirurgia é a mais antiga e mais definitiva quando o tumor é localizado e nas condições anatômicas mais favoráveis, sendo um meio simples e seguro para remover tumores sólidos quando o tumor é confinado a um local anatômico de origem. (SALMON & BERTINO, 1996).

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada. As radiações ionizantes são eletromagnéticas ou corpusculares e carregam energia. Ao interagirem com os tecidos, dão origem a elétrons rápidos que ionizam o meio e criam efeitos químicos como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de DNA. A morte celular pode ocorrer então por variados mecanismos, desde a inativação de sistemas vitais para a célula até sua incapacidade de reprodução. (INCA, 2012).

A terapia biológica para câncer inclui, além do transplante de medula óssea, usos de modificadores de resposta biológica como as linfocinas ou anticorpos

monoclonais e agentes como ácido retinóico que podem fazer com que as células tumorais sofram diferenciação e se tornem inofensivas. (BENNETT & PLUM, 1996).

A quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas. São drogas que atuam a nível celular interferindo no seu processo de crescimento e divisão. A maioria dos agentes antineoplásicos não possui especificidade, ou seja, não destrói seletiva e exclusivamente as células tumorais. Em geral, são tóxicos aos tecidos de rápida proliferação caracterizados por uma alta atividade mitótica e ciclos celulares curtos. As drogas antineoplásicas agem especialmente em células que estão em processo de divisão ativa; portanto, são mais eficazes quando utilizadas precocemente, ou seja, quando o tumor é ainda pequeno e cresce exponencialmente. (BONASSA, 2005).

A quimioterapia atualmente é uma das principais modalidades terapêuticas comumente utilizada no tratamento de pacientes com vários tipos de câncer. Contudo, em muitos casos, somente a quimioterapia não leva a resultados terapêuticos satisfatórios como a remissão de tumores e a prevenção de metástase, além de induzir muitos efeitos colaterais nas doses efetivas (SALGALLER, 1998)

Os efeitos colaterais mais comuns ocasionados pelos agentes quimioterápicos são: náuseas, vômitos, dermatite, fadiga, alterações no paladar, alopecia, sudorese, ganho de peso e supressão medular. (SMELTZER e BARE, 2002).

Os pesquisadores buscam novas drogas com alguns pré requisitos para que sejam mais vantajosos do que os tratamentos existentes: não podem exercer toxicidade em células normais, do contrário, promove dano generalizado; precisam promover a morte celular por apoptose; não podem gerar necrose nem induzir a eventos genotóxicos, ou seja, não pode provocar alterações no DNA, do contrário pode estar gerando mais chances de neoplasia.

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos. Muitas dessas

substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos (PHILLIPSON & ANDERSON, 1998).

Depois da descoberta destes medicamentos de origem vegetal, pode-se entender a corrida entre algumas indústrias transnacionais pela busca de substâncias bioativas novas. Nos anos 90 esta busca foi intensificada, especialmente nas florestas tropicais onde se concentra grande parte da biodiversidade (ROUHI, 1997) e especialmente no Brasil, onde a grande maioria das espécies continua sem qualquer estudo químico ou biológico (CORDELL, 1995).

Outra vantagem, ainda é o acúmulo de substâncias puras, pelas plantas. A preocupação da indústria farmacêutica com produtos quirais se intensificou e o mercado de fármacos cardiovasculares, antibióticos, hormônios, vitaminas, antiinflamatórios e antitumorais enantioméricos entre 1994 e 1998 girou em torno de 27%. Este mercado explodiu nos anos seguintes e o faturamento de produtos quirais produzidos a partir de espécies vegetais, a dez anos atrás, alcançou 45,2 bilhões de dólares. Foi muito em função desses dados que a indústria farmacêutica investiu maciçamente em programas de bioprospecção, mesmo que considere um investimento de alto risco. Nos anos noventa, o avanço das tecnologias associados à química combinatória, biotecnologia e estudos genômicos mudou completamente o panorama da pesquisa em Química de Produtos Naturais praticada nos países industrializados. A fitoquímica deixou de ser o alvo. Eram necessários estudos mais abrangentes sobre a função, regulação e natureza desses produtos naturais. A biossíntese bem reconhecida de muitas classes foi o elo de transição para o entendimento de processos moleculares. A corrida vertiginosa por novos protótipos de fármacos gerou as já conhecidas “fábricas de descoberta de produtos bioativos”, onde centenas de extratos poderiam ser testados em um dia. (PINTO ET AL, 2002).

Nesse contexto, foram incluídos os líquens como sendo portadores de compostos químicos inéditos devido à vasta gama da espécie ainda não explorada.

Os líquens são entidades biológicas formadas pela simbiose entre dois seres bastante distintos: um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobiontes). Nessa simbiose, enquanto a alga, através do processo de fotossíntese, produz enormes quantidades de carboidratos para “alimentar” o fungo, este oferece um ambiente propício para o desenvolvimento das algas. Produzem um talo de estrutura estável e

funcionamento ímpar, não comparado a outros grupos taxonômicos, possibilitando a sobrevivência em ambientes onde nenhum dos dois simbiontes viveria isoladamente (RAVEN et al, 2007).

Podem ser encontrados desde o nível do mar até montanhas mais altas. Considerando que podem ser escassos em altitudes extremamente elevadas e em matas escuras. No entanto, podem ser encontrados em desertos, onde as temperaturas são variáveis e em regiões polares com temperaturas muito baixas. Seu limite de tolerância às oscilações climáticas é superior a qualquer outro organismo fotossintetizante (HONDA e VILEGAS, 1999).

A presença de líquens nos mais variados hábitat depende da disponibilidade tanto de fatores físicos e climáticos que proporcionem as condições necessárias para seu desenvolvimento. A maioria dos líquens não apresenta especificidade para substrato, mas existem espécies que apenas se desenvolvem sobre o córtex de árvores, outras sobre as folhas e muitas sobre rochas, alcalinas ou ácidas, necessitando ou não das características como rugosidade, porosidade, dureza, exposição à luz, pH do substrato, presença de partículas no ar, umidade, ventos e temperatura (MACELLI, 2006).

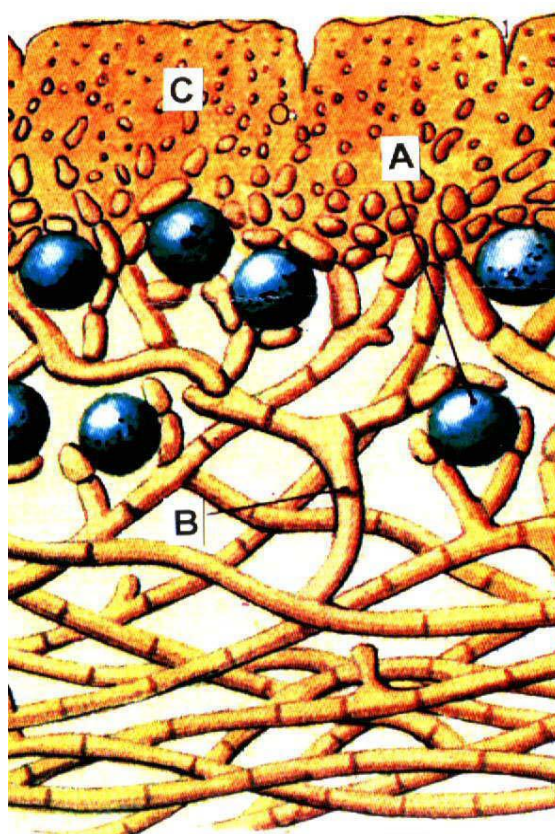
Os líquens podem ocorrer em três distintos hábitos (SPEER, 2012):

- Crustoso (forma de crosta aderida contra o substrato).
- Folioso (forma de folha sobre o substrato).
- Fruticoso (apresenta-se em forma de arbusto).

Mesmo apresentando diversidade de hábitos de crescimento entre si, todos os líquens têm uma morfologia interna similar. As partes componentes do líquen estão dispostas no talo. O talo liquênico é formado principalmente por hifas do fungo e a densidade relativa desses filamentos define as camadas do líquen (XAVIER – FILHO & RIZZINI, 1976).

Na superfície externa ou córtex, os filamentos estão agrupados firmemente para proteger o líquen de outros organismos e reduzir a intensidade da luz que poderia causar dano às células das algas (LEGAZ et al., 1986). As algas estão dispostas abaixo do córtex em uma camada onde as hifas não estão tão densas. Abaixo da camada de algas encontra-se a medula, que corresponde a um feixe de hifas frouxas. Nos líquens foliosos há um segundo córtex abaixo da medula (córtex

inferior), mas nos líquens crustosos a medula está em contato direto com o substrato ao qual o líquen está aderido. A Figura 01 mostra um exemplo de líquen crustoso.



Fonte: PEREIRA (2000)

Figura 1 – Modelo esquemático da microestrutura do talo líquênico. (A) Fotobionte, ou camada gonidial; (B) Hifas medulares ou medula; (C) Hifas corticais ou córtex superior.

As substâncias produzidas pelos líquens são agrupadas de acordo com a localização no talo em produtos intracelulares (carboidratos, carotenóides, vitaminas, aminoácidos e proteínas) e produtos extracelulares, também chamados metabólitos secundários, encontrados na medula (depsídios e depsidonas) ou no córtex. A concentração de metabólitos secundários pode variar de 0,1% a 10% em relação ao peso seco do talo líquênico (HONDA, 1999).

Os metabólitos primários são utilizados pelo fungo para realizar fotossíntese. A partir do transporte massivo de carboidratos fornecidos pela alga, o fungo sintetiza dentro de suas hifas os metabólitos secundários conhecidos como substâncias

liquênicas, que são logo excretadas e depositadas na sua superfície na forma de cristais. Estes, acumulados sobre as hifas do córtex superior, participam do mecanismo adaptativo de diversas espécies (LAWREY,1977). Esses cristais ou metabólitos secundários podem atuar na fotorrecepção, foto-seleção, impermeabilização, regulação de temperatura, etc., e são formados por substâncias que caracterizam os líquens, responsáveis pelos diversos benefícios deles advindos (MACFARLANE et al, 1984; CULBERSON, et al 1977).

Existe conhecimento de aproximadamente 800 compostos provenientes do metabolismo de líquens: ácidos alifáticos, *meta*- e *para*-depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico. Embora muitos desses compostos sejam também produzidos por fungos de vida livre e por plantas superiores, a maior parte é considerada exclusiva dos líquens (ELIX & NASH,1996). A maioria dos metabólitos secundários presentes em líquens é derivada da rota acetato-polimalonato; outros são derivados da rota do ácido chiquímico ou da rota do ácido mevalônico (HONDA, et al 2006).

Os líquens são utilizados, há muito tempo, pela população de diversas partes em mundo como plantas medicinais e por produzirem substâncias oloríferas (óleos essenciais), ou produtos de degradação que geram perfumes muito apreciados. *Evernia furfuracea* era empregada para embalsamar cadáveres – mumificação – no Egito antigo. Fragmentos deste líquen foram encontrados em um vaso da 17ª dinastia egípcia, aproximadamente no século XVII a.C. Quanto ao emprego dos líquens na medicina popular, eram designados como “líquens verdadeiros” aqueles que Dioscorides, cirurgião do exército de Nero, indicava para tratamento de acordo com a semelhança que tivessem com a enfermidade, ou os órgãos afetados. Esta era a “Doutrina dos Sinais” (ABRAHAN E FLOREY, 1949; LLANO, 1951). Alguns líquens como *Lobaria pulmonaria* e *Cetralia islandica* também são relatados para uso medicinal desde o século XVII, sendo incluídos em inúmeras farmacopéias até o século passado (BUSTINZA, 1951a). O uso de *Usnea longissima* como expectorante e para o tratamento local de ferimentos é relatado na China. Há relatos que o pigmento de *Usnea* sp é usado a mais de 50 anos com sucesso para o tratamento da tuberculose (SHIBATA et al, 1949). Na Finlândia, o extrato aquoso obtido a

quente dos chamados musgos das renas (*Cladonia alpestris*, *C. rangiferina* ou *C. sylvatica*) é tradicionalmente usado como remédios para tuberculose (VARTIA, 1950). O interessante é que posteriormente foi verificada a atividade bactericida de extratos desses líquens (LIMA, 2009).

Nas últimas décadas, os líquens têm atraído o interesse da comunidade científica pelos vários relatos de atividade farmacológica e medicinal, entre elas: ação antiespasmódica, espamolítica, histamínica, hipotensiva, hipoglicemiante, neuromuscular e analgésica, tanto periférica como central (APPA-RAO, 1987; SILVA et al, 1997). Também são relatadas na literatura atividades contra leishmaniose cutânea, antioxidante, antinociceptiva e tripanossomicida (FOURNET, et al, 1997; OBADASOGLU et al, 2005; CARVALHO et al, 2005). A capacidade fotoprotetora de metabólitos liquênicos tem sido demonstrada por métodos *in vitro* e *in vivo* (FERNANDEZ et al, 1996; RACAN et al, 2002). Essas descobertas têm estimulado várias especulações sobre o potencial dessas substâncias como fonte de novos fármacos.

Estudos de atividade antibiótica com diversos líquens constataram a eficácia desses contra diversas bactérias, principalmente as Gram-positivas, na década de 40 (BURKHOLDER et al, 1944). O interesse pelas substâncias responsáveis por essa atividade impulsionou os trabalhos de isolamento dos ácidos liquênicos. Bustinza, discípulo de Fleming, foi também um dos precursores neste tema de investigação, estudando a eficiência antimicrobiana de compostos oriundos de líquens, notadamente o ácido úsnico, isômeros e derivados (BUSTINZA & CABALLERO, 1948; BUSTINZA, 1951b). Vários trabalhos continuam investigando a atividade bactericida desses organismos a fim de descobrir novos medicamentos, visto que é cada vez maior o número de microrganismos patogênicos resistentes aos tratamentos comuns (SAENZ, 2006) .

Estudos iniciais envolvendo substâncias liquênicas para verificação de atividade anticancerígena e antitumoral, foram publicados no final da década de 50, onde foi demonstrada a eficiência do ácido polipórico de *Sticta coronata* contra leucemia linfocítica (CAIN, 1960). Testes com extratos brutos e frações polissacarídicas contra tumores sólidos do tipo sarcoma-180 e adenocarcinoma de mama demonstraram resultados significativos (TAKEDA et al, 1972). Alguns

produtos liquênicos nitrogenados impediram por completo o desenvolvimento de tumores ascíticos do tipo carcinoma de Ehrlich; entretanto estes mesmos compostos foram ineficazes contra o sarcoma-180 do tipo sólido (TAKAHASHI et al, 1981).

Estima-se, há algumas décadas, que os compostos liquênicos de natureza fenólica são também eficazes contra neoplasias. O ácido úsnico apresentou alta atividade contra o carcinoma de Lewis (KUPCHA E KOPPERMANN, 1975) e baixa para leucemia linfocítica P388 (TAKAI et al, 1979). Este ácido foi, ainda, o responsável pela ação antitumoral e citotóxica de extratos de *Usnea fasciata*, que possui altos teores do referido composto (PEREIRA et al, 1994). A atranorina, bem como os ácidos protoliquesterínico e nefrosferínico, exibiram forte inibição contra o carcinoma de Ehrlich sólido (HIRAYAMA, et al 1980; SANTOS, 1996).

Estudos com líquens nordestinos e amazônicos vêm sendo avaliados quanto à presença de compostos antineoplásicos. A eficiência de diferentes extratos obtidos de Cladoniaceae contra tumores sólidos do tipo sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich, foi comprovada, bem como contra células KB (carcinoma nasofaríngeo) (LIMA, et al, 1990). Esses mesmos extratos foram altamente eficazes quando testados frente a mais quatro diferentes linhagens celulares (*in vitro*), notadamente os que continham maiores teores de atranorina e dos ácidos úsnico e estético (NASCIMENTO et al, 1994). Líquens de distintas procedências como da Chapada da Diamantina (BA), Antártica e tabuleiros arenosos da Paraíba, demonstraram resultados altamente satisfatórios para testes com extratos brutos, onde a concentração dos princípios ativos é muito baixa (SILVA et al, 1994).

Líquens da caatinga e de brejos nordestinos foram também estudados. *Teloschistes flavicans*, *Ramalina celastri* e *Heterodermia leucomela*, procedentes da caatinga, apresentaram extratos orgânicos e aquosos ativos contra o carcinoma de Ehrlich e células KB; *Ramalina complanata*, ocorrente em brejo de altitude (PB), foi eficaz contra tumores e apresentou atividade contra as células mencionadas (PEREIRA, 1998).

No talo de *Cladonia verticillaris* já foi detectada a presença de vários compostos, entre eles o orcinol, β -metil orcinol, carboxilato, atranorina, ácido evérnico, ácido protocetrário e ácido fumarprotocetrário (PEREIRA, 1989), além

dos produtos intermediários da biossíntese deste último, como o ácido hipoprotocetrárico e seu aldeído (PEREIRA et al., 1999).

As substâncias produzidas pelos líquens se distinguem entre os produtos naturais, devido às atividades biológicas que apresentam. Além da atividade antibiótica, especialmente sobre bactérias Gram-positivas, muitas das substâncias são ativas sobre fungos dermatófitos patógenos (LAWREY, 1986). Existem substâncias que têm mostrado ação inibitória da atividade de enzimas virais, tais como HIV-1 integrase e HSV-1 (NEAMATI, 1997) e de outras enzimas como a lipooxigenase, a histidina descarboxilase e a tirosinase, (INGÓLFSDÓTTIR, 2002) outras inibem a biossíntese de Leucotrieno B₄ (LTB₄) (KUMAR e MULLER, 2000). Além disso muitas substâncias isoladas de líquens têm apresentado também atividade antitumoral.

Apesar do potencial de atividades apresentadas pelas substâncias de natureza fenólica produzida pelos líquens, essas não são usadas corretamente como medicamentos ou substratos para a preparação destes. A limitação para o uso das substâncias produzidas pelos líquens como protótipo para novas drogas se deve não somente à baixa solubilidade apresentada, como também, pelo efeito tóxico da maioria dos derivados fenólicos. Entretanto, uma substância mediante modificações estruturais e/ou funcionalizações, pode ter sua solubilidade alterada, a atividade e a toxicidade potencializada. Assim, através de um planejamento racional é possível modificar uma determinada substância alterando a solubilidade e a atividade. (MICHELETTI et al, 2009).

Dentre as espécies de líquens pouco estudadas quanto a suas propriedades biologicamente ativas e composição fenólica, encontra-se a *Pseudociphelaria aurata*.

Pseudociphelaria aurata (Ach.) Vainio é um fungo liquenizado pela alga verde *Dictyo chloropsis symbiotica* (CORDEIRO et al., 2005), pertencendo à família Lobariaceae, que inclui macrolíquens folhosos de gêneros relacionados. Possui hábito folhoso, podendo ser facilmente destacada de seu substrato, geralmente córtex de árvores ou arbustos. A superfície superior é esverdeada quando úmida, pardacenta ou castanho-avermelhada quando seco, com proeminente margem sorediada amarela. A reprodução se dá principalmente através da formação de

numerosos sorédios granulares amarelos; apotécios são raros. As pseudocifelas irregulares e amarelas na parte inferior do talo são características da espécie, que revela também a coloração amarela da medula devido à presença de compostos secundários da via do ácido chiquímico. O tomento geralmente é curto, não denso, castanho claro. Pode ter a cianobactéria *Nostoc sp.* em cefalódios como fotobionte secundário, principalmente em exemplares de grandes altitudes (GALLOWAY, 1988; FLEIG, 1999; MONCADA & FORERO, 2006).

P. aurata tem distribuição ampla em estados do sul e sudeste do Brasil, sobretudo em localidades cuja altitude proporcione a ocorrência de baixas temperaturas, e umidade relativa do ar alta (FLEIG, 1999). Em Pernambuco, o grupo de liquenologia da UFPE registrou ocorrência da espécie em brejos (Garanhuns, Poção, Arcoverde, Saloá), que possuem as características supracitadas para o sul e sudeste brasileiro (LIMA *et al.*, 2004).

Segundo Culberson (1969), as principais substâncias de *P. aurata*, muitas vezes relatada como *Sticta aurata*, são a calicina (Figura 2a), o ácido pulvínico (Figura 2c) e sua lactona (Figura 2b), esta última às vezes chamada de *stictaurina*. As três substâncias são derivadas do ácido pulvínico, compostos amarelos e laranjas, formadas pela via do ácido chiquímico. Huneck e Follmann (1967 *apud* CULBERSON, 1970) isolaram 1.2% de calicina e 3% de lactona do ácido pulvínico a partir de 5g de líquen. Huneck *et al.* (*apud* CULBERSON, 1977) relatam mais três substâncias, o durvilonol, o durvilodiol e uma outra substância neutra não identificada.

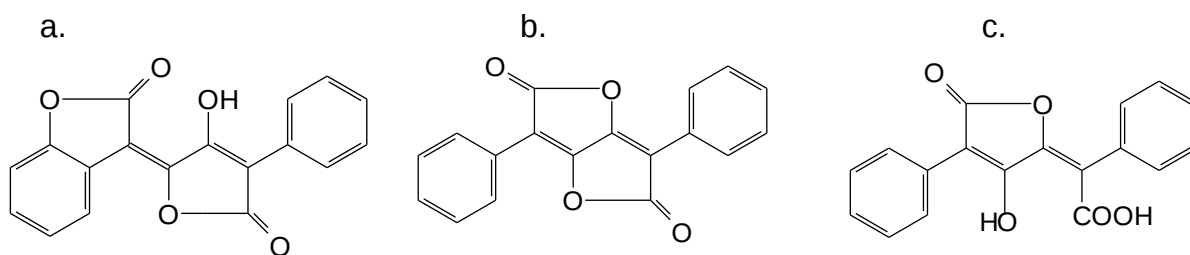


Figura 2- Estruturas moleculares das principais substâncias de *Pseudocyphellaria aurata*, segundo Huneck e Yoshimura (1996): **a.** calicina, **b.** lactona do ácido pulvínico e **c.** ácido pulvínico.

CAPITULO 2

Artigo a ser submetido ao periódico:

Acta Botanica Brasilica

ISSN: 0102-3306 – versão impressa

1677-941X – versão online

Avaliação da atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* de extratos orgânicos de *Pseudociphellaria aurata* (líquen).

Sâmia Dayana Lemos de Lacerda¹; Emerson Peter da Silva Falcão^{2,3}; Noemia Pereira da Silva Santos²; Nicácio Henrique da Silva⁴; Eugênia Cristina Pereira⁵; Rafael Augusto Albuquerque Ribeiro da Silva²

Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco.

1-Parte de dissertação de mestrado do autor, Programa de pós-graduação em saúde humana e meio ambiente;

2- Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco;

3- Autor para correspondência: emerson_falco@yahoo.com.br;

4- Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco;

5- Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Departamento de Ciências Geográficas – Universidade Federal de Pernambuco

Avaliação da atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* de extratos orgânicos de *Pseudociphellaria aurata* (líquen).

RESUMO

(Avaliação da atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* de extratos orgânicos de *Pseudociphellaria aurata*, líquen). Este estudo descreve a avaliação da atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* dos extratos orgânicos da *Pseudociphellaria aurata* (Líquen). O material botânico foi coletado no município de Saloá-PE. Os extratos orgânicos foram obtidos através do método de esgotamento a quente. Foram realizadas análises cromatográficas e avaliados a citotoxicidade, a atividade antitumoral, o ritmo mitótico e a histopatologia. O extrato etéreo apresentou o maior rendimento, 3,75%. A análise em CCD demonstrou a presença de calicina, ácido pulvínico e sua lactona, estes dados foram confirmados em CLAE, demonstrando a maior concentração do ácido pulvínico no extrato etéreo, seguido pelo clorofórmico e sua ausência no extrato acetônico. Os testes de atividade citotóxica mostraram IC₅₀ de 3,75µg mL⁻¹ e 17µg mL⁻¹ para os extratos etéreo e clorofórmico, respectivamente. Os ensaios de toxidez mostraram que os extratos apresentaram baixa toxidez, não sendo determinada a DL50. A atividade antitumoral apresentada pelo extrato etéreo foi de 67% frente ao sarcoma 180 e de 56,4% frente ao carcinoma de Erlich, em relação ao grupo controle. Os resultados dos ensaios de AgNOR demonstraram para o carcinoma de Erlich uma significativa diminuição do ritmo mitótico. Portanto, pode-se sugerir que o principal responsável pelas atividades observadas é o ácido pulvínico. O conjunto de dados indica que a atividade antineoplásica verificada tem seu mecanismo relacionado com a inibição do processo mitótico e não somente a ação citotóxica propriamente dita.

Palavras – chave: antitumoral; líquen; *Pseudociphellaria aurata*.

ABSTRACT

In vitro and in vivo evaluation of antineoplastic activity of organic extracts of *Pseudociphellaria aurata* (lichen). This study describes the evaluation of antineoplastic activity in vitro and in vivo organic extracts of *Pseudociphellaria aurata* (lichen). The plant material was collected in the municipality of Saloá-PE. The organic extracts were obtained by the method of heat exhaustion. Chromatographic analyzes were performed and evaluated the cytotoxicity, antitumor activity, the mitotic rhythm and histopathology. The ether extract had the highest yield, 3.75%. The analysis showed the presence of TLC calicina, pulvínic acid and its lactone, these data were confirmed by HPLC, showing a higher concentration of acid in

pulvínic ether extract, followed by chloroform and acetone extract in his absence. The cytotoxicity tests showed IC₅₀ of 3.75 mg mL⁻¹ and 17 µg mL⁻¹ for chloroform and ether extracts respectively. The toxicity tests showed that the extracts showed low toxicity, the LD₅₀ not determined. The antitumor activity displayed by the ether extract was 67% compared with sarcoma 180 and 56.4% against the Erhlich carcinoma, compared to the control group. The test results demonstrated for the AgNOR carcinoma Erlich a significant decrease in the mitotic rate. Therefore, one may suggest that the principal is responsible for the activities observed acid pulvínico. The data set indicates that the antineoplastic activity has verified its mechanism related to inhibition of the mitotic process and not only the cytotoxic action itself.

Key words: antitumor; lichen, *Pseudocyphellaria aurata*.

Introdução

A simbiose existente nos líquens possibilita a produção de diversos compostos, a maioria originados de metabolismo secundário desses organismo. Esses compostos são em sua maioria fenóis. As atividades biológicas dessas substâncias foram elucidadas por vários autores (CONHEN, 1996; NANDI et al., 2007; SELASSIE et al., 2005).

Um dos maiores interesses no estudo químico dos líquens está na sua possibilidade de sua atividade antitumoral. Os estudos relacionados a esta atividade tiveram início no final da década de 60 (SHIBATA *et al.*, 1968).

Estudos envolvendo a ação antitumoral e citotóxica dos metabólitos secundários frente a tumores experimentais comprova que essas substâncias exercem função de inibição do crescimento tumoral. Apoptose, captação de radicais, antioxidantes e características pró-oxidantes são os principais mecanismos de ação da atividade antitumoral dos compostos fenólicos e vários estudos quantitativos de estrutura e atividade têm sido realizados (SELASSIE *et al.*, 2005; ODABASOGLU *et al.*, 2005; NANDI *et al.*, 2007).

Extratos dos líquens *Cladonia convoluta*, *Cladonia rangiformis*, *Parmelia caperata*, *Plastimatia glauca* e *Romalia cuspidata* apresentaram atividade citotóxica em linhagens de células neoplásicas humanas, mielogenoma leucêmico, metástase de carcinoma de próstata adenocarcinoma de mama e glioblastoma (BÉZIVIN *et al.*, 2003).

O presente estudo objetivou obter extratos orgânicos de *Pseudocyphellaria aurata*, analisar sua composição fenólica e avaliar a ação antitumoral *in vivo*. Considerando que não

foram encontrados dados anteriores que remetam a atividade desses compostos fenólicos e do extrato orgânicos do referido líquen.

Materiais e métodos

Coleta e armazenamento do material líquênico

Amostras de *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio foram coletadas na Serra da Prata – coordenadas 24L 0742998 e UTM 9001885 – município de Saloá-PE. Após a limpeza, o material líquênico foi acondicionado em sacos de papel até o momento de seu processamento.

Preparo dos extratos orgânicos

O Material botânico teve seus compostos fenólicos extraídos através da maceração de 20g do talo seco com 100mL dos solventes: éter, clorofórmio e acetona, seguindo a série eluotrópica, através da técnica de esgotamento a quente em soxlet. Os extratos orgânicos foram evaporados em rota-evaporador até secura. Os extratos orgânicos secos foram mantidos em dissecador até peso constante e posteriormente utilizados para ensaios de citotoxicidade, DL50 e atividade antitumoral

Análise dos fenóis líquênicos

A análise da fração fenólica foi realizada por meio de técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), e líquida de alta eficiência (CLAE). Para os ensaios em CCD os extratos orgânicos (etéreo, clorofórmico e acetônico) foram diluídos até a concentração de $2,0\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, sendo aplicados 5 μl da solução em cromatoplasas de sílica Gel F Merck F-254nm (20 x 20cm; 0,25mm de espessura). A fase móvel utilizada foi o sistema, Hexano: acetato de etila (9:1). De acordo com a metodologia descrita por Culberson (1972). As bandas foram observadas sob luz UV de comprimento de onda curta (254nm) e longa (365nm), e reveladas com ácido sulfúrico a 10% e aquecimento a 100 °C/10min, sendo identificadas por suas reações de cor, e Rf comparados aos dos padrões já conhecidos para espécie.

No tocante à análise em CLAE foram injetados $0,1\text{mg mL}^{-1}$ das amostras em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado a um detector de UV da marca CG. As condições de cromatografia obedeceram à metodologia de Legaz & Vicente, 1983, a citar: coluna de fase reversa MicroPack MCH-18 (300mm x 4mm I.D.), volume de injeção 10 μL ; fase móvel metanol:água:ácido acético (80:19,5:0,5 v/v) em sistema isocrático; pressão 88 atm; temperatura ambiente ($28^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$); detector de UV a 254nm.

Ensaio de citotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia da UFPE. Foram utilizadas células da linhagem Hela (Carcinoma epidermóide de colo de útero) em fase exponencial de crescimento, após 24h de repicadas. As células foram cultivadas em DMEM (Meio Essencial Mínimo Dubelco), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de uma solução de antibióticos (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250mg/mL) e 1% de glutamina 200 μM . Em seguida foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida, enriquecida com 5% de CO_2 .

A viabilidade celular foi determinada utilizando exclusão do Azul Tripán, corante vital capaz de penetrar facilmente nas células eventualmente danificadas pelas manipulações experimentais, corando-as em azul; as células íntegras, vivas, permanecem incolores (Weisenthal *et al.*, 1983).

A avaliação da citotóxicidade foi determinada utilizando método colorimétrico MTT ou brometo {3-[4,5 dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio}. Este método se baseia na capacidade apresentada por células de reduzir o sal tetrazólio a cristais azuis (formazan), que precipita pela ação da enzima mitocondrial succinil desidrogenase, ativa apenas para células vivas. Uma solução de MTT a 5% foi preparada em PBS – Phosphate Buffered Saline, estéril, em agitador magnético, durante 4h, em ausência de luz e em seguida filtrada em filtro Millipore com poros de 0,22 μm de diâmetro; esta solução foi conservada em refrigerador, ao abrigo de luz, durante um mês (Mosmann, 1983, modificado por Carmichael *et al.*, 1987 e Alley *et al.*, 1988). Nos ensaios de citotoxicidade foi utilizada uma suspensão de 5×10^4 células/mL. Esta foi distribuída em placa com 96 poços (198 μL em cada poço). Decorridos 24h foram adicionado 22 μL dos extratos orgânicos de *Pseudociphellaria aurata*, dissolvidos em DMSO (dimetilsulfóxido), nas concentrações de 20; 10; 5 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Após 72h de incubação,

foram adicionados 15µL de MTT em cada poço. As placas foram reincubadas nas mesmas condições, por um período de 2h, após o qual o meio de cultura foi removido e adicionado 100µL de DMSO em cada poço, para solubilização dos cristais (Formazan). A leitura foi realizada em leitor automático para placas Multiskan ELX-800, a 540nm.

O desenvolvimento das células tratadas foi comparado ao das células controle, onde a percentagem de inibição foi calculada através da fórmula: $(C - T) / C \times 100$, onde C é a média das células controle, e T é a média das células tratadas.

Ensaio de toxidez aguda -Determinação da dose letal média (DL50)

Os ensaios de atividade antitumoral foram precedidos de testes para a determinação da toxidez dos derivados pirimidínicos, segundo a metodologia de Karber & Berhrens (1964), modificada por Berlion (1988). Nos experimentos foram utilizados camundongos machos albinos suíços, divididos em lotes de quatro animais. A via de administração utilizada foi a intraperitoneal.

O ensaio consistiu em duas fases, uma preliminar e outra definitiva. Na primeira fase, os animais foram divididos em lotes e receberam em única dose a droga teste, em concentrações crescentes, seguindo uma progressão geométrica de razão 2,0. A finalidade foi determinar qual a maior dose que não apresenta letalidade (D1) e a menor que apresenta 100% de letalidade (D2). A partir dos dados da fase preliminar iniciou-se a fase definitiva. Os animais receberam doses da droga compreendidas entre D1 e D2, seguindo uma progressão geométrica de razão 1,5. Em seguida, os animais foram observados durante quatro horas (com anotações a cada 10 min.) e acompanhados por período de 24, 48 e 72h. Os resultados finais foram avaliados segundo a fórmula:

$$DL50\% = Df - \frac{\sum(a.b)}{n}$$

Df = dose mínima capaz de matar todos os animais

a = diferença entre duas doses consecutivas administradas

b = média de animais mortos entre duas dose consecutivas

n = número de camundongos por lote

Avaliação da atividade antitumoral in vivo

Para a avaliação da atividade antitumoral foram empregados 60 camundongos albinos Swiss, machos com idade de 35 a 60 dias e peso médio de 30,0 g, provenientes do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-Lika-UFPE. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob ciclo dia/noite natural (12h luz e 12h escuro), com livre acesso de água e alimento durante o experimento e distribuídos em grupos ($n= 10$ grupo) segundo delineamento experimental.

Os testes de Atividade antitumoral foram realizados, segundo a metodologia descrita por Stock et al., (1965). Nestes estudos foram avaliadas dois tumores experimentais, um de origem epitelial, o Carcinoma de Ehrlich e outro de origem conjuntiva, o Sarcoma 180. Células do tumor ascítico ($5,0 \times 10^6$ células ml^{-1}) foram inoculadas via subcutânea (s.c) na região dorsal direita do camundongo. Após 24 h de inoculação teve início o tratamento, realizado por 7 dias consecutivos. Injeções de soluções dos extratos eteréo de *Pseudocyphellaria aurata*, administrados intraperitonealmente numa dose equivalente a 200 mg/ kg. As amostras contendo os extratos foram preparadas em solução estéril de NaCl a 0,9% contendo Tween 80 a 0,05% (v/v). Os animais do grupo controle tratados com o veículo (solução de NaCl a 0,9 estéril). Após 7 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os tumores e órgãos (fígado, rins e baço) foram dissecados e pesados, consecutivamente submetidos a estudos histopatológicos.

A inibição tumoral determinada a partir do peso médio tumoral dos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle não tratado.

Durante o ensaio todos os animais examinados diariamente quanto a sua mobilidade e presença de alguns sinais clínicos tais como diarreia, dispnéia e prostração. Os dados avaliados foram anotados em ficha própria, individual para cada camundongo. O peso corpóreo e a quantidade de alimento consumida.

Estudos histopatológicos

As espécimes de tecido obtidas foi mergulhado em uma solução de formol a 10 % neutro tamponado (NBF), permanecendo nesta solução pelo período de 24 horas. Após esse

procedimento, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Para cada fragmento tumoral foram confeccionados cortes semi-seriados com espessura 5µm. Assim, os cortes obtidos foram colocados em lâminas untadas com albumina e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, por 24 horas para secagem.

Avaliação microscópica e estatística.

Os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.) para a descrição histomorfológica preliminar. Para a técnica de AgNOR (Ploton *et al.* 1986), os cortes foram tratados previamente em solução de ácido acético/etanol (1:3) durante cinco minutos, lavados com etanol absoluto (três vezes) e deixados em água deionizada corrente por 15 minutos. Então foram secos com papel-filtro e receberam a solução aquosa de nitrato de prata (50%) misturada com solução de gelatina (2% em solução de ácido fórmico a 1%) na proporção de 2:1. A solução de prata foi incubada por 30 minutos, em temperatura ambiente e em estufa a 45°C.

As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por câmera digital (Moticam 3.0) acoplada ao microscópio óptico (Nikon E-200), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 20 campos por lâmina com aumento final de 1000X.

As fotomicrografias foram avaliadas através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.) o plugin “cell counter” será utilizado na contagem dos AgNORs por célula (200 células tumorais por animal) e o plugin “color deconvolution” na determinação da área dos AgNORs por célula (µm²) e a porcentagem da área celular ocupada por estes.

Os dados da contagem obtidos foram analisados estatisticamente através do teste de Mann-Whitney com o intuito de se verificar possíveis diferenças entre os grupos. Para tanto, foi adotado o nível de significância de 5% ou $p < 0,05$.

Resultados e discussões

A produção de metabólitos secundários liquênicos pode ser influenciada por condições ambientais, variações de temperatura, pois esses podem interferir na atividade

fisiológica dos líquens. Também podem influenciar na produção de metabólicos os fatores como a idade do talo e fatores genéticos (Hale, 1983).

Durante o processo de extração do material liquênico, observou-se a sedimentação e formação espontânea de cristais os quais foram utilizados para realização de cromatografia camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. A concentração de metabólitos secundários pode variar de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo liquênico, embora em alguns casos a concentração possa ser mais alta (Galun *et al.*, 1988). Os rendimentos das extrações realizadas foram aproximados aos citados por Asahina e Shibata (1954); na qual obtiveram 3,12% de cristais com aspectos semelhantes aos obtidos na extração realizada no atual trabalho. Houve variação entre os solventes utilizados, sendo encontrado maior formações de cristais na extração etérea, obtendo 3,75% desses cristais (Fig. 1). No extrato acetônico foram obtidos 3,0% de substância amorfa com coloração amarelada, e no extrato clorofórmico onde o rendimento foi menor, com 0,68% de substância amorfa escura.



Figura 1. Cristais obtidos da extração com éter de *Pseudociphalaria aurata*.

Porém nas CCD evidenciaram-se as principais substâncias nos três extratos; em concentrações diferentes (Fig. 2). As três principais substâncias encontradas na espécie: calicina (Rf 0,78), o ácido pulvínico (Rf 0,09) e sua lactona (Rf 0,80). Valores semelhantes aos reportados por Huneck & Yoshimura (1996), para as mesmas substâncias. Evidenciou-se também a presença de alguns outros metabolitos não claramente descritos para espécie.

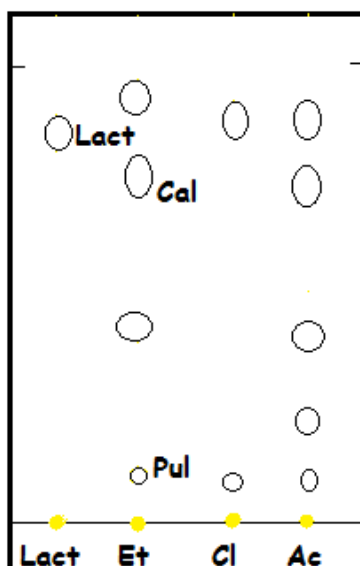


Figura 2. Cromatografia de Camada Delgada dos extratos orgânicos de *P. aurata*, Lact – Lactona, Cal – Calicina, Pul – ácido pulvínico, Et- extrato etéreo, Cl- extrato clorofórmico, Ac – extrato o acetônico

A análise em CLAE corroborou os resultados observados em CCD. Foram observados em todos os extratos um conjunto principal de três picos, exceto para o extrato clorofórmico, onde o primeiro dos picos está ausente. Tais picos, em sua sequência de eluição na coluna, quando relacionada à CCD deve corresponder ao ácido pulvínico ($Tr = 3,2$), calicina ($Tr = 5,7$) e a lactona do ácido pulvínico ($Tr = 6,2$). A pequena variação nos tempos de retenção entre os extratos pode estar relacionada ao tipo de injetor utilizado. Para o extrato acetônico ainda se verifica um pico adicional mais elevado.

Este pode corresponder a um composto resultante de reação fotolítica ou oxidativa do ácido pulvínico. Em experimentos de cromatografia em coluna foram verificadas alterações de cor, em questão de horas, do referido composto, uma vez isolado. Este fenômeno dificultou o procedimento de purificação (dados ainda não publicados). Esta hipótese é ainda corroborada por Xavier (2008) que chama a atenção para a possível presença nos extratos desta espécie de compostos fotorreativos.

Nos resultados é possível ainda se verificar que o extrato em que a concentração de ácido pulvínico foi maior no acetônico, seguida pelo etéreo, o que é esperado em face da polaridade dos solventes e o composto em questão. Já a calicina e a lactona do mencionado ácido aparecem em maior concentração no extrato clorofórmico, seguida pelo etéreo (Fig. 3)

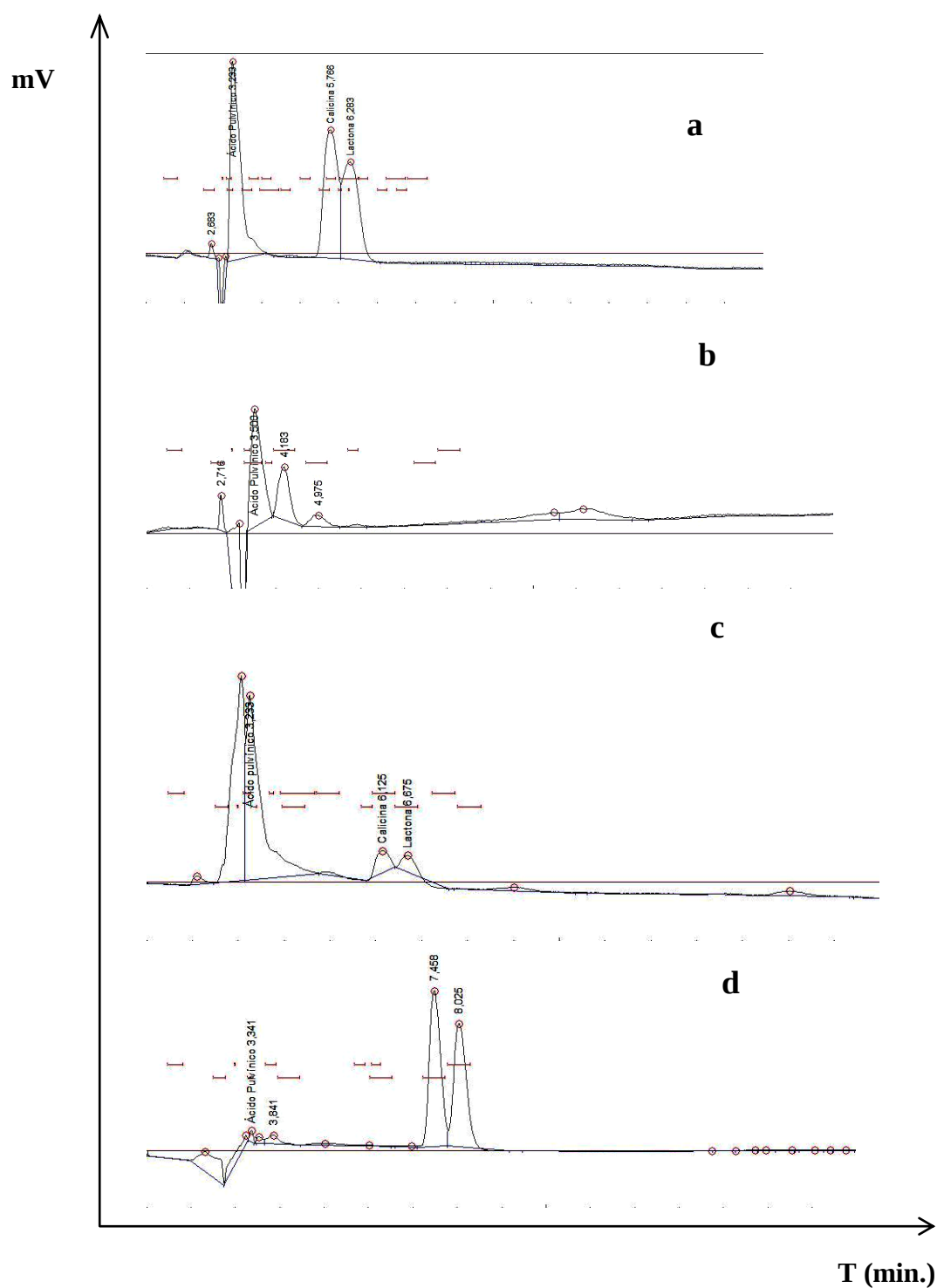


Figura 3. Cromatogramas em CLAE dos padrões de *P. aurata* (a), extrato orgânico etéreo (b), extrato orgânico acetônico (c), extrato orgânico clorofórmico (d) de *P. aurata*.

Na determinação da atividade antineoplásica *in vitro* realizados com as células HeLa (carcinoma epidermoide do colo de útero), foram testados extratos orgânicos etéreo e clorofórmico da *Pseuddociphellaria aurata*, além grupo celular testado com solução salina, representando o grupo controle. Ambos nas concentrações de 2,5; 5,0; 10; e 20µg/ml. Apresentaram em todas as doses utilizadas variações na viabilidade celular, sendo mais evidente no extrato etéreo, no qual, na maior dose utilizada apresentou 9,1% de viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (Fig. 4). Esse achado deve-se provavelmente pela ação do ácido pulvinico, pois é o metabolito secundário mais evidenciado na CLAE do extrato etéreo, porém existem outras substâncias que podem atenuar essa ação do extrato etéreo, considerando que no extrato clorofórmico também apresenta concentrações significativas do ácido pulvinico. Também não se pode descartar a hipótese de que os outros metabolitos presentes no extrato clorofórmico, como se evidenciou a calicina e lactona, possam ter algum tipo de ação bloqueadora do efeito citotóxico do ácido pulvinico, ou quando usados combinados possam antagonizar o efeito citotóxico presente no ácido pulvinico, pois não verificou-se ações citotóxicas comuns aos extratos testados.

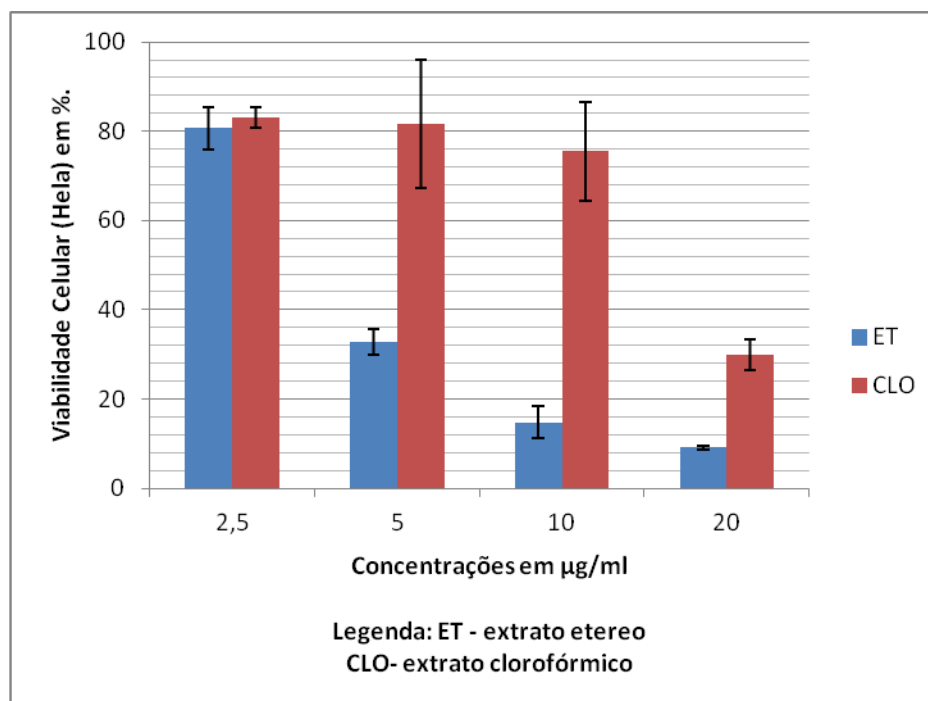


Figura 4. Atividade citotóxica com células HeLa dos extratos orgânicos etéreo e clorofórmico da *P. aurata*.

Considerando os resultados da viabilidade celular dos extratos testados, estimou-se a concentração inibitória mínima para 50% das células (IC 50%) sendo $3,75\mu\text{g mL}^{-1}$ e $17\mu\text{g mL}^{-1}$, para os extratos etéreo e clorofórmico, respectivamente. Confirmando que para haver ação citotóxica expressiva do extrato etéreo necessita-se de uma dosagem menor quando comparada ao extrato clorofórmico.

Nos ensaios de toxicidade aguda *in vivo*, observou-se que o extrato bruto etéreo não apresentou sinais de toxicidade nos animais avaliados até a concentração de 2000mg/ml. Também não foram evidenciadas presença de animais mortos em todas as doses testadas (500mg/kg, 1000 mg/kg e 2000mg/kg). Durante as 48 horas não foram evidenciadas reações expressivas tais como diarreias e piloereção até as doses de 2000mg/ml. Não sendo possível determinar a DL50% desta fração orgânica testada.

Nos estudos de atividade antitumoral *in vivo* foram avaliados os seguintes tumores sólidos experimentais, Sarcoma 180 e Carcinoma de Erlich. Os resultados expressaram diferenças de inibição tumoral entre os tumores testados. Quando testado o extrato orgânico etéreo na concentração de $200\text{mg mL}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, o tumor Sarcoma 180 apresentou 67% de crescimento tumoral, e 33% de inibição tumoral quando comparado ao grupo controle, testado com solução salina 0,9%. Enquanto os animais implantados com o tumor carcinoma de Erlich demonstraram um crescimento tumoral de 56,4%, e 43,6% de inibição tumoral quando comparado ao grupo controle.

A massa tumoral média desses tumores também apresentou diferenças expressivas. Porém apesar do carcinoma de Erlich apresentar uma redução na massa tumoral frente ao Sarcoma 180, não há diferença significativa na redução do crescimento tumoral (Fig 5). A massa tumoral média do Sarcoma no grupo controle foi de 1,757g, enquanto que no grupo tratado com extrato orgânico etéreo foi 1,177g, tendo redução significativa no crescimento tumoral. No Carcinoma de Erlich a massa tumoral média no grupo controle foi de 1,386g, e no grupo tratado com extrato etéreo foi 0,780g. Dados que indicam uma ação antitumoral do extrato orgânico etéreo do líquen estudado; evidenciado pela diminuição do crescimento tumoral em ambos os tumores, que, entre eles não apresentam crescimento desiguais, porém quando comparados ao grupo tratado com solução salina 0,9%, apresentam redução no crescimento, com inibição tumoral significativa.

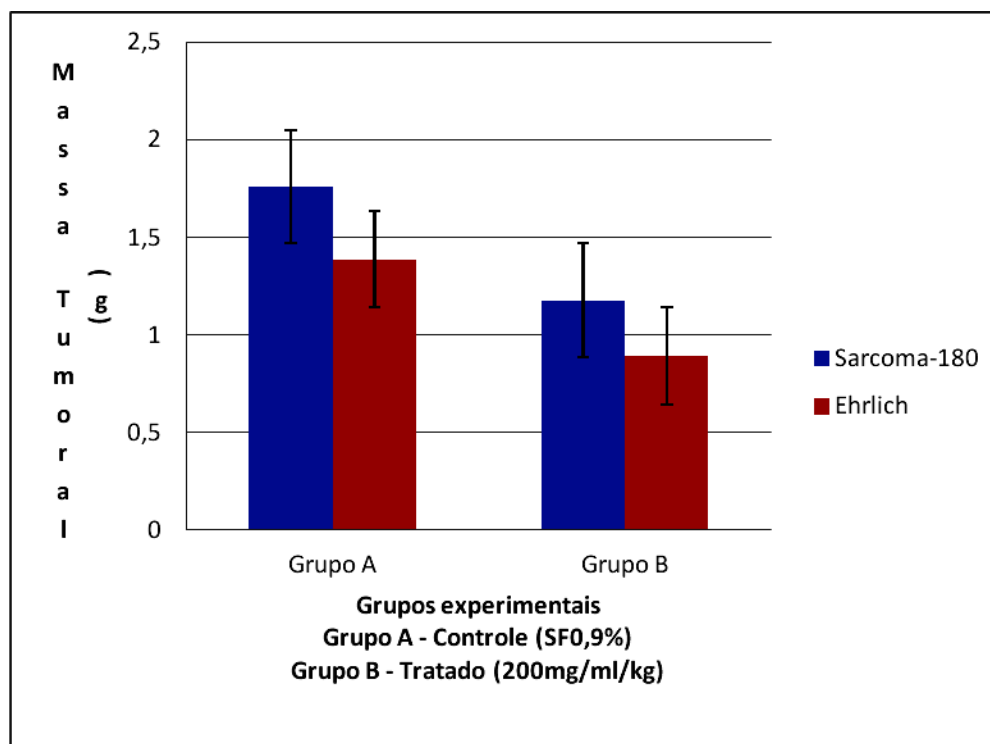


Figura 5. Massa Tumoral Média dos grupos experimentais

O extrato orgânico etéreo, utilizado para a determinação da atividade antitumoral, tem em sua maior concentração o ácido pulvínico, evidenciado na CLAE. Devendo-se provavelmente a este composto a ação obtida quando testado nos grupos tumorais. Não evidencia-se na literatura menção a este composto como antitumoral. Porém, estes dados não excluem a possível influência ou ação sinérgica dos demais componentes desses extratos.

A diferença da ação dos grupos tumorais tratados com extrato etéreo e o grupo controle, evidenciou-se na histopatologia dos tumores após término do tratamento. Entre os tipos de tumores, mesmo sendo de origem diferentes, o Sarcoma 180 de origem conjuntiva, e o carcinoma de Erlich de origem epitelial, não demonstraram alterações significativas na invasão de tecidos adjacentes aos tumores, na necrose tumoral e na mitose celular, notando-se maior área de necrose tumoral no grupo tratado com extrato etéreo bruto da *Pseudoociphellaria aurata* em relação ao grupo tratado com solução salina a 0,9% (Fig. 6 A, B, C).

Porém, quando utilizado a técnica de AgNor visualizou-se que no carcinoma de Erlich houve diminuição na proliferação celular com um significativo efeito citotóxico, e uma área de necrose tumoral menor. No Sarcoma 180 notou-se a área de necrose tumoral maior, o que

pode justificar a massa tumoral ser maior em relação ao carcinoma de Erlich, ambos também comparados ao grupo controle, tratado com solução salina 0,9%. (Tab. 1 e 2)

Apesar de o extrato etéreo demonstrar maior atividade sob o carcinoma de Erlich, não deve-se excluir o efeito citopático sob Sarcoma 180, pois a massa tumoral que é evidenciada nesse tumor, pode ser resultado da maior área de necrose.

A técnica de AgNOR marca as regiões organizadoras de nucléolo (NORs) que foram descritas primeiramente por Heintz (1931) e por McClintock (1934) (Derenzini, 2000), como sendo as regiões marcadas de cromatina em torno da qual, no fim da telofase, o nucléolo é reformado após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula (Fig. 6D). Estas regiões correspondem aos constituintes secundários de cromossomas da metafase (Howell, 1982; Ploton, 1986).

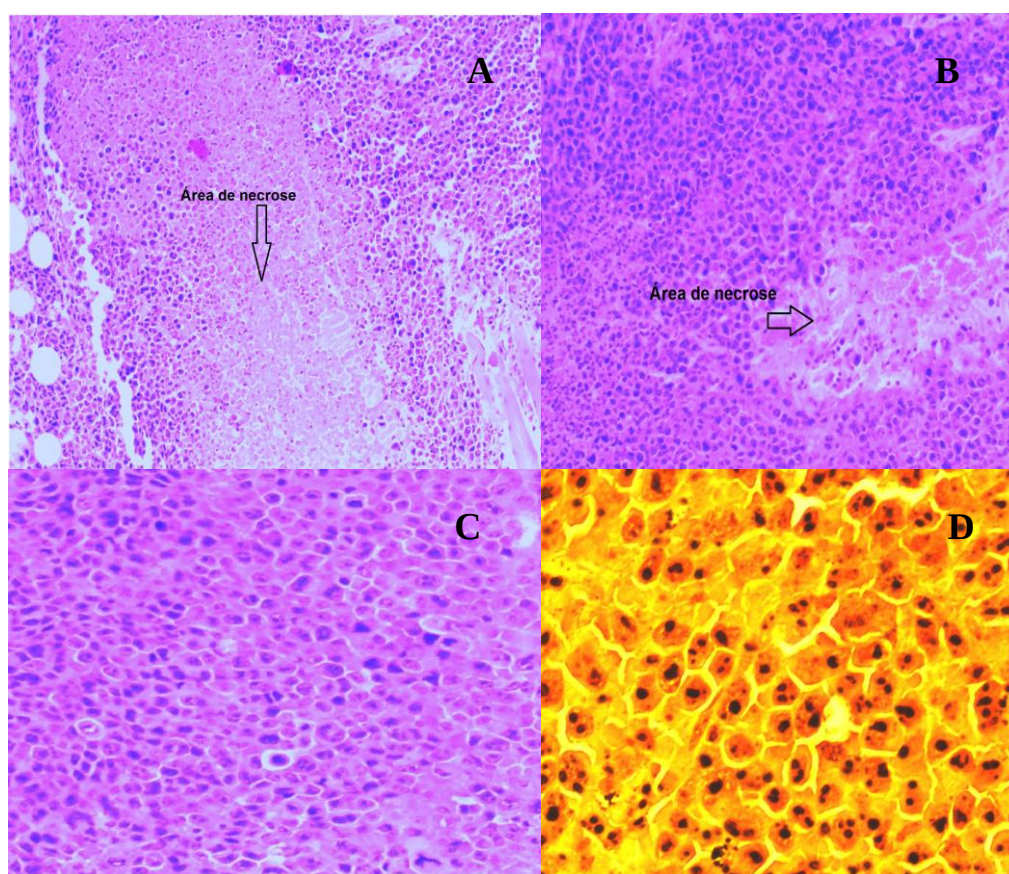


Figura 6. Micrografia em Hematoxilina - Eosina (HE) do Sarcoma 180 a 100x (A) e carcinoma de Ehrlich a 100x (B) tratados com extrato etéreo da *P. aurata*, do grupo controle tratado com solução salina a 0,9% a 400x (C) e Micrografia AgNor do sarcoma 180 a 400x (D).

Tabela 1. Alterações nos parâmetros de marcação de AgNORs em células neoplásicas de Tumor de Ehrlich de animais tratados com extrato etéreo de *P. aurata* em comparação com controle, média $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Controle	Tratado
AgNOR/Núcleo	2,81 $\pm$ 0,97	2,42 $\pm$ 0,36*
Área AgNOR/Célula (μm^2)	9,36 $\pm$ 4,68	8,48 $\pm$ 2,63
% área celular ocupada AgNOR	10,19 $\pm$ 4,72	11,13 $\pm$ 2,92

AgNORs, Regiões argirofílicas organizadoras de nucléolos.

* p=0,02, teste de Mann-Whitney

Tabela 2. Alterações nos parâmetros de marcação de AgNORs em células neoplásica de Sarcoma 180 de animais tratados com extrato etéreo de *P. aurata* em comparação com controle, média $\pm$ desvio-padrão.

Parâmetros	Controle	Tratado
AgNOR/Núcleo	2,16 $\pm$ 1,17	1,99 $\pm$ 0,93
Área AgNOR/Célula (μm^2)	6,14 $\pm$ 3,21	8,19 $\pm$ 7,61
% área celular ocupada AgNOR	8,01 $\pm$ 3,92	9,95 $\pm$ 8,26

AgNORs, Regiões argirofílicas organizadoras de nucléolos.

* p<0,05, teste de Mann-Whitney

Conclusões

Os extratos orgânicos da *Pseudociphellaria aurata* apresentam ação citotóxica e antitumoral *in vitro e in vivo* frente a tumores experimentais (Sarcoma 180 e Carcinoma de Erlich).

O efeito antineoplásico parece estar relacionado à ação antiproliferativa, embora o mecanismo não esteja claro.

Possivelmente o efeito observado está relacionado ao ácido pulvinico presente em maiores concentrações nos extrato ativos.

Referências

- Alley M C, Scudiero D A, Monsk A, Hursey M L, Czerwinski M J, Fine D L, Abbott B J, Mayo J G, Shoemaker R H. And Boyd M R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48, 589-601, 1988.
- Asahina, Y. & Shibata, S. **Chemistry of lichen substances**. Tokio, Japan Society for the Promotion of Science. 1954.
- Berlion, M. *Mise au point d'un système de selection de substances antitumorales: application à l'étude d'analogues structuraux de la Géopétaline*. Grenoble, Thèse (Doctorat) - Université Joseph Fourier, U.F.R. de Pharmacie, França - 385p. 1988.
- Bézivin C, Tomasi F, Lohézie-Le D, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*. 10: 499-503, 2003.
- Carmichael, J., W. G. Degraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna and J. B. Mitchell Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 47:943-946, 1987.
- Cohen Pa, Hudson Jb, Towers Ghn. Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. *Experientia*. 52: 180-183, 1996.
- Culberson, C.F. Supplement to Chemical and Botanical Guide of Lichen Products. **Bryologist**, v. 73, p. 177 -377, 1970.
- Derenzini, M. The AgNORs. *Micron.*, 31: 117-120. 2000
- GALUN, M. Lichenization. In: *CRC Handbook of Lichenology*, Volume II. Galun, M., ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 153–169, 1988.

- Hale Jr..Me. The Biology of Lichens, 3rd ed.London, Edward Arnold; 1983.
- Howell, W. M. And Black, D. A., Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer:a one-step method. *Experientia*, 36, 1014-1015, 1980.
- Huneck, S. & Yoshimura, I. **Identification of Lichen Substances**. Springer, 492p, 1996.
- Karber, G.; Behrens, B. Statistical methods in biological assays. London: Griffin Ch. An. C. 1964.
- Legaz, M. E. G.; Xavier-Filho, L.; Vicente, C. C. Metabolitos vegetales y microbianos para la industria – un enfoque biotecnológico. *Âmbito Cultural*, Rio de Janeiro, 304p, 2008.
- Legaz, M. E.; Vicente, C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiol.*, **71**, 300-302, 1983.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods* 65, 55-63, 1983.
- Nandi S, Vracko M, Bagchi Mc. Anticancer activity of selected phenolic compounds : QSAR studies using ridge regression an neural networks. *Chemical Biology and Drug Design*. 70: 424-436, 2007.
- Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Bayir Y, Halici M. Antioxidant activity, reducing power phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*. 76: 216-219, 2005.
- Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F. And Adnet, J. J. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochemistry Journal*, **18**, 5-14, 1986,
- Selassie Cd, Kapur S, Varma Rp, Rosario M. Cellular apoptosis and citotoxicity of phenolic compounds: Quantitative structure-activity relationship study. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48: 7234 – 7242, 2005.
- Shibata S, Nishikawa Y, Takeda T, Tanaka M. *Chem. Pharm. Bull.* 16: 2362, 1968.
- Weisenthal, L.M. In vitro assays in preclinical antineoplastic drug screening. *Sem. Oncol.*, 8, 362, (1981).

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABRAHAN, E. P.; FLOREY, H. W.; **Antibiotic**, 13, 566; 1949.
- ADAM, K. J.; ODHAV, B. AND BHOOLA, D. K. Immune response in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**. Vol. 99, p. 113-132, 2003.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. New york, J. Wiley & Sons, p. 869, 1996.
- APPA-RAO, A. V. N.; PRABHAKAR, M. C.; **Fitoterapia**, 58, 221; 1987.
- BEHEBA, B.C.; VERMA, N.; SONONE, A.; MAKHIJA, U.; Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea Ghattensis* in vitro. **Biotechnonology Letters**. v 27, p 991-995, 2005.
- BENNETT, J. C.; PLUM, F.. **Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 20^a ed. vol. 1, p. 1113-1115. 1996
- BONASSA, E. M. A.; SANTANA, T. R. *Enfermagem em Terapêutica Oncologica*, 3 ed Atheneu São Paulo, 2005.
- BURKHOLDER, P. R.; EVANS, A. W.; MACVEIGH, I.; THORNTON, H. R.; **Proc. Nat. Acad. Sci. Was.** 30, 250; 1944.
- BUSTINZA, F. Anticacterial substances from lichens. **Endeavour**. v. 10 (38):95-99. 1951b.
- BUSTINZA, F.; **Ann. Inst. Bot. A. J. Cavanilles**, 10,157, 1951a.
- BUSTINZA, F. & CABALLERO, A.; **Ann. Inst. Bot. Madrid**, 7, 511, 1948.
- CAIN, B. F.; **J. Chem. Soc.**, 1, 936. 1960.
- CARVALHO, E.A.B.; ANDRADE, P.P.; SILVA, N.H.; PEREIRA, E.C.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; **Micron**, 36, 155. 2005.
- CARRAZONI, Ed Paschoal. **Química de liquens**. Recife: Fundação Antonio dos Santos Abranches. 36p. 1983
- COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P.L. & SAVA, G.. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften** 89: 137-146. 2002.
- CORDELL, G. W; *ACS Symp. Ser.* 588, 8, **1995**.

CORDEIRO, L. M. C., MONTAI, A. V., GORIN, P.A. J., IACOMINI, M. Polysaccharide production by the chlorolichen *Pseudocyphellaria clathrata*. **Bryologist**, v. 108, n. 1, p. 118-122, 2005.

CORRECHÉ E R, CARRASCO M, ESCUDERO M E, VELÁZQUEZ L, GUZMÁN, A M S, GIANNINI, F, ENRIZ R.D, JAÚREGUI E A, CEÑAL J P. and GIORDANO O.S. Study of citotoxicity and antimicrobial activities of usnic acid derivatives. *Fitoterapia* LXIX (6), 493-501. (1998)

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L.; JOHNSON, A. A.; *Second Supplement to chemical and Botanical Guide of Lichen Products*, The American Bryological and Lichenological Society, Inc.: St. Louis, 1977

CULBERSON, C. F. **Chemical and Botanical Guide to Lichen Products**. North Carolina, USA, University of North Carolina Press Chapel Hill, 627 p., 1969.

DUARTE, B.R. Estudo comparativo da atividade do ácido úsnico com sua forma nanocapsulada. Tese de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2002

DUNN, P. G; OLD, J. L. AND SCHREIBER, D. R. The Three Es of Cancer Immunoediting. **Annual Reviews Immunology**. Vol. 22, p. 329-360; 2004.

ELIX, J. A. , NASH III, T. H *Lichen Biology*. ed. Cambridge University Press: Cambridge, 1996;

FERNANDÉZ, E.; QUILHOT, W.; GONZÁLEZ, I.; HIDALGO, M. E.; MOLINA, X.; MENESES, I. ; **Cosmetic Toil**. 111, 69; 1996.

FLEIG, M. O gênero *Pseudocyphellaria* (liquens) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas Botânicas**, n. 49, p. 163-179, 1999.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; ORTIZ, S. T.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; QUILHOT, W.; FERNANDÉZ, E.; HIDALGO, M. E.; **Comp. Biochem. Physiol.** 116, 51; 1997.

GALLOWAY, D. J. Studies in *Pseudocyphellaria* (lichens) I. The New Zealand species. **Bulletin of the British Museum (Natural History)**, Botany series,v. 17, p. 1-267, 1988.

HALE JR. M. E. **The Biology of lichens**. 3ed. London Edward Arnold Pub., 90p. 1983.

HIRAYAMA, T.; FUJIKAWA, F.; KASSAHARA, T.; OTSUKA, M.; NISHIDA, N.; MIZUNO, D.; **Yakugaku Zasshi**, 100, 755; 1980.

HONDA, N. K. AND VILEGAS. W., A Química de Liquens. **Química Nova**. 22, 25-55. 1999.

HONDA, N. K. XAVIER-FILHO, L. LEGAZ, M. E.; CÓRDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. **Biologia de liquens**, eds.; Âmbito Cultural: Rio de Janeiro, 2006

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**. v. 61: 729-736, 2002

INCA. Instituto Nacional do Cancer. Estimativa 2012 – Incidência do Cancer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>, acesso em : 06 de outubro de 2012.

KUMAR, S. K. C.; MÜLLER, K.; **Eur. J. Med. Chem.** 35, 405. 2000.

KUPCHAN, S. M.; KOPPERMANN, H. L.; **Experientia**, 31, 625, 1975.

LAWREY, M. Inhibition of moss spore germination by acetone extracts of terricolous *Cladonia species*. **Bull. Torrey Bot. Club**. v. 104 (1): 49-52, 1977.

LAWREY, J. D.; **Bryologist**. 2, 268, 1986.

LEGAZ, M. E. et al. Pigment analysis of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. **Byochem. Syst. Ecol.**, v.14, p.575-582, 1986.

LLANO, G.A.; **Smithsonian Institution Publ.**, 4, 385, 1951.

LIMA, C. R. V.; MARQUES, A. M.; MARTINS, M. C. B.; LIMA, M. J. G.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C. G. **Anais - VII Reunião Regional da SBBq e 2º International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology – SBBq**, Recife, Brasil, 2004.

LIMA, C. R. V. **Produção de Metabólitos Bioativos de *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.) Vainio por imobilização de fragmentos do talo**. Tese de mestrado em Biologia vegetal, Universidade Federal de Pernambuco – Brasil. 2009.

LIMA, R. C., NASCIMENTO, S. C., PEREIRA, E. C., CAMPOS –TAKAKI, G. M. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. **Bol. Soc. Brot.** v. 63: 339-348, 1990.

LODETTI, G.; GIGOLA, P.; BERTASI, B.; D'AMBROSCA, F.; PONCHIO, G.; FISHBACH, M.; LOSIO, M. N. Valutazione in vitro della citossicità indotta da prodotti per l'igiene orale contenenti acido úsnico, agente antimicrobiano naturale estrato dai licheni *Gimmoc.*, 4, 67-72, 2000.

MARCELLI, M. P. EM *BIOLOGIA DE LIQUENS*, XAVIER-FILHO, L. LEGAZ, M. E.; CÓRDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. eds.; Âmbito Cultural: Rio de Janeiro, 2006.

MARTINS, Mônica Cristina Barroso. **Atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos orgânicos e ácido barbático de *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.** Recife, 63 folhas Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica 2005.

MACFARLANE, J. D.; KERSHAW, K. A. BROWN, D. H Em *Lichen Physiology and Cell Biology*,. ed.: Plenum Presss: N. York, 1984.

MICHELETTI A.C., BEATRIZ A., LIMA D. P., HONDA N. K., PESSOA C. Ó., MORAES M. O., LOTUFO L. V., MAGALHÃES H. I. F., CARVALHO N. C. P. Constituintes Químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Elisomo & Adler – Isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibióticas e citotóxica. Química Nova vol 32, n 1, 12-20, 2009.

MOURA, M. C. G. G. **Atividade antimicrobiana de compostos de canoparmelia texana (Tuck.) Elix & Hale (Líquén).** Recife, 2008. 55 folhas Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2008.

NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; OLIVEIRA, A. F. M.; SILVA, N. H.; BOITARD, M.; BÉRIEL, H.; **Acta Bot. Bras**, 8, 97. 1994.

NASH III, T. H. **Lichen Biology** Cambridge University Press, Cambridge, USA, led., p.,303, 1996.

NEAMATI N, HONG H, MAZUMDER A, WANG S, SUNER S, NICKLAUS MC, MILNE GWA, PROSKA B, POMMIER Y. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 Integrase : discovery of novel inhibitors through 3D database searching. Journal of Medicinal Chemistry; 40: 942 - 951. 1997.

NISHIKAWA, Y., SHIBATA, S. & FUKUOKA, F. Chem. Pharm. Bull. v. 17(9): 1910-1916, 1969.

OLIVEIRA, M.S. **Atividade antinociceptiva, antipirética e antiinflamatória do extrato bruto e do ácido fumarprotocetrárico isolado de Cladonia verticillaris (LÍQUEN).** Recife,. 82 folhas Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. 2003

ODABASOGLU, F.; ASLAN, A.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H; KARAGOZ, Y.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; **Fitoterapia**, 76, 216; 2005.

PEREIRA, E. C. G. **Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de Cladonia e Cladina (líquen).** Dissertação de mestrado, 1989.

PEREIRA, E. C.; NASCIMENTO, S. C.; LIMA, R. M. C.; SILVA, N. H.; OLIVEIRA, A. F. M.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENTE, C. & LEGAZ, M. E.; *Tokai J. of Exp. and Clin. Medicine* 19, 47; 1994.

PEREIRA, E. C. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae (líquen), a partir de imobilização celular.** Tese de Doutorado em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 225p. 1998.

PEREIRA, E. C.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E.; SILVA, N. H.; SILVA, E. F. & ANDRADE, L. H. C.; **Phyton**, 39, 79; 1999b.

PEREIRA, E. C. **Biologia de Líquens**. Apostila do curso oferecido pelo Depto. de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C.; *J. Ethnopharmacol.*, 25, 61. **1998**.

PINTO A. C., BOLZANI V. S. , SILVA D. H. S., LOPES N.P., EPIFANIO R. A.; **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas** , Química Nova, vol 25, Supl. 1, 54-61, 2002

RACAN, F.; ROSAN, S.; BOEHM, K., FERNANDÉZ, E.; HIDALGO, E.; QUILHOT, W.; RUBIO, C.; BOEHM, F.; PIAZENA, H.; OLTMANNS.; *J. Photochem. Photobiol.* 68,133. 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E.; *Biologia vegetal*, 7ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.

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

ROUHI, A. M.; **Chem. Eng. News**, 7, 214, 1997.

SAENZ, M. T.; GARCIA, M. D. & ROWE, J. G.; **Fitoterapia**, 77, 156; 2006.

SALGALLER L. AND LODGE A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **J. Surg. Oncol.** Vol. 68, p. 122-138. 1998.

SALMON, S. E.; BERTINO, J. R. Fundamentos da Terapia do Câncer. *In* Bennett, J. C.; Plum, F. (org). **Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 20ª ed.vol. 1, p. 1145-1147; 1996.

SANTOS, N. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 1996.

SANTOS, N. P. **Nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico de *Cladonia substellata* com potencial ação antitumoral**. 124 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil. 2003

SEAWARD, M. R. D. **Lichen Ecology**. London, Academic Press, p. 550, STOCK, K., Tumor Transplantation. 1977.

SHIBATA, S.; UKITA, T.; TAMURA, T.; MIURA, Y.; *Jap. Med. J.*, , 2, 152, **1948**.

SILVA, A. R. **Cladonia verticillaris (Raddi) Fr. como agente tripanocida sobre Trypanosoma cruzi**. Recife, 2009. 57 folhas : Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia Vegetal, 2009.

SILVA, E.F.; CATANHO, M. T. J.; PEREIRA, E. C. & SILVA, N. H.; *Resumos do Terceiro Encontro do Grupo Latino-Americano de Liquenólogos (GLAL-3)*, Campos do Jordão, Brasil, 1997.

SILVA, N. H.; SANTOS, N. P.; LIMA, R. C. & PEREIRA, E. C.; *Resumos da XVIII Reunião Nordestina de Botânica*, Areia, Brasil, 1994.

SOUSA, A. P. A. , **Potencial Antitumoral de Alginatos isolados da alga marinha marron Sargassum vulgare AGARDH (1820)**, 137 folhas, Dissertação – Universidade Federal do Ceará, 2006.

SPEER, B. R. **Introduction to Lichens**: an alliance between kingdoms. Disponível em <www.ucmp.berkeley.edu/fungi/lichens/lichens.html> Acesso em: 07 out. 2012.

SMELTZER, S. ; BARE, B. G. **Brunner & Suddarth – Tratado de enfermagem Médico-Cirúrgico**, 9 ed Guanabara – Koogan, 2002

TAKAI, M.; UEHARA, Y.; BEISLER, J. A.; *J. Med. Chem.*, 22, 1380; 1979.

TAKAHASHI, K.; KON, T.; YOKOTO, I.; SHIBATA, S.; *Carbohydrate Research*, 89:166; 1981.

TAKEDA, T.; FUNATSU, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F.; *Chem. Pharm. Bull*, 20, 2445. 1972.

VARTIA, K. O.; *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn* 28, 7; 1950.

WANDERLEY, Marcela Silvestre Outtes. **Atividade antitumoral de nanocapsulas, contendo a ácido úsnico extraído da Cladonia substellata**. Recife, 49 fls. : Monografia (graduação). Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, 2004.

WESSEN, Cynthia K.; CATANHO, Maria Teresa Jansem.. **Investigação da ação expectorante do extrato acetônico e do ácido fumarprotocetrático de Cladonia Verticillaris (Líquen) em camundongos**. Recife, 55 folhas Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2007.

XAVIER – FILHO, L. & RIZZINI, C. T. **Manual de Liquenologia Brasileiro**. Recife: UFPE, 431 p, 1976.

ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO



Normas gerais para publicação de artigos na Acta Botanica Brasilica

A **Acta Botanica Brasilica** (**Acta bot. bras.**) publica artigos originais, comunicações curtas e artigos de revisão, estes últimos apenas a convite do Corpo Editorial. Os artigos são publicados em Português, Espanhol e Inglês e devem ser motivados por uma pergunta central que mostre a originalidade e o potencial interesse dos mesmos aos leitores nacionais e internacionais da Revista. A Revista possui um espectro amplo, abrangendo todas as áreas da Botânica. Os artigos submetidos à Acta bot.bras. devem ser inéditos, sendo vedada a apresentação simultânea em outro periódico.

Sumário do Processo de Submissão. Manuscritos deverão ser submetidos por um dos autores, em português, inglês ou espanhol. Para facilitar a rápida publicação e minimizar os custos administrativos, a **Acta Botanica Brasilica** aceita somente Submissões On-line. **Não envie documentos impressos pelo correio.** O processo de submissão on-line é compatível com os navegadores Internet Explorer versão 3.0 ou superior, Netscape Navigator e Mozilla Firefox. Outros navegadores não foram testados.

O autor da submissão será o responsável pelo manuscrito no envio eletrônico e por todo o acompanha-mento do processo de avaliação.

Figuras e tabelas deverão ser organizadas em arquivos que serão submetidos separadamente, como documentos suplementares. Documentos suplementares de qualquer outro tipo, como filmes, animações, ou arquivos de dados originais, poderão ser submetidos como parte da publicação.

Se você estiver usando o sistema de submissão on-line pela primeira vez, vá para a página de '[Cadastro](#)' e registre-se, criando um 'login' e 'senha'. Se você está realmente registrado, mas esqueceu seus dados e não tem como acessar o sistema, clique em '[Esqueceu sua senha](#)'.

O processo de submissão on-line é fácil e auto-explicativo. São apenas 5 (cinco) passos. Tutorial do processo de submissão pode ser obtido em <http://www.botanica.org.br/ojs/public/tutorialautores.pdf>. Se você tiver problemas de acesso ao sistema, cadastro ou envio de manuscrito (documentos principal e suplementares), por favor, entre em contato com o nosso [Suporte Técnico](#).

Custos de publicação. O artigo terá publicação gratuita, se pelo menos um dos

autores do manuscrito for **associado da SBB, quite com o exercício correspondente ao ano de publicação**, e desde que o número de páginas impressas (editadas em programa de editoração eletrônica) não ultrapasse o limite máximo de 14 páginas (incluindo figuras e tabelas). Para cada página excedente assim impressa, será cobrado o valor de R\$ 35,00. A critério do Corpo Editorial, mediante entendimentos prévios, artigos mais extensos que o limite poderão ser aceitos, **sendo o excedente de páginas impressas custeado pelo(s) autor(es)**. Aos autores não-associados ou associados em atraso com as anuidades, serão cobrados os custos da publicação por página impressa (R\$ 35,00 por página), a serem pagos quando da solicitação de leitura de prova editorada, para correção dos autores. No caso de submissão de figuras coloridas, **as despesas de impressão a cores serão repassadas aos autores (associados ou não-associados)**, a um custo de R\$ 600,00 reais a página impressa.

Seguindo a política do Open Access do Public Knowledge Project, assim que publicados, os autores receberão a URL que dará acesso ao arquivo em formato Adobe® PDF (Portable Document Format). Os autores não mais receberão cópias impressas do seu manuscrito publicado.

Publicação e processo de avaliação. Durante o processo de submissão, os autores deverão enviar uma carta de submissão (como um documento suplementar), explicando o motivo de publicar na Revista, a importância do seu trabalho para o contexto de sua área e a relevância científica do mesmo. Os manuscritos submetidos serão enviados para assessores, a menos que não se enquadrem no escopo da Revista. Os manuscritos serão sempre avaliados por dois especialistas que terão a tarefa de fornecer um parecer, tão logo quanto possível. Um terceiro assessor será consultado caso seja necessário. Os assessores não serão obrigados a assinar os seus relatórios de avaliação, mas serão convidados a fazê-lo. O autor responsável pela submissão poderá acompanhar o progresso de avaliação do seu manuscrito, a qualquer tempo, **desde que esteja logado no sistema da Revista.**

Preparando os arquivos. Os textos do manuscrito deverão ser formatados usando a fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento entre linhas 1,5 e **numeração contínua de linhas**, desde a primeira página. Todas as margens deverão ser ajustadas para 1,5 cm, com tamanho de página de papel A4. Todas as páginas deverão ser numeradas sequencialmente.

O manuscrito deverá estar em formato Microsoft® Word DOC (versão 2 ou superior). Arquivos em formato RTF também serão aceitos. Arquivos em formato Adobe® PDF não serão aceitos. **O documento principal não deverá incluir qualquer tipo de figura ou tabela. Estas deverão ser submetidas como documentos suplementares, separadamente.**

O manuscrito submetido (documento principal, acrescido de documentos suplementares, como figuras e tabelas), poderá conter até 25 páginas (equivalentes a 14 páginas impressas, editadas em programa de editoração

eletrônica). Assim, antes de submeter um manuscrito com mais de 25 páginas, entre em contato com o [Editor-Chefe](#). Todos os manuscritos submetidos deverão ser subdivididos nas seguintes seções:

1. DOCUMENTO PRINCIPAL

1.1. Primeira página. Deverá conter as seguintes informações:

- a) Título do manuscrito, conciso e informativo, com a primeira letra em maiúsculo, sem abreviações. Nomes próprios em maiúsculo. Citar nome científico completo.
- b) Nome(s) do(s) autor(es) com iniciais em maiúsculo, com números sobrescritos que indicarão, em rodapé, a afiliação Institucional. Créditos de financiamentos deverão vir em Agradecimentos, assim como vinculações do manuscrito a programas de pesquisa mais amplos (não no rodapé). Autores deverão fornecer os endereços completos, evitando abreviações.
- c) Autor para contato e respectivo e-mail. O autor para contato será sempre aquele que submeteu o manuscrito.

1.2. Segunda página. Deverá conter as seguintes informações:

- a) **RESUMO:** em maiúsculas e negrito. O texto deverá ser corrido, sem referências bibliográficas, em um único parágrafo. Deverá ser precedido pelo título do manuscrito em Português, entre parênteses. Ao final do resumo, citar até 5 (cinco) palavras-chave à escolha do(s) autor(es), em ordem alfabética, não repetindo palavras do título.
- b) **ABSTRACT:** em maiúsculas e negrito. O texto deverá ser corrido, sem referências bibliográficas, em um único parágrafo. Deverá ser precedido pelo título do manuscrito em Inglês, entre parênteses. Ao final do abstract, citar até 5 (cinco) palavras-chave à escolha do(s) autor(es), em ordem de alfabética.

Resumo e abstract deverão conter cerca de 200 (duzentas) palavras, contendo a abordagem e o contexto da proposta do estudo, resultados e conclusões.

1.3. Terceira página e subseqüentes. Os manuscritos deverão estar estruturados em Introdução, Material e métodos, Resultados e discussão, Agradecimentos e Referências bibliográficas, seguidos de uma lista completa das legendas das figuras e tabelas (se houver), lista das figuras e tabelas (se houver) e descrição dos documentos suplementares (se houver).

1.3.1. Introdução. Título com a primeira letra em maiúsculo, em negrito, alinhado à esquerda. O texto deverá conter:

- a) abordagem e contextualização do problema;
- b) problemas científicos que levou(aram) o(s) autor(es) a desenvolver o trabalho;
- c) conhecimentos atuais no campo específico do assunto tratado;
- d) objetivos.

1.3.2. Material e métodos. Título com a primeira letra em maiúsculo, em negrito, alinhado à esquerda. O texto deverá conter descrições breves, suficientes à repetição do trabalho. Técnicas já publicadas deverão ser apenas citadas e não descritas. Indicar o nome da(s) espécie(s) completo, inclusive com o autor. Mapas poderão ser incluídos (como figuras na forma de documentos suplementares) se forem de extrema relevância e deverão apresentar qualidade adequada para impressão (ver recomendações para figuras). Todo e qualquer comentário de um procedimento utilizado para a análise de dados em Resultados deverá, obrigatoriamente, estar descrito no item Material e métodos.

1.3.3. Resultados e discussão. Título com a primeira letra em maiúsculo, em negrito, alinhado à esquerda. Tabelas e figuras (gráficos, fotografias, desenhos, mapas e pranchas), se citados, deverão ser estritamente necessários à compreensão do texto. Não insira figuras ou tabelas no texto. Os mesmos deverão ser enviados como documentos suplementares. Dependendo da estrutura do trabalho, Resultados e discussão poderão ser apresentados em um mesmo item ou em itens separados.

1.3.4. Agradecimentos. Título com a primeira letra em maiúsculo, em

negrito, alinhado à esquerda. O texto deverá ser sucinto. Nomes de pessoas e Instituições deverão ser escritos por extenso, explicitando o motivo dos agradecimentos. 1.3.5. Referências bibliográficas. Título com primeira letra em maiúsculo, em negrito, alinhado à esquerda. Se a referência bibliográfica for citada ao longo do texto, seguir o esquema autor, ano (entre parênteses). Por exemplo: Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva *et al.* (1997) ou Silva (1993; 1995), Santos (1995; 1997) ou (Silva 1975; Santos 1996; Oliveira 1997). Na seção Referências bibliográficas, seguir a ordem alfabética e cronológica de autor(es).

Nomes dos periódicos e títulos de livros deverão ser grafados por extenso e em negrito. Exemplos: Santos, J.; Silva, A. & Oliveira, B. 1995. Notas palinológicas. *Amaranthaceae*. *Hoehnea* 33(2): 38-45. Santos, J. 1995. Estudos anatômicos em *Juncaceae*. Pp. 5-22. In: Anais do XXVIII Congresso Nacional de Botânica. Aracaju 1992. São Paulo, HUCITEC Ed. v.I. Silva, A. & Santos, J. 1997. *Rubiaceae*. Pp. 27-55. In: F.C. Hoehne (ed.). *Flora Brasílica*. São Paulo, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. Endress, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Oxford. Pergamon Press. Furness, C.A.; Rudall, P.J. & Sampson, F.B. 2002. Evolution of microsporogenesis in Angiosperms.

<http://www.journals.uchicago.edu/IJPS/journal/issues/v163n2/020022/020022.html>

(acesso em 03/01/2006). Não serão aceitas referências bibliográficas de monografias de conclusão de curso de graduação, de citações de resumos de Congressos, Simpósios, Workshops e assemelhados. Citações de Dissertações e Teses deverão ser evitadas ao máximo e serão aceitas com justificativas consistentes. 1.3.6. Legendas das figuras e tabelas. As legendas deverão estar incluídas no fim do documento principal, imediatamente após as Referências bibliográficas. Para cada figura, deverão ser fornecidas as seguintes informações, em ordem numérica crescente: número da figura, usando algarismos arábicos (Figura 1, por exemplo; não abrevie); legenda detalhada, com até 300 caracteres (incluindo espaços). Legendas das figuras necessitam conter nomes dos táxons com respectivos autores, informações da área de estudo ou do grupo taxonômico.

Itens da tabela, que estejam abreviados, deverão ser escritos por extenso na legenda. Todos os nomes dos gêneros precisam estar por extenso nas legendas das tabelas.

Normas gerais para todo o texto. Palavras em latim no título ou no texto, como por exemplo: *in vivo*, *in vitro*, *in loco*, *et al.* deverão estar grafadas em *italico*. Os nomes científicos, incluindo os gêneros e categorias infragenéricas, deverão estar em *italico*. Citar nomes das espécies por extenso, na primeira menção do parágrafo, acompanhados de autor, na primeira menção no texto. Se houver uma tabela geral das espécies citadas, o nome dos autores deverá aparecer somente na tabela. Evitar notas de rodapé.

As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, deverão ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de

Pernambuco (UFPE); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Usar abreviaturas das unidades de medida de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (por exemplo 11 cm, 2,4 µm). O número deverá ser separado da unidade, com exceção de percentagem, graus, minutos e segundos de coordenadas geográficas (90°, 17°46'17" S, por exemplo).

Para unidades compostas, usar o símbolo de cada unidade individualmente, separado por um espaço apenas. Ex.: mg kg⁻¹, µmol m⁻² s⁻¹, mg L⁻¹. Litro e suas subunidades deverão ser grafados em maiúsculo. Ex.: L, mL, µL. Quando vários números forem citados em seqüência, grafar a unidade da medida apenas no último (Ex.: 20, 25, 30 e 35 °C). Escrever por extenso os números de zero a nove (não os maiores), a menos que sejam acompanhados de unidade de medida. Exemplo: quatro árvores; 10 árvores; 6,0 mm; 1,0-4,0 mm; 125 exsiccatas.

Para normatização do uso de **notações matemáticas**, obtenha o arquivo contendo as instruções específicas em <http://www.botanica.org.br/ojs/public/matematica.pdf>. O Equation, um acessório do Word, está programado para obedecer as demais convenções matemáticas, como espaçamentos entre sinais e elementos das expressões, alinhamento das frações e outros. Assim, o uso desse acessório é recomendado. Em trabalhos taxonômicos, o material botânico examinado deverá ser selecionado de maneira a citarem-se apenas aqueles representativos do táxon em questão, na seguinte ordem e obedecendo o tipo de fonte das letras: **PAÍS. Estado:** Município, data, fenologia, coletor(es) número do(s) coletor(es) (sigla do Herbário).

Exemplo:

BRASIL. São Paulo: Santo André, 3/XI/1997, fl. fr., Milanez 435 (SP).

No caso de mais de três coletores, citar o primeiro seguido de *et al.* Ex.: Silva *et al.*

Chaves de identificação deverão ser, preferencialmente, indentadas. Nomes de autores de táxons não deverão aparecer. Os táxons da chave, se tratados no texto, deverão ser numerados seguindo a ordem alfabética. Exemplo:

1. 1. Plantas terrestres
2. 2. Folhas orbiculares, mais de 10 cm diâm.
..... 2. S. orbicularis
3. 2. Folhas sagitadas, menos de 8 cm compr.
..... 4. S. sagittalis
4. 1. Plantas aquáticas
5. 3. Flores brancas 1. S. albicans
2. Flores vermelhas 3. S. purpúrea

O tratamento taxonômico no texto deverá reservar o itálico e o negrito simultâneos apenas para os nomes de táxons válidos. Basiônimo e sinonímia aparecerão apenas em itálico. Autores de nomes científicos deverão ser citados de forma abreviada, de acordo com o índice taxonômico do grupo em pauta (Brummit & Powell 1992 para Fanerógamas).

Exemplo:

1. ***Sepulveda albicans*** L., Sp. pl. 2: 25. 1753.

Pertencia albicans Sw., Fl. bras. 4: 37, t. 23, f. 5. 1870.

Fig. 1-12

Subdivisões dentro de Material e métodos ou de Resultados e/ou Discussão deverão ser grafadas com a primeira letra em maiúsculo, seguida de um traço (-) e do texto na mesma linha.

Exemplo: Área de estudo - localiza-se ...

2. DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

2.1. Carta de submissão. Deverá ser enviada como um arquivo separado. Use a carta de submissão para explicitar o motivo da escolha da Acta Botanica Brasilica, a importância do seu trabalho para o contexto de sua área e a relevância científica do mesmo.

2.2. Figuras. Todas as figuras apresentadas deverão, obrigatoriamente, ter chamada no texto. Todas as imagens (ilustrações, fotografias, eletromicrografias e gráficos) são consideradas como 'figuras'. **Figuras coloridas poderão ser aceitas, a critério do Corpo Editorial, que deverá ser previamente consultado. O(s) autor(es) deverão se responsabilizar pelos custos de impressão.**

Não envie figuras com legendas na base das mesmas. **As legendas deverão ser enviadas no final do documento principal.**

As figuras deverão ser referidas no texto com a primeira letra em maiúsculo, de forma abreviada e sem plural (Fig.1, por exemplo).

As figuras deverão ser numeradas sequencialmente, com algarismos arábicos, colocados no canto inferior direito. Na editoração final, a largura máxima das figuras será de: 175 mm, para duas colunas, e de 82 mm, para uma coluna.

Cada figura deverá ser editada para minimizar as áreas com espaços em branco, otimizando o tamanho final da ilustração.

Escalas das figuras deverão ser fornecidas com os valores apropriados e deverão

fazer parte da própria figura (inseridas com o uso de um editor de imagens, como o Adobe® Photoshop, por exemplo), sendo posicionadas no canto inferior esquerdo, sempre que possível. Ilustrações em preto e branco deverão ser fornecidas com aproximadamente 300 dpi de resolução, em formato TIF. Ilustrações mais detalhadas, como ilustrações botânicas ou zoológicas, deverão ser fornecidas com resoluções de, pelo menos, 600 dpi, em formato TIF. Para fotografias (em preto e branco ou coloridas) e eletromicrografias, forneça imagens em formato TIF, com pelo menos, 300 dpi (ou 600 dpi se as imagens forem uma mistura de fotografias e ilustrações em preto e branco). Contudo, atenção! Como na editoração final dos trabalhos, **o tamanho útil destinado a uma figura de largura de página (duas colunas) é de 170 mm, para uma resolução de 300 dpi, a largura das figuras não deverá exceder os 2000 pixels. Para figuras de uma coluna (82 mm de largura), a largura máxima das figuras (para 300 dpi), não deverá exceder 970 pixels.** Não fornecer imagens em arquivos Microsoft® PowerPoint, geralmente geradas com baixa resolução, nem inseridas em arquivos DOC. Arquivos contendo imagens em formato Adobe® PDF não serão aceitos. Figuras deverão ser fornecidas como arquivos separados (documentos suplementares), não incluídas no texto do trabalho. As imagens que não contiverem cor deverão ser salvas como 'grayscale', sem qualquer tipo de camada ('layer'), como as geradas no Adobe® Photoshop, por exemplo. Estes arquivos ocupam até 10 vezes mais espaço que os arquivos TIF e JPG. A **Acta Botanica Brasílica** não aceitará figuras submetidas no formato GIF ou comprimidas em arquivos do tipo RAR ou ZIP. Se as figuras no formato TIF forem um obstáculo para os autores, por seu tamanho muito elevado, estas poderão ser convertidas para o formato JPG, antes da sua submissão, resultando em uma significativa redução no tamanho. Entretanto, não se esqueça que a compressão no formato JPG poderá causar prejuízos na qualidade das imagens. Assim, é recomendado que os arquivos JPG sejam salvos nas qualidades 'Máxima' (Maximum). O tipo de fonte nos textos das figuras deverá ser o Times New Roman. Textos deverão ser legíveis. Abreviaturas nas figuras (sempre em minúsculas) deverão ser citadas nas legendas e fazer parte da própria figura, inseridas com o uso de um editor de imagens (Adobe® Photoshop, por exemplo). Não use abreviaturas, escalas ou sinais (setas, asteriscos), sobre as figuras, como "caixas de texto" do Microsoft® Word. **Recomenda-se a criação de uma única estampa**, contendo várias figuras reunidas, numa largura máxima de 175 milímetros (duas colunas) e altura máxima de 235 mm (página inteira). No caso de estampa, a letra indicadora de cada figura deverá estar posicionada no canto inferior direito. Inclua "A" e "B" para distingui-las, colocando na legenda, Fig. 1A, Fig. 1B e assim por diante. Não use bordas de qualquer tipo ao redor das figuras. É responsabilidade dos autores obter permissão para reproduzir figuras ou tabelas que tenham sido previamente publicadas.

2.3. Tabelas. As tabelas deverão ser referidas no texto com a primeira letra em maiúsculo, de forma abreviada e sem plural (Tab. 1, por exemplo). **Todas as tabelas apresentadas deverão, obrigatoriamente, ter chamada no texto.** As tabelas deverão ser sequencialmente numeradas, em arábico (Tabela 1, 2, 3, etc; não abrevie), com numeração independente das figuras. O título das tabelas deverá estar acima das mesmas. Tabelas deverão ser formatadas usando as ferramentas de criação de tabelas ('Tabela') do Microsoft® Word. Colunas e linhas da tabela deverão ser

visíveis, optando-se por usar linhas pretas que serão removidas no processo de edição final. Não utilize padrões, tons de cinza, nem qualquer tipo de cor nas tabelas. Dados mais extensos poderão ser enviados como documentos suplementares, os quais estarão disponíveis como links para consulta pelo público. Mais detalhes poderão ser consultados nos últimos números da Revista.