

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

JOELMA PESSOA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE
EXTRATOS ORGÂNICOS E ÁCIDO BARBÁTICO ISOLADO DO
LÍQUEN *Cladonia salzmannii* (Nyl.)**

RECIFE

2015

JOELMA PESSOA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE
EXTRATOS ORGÂNICOS E ÁCIDO BARBÁTICO ISOLADO DO
LÍQUEN *Cladonia salzmannii* (Nyl.)**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

RECIFE

2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Gonçalves, Joelma Pessoa

Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de extratos orgânicos e ácido
barbático isolado do líquen *Cladonia salzmännii* (Nyl.) / Joelma Pessoa Gonçalves. –
Recife: O Autor, 2015.

73 f.: il.

Orientadores: Nicácio Henrique da Silva, Emerson Peter da Silva Falcão
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2015.
Inclui referências e anexos

1. Câncer 2. Líquens 3. Testes de toxicidade I. Silva, Nicácio Henrique da
(orient.) II. Falcão, Emerson Peter da Silva (coorient.) III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-259

Joelma Pessoa Gonçalves

Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de extratos orgânicos e ácido
barbático isolado do líquen *Cladonia salzmannii* (Nyl.)

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado por:

Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva - Presidente

Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia de Menezes Lima

Prof^a. Dr^a. Mônica Cristina Barroso Martins

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas

Data: 25/02/2015

Dedico esta importante conquista a Deus, pela saúde, fé e força concedidas. Ao meu marido, Leandro Emanuel, companheiro compreensivo e carinhoso em todos os momentos. A minha mãe e ao meu irmão, Marly e Alessandro, pelo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, o sublime criador que conduz os meus passos eternamente. Pela sabedoria e perseverança concedidas, e por ter me dado o privilégio de conhecer pessoas tão especiais durante a execução deste trabalho. Ao que me permitiu a vida, o lugar de honra e glória até o meu último suspiro.

Ao meu amado marido, Leandro Emanuel, serei eternamente grata pelas palavras de encorajamento, pelo amor e carinho contínuos, e por toda ajuda nos momentos difíceis. A nossa união durante as batalhas nos torna a cada dia mais fortes e corajosos.

Agradeço a minha querida mãe, Marly dos Santos, e ao meu irmão, Alexsandro Fernandes, que sempre torceram pelo meu sucesso e me ajudaram a progredir. Todas as minhas conquistas são frutos do incentivo de vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva, pelo seu incentivo, apoio, disponibilidade e por todos os ensinamentos compartilhados. Meu respeito e admiração contínuos. Obrigada por acreditar no meu potencial para a execução deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, que me acompanha e apoia desde a minha graduação. Sempre serei grata pelas oportunidades de crescimento acadêmico e por todos os conselhos concedidos.

Agradeço imensamente a Prof^{ra}. Dr^a. Noemia Pereira da Silva Santos, por abrir as portas do Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células (NanoBioCel) do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (CAV-UFPE). Onde tive a oportunidade de aprender mais sobre cultura de células. Pelo incentivo e confiança, minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas, pela sua constante disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas, por disponibilizar os equipamentos necessários para a realização dos testes de genotoxicidade, e pelo total apoio na execução dos testes estatísticos presentes neste trabalho.

A Prof^{ra}. Dr^a. Mônica Cristina Barroso Martins, por toda contribuição prestada para a realização deste trabalho, em especial durante a obtenção dos extratos orgânicos e purificação do ácido barbático.

A Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva e a Pós-doutoranda Jaciana dos Santos Aguiar, pela colaboração na realização do teste do MTT para avaliação da citotoxicidade das minhas amostras.

A Dr^a. Maria de Lourdes Lacerda Buril, pela identificação do líquen utilizado neste trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Produtos Naturais - UFPE, João Antônio Virgínio, que sempre me ajudou de maneira prestativa e amigável desde a minha graduação.

Quero deixar o meu agradecimento especial para duas pessoas que conheci durante esta trajetória: Talita Giselly e Sandrelli Meridiana. A ajuda de vocês foi essencial na execução deste trabalho. Não tenho dúvidas de que vocês foram enviadas por Deus para me ajudar nas etapas finais deste trabalho.

As colegas de laboratório e curso, Alexsandra Nascimento e Tamiris Alves, por toda ajuda e companheirismo durante as disciplinas cursadas e execução das atividades no laboratório.

A todos os colegas do Laboratório de Produtos Naturais, pela união e apoio.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia.

Aos demais amigos e colegas, pelo incentivo contínuo.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FACEPE, pelo apoio financeiro.

*A sabedoria que vem do céu é,
primeiramente, pura; depois, pacífica,
compreensiva, amável, cheia de
misericórdia e de bons frutos, não trata
os outros pela sua aparência e é livre de
fingimento.*

(Tiago 3:17)

RESUMO

Os metabólitos secundários dos líquens são responsáveis pela maioria das suas atividades biológicas. Muitos destes compostos apresentam relevante atividade antineoplásica. O objetivo deste trabalho foi verificar as atividades citotóxica e genotóxica *in vitro* dos extratos orgânicos e do ácido barbático (BAR) purificado de *Cladonia salzmännii* Nyl. Os extratos orgânicos foram obtidos a partir do talo líquênico (22 g) previamente limpo e seco, com os solventes éter dietílico, clorofórmio e acetona, através do método de esgotamento a quente em aparelho de Soxhlet. O ácido barbático foi purificado a partir do extrato etéreo (1,3 g). A análise química dos extratos orgânicos e do BAR purificado foi realizada através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A pureza do BAR purificado foi observada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A atividade citotóxica dos extratos orgânicos e do BAR purificado foi determinada através do Método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] e do IPBC (Índice de Proliferação com Bloqueio da Citocinese). O potencial genotóxico dos extratos orgânicos e do BAR purificado foram determinados através do teste do micronúcleo e do ensaio cometa. O dimetilsulfoxido (DMSO) foi utilizado como solvente de diluição das amostras em todos os testes de atividade biológica. Os resultados referentes a CI_{50} demonstraram relevante potencial citotóxico para o extrato etéreo (Ext E) (50 $\mu\text{g/mL}$) frente as linhagens celulares NCI-H292 (CI_{50} : 29,91 $\mu\text{g/mL}$), HEp-2 (CI_{50} : 26,75 $\mu\text{g/mL}$) e HL-60 (CI_{50} : 3,59 $\mu\text{g/mL}$), e para o BAR purificado (25 $\mu\text{g/mL}$) contra as linhagens HEp-2 (CI_{50} : 15,79 $\mu\text{g/mL}$) e MCF-7 (CI_{50} : 18,28 $\mu\text{g/mL}$). Porém, a avaliação da citotoxicidade considerando o Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) demonstrou atividade citotóxica para o BAR purificado em todas as concentrações testadas (5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$) e para todos os extratos orgânicos (50 $\mu\text{g/mL}$) frente as células do Carcinoma de Ehrlich. Entretanto, para o Sarcoma 180 apenas o BAR purificado na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ e os extratos etéreo e clorofórmico (50 $\mu\text{g/mL}$) foram considerados citotóxicos. O teste do micronúcleo (MN) demonstrou que o BAR purificado na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou potencial genotóxico em ambas as linhagens celulares tumorais. Além disso, o extrato clorofórmico e BAR purificado na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ não foram considerados genotóxicos para o Sarcoma 180. No ensaio cometa, todos os compostos testados induziram danos ao DNA em ambas as linhagens tumorais. Com base nos resultados, considera-se que os extratos orgânicos e o BAR purificado de *C. salzmännii* (Nyl). apresentam atividade citotóxica e genotóxica frente as linhagens celulares tumorais testadas.

PALAVRAS – CHAVE: Depsídeos. Antitumoral. Micronúcleo. Cometa.

ABSTRACT

The secondary metabolites of lichens are responsible for most of their biological activities. Many of these compounds exhibit significant antineoplastic activity. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxic and genotoxic activities of organic extracts and purified barbatic acid from *Cladonia salzmannii* Nyl. The organic extracts were obtained from liquenic thallus (22 g) previously cleaned and dried with the solvents diethyl ether, chloroform and acetone, through hot exhausted method in a Soxhlet apparatus. The barbatic acid was purified from the ether extract (1.3 g). Chemical analysis of the organic extracts and purified BAR was performed by Thin Layer Chromatography (TLC). The purity of purified BAR was observed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The cytotoxic activity of the organic extracts and purified BAR was determined by the MTT method [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] and IPBC (Cytokinesis-Block Proliferation Index). The genotoxic potential of the organic extracts and purified BAR was determined by the micronucleus test and comet assay. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as diluting solvent of the samples in all biological tests. The results for IC₅₀ demonstrated significant cytotoxic potential to the ether extract (Ext E) (50 µg/mL) against the cell lines NCI-H292 (IC₅₀: 29,91 µg/mL), HEp-2 (IC₅₀: 26,75 µg/mL) and HL-60 (IC₅₀: 3,59 µg/mL) and to the purified BAR (25 µg/mL) against the cell lines HEp-2 (IC₅₀: 15,79 µg/mL) and MCF-7 (IC₅₀: 18,28 µg/mL). However, the assessment of cytotoxicity considering the Cytokinesis-Block Proliferation Index (IPBC) showed cytotoxic activity for purified BAR at all concentrations tested (5, 10, 20 and 40 µg/mL) and for all organic extracts (50 µg/mL) against Ehrlich carcinoma cells. However, for Sarcoma 180 only BAR purified at a concentration of 40 µg/mL and ether and chloroform extracts (50 µg/mL) were considered cytotoxic. The micronucleus test (MN) showed that the purified BAR at a concentration of 5 µg/mL showed no genotoxic potential in both tumor cell lines. Furthermore, the chloroform extract and purified BAR at a concentration of 10 µg/mL were not considered genotoxic for Sarcoma 180. In the comet assay, all compounds tested induced DNA damage in both tumor lines. Based on the results, it is considered that the organic extracts and the BAR purified from *C. salzmannii* (Nyl). exhibit cytotoxic and genotoxic activity front of the tested tumor cell lines.

KEY – WORDS: Depsides. Antitumor. Micronuclei. Comet.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1.	Esquema representativo do ciclo celular.	19
Figura 2.	Microestrutura do talo liquênico.	22
Figura 3.	Fórmula estrutural do ácido barbático.	25
Figura 4.	<i>Cladonia salzmannii</i> Nyl.	25
Figura 5.	Micronúcleos: (A) Células do Sarcoma 180; (B) Células do Carcinoma de Ehrlich.	29
Figura 6.	Célula do Sarcoma 180 apresentando danos ao DNA (imagem de cometa).	30

ARTIGO

Figura 1.	Cromatografia em Camada Delgada dos extratos orgânicos de <i>C. salzmannii</i> Nyl. e do BAR purificado a partir do extrato etéreo.	47
Figura 2.	Cromatograma (CLAE): A- Éter dietílico (Tr: 3,95min.); B- BAR purificado (Tr: 32,96 min.).	47

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1.	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2015 por gênero, exceto pele não melanoma*	20
------------------	---	----

ARTIGO

Tabela 1.	Porcentagem de inibição sobre o crescimento celular de linhagens celulares tumorais humanas.	48
Tabela 2.	CI ₅₀ do extrato etéreo e do BAR purificado.	49
Tabela 3.	Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) médio das linhagens celulares tratadas com os extratos orgânicos e BAR purificado (µg/mL) obtidos a partir de <i>C. salzmännii</i> Nyl.	49
Tabela 4.	Frequência média de micronúcleos (MNs) em células binucleadas tratadas com os extratos orgânicos e BAR purificado (µg/mL) obtidos a partir de <i>C. salzmännii</i> Nyl.	50
Tabela 5.	Frequência de Dano (FD) média para as linhagens celulares tratadas com os extratos orgânicos e BAR purificado (µg/mL) obtidos a partir de <i>C. salzmännii</i> Nyl.	50
Tabela 6.	Índice de Dano (ID) médio para as linhagens celulares tratadas com os extratos orgânicos e BAR purificado (µg/mL) obtidos a partir de <i>C. salzmännii</i> Nyl.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
2-AF	2-aminofluoreno
4-DNP	4-nitro-o-fenilenodiamina
BAR	Ácido barbático
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CI ₅₀	Concentração mínima para inibir 50% da proliferação celular
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C.N.	Controle Negativo
C.P.	Controle Positivo
D.P.	Desvio Padrão
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Epstein-Barr Virus
EGF	Epidermal growth factor
Ext. E	Extrato etéreo
Ext. C	Extrato clorofórmico
Ext. A	Extrato acetônico
FD	Frequência de Dano
HaCat	Células epidérmicas transformadas espontaneamente

HeLa	Células imortais de câncer do colo do útero
HEp-2	Linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano
HL-60	Leucemia promielocítica aguda
IAL	International Association for Lichenology
ID	Índice de Dano
IMA	Imazalil
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPBC	Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese
J774	Linhagem de células macrofágicas
KB	Carcinoma epidermóide nasofaríngeo
Kg	Quilograma
LT-B4	Leucotrieno B4
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humana
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
MMS	Metil metano sulfonato
MN	Micronúcleo
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NCI-H292	Carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano
nm	Nanômetro
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PANC-1	Carcinoma de pâncreas humano
PC-3	Carcinoma de próstata humana

PDGF	Platelet derived growth factor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
T-47D	Carcinoma de mama humana
TR	Tempo de Retenção
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV	Ultravioleta
V 79	Fibroblastos de pulmão de Hamster chinês

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 GENERALIDADES SOBRE O CÂNCER E CARCINOGENESE	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	20
1.3 LIQUENS	21
1.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS LIQUENS	22
1.5 DEPSÍDEOS	24
1.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	26
1.7 CÉLULAS TUMORAIS: SARCOMA 180 E CARCINOMA DE EHRLICH	27
1.8 GENOTOXICIDADE	28
1.8.1 Teste do Micronúcleo	29
1.8.2 Ensaio Cometa	29
2. REFERÊNCIAS	31
3. OBJETIVOS	38
3.1 GERAL	38
3.2 ESPECÍFICOS	38
4. ARTIGO	39
RESUMO	40
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAIS E MÉTODOS	42
RESULTADOS	46
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
5. CONCLUSÃO	57
ANEXO A – GUIDE FOR AUTHORS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 GENERALIDADES SOBRE O CÂNCER E CARCINOGENESE

O câncer é definido de diversas maneiras na literatura, porém os conceitos encontrados se baseiam em uma única linha de pensamento: a multiplicação de células fora de controle. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer - INCA, este é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças diversas. Tais células, se dividem rapidamente, e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos (BRASIL- INCA, 2011). A palavra câncer vem do grego “karkinos” que significa caranguejo. Hipócrates, o notável médico grego (460-377 a.C.), considerado o pai da medicina moderna, deu-lhe este nome ao observar o aspecto da maioria dos tumores, uma vez que os vasos sanguíneos superficiais se apresentavam turgidos e ramificados, projetando-se ao redor de um corpo central, lembrando o referido crustáceo (FILHO, 2011; MITCHELL *et al.*, 2012).

O termo câncer é uma expressão comum que designa todos os tumores malignos. Comumente, outros termos também são utilizados quando se faz menção a esta doença. Sendo os termos “tumor” e “neoplasia” os mais empregados. Entretanto, o termo tumor apresenta-se muito impreciso, pois representa qualquer inchaço ou intumescimento localizado, podendo ser causado por outros processos patológicos, como inflamações e hematomas. A palavra neoplasia significa literalmente o processo de “novo crescimento”. O oncologista britânico Rupert Willis (1898-1980) definiu neoplasia como uma massa de tecido anormal, cujo crescimento excede o tecido normal e persiste da mesma maneira excessiva após a cessação do estímulo que evocou a mudança. Deste modo, acompanhado das palavras benigna ou maligna, o termo neoplasia expressa de maneira mais precisa esta proliferação anormal de células e o comportamento biológico de tais lesões (MITCHELL *et al.*, 2012).

O câncer não é uma doença apenas da atualidade. Os seres humanos e outros animais tiveram neoplasias malignas ao longo da história. Alguns dos primeiros indícios desta doença foram tumores ósseos fossilizados encontrados em múmias humanas no Egito e no Peru, além de antigos manuscritos. A descrição mais antiga foi relatada no Egito e data de cerca de 3.000 a.C., denominado Papiro de Edwin Smith, é considerado como o mais antigo tratado de cirurgia traumática. Nele encontram-se descritos oito casos de tumores ou úlceras da mama que foram tratadas através da cauterização com uma ferramenta chamada “broca de fogo”. A escrita diz sobre a doença: “Não há nenhum tratamento”. Portanto, estes achados deixam claro que este processo patológico é conhecida há muitos séculos, embora as preocupações a cerca desta doença, e sobre as mortes causadas por ela, sejam mais notórias e intensas nos dias de hoje (ACS, 2011; BRASIL- INCA, 2011; RETTIG, 1977).

As células sofrem mutações e mudanças epigenéticas causadas pela interação de muitos fatores externos e da susceptibilidade individual; tais características definem o câncer como uma doença genética (WEINBERG, 2007). O processo de formação desta patologia é denominado carcinogênese ou oncogênese, e constitui-se de um sistema sequenciado e lento. Considerando a carcinogênese como um processo de múltiplas etapas envolvendo várias alterações, estes erros teriam efeito cumulativo durante a vida do indivíduo até a expressão do

fenótipo final (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). A incidência de neoplasias malignas aumenta com a idade, indicando a necessidade do acúmulo de mutações. O acúmulo de mutações no DNA ocorre especialmente nos genes que garantem a ordem dos eventos do ciclo de divisão celular, nos que consertam eventuais erros na replicação do material genético ou nos que promovem e mantêm o estado de diferenciação celular (DEVLIN, 2007).

A carcinogênese é composta por três estágios: iniciação, promoção e progressão. No início do processo ocorre uma modificação genética causada pela atuação de agentes cancerígenos. Nesta fase as células se encontram geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente. Ao término desta fase as células encontram-se "preparadas", ou seja, "iniciadas" para a ação de um segundo grupo de agentes. Essa alteração genética preliminar recebe o nome de iniciação. A etapa seguinte do processo de carcinogênese é a promoção, em que as células geneticamente alteradas sofrem o efeito de agentes oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio (BRAGA; TEIXEIRA; CHAMMAS, 2004; BRASIL-INCA, 2011).

A progressão tumoral é o terceiro e último estágio da carcinogênese, e se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já instalado, evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Uma característica essencial da célula transformada é sua capacidade de replicação sustentada, muitas vezes chamada de capacidade de replicação infinita. A explicação para este fenômeno encontra-se baseada nos telômeros, grupo de nucleotídeos que estabilizam as extremidades dos cromossomos e têm sua síntese coordenada pela enzima telomerase. Nas células embrionárias e células-tronco pluripotentes (*stem cells*), a telomerase está sempre ativa, mas é inativada quando a célula se diferencia. Assim, todas as células somáticas (diferenciadas) possuem um número limitado de divisões celulares, e esta limitação deve-se ao encurtamento dos telômeros. A grande maioria das células neoplásicas apresenta a telomerase na forma ativa, o que resulta na divisão celular infinita (BRAGA; TEIXEIRA; CHAMMAS, 2004).

As alterações genéticas podem ser causadas por erros durante o processo de replicação, ou induzidas por agentes responsáveis por promoverem alterações no DNA que induzem a formação do câncer, sendo estes denominados de agentes cancerígenos. A carcinogênese é determinada pela exposição a esses agentes, em uma dada frequência e período de tempo, e pela interação entre eles. Devem ser consideradas, também, as características individuais, que facilitam ou dificultam a instalação do dano celular. Portanto, a presença dos agentes cancerígenos, por si só, não pode ser responsabilizada pelo desenvolvimento dos tumores (BRASIL-INCA, 2011).

Os agentes cancerígenos podem ser físicos, como luz ultravioleta e radiações ionizantes; biológicos, como alguns vírus, que se integram ao genoma celular interrompendo seqüências gênicas ou promovendo rearranjos gênicos; ou químicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosaminas. A classificação destes agentes também pode ser

realizada de acordo com o estágio da carcinogênese em que atuam, sendo denominados como oncoiniciador, capaz de provocar diretamente o dano genético das células; oncopromotor, que atua sobre as células iniciadas, transformando-as em malignas; ou oncoacelerador, que se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas (ROSSI; HANNINEN, 2012).

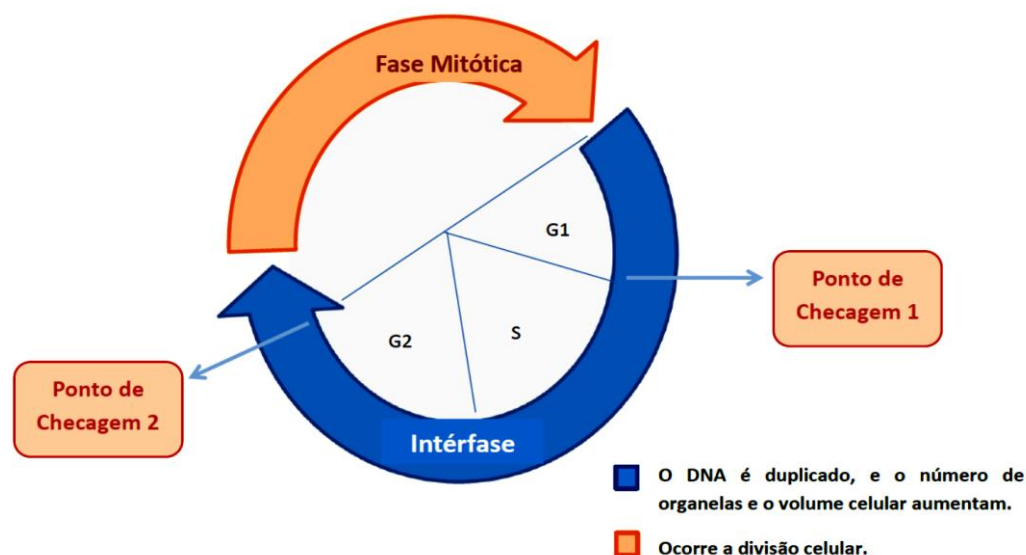
Avaliar o impacto dos diferentes agentes cancerígenos aos quais estamos expostos tem sido difícil, porque eles vêm de várias fontes, têm potenciais diferentes, e são afetados pela genética, pelos moduladores ambientais do metabolismo carcinogênico, e também por fatores de estilo de vida. E além da possibilidade de atuação isolada, é importante salientar que os fatores ambientais podem atuar em conjunto ou em sequência para produzir as múltiplas anormalidades genéticas características das células neoplásicas. As neoplasias são entendidas hoje como o resultado de agressões ambientais em um indivíduo geneticamente suscetível (FILHO, 2011).

O processo de metástase é definido como a capacidade que a célula maligna apresenta de invadir outros tecidos e formar novos tumores. A malignidade ignora as restrições de crescimento impostas pelo organismo, em especial pelas células vizinhas normais. Sendo assim, esta é a principal característica que difere uma neoplasia benigna de uma maligna. A metástase é um processo dinâmico em que genes são alternadamente ativados e desativados, e no qual estão envolvidas células cancerosas e normais. Para que uma célula cancerosa sobreviva e forme uma metástase, ela deve ser capaz de se desprender das demais, invadir a matriz extracelular, produzir enzimas proteolíticas que digiram a membrana basal, induzir a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos (angiogênese), e por estes mesmos vasos, alcançar a circulação sanguínea ou linfática. Na circulação, essa célula tumoral deve resistir a mecanismos de defesas celulares e humorais (células “natural killer”, macrófagos, TNF, IFN), alcançando um órgão favorável ao seu crescimento, na dependência de receptores para essa célula, da presença de hormônios ou de fatores de crescimento. A maior parte das células é destruída ainda na circulação, pela ação do sistema imune (MELO; JUNQUEIRA; CHAMMAS, 2003; NAGAI; CHAMMAS; BRENTANI, 2009).

Considerando o ciclo celular como sendo de fundamental importância no processo de oncogênese, algumas considerações devem ser realizadas. O ciclo celular é constituído de quatro fases (G1, S, G2 e M), e compreende os processos de duplicação do DNA e divisão nuclear (mitose) (Figura 1). Para iniciar um ciclo, a célula em repouso (fase G 0) precisa ser estimulada por fatores de crescimento (como o PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas, e o EGF- Fator de crescimento epidermal), hormônios esteróides e citocinas, todos produzidos por elas mesmas ou por células ao seu redor. Após este estímulo, uma série de reações químicas e eventos morfológicos, devem ocorrer de modo sucessivo e ordenado dentro de cada fase do ciclo de divisão celular. Na fase S, há duplicação do DNA e durante a fase M, segregação de todos os componentes celulares entre as células-filhas. As fases G1 e G2 correspondem aos períodos em que as células se preparam para execução das fases S e M, respectivamente. A principal função do ciclo celular é garantir que o DNA seja fielmente duplicado durante a fase S e que cópias idênticas dos cromossomos sejam igualmente distribuídas entre as células-filhas durante a mitose (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Durante a transição entre as fases G1/S e G2/Mitose ocorre a regulação do ciclo celular através de mecanismos denominados ‘pontos de checagem’, onde a célula garante que o estágio precedente tenha sido completado sem erros para que o processo de divisão possa avançar para a fase subsequente (KHODJAKOV; RIEDER, 2009). Esse mecanismo de controle de falhas permite que as células reparem os defeitos, impedindo a sua transmissão para as novas células e contribuindo com a manutenção da estabilidade genômica (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Quando a replicação, a reparação do DNA ou a reunião dos cromossomos for aberrante, as células normais detêm o seu avanço no ciclo celular até que a condição seja corrigida. Porém, se o dano ao DNA ou ao cromossomo for extenso, a reparação fica impossível e o ciclo celular é interrompido para dar início ao processo de morte celular por apoptose (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Figura 1. Esquema representativo do ciclo celular.



Fonte: Adaptado de DE ALMEIDA *et al.*, 2005.

Duas classes de genes, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor são os mais diretamente relacionados à regulação do ciclo celular. Os proto-oncogenes são responsáveis pela produção de proteínas que atuam na estimulação do ciclo celular, enquanto os genes supressores de tumor são responsáveis pela produção de proteínas que atuam inibindo o ciclo celular (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). A ativação dos proto-oncogenes os transformam em oncogenes. Estes são descritos como genes anormais responsáveis pela estimulação excessiva e constante dos eventos bioquímicos da proliferação celular, o que configura o câncer. Os genes supressores de tumor, por outro lado, permitem indiretamente a formação de um câncer quando são inativados. As alterações que afetam os genes supressores de tumor perturbam o sistema inibidor e o ciclo celular fica desregulado, promovendo a ocorrência desordenada de divisões celulares e o surgimento de células cancerosas. A ativação dos proto-oncogenes e a inativação dos genes supressores de tumor podem ser causadas por mutações, deleções e (e/ou) translocações cromossômicas (NEVILLE *et al.*, 2009).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

O problema do câncer no Brasil ganha relevância pelo perfil epidemiológico apresentado nas últimas décadas, e com isso, o tema conquista cada vez mais espaço nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas de governo. O conhecimento sobre a situação dessa doença permite estabelecer prioridades e alocar recursos de forma direcionada para a modificação positiva desse cenário na população brasileira. A vigilância do câncer destina-se a produzir informações para a tomada de decisões. Essas informações provêm dos registros de câncer, dos grandes sistemas de informação em saúde, de análises e estimativas, bem como de pesquisas e estudos epidemiológicos (BRASIL- INCA, 2014).

Estima-se que, até 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer. No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero. Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 395 mil novos casos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino (Tabela 1). Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide (BRASIL- INCA, 2014).

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2015 por gênero, exceto pele não melanoma*

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: BRASIL- INCA, 2014.

É incontestável que o câncer tornou-se hoje, no Brasil, um problema de saúde pública, cujo controle e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões. As abordagens orientadas para enfrentar esse problema de saúde são, necessariamente, múltiplas, incluindo: ações de educação para saúde em todos os níveis da sociedade; prevenção orientada para indivíduos e grupos; geração de opinião pública; apoio e estímulo à formulação de legislação específica para o enfrentamento de fatores de risco relacionados à doença; e fortalecimento de ações em escolas e ambientes de trabalho (BRASIL- INCA, 2014).

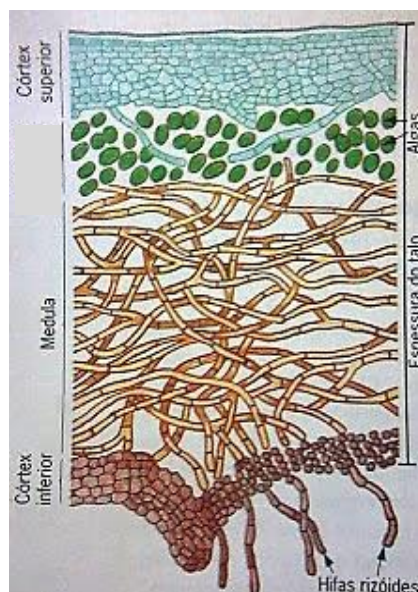
1.3 LIQUENS

A autêntica natureza dos líquens foi descrita em 1868, quando foi considerado tratar-se não de um organismo vegetal, mas de uma complexa simbiose entre algas e fungos. Entretanto, a ideia inicial de simbiose não foi reconhecida por todos. Alguns botânicos, consideravam a existência de parasitismo do tipo helotismo, no qual a alga seria parasitada pelo fungo, que dela retiraria o seu alimento. Porém, outros admitiram parasitismo considerando que a alga seria parasita do fungo (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976). Numerosas teorias e definições foram propostas através do tempo, contudo, durante uma reunião geral ocorrida no ano de 1981, o comitê de terminologia da *International Association for Lichenology* (IAL) definiu líquen como a associação entre um fungo e um componente fotossintético, que resulta em talos estáveis de ultraestrutura específica (XAVIER-FILHO *et al.*, 2006).

Esta associação envolve uma estreita integração fisiológica, na qual o fungo retém água protegendo o fotobionte contra dessecação, além de fornecer proteção física. Em contrapartida, as algas fornecem vitaminas e realizam a fotossíntese produzindo carboidratos para uso próprio e para o fungo (NASH III, 1996). A simbiose líquênica é uma estratégia evolucionária bem sucedida, resultando em uma abundante diversidade de espécies (GRUBE; KROKEN, 2000). O componente micobionte geralmente pertence ao filo Ascomycota, mas também pode pertencer ao filo Basidiomycota, já o fotobionte pode pertencer tanto as Chlorophyta quanto as Cyanobacteria (BENATTI; MARCELLI, 2007). O fotobionte ocupa uma parte muito pequena do talo variando de 5-10% da massa total, estando completamente envolvido pelas hifas do fungo (HONDA; VILEGAS, 1999).

A estrutura do talo líquênico é bastante peculiar, de modo que o micobionte e o fotobionte se dispõem em camadas sucessivas. No talo destaca-se o córtex superior, composto de hifas entrelaçadas, que serve de proteção para a camada de algas. Centralmente encontra-se uma camada de hifas frouxas, a medula, seguida de outro feixe de hifas, o córtex inferior (Figura 2). O fungo geralmente é responsável não só pela forma, como também pela estrutura do líquen, contribuindo as hifas para a maior parte da sua massa. Os cortes transversais de certas espécies de líquens, observados ao microscópio óptico, demonstram as algas distribuídas de forma homogênea, praticamente em todo o talo, enquanto as hifas se aglomeram junto às superfícies superior e inferior do líquen (NASH III, 1996).

De acordo com a morfologia do talo, os líquens podem ser classificados em: folhoso, crustoso e fruticoso. Os líquens folhosos possuem, geralmente, forma laminar e grande dimensão, aderindo-se diretamente ao substrato por um ou mais pontos ou através de rizinas (pequenos filamentos semelhantes a raízes). Podem ser destacados do substrato com alguma facilidade, normalmente com o auxílio de uma navalha. Os líquens crustosos fixam-se ao substrato em toda a sua extensão, e estão de tal forma envolvidos pelas partículas do substrato que para a sua remoção torna-se necessário retirar também parte dele. Ao contrário dos anteriores, os líquens fruticosos apresentam um talo cilíndrico e se assemelham a pequenos arbustos, convergindo para um único ponto que os une ao substrato (AHMADJIAN, 1993; NASH III, 1996).

Figura 2. Microestrutura do Talo Liquênico.

Fonte: SILVA; SASSON, 2005.

Usualmente a reprodução dos líquens ocorre de forma vegetativa, por meio de fragmentação do talo, que por vezes apresenta visíveis protuberâncias, contendo as partes alga e fungo (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976). Essas estruturas são denominadas isídios, que ao se destacar do talo, são disseminadas para formação de novos líquens. Outra forma de reprodução é a liberação de massas de hifas envolvendo células de algas. Estas estruturas especializadas são liberadas através de interrupções ou perfurações do talo, denominadas sorédios. Os Isídios e sorédios são geralmente disseminados por agentes dispersantes como água, vento e insetos (SEAWARD, 1993).

Os líquens podem se desenvolver nos mais diversos substratos como folhas, rochas, cascas de árvores e solo (HONDA; VILEGAS, 1999; NASH III, 1996). Embora apresentem a capacidade de sobreviver nos mais diferentes ambientes eles são muito sensíveis à poluição atmosférica (SEAWARD, 1993), e por este motivo têm sido utilizados como bioindicadores porque diferentemente dos vegetais superiores, não dependem de um sistema radicular para absorção de nutrientes (KÄFFER *et al.*, 2012). Devido a sua grande capacidade de adaptação às condições ambientais adversas, encontram-se amplamente distribuídos desde as regiões polares às tropicais, e das planícies às montanhas mais altas (SHUKLA; JOSHI; RAWAT, 2010).

1.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS LIQUENS

As substâncias químicas produzidas pelos líquens são classificadas, de acordo com a localização no talo, em produtos intracelulares e extracelulares. Os produtos intracelulares, representados pelas proteínas, aminoácidos, polióis, carotenóides, polissacarídeos e vitaminas, são encontrados tanto na parede celular quanto no citoplasma de fungos e algas. Os produtos extracelulares, provenientes do metabolismo secundário destes organismos, são classificados em quatro grupos bioenergeticamente relacionados: depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos e ácidos únicos. Estes metabólitos secundários localizam-se no córtex ou na medula, em

concentração de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo liquênico (HONDA; VILEGAS, 1999; NASH III, 1996).

A produção das substâncias liquênicas ocorre através de três principais vias biossintéticas: a do acetato polimalonato, onde são formados os ácidos graxos, depsídeos, depsidonas e quinonas; a do ácido chiquímico, onde se produzem os pigmentos amarelos ou laranjas, derivados do ácido vulpínico; e a do ácido mevalônico, que forma os terpenóides e esteróides. Entretanto, a origem biossintética da maioria dos metabólitos secundários decorre das vias do ácido chiquímico e do acetato polimalonato. Outras vias biossintéticas também são evidenciadas, como a dos aminoácidos e a dos carboidratos; nesta última são formados os sacarídeos e polióis (HONDA; VILEGAS, 1999).

As substâncias liquênicas são utilizadas desde a Idade Média pela indústria da perfumaria e de alguns pigmentos (NASH III, 1996). Algumas espécies de líquens são comestíveis e podem ser aproveitadas tanto para aplicação na pecuária como para a alimentação humana (XAVIER-FILHO *et al.*, 2006). A ação farmacológica dos metabólitos liquênicos aplica-se tanto para extratos brutos como para substâncias purificadas. A eficácia das substâncias liquênicas foi estudada a partir da década de quarenta, quando surgiram os primeiros relatos sobre o assunto. Burkholder *et al.* (1944) deram início a testes antibacterianos, e posteriormente muitos outros pesquisadores obtiveram resultados satisfatórios sobre a ação das substâncias liquênicas frente a diferentes microorganismos (ESIMONE; ADIKWU, 1999; FALCÃO *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 1996).

Na literatura, também são reportadas ações analgésica, antipirética, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante e imunológica dos metabólitos liquênicos sobre diversos sistemas biológicos (MAIA *et al.*, 2002; PIOVANO *et al.*, 2002; WHITE *et al.*, 2014). Além disto, apresentam atividade protetora contra a radiação U.V., sendo portanto considerados bons protetores solares (DEVEHAT *et al.*, 2013; RANCAN *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 2004).

A eficiência destas substâncias contra tumores e células cancerígenas encontra-se bem estabelecida na literatura. Bézin *et al.* (2003), descreveram relevante atividade citotóxica para extratos obtidos a partir dos líquens *Cladonia convoluta*, *C. rangiformis*, *Parmelia caperata*, *Platismatia glauca* e *Ramalina cuspidata* contra várias linhagens de células tumorais ($CI_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$). Kristmundsdóttir *et al.* (2005), demonstraram que o ácido úsnico tem atividade antiproliferativa contra as linhagens de carcinomas humanos de mama (T-47D), do pâncreas (PANC-1) e da próstata (PC-3). O ácido salazínico e seus derivados foram testados frente as linhagens tumorais humanas de mama (MDA/MB-435), do cólon (HCT-8) e do sistema nervoso central (SF-295). A série homóloga dos ácidos 8',9'-di-O-alquil salazínicos apresentou resultados promissores na avaliação da atividade citotóxica ($CI_{50} \leq 1,73 \mu\text{g/mL}$) (MICHELETTI *et al.*, 2009). Derivados do ácido lecanórico, apresentaram potencial citotóxico contra linhagens celulares tumorais diversas. O composto mais potente foi o orselinato de *n*-butila, seguido dos orselinato de *sec*-butila e de *terc*-butila (CI_{50} : 7,2; 8,9 e 10,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (BOGO *et al.*, 2010).

Os estudos de genotoxicidade utilizando substâncias liquênicas têm sido frequentemente realizados. O potencial genotóxico do extrato acetônico obtido a partir de

Cetraria aculeata em duas cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA100) e em cultura de linfócitos humanos foi avaliado por Zeytinoglu *et al.* (2008). Os resultados demonstraram que o extrato acetônico não apresentou efeito genotóxico para ambos. A caracterização química do extrato acetônico através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) revelou a presença dos ácidos liqueterínico e protoliqueterínico no extrato testado. Aydin e Turkez (2011) relataram que não houve potencial genotóxico para extratos aquosos obtidos a partir dos líquens *Aspicilia calcarea*, *Cetraria chlorophylla*, *Dermatocapon intestiniforme* e *Physcia aipolia* em cultura de linfócitos humanos. Entretanto, estudos recentes descreveram atividade genotóxica dose dependente para extratos metanólicos obtidos a partir de *Hypogymnia physodes* e *C. islandica* em cultura de linfócitos humanos (ARI *et al.*, 2014; GRUJIČIĆ 2014).

Considerando o potencial genotóxico de diversos compostos sobre células humanas não tumorais, muitos trabalhos têm investigado a antígenotoxicidade das substâncias líquênicas sobre alguns destes compostos, como o subcitrato de bismuto coloidal (GEYIKOGLU; TURKEZ; ASLAN, 2007), a mitomicina C (TURKEZ; AYDIN; ASLAN, 2012; ZEYTINOGLU *et al.*, 2008), a 4-nitro-o-fenilenodiamina (4-DNP) e a 2-aminofluoreno (2-AF) (ZEYTINOGLU *et al.*, 2008), a aflatoxina B1 (ASLAN *et al.*, 2012; CEKER *et al.*, 2013; KOTAN *et al.*, 2011; TURKEZ *et al.*, 2010), o metil metano sulfonato (MMS) (LEANDRO *et al.*, 2013) e o imazalil (IMA) (TURKEZ; AYDIN; ASLAN, 2014). A capacidade de algumas substâncias líquênicas em reverter danos induzidos ao DNA, torna possível a sua aplicabilidade como agente quimiopreventivo.

1.5 DEPSÍDEOS

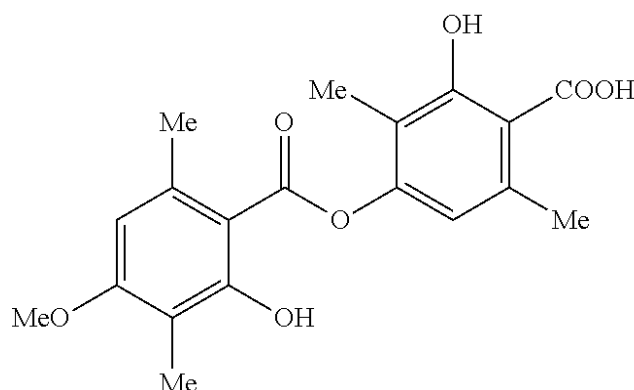
Os depsídeos são uma classe distinta de compostos aromáticos obtidos de líquens, os quais são formados pela condensação de duas ou mais unidades fenólicas derivadas do orcinol (ácido orselínico) ou do β -orcinol (ácido β -metil-orselínico) (GRIMSHAW, 1976). Esses compostos são formados pela esterificação da carboxila da posição 1 da primeira unidade com a hidroxila da posição 4' ou da posição 3' da segunda unidade. Os compostos resultantes são *para*-depsídeos e *meta*-depsídeos da série do orcinol, como o ácido lecanórico e o ácido criptoclorofoico, e da série do β -orcinol, como a atranorina e o ácido barbático (HONDA; VILEGAS, 1999; KUMAR; MÜLLER, 1999).

A síntese dos depsídeos segue a via do acetato polimalonato e inicia-se, como no caso dos ácidos graxos, com a condensação de 1 mol de acetilSCoA e 3 moles de malonilSCoA. A enzima ácido orselínico sintase é responsável por catalisar a reação biossintética de formação do ácido orselínico, sendo este a unidade fundamental da biossíntese dos depsídeos (CULBERSON, 1969; HONDA; VILEGAS, 1999). Vários depsídeos bem caracterizados exibem atividade anti-inflamatória, analgésica, antipirética, antioxidante, antibacteriana e antifúngica, além de propriedades anticancerígenas (HIDALGO *et al.*, 1994; MULLER, 2001; PIOVANO *et al.*, 2002; RUSSO *et al.*, 2006).

O ácido barbático (C₁₉H₂₀O₇) (Figura 3), é um depsídeo formado por dois anéis aromáticos interligados entre si por uma ligação éster, apresentando em um dos anéis um grupo carboxílico. Possui massa molecular de 324 u.m.a. e o solvente mais adequado para a extração é o éter dietílico, porém, também é solúvel em clorofórmio e acetona. Seus cristais

possuem cor amarelo-pálido em forma de pequenas agulhas, com ponto de fusão em torno de 187 °C (HUNECK; YOSHIMURA, 1996).

Figura 3. Fórmula estrutural do ácido barbático.



Fonte: OHBA; MURASE; SUGIYAMA, 2013.

O ácido barbático é o composto principal de *Cladonia salzmannii* Nyl. (1887) (Figura 4), estando também presente em outras espécies do gênero *Cladonia*, como: *C. coccifera*, *C. krogiana*, *C. amaurocrea*, *C. incrassata*, e *C. cristatella* (LOFALL; TIMDAL, 2002; KOWALSKI; HAUSNER; PIERCEY-NORMORE, 2011). O gênero *Cladonia*, pertencente à família Cladoniaceae, apresenta distribuição cosmopolita e ampla representatividade no Brasil, onde são relatadas aproximadamente trezentas espécies (CULBERSON, 1970). Nos solos arenosos do nordeste brasileiro é comum encontrar lugares caracterizados pela abundância de colônias líquênicas da família Cladoniaceae. A espécie *C. salzmannii* Nyl. distribui-se geograficamente na região Nordeste do Brasil, principalmente nos Estados de Pernambuco, Paraíba, Bahia, Minas Gerais e Sergipe. Ocasionalmente, esta espécie também produz os ácidos taminólico, D-taminólico e 4-O-dimetilbarbático (AHTI; STENROOS; XAVIER-FILHO, 1993). O ácido barbático também é encontrado em espécies de outros gêneros como: *Hypogymnia hengduanensis*, *Usnea longissima*, *Arthothelium awasthii* e *Heterodea muelleri* (BEHERA *et al.*, 2008; HAGER *et al.*, 2008; MALLAVADHANI *et al.*, 2004).

Figura 4. *Cladonia salzmannii* Nyl.



Fonte: O autor, 2013.

Os estudos sobre as atividades biológicas deste depsídeo tiveram início ainda na década de oitenta, quando Nishitoba *et al.* (1987) demonstraram o seu efeito alelopático em sementes de alface, nas quais ocorreu a inibição do desenvolvimento. Posteriormente, o ácido foi considerado como inibidor do complexo proteico denominado fotossistema II, localizado nos tilacoides do espinafre (ENDO *et al.*, 1998). A inibição do fotossistema II através da ação deste composto continuou a ser alvo de estudos por Takahagi *et al.* (2006), os quais relataram que, em células de tabaco tolerantes ao herbicida atrazina, a inibição ocorreu mediante a sua atuação sobre a cadeia transportadora de elétrons (CTE), gerando o impedimento do fluxo de elétrons através das proteínas localizadas na membrana mitocondrial interna.

A atividade antimicrobiana do ácido barbático foi analisada por Martins *et al.* (2010). O efeito *in vitro* contra as cepas de *Staphylococcus aureus* foi evidente. A concentração mínima inibitória (CMI) foi de 50 µg/mL para os isolados clínicos e 100 µg/mL para as linhagens multirresistentes. Portanto, a CMI do ácido barbático mostrou o mesmo nível de inibição de outras substâncias líquênicas.

A inibição do vírus Epstein-Barr (EBV) pelo ácido barbático foi relatada por Yamamoto *et al.* (1995), e sendo o EBV considerado pela *International Agency for Research on Cancer* como um carcinógeno de grau I (agentes que comprovadamente causam neoplasias em humanos), a ação inibitória deste composto sobre tal vírus torna-se relevante (NIEDOBITEK, 1999). Kumar; Müller (1999) descreveram a atuação do ácido barbático como inibidor não-redox da síntese do leucotrieno B₄ (LT-B₄) e como agente antiproliferativo sobre a linhagem de células HaCaT (células epidérmicas transformadas espontaneamente).

O potencial citotóxico dos extratos clorofórmico e de acetato de etila do líquen *Thamnolia vermicularis* contra a linhagem de células HeLa (células imortais de câncer do colo do útero) foi reportado por Manojlovic *et al.* (2010), que evidenciaram a presença do ácido barbático como sendo um dos compostos ao qual é atribuído grande potencial para ser utilizado na indústria farmacêutica.

Considerando as atividades biológicas descritas anteriormente e o elevado potencial farmacológico atribuído ao ácido barbático torna-se relevante a realização de estudos que busquem investigar os potenciais citotóxico e genotóxico desta substância.

1.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A aprovação de um novo composto para testes em humanos demanda uma extensa avaliação de ensaios de toxicidade em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Através da avaliação destas técnicas de bioensaio define-se a concentração de uma determinada substância capaz de produzir uma resposta biológica. A toxicidade pode ser medida através da DL₅₀ (dose letal para 50% do grupo de animais) e da CI₅₀ (concentração que inibe 50 % do crescimento em relação ao controle negativo) (RANG *et al.*, 2004).

A citotoxicidade é considerada como o potencial que um determinado composto apresenta para induzir a morte celular. Os testes de citotoxicidade são necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto para causar morte

celular como consequência de danos às funções básicas das células (EISENBRAND *et al.*, 2002). O uso de testes *in vitro* tem sido amplamente utilizado para pesquisa de agentes anticâncer. A citotoxicidade é considerada um parâmetro para a detecção da atividade antitumoral. A maioria dos quimioterápicos usados na terapêutica foi selecionada por sua capacidade de controlar a proliferação celular (RAMIREZ-MARES; CHANDRA, 2004).

Os sistemas celulares mais comumente empregados na toxicologia *in vitro* compreendem culturas primárias, linhagens imortalizadas, células geneticamente modificadas, células tronco, células em diferentes estágios de diferenciação, co-culturas de diferentes tipos celulares, culturas tridimensionais, fatias de tecido e sistemas de barreira (ZUCCO *et al.*, 2004). As culturas celulares são derivadas de explantes primários ou de suspensão de células dispersas, sendo cultivadas em monocamadas aderentes em substrato sólido, ou em suspensão no meio de cultura, quando as células não aderem ao substrato (FRESHNEY, 2005). Os ensaios de citotoxicidade podem ser desenvolvidos através de diversas metodologias: contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos (HOUGHTON *et al.*, 2007).

Os métodos de análise através da captação e exclusão de corantes pelas células, são amplamente utilizados para medir o nível de toxicidade celular. O teste de redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] a formazan tem sido um dos mais frequentemente utilizados para avaliar a citotoxicidade (MOSMANN, 1983). O MTT entra na célula via endocitose, e a redução para formazan ocorre nas mitocôndrias ativas das células viáveis (LIU *et al.*, 1997). Esta análise tem sido utilizada com sucesso para verificar a capacidade de redução mitocondrial e a viabilidade celular (KIM *et al.*, 2009).

Atualmente a toxicidade celular tem sido constantemente avaliada através do Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) das células tratadas, em comparação com o controle negativo. O índice é calculado baseando-se no número de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas encontradas no total de 500 células contadas por tratamento. Sendo assim, uma diminuição significativamente estatística no valor deste índice, quando comparado ao controle negativo, designa perda nas funções celulares e/ou morte celular (OECD, 2014).

1.7 CÉLULAS TUMORAIS: SARCOMA 180 E CARCINOMA DE EHRLICH

O Sarcoma 180 foi descoberto no Crocker Laboratory (Columbia University, New York) em 1914, sendo por este motivo também denominado tumor de Crocker. Inicialmente foi classificado como um carcinoma mamário, devido ao fato de ter se originado espontaneamente como um tumor sólido na região axilar de camundongos. Em 1919, após diversos transplantes subcutâneos assumiu a forma sarcomatosa (ZUCKERBERG, 1973). Em 1951, a forma ascítica do tumor foi desenvolvida através da inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss. Histologicamente, observam-se células poliédricas de citoplasma basófilo com núcleo central arranjadas em ninhos ou cordões, estroma circundando o tumor e necrose central (KURASHIGE; MITSUHASHI, 1982).

O Carcinoma de Ehrlich foi descrito como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas (EHRLICH, 1906). Primariamente, o tumor foi desenvolvido sob circunstâncias experimentais na forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. A forma

ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais, foi desenvolvida em 1932. Histologicamente, o Carcinoma de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose, células extremamente anaplásicas, poucas células inflamatórias e estroma escasso (GUPTA *et al.*, 2004).

A frequente utilização destes tumores nos estudos de cancerologia experimental ocorre em consequência do alto índice mitótico e de invasividade que estes possuem, além da simplicidade do cultivo celular. Deste modo, estas linhagens celulares tumorais apresentam fundamental importância na descoberta de novos fármacos antineoplásicos, bem como no aperfeiçoamento dos métodos de prevenção e diagnóstico do câncer (CRUZ *et al.*, 2009).

1.8 GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade constitui a área da genética responsável pelo estudo dos processos que alteram o DNA em seu fundamento molecular, processo denominado como mutagênese. Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA produzindo modificações em sua estrutura ou função, e quando essas alterações se fixam apresentando a capacidade de serem transmitidas, são denominadas mutações. A palavra mutação pode ser definida como sendo qualquer alteração permanente no DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies, mas podem ocorrer uma série de problemas, que na maioria das vezes apresentam resultados maléficos, incluindo malformação, câncer, envelhecimento e morte (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003). Portanto, os mecanismos de mutagênese e carcinogênese mostram-se intrinsecamente ligados. A mutação é consequência de danos no DNA, e estes danos podem ser o processo inicial da formação de neoplasias (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Para verificar o potencial genotóxico de um determinado composto, existem testes bem definidos e internacionalmente reconhecidos pelas agências reguladoras como parte da bateria de testes recomendada para o registro de novos produtos que entram no mercado mundial (HAYASHI *et al.*, 2000). A utilização de organismos experimentais e bioensaios para a detecção de danos ao material genético tem permitido a quantificação e reconhecimento de uma ampla gama de substâncias com atividade genotóxica (OBE *et al.*, 2002).

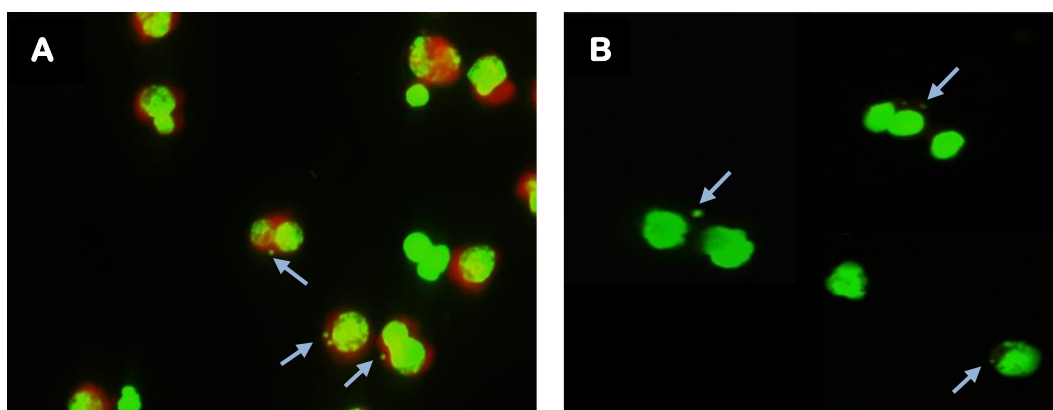
Os testes de genotoxicidade são frequentemente categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam. A associação desses indicadores biológicos, bem caracterizados e quantificados, com o conhecimento dos mecanismos de ativação de proto-oncogenes ou da perda de função dos genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância de sua realização (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Vários métodos citogenéticos têm sido utilizados para a monitorização biológica de populações expostas a agentes genotóxicos e carcinogênicos, como a quantificação de micronúcleos e lesões no DNA (COLLINS *et al.*, 1997; MAC GREGOR *et al.*, 1987).

1.8.1 Teste do Micronúcleo

Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos que resultam de quebras ou cromossomos inteiros que se atrasam durante a mitose, e portanto não podem ser incorporados ao núcleo principal das células filhas após a divisão nuclear (Figura 5). O índice de micronúcleos em células humanas ou de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos empregados na rotina dos testes de genética toxicológica *in vivo* e *in vitro* (NERSESYAN; ADAMYAN, 2004). Essas estruturas são tipicamente arredondadas, além de possuírem cor e textura semelhantes ao núcleo principal (MÜLLER; STREFFER, 1994).

O teste do micronúcleo é um ensaio frequentemente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (TWEATS *et al.*, 2007). Existem algumas técnicas utilizadas para análise de micronúcleos, mas a técnica que realiza o bloqueio da citocinese utilizando a citocalasina B é a única que atinge dois objetivos importantes. O primeiro é que o micronúcleo recém formado permanece “preso” ao citoplasma, evitando a sua perda. O segundo objetivo, está associado ao fato de que as células analisadas devem apresentar-se binucleadas, facilitando a leitura das amostras (FENECH; MORLEY, 1985). Além disso, o bloqueio da citocinese permite confirmar que as células analisadas passaram pelo processo de divisão celular durante a realização do teste.

Figura 5. Micronúcleos: (A) Células do Sarcoma 180; (B) Células do Carcinoma de Ehrlich.

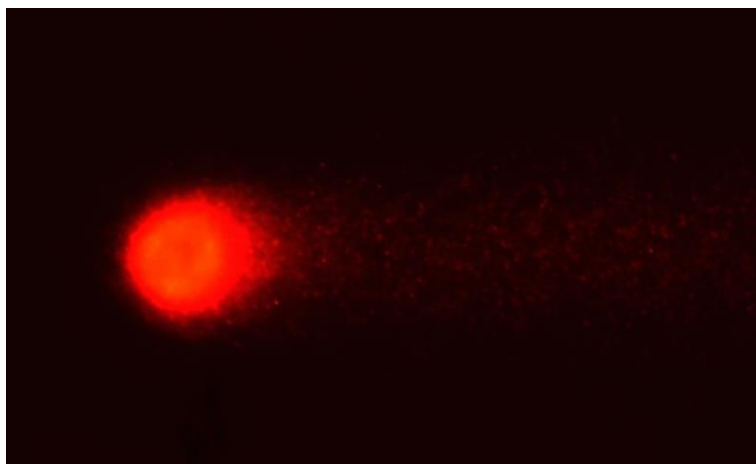


Fonte: O autor, 2014.

1.8.2 Ensaio Cometa

O princípio básico do ensaio cometa é a migração de pequenos fragmentos do DNA durante eletroforese através do gel de agarose. As células com DNA danificado caracterizam a imagem de nucleóides como cometas, consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (DNA quebrado), que quando corados podem ser observados em microscópio de fluorescência (Figura 6). A extensão do DNA que migrou está correlacionada com o nível do dano ocorrido (TICE *et al.*, 2000).

Figura 6. Célula do Sarcoma 180 apresentando danos ao DNA (imagem de cometa).



Fonte: O autor, 2014.

Este ensaio vem sendo proposto para estudos de genética toxicológica devido as suas vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Ele combina a simplicidade da técnica bioquímica para detecção de quebras no DNA com a utilização de poucas células, além de corresponder a um ensaio citogenético. As vantagens dessa técnica incluem a sensibilidade na detecção de dano ao DNA; a coleta de dados em nível celular individual; o uso de um número pequeno de células para a análise; a possibilidade de aplicação em qualquer população de células eucarióticas; e principalmente, a rapidez de resultados (TICE *et al.*, 2000).

O Ensaio Cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas através deste ensaio são passíveis de correção. Assim sendo, a sua utilização também aplica-se para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (ALBERTINI *et al.*, 2001). Além disso, a utilização deste ensaio *in vitro* também é útil para a detecção de células em apoptose. Visto que, as células em fases finais do processo de morte celular por apoptose apresentam formas características com mais de 90% do DNA na cauda e pouquíssimo ou nenhum DNA detectável na cabeça do cometa (GONTIJO; TICE, 2003).

Os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade constituem métodos de avaliação obrigatórios para a aprovação de novos fármacos. Considerando o elevado potencial tóxico e a baixa seletividade dos fármacos utilizados no tratamento do câncer, torna-se necessária a realização de pesquisas que busquem novas drogas antitumorais mais seletivas. Os metabólitos secundários liquênicos são amplamente descritos na literatura por seu potencial biológico, destacando-se a atividade antitumoral relatada para muitos destes compostos. Diante disto, torna-se relevante a realização de estudos que busquem avaliar o potencial citotóxico e genotóxico de metabólitos liquênicos, tais como o ácido barbático.

2. REFERÊNCIAS

- ACS - American Cancer Society. **The History of Cancer**. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2011.
- AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. New York: John Wiley & Sons Inc. 1993.
- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER-FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Biology**, v. 7, p. 55-70, 1993.
- ALBERTINI, R. J.; *et al.* IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2001.
- ARI, F.; *et al.* Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on breast cancer cells. **Environmental Toxicology**, v. 29, p. 804-813, 2014.
- ASLAN, A.; *et al.* Protective role of methanol extracts of two lichens on oxidative and genotoxic damage caused by AFB1 in human lymphocytes *in vitro*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, p. 505-512, 2012.
- AYDIN, E.; TURKEZ, H. Antioxidant and genotoxicity screening of aqueous extracts of four lichens collected from North East Anatolia. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 20, p. 2085-2091, 2011.
- BEHERA, B. C.; *et al.* Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 776-784, 2008.
- BENATTI, M. N.; MARCELLI, M. P. Gêneros de fungos liquenizados dos manguezais do Sul-Sudeste do Brasil, com enfoque no manguezal do Rio Itanhaém, Estado de São Paulo. **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, p. 863-878, 2007.
- BÉZIVIN, C.; *et al.* Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, p. 499-503, 2003.
- BRAGA, P. B.; TEIXEIRA, V. R.; CHAMMAS, R. Aspectos Moleculares da Transformação Celular: Conceitos e Implicações. In: Dan Linetzky Waitzberg. (Org.). **Dieta, Nutrição e Câncer**. 1ª Ed. São Paulo: Atheneu; p. 79-87, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer - INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acesso em 5 de maio de 2014]. **Disponível em:** <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>
- BOGO, D.; *et al.* *In vitro* Antitumour Activity of Orsellinates. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 65, p. 43-48, 2010.
- BURKHOLDER, P. R.; *et al.* Antibiotic activity of lichens. USA: PNAS- Proceedings of the National Academy of Science, v. 30, n. 9, p. 250-255, 1944.

CEKER, S.; *et al.* Genotoxic and antigenotoxic potentials of two *Usnea* species. **Toxicology and Industrial Health**, 2013.

COLLINS, A. R.; *et al.* The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, v. 375, p. 183-193, 1997.

CRUZ, M.; *et al.* Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v.15, p. 669-682, 2009.

CULBERSON, C. F. Chemical and botanical guide to lichen products. North Carolina: University of North Carolina Press, 1969.

CULBERSON, C. F. Supplement to chemical and botanical guide to lichen products. **The Bryologist**, v. 73, p. 177-377, 1970.

DE ALMEIDA, V. L.; *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

DEVEHAT, F.; *et al.* Lichenic extracts and metabolites as UV filters. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 17-28, 2013.

DEVLIN, T. M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. 6ª Ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, p. 1186, 2007.

EHRlich, P. Experimentally carcinomstudien an Mäusen. *Arb Inst Exp Ther Frankfurt*, v. 1, p. 78-80, 1906.

EISENBRAND, G.; *et al.* Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

ENDO, T.; *et al.* Inhibition of photosystem II of spinach by lichen-derived depsides. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, p. 2023-2027, 1998.

ESIMONE, C. O.; ADIKWU, M. U. Antimicrobial activity and citotoxicity of *Ramalina farinacea*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 428-431, 1999.

FALCÃO, E. P.; *et al.* Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, p. 43-49, 2002.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleous test. **Cytobios Journal**, v. 43, p. 233-246, 1985.

FILHO, G. B. BOGLIOLO **Patologia**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 5ª Ed. New York: Wiley-Liss; 2005.

GEYIKOGLU, F.; TURKEZ, H.; ASLAN, A. The protective roles of some lichen species on colloidal bismuth subcitrate genotoxicity. **Toxicology and Industrial Health**, v. 23, p. 487-492, 2007.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. (Org.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 247-279, 2003.

GRIMSHAW, J. Depsides, hydrolysable tannins, lignans, lignin and humic acid. **Rodd's Chemistry of Carbon Compounds**. 2ª Ed. Amsterdam: Elsevier, p. 203, 1976.

GRUBE, M.; KROKEN, S. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. **Mycological Research**, v. 104, nº 11, p. 1284-1294, 2000.

GRUJIČIĆ, D.; *et al.* Evaluation of *in vitro* antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica*. **Cytotechnology**, v. 66, p. 803-813, 2014.

GUPTA, M.; *et al.* Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, p. 1070-1076, 2004.

HAGER, A.; *et al.* Production and bioactivity of common lichen metabolites as exemplified by *Heterodea muelleri* (Hampe) Nyl. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 113-120, 2008.

HAYASHI, M.; *et al.* *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 234 - 252, 2000.

HIDALGO, M. E.; *et al.* Antioxidant capacity of depsides and depsidones. **Phytochemistry**, v. 3, p. 1585-1587, 1994.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A. **Química de Líquens**. Química Nova, v. 22, n.1, p. 25-55, 1999.

HOUGHTON, P. J.; *et al.* The sulphorhodamide (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anti cancer activity. **Methods**, vol. 42, p. 377-387, 2007.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, Y. **Identification of lichen substances**. New York: Springer-Verlag, p. 494, 1996.

KÄFFER, M. I.; *et al.* Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. **Environmental Pollution**, v.163, p.24-31, 2012.

KHODJAKOV, A.; RIEDER, C. L. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. **Journal of Biology**, v. 8, p. 88, 2009.

KIM, H.; *et al.* Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. **Toxicology Letters**, v. 184, p.13-17, 2009.

KOTAN, E.; *et al.* Protective role of methanol extract of *Cetraria islandica* (L.) against oxidative stress and genotoxic effects of AFB₁ in human lymphocytes *in vitro*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, p. 599-605, 2011.

KOWALSKI, M.; HAUSNER, G.; PIERCEY-NORMORE, M. Bioactivity of secondary metabolites and thallus extracts from lichen fungi. **Mycoscience**, v. 52, p. 413-418, 2011.

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

KUMAR, K. C., MÜLLER, K. Depsides as non-redox inhibitors of leukotriene B4 biosynthesis and HaCaT cell growth. 1. Novel analogues of barbatic and diffractaic acid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 1035-1042, 1999.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180-bearing mice and EL4 bearing-mice. **Gan**, v. 73, p. 85-90, 1982.

LEANDRO, L. F.; *et al.* Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)- usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays. **Mutation Research**, v. 753, p. 101-106, 2013.

LIU, Y.; *et al.* Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p. 581-593, 1997.

LOFALL, B. P.; TIMDAL, E. *Cladonia krogiana*, a new xanthone-containing species from Norway. **The Lichenologist**, v. 34, p. 277-281, 2002.

MAC GREGOR, J. T.; *et al.* Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v. 189, p. 103-112, 1987.

MAIA, M. B. S.; *et al.* Anticonceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from lichen *Cladina dendroides*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, p. 259-264, 2002.

MALLAVADHANI, U. V.; *et al.* Phenolic and steroidal constituents of the lichen *Usnea longissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 95-97, 2004.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 153-166, 2009.

MANOJLOVIC, N.; *et al.* Screening of *Thamnia vermicularis* var. *subuliformis* for antimicrobial, antioxidante and cytotoxic activities. **Planta Médica**, v. 72, p. 442, 2010.

MARTINS, M. C. B.; *et al.* *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, v. 53, p. 115-122, 2010.

MELO, F. H. M.; JUNQUEIRA, M. S.; CHAMMAS, R. Mecanismos de Invasão e Metástases. In: Maria Mitzi Brentani; Luiz Paulo Kowalski; Francisco Ricardo Gualda Coelho. (Org.). **Bases da Oncologia**. 2ª Ed. São Paulo: Editora Marina e Tedmedd Editora, p. 201-226, 2003.

MICHELETTI, A. C.; *et al.* Chemical constituents of *Parmotrema ichexanthonicum* Eliasaro & Adler - isolation, structure modification and evaluation of antibiotic and cytotoxic activities. **Química Nova**, v. 32, p. 12-20, 2009.

MITCHELL, R. N.; *et al.* Robbins & Cotran: **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. p. 132- 159. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 9-16, 2001.

MÜLLER, W. U., STREFFER, C. Micronucleus assays. In: **Advances in Mutagenesis Research**. Berlin: Springer-Verlag, v. 5, p. 134, 1994.

NAGAI, M.A.; CHAMMAS, R.; BRENTANI, M. M. Oncogênese e Fisiopatologia do Câncer. In: M.A. Martins; F.J. Carrilho; V.A.F. Alves; E.A. Castilho; G.G. Cerri; C.L. Wen. (Org.). **Clínica Médica**. 1ª Ed. São Paulo: Manole, v. 3, p. 448-466, 2009.

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

NERSESYAN, A. K.; ADAMYAN, R. T. Micronuclei level in exfoliated buccal mucosa cells of patients with benign and malignant tumors of female reproductive organs and breast. **Tsitol Genet Journal**, v. 38, p. 72-75, 2004.

NEVILLE, B. W.; *et al.* **Patologia Oral & Maxilofacial**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NIEDOBITEK, G. The Epstein-Barr Virus: a group 1 carcinogen? **Virchows Archiv**, v. 435, p. 79-86, 1999.

NISHITOBA, Y.; *et al.* Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 3181, 1987.

OBE, G.; *et al.* Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. **Mutation Research**, v. 504, n.5, p. 17-36, 2002.

OECD. Guideline for the Testing of Chemicals. No. 487. *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development - OECD, 2014.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu. 2008.

OHBA, T.; MURASE, D.; SUGIYAMA, M. Inhibitor of Endothelin Action and Skin-Whitening Agent. USPTO Patent: US 13993454. KAO CORPORATION, 2013.

PEREIRA, E. C.; *et al.* Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos I: *Cladonia corallifera* e *Cladonia substellata*. Ver. **Revista da Universidade do Amazonas, Série: Ciências Biológicas**, v. 1, p. 65-77, 1996.

PIOVANO, M.; *et al.* Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**. v. 47, n. 3, p. 235-240, 2002.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S. M. *In vitro* chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguaiensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, p. 53-65, 2004.

RANCAN, F.; *et al.* Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. **Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology**, v. 68, p. 133-139, 2002.

RANG, H. P.; *et al.* **Farmacologia**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RETTIG, R. A. Cancer crusade: The story of the National Cancer Act of 1971. Princeton, New Jersey: PUP, 1977.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. (Org.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 21-27, 2003.

ROSSI, M; HANNINEN, M. L. *Helicobacter spp.* other than *H. pylori*. **Helicobacter**, v. 1, p. 56-61, 2012.

RUSSO, A., *et al.* Pannarin inhibits cell growth and induces cell death in human prostate carcinoma DU-145 cells. **Anti-Cancer Drugs**, v. 17, p. 1163-1169, 2006.

SEAWARD, M. R. D. Lichens and sulphur dioxide air pollution: field studies. **Environmental Pollution**, v. 1, 73-91, 1993.

SHUKLA, K.; JOSHI, P. G.; RAWAT, M. S. M. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 303-314, 2010.

SILVA J.; ERDTMANN B.; HENRIQUES J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora alcance, p. 422, 2003.

SILVA, C.; SASSON, S. Biologia 2 - Seres vivos: estrutura e função. 8ª Ed. São Paulo: Saraiva, 2005.

TAKAHAGI, T.; *et al.* Inhibition of PS II in atrazine-tolerant tobacco cells by barbatic acid, a lichen-derived depside. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, p. 266-268, 2006.

TICE, R. R.; *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TORRES, A.; *et al.* A new UVB absorbing mycosporine with photoprotective activity from the lichenized ascomycete *Collema cristatum*, **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 780-784, 2004.

TURKEZ, H.; *et al.* Antimutagenic effects of lichen *Pseudovernia furfuracea* (L.) Zoph. extracts against the mutagenicity of aflatoxin B1 *in vitro*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 26, p. 625-631, 2010.

TURKEZ, H.; AYDIN, E.; ASLAN, A. *Xanthoria elegans* (Link) (lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes. **Cytotechnology**, v. 64, p. 679-686, 2012.

TURKEZ, H.; AYDIN, E.; ASLAN, A. Role of aqueous *Bryoria capillaris* (Ach.) extract as a genoprotective agent on imazalil-induced genotoxicity *in vitro*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, p. 33-39, 2014.

TWEATS, D. J.; *et al.* Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory *in vivo* tests II. Identification of *in vivo*-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 627, p. 92-105, 2007.

WEINBERG, R. A. The biology of cancer. New York: Garland Science, 2007.

WHITE, P. A.; *et al.* Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: a systematic review. **Molecules**, v. 19, p. 1496-1527, 2014.

XAVIER- FILHO, L.; RIZZINI, C. T. **Manual de Liquenologia Brasileiro**. Recife: UFPE, 1976.

XAVIER- FILHO, L.; *et al.* **Biologia de Liquens**. 4^a Ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p. 581-619, 2006.

YAMAMOTO, Y.; *et al.* Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. **Chemistry Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, p. 1388-1390, 1995.

ZEYTINOGLU, H.; *et al.* Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract from lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 118-123, 2008.

ZUCCO, F.; *et al.* Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 153-163, 2004.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v. 33, p. 2278-2282, 1973.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Verificar as atividades citotóxica e genotóxica dos extratos orgânicos e do ácido barbático purificado obtido a partir do líquen *Cladonia salzmannii* Nyl. através de ensaios *in vitro* frente a células neoplásicas experimentais.

3.2 ESPECÍFICOS

- Obter os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico do talo *in natura* de *C. salzmannii*.
- Isolar, purificar e identificar o ácido barbático a partir do extrato etéreo de *C. salzmannii*.
- Analisar os extratos orgânicos e a substância purificada de *C. salzmannii* através das técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Determinar a atividade genotóxica *in vitro* de *C. salzmannii* frente à células neoplásicas experimentais através dos testes de micronúcleo e cometa.

4. ARTIGO

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE EXTRATOS ORGÂNICOS E ÁCIDO BARBÁTICO ISOLADO DO LÍQUEN *Cladonia salzmanni* Nyl.



Artigo a ser submetido ao periódico **Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**

(FI: 2.481; QUALIS CB II: B1)

Avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade de extratos orgânicos e ácido barbático isolado do líquen *cladonia salzmanni* Nyl.

Joelma, P. Gonçalves¹; Mônica, C. B. Martins⁵; Maria de L. L. Buril³; Teresinha, G. da Silva²; Noemia, P. da S. Santos³; Cristiano, A. Chagas³; Emerson, P. S. Falcão³; Nicácio, H. da Silva^{1,4}

¹Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, UFPE, Recife-PE, Brasil; ²Departamento de Antibióticos, UFPE, Recife-PE, Brasil; ³Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil; ⁴Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife-PE, Brasil; ⁵Departamento de Geografia, UFPE, Recife-PE, Brasil.

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi verificar as atividades citotóxica e genotóxica *in vitro* dos extratos orgânicos e do ácido barbático (BAR) purificado de *Cladonia salzmanni* Nyl. Os extratos orgânicos foram obtidos a partir do talo liquênico (22 g) previamente limpo e seco, com os solventes éter dietílico, clorofórmio e acetona, através do método de esgotamento a quente em aparelho de Soxhlet. O ácido barbático foi purificado a partir do extrato etéreo (1,3 g). A análise química dos extratos orgânicos e do BAR purificado foi realizada através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A pureza do BAR purificado foi observada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A atividade citotóxica dos extratos orgânicos e do BAR purificado foi determinada através do Método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] e do IPBC (Índice de Proliferação com Bloqueio da Citocinese). O potencial genotóxico dos extratos orgânicos e do BAR purificado foram determinados através do teste do micronúcleo e do ensaio cometa. O dimetilsulfoxido (DMSO) foi utilizado como solvente de diluição das amostras em todos os testes de atividade biológica. Os resultados referentes a CI₅₀ demonstraram relevante potencial citotóxico para o extrato etéreo (Ext E) (50 µg/mL) frente as linhagens celulares NCI-H292 (CI₅₀: 29,91 µg/mL), HEp-2 (CI₅₀: 26,75 µg/mL) e HL-60 (CI₅₀: 3,59 µg/mL), e para o BAR purificado (25 µg/mL) contra as linhagens HEp-2 (CI₅₀: 15,79 µg/mL) e MCF-7 (CI₅₀: 18,28 µg/mL). Porém, a avaliação da citotoxicidade considerando o Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) demonstrou atividade citotóxica para o BAR purificado em todas as concentrações testadas (5, 10, 20 e 40 µg/mL) e para todos os extratos orgânicos (50 µg/mL) frente as células do Carcinoma de Ehrlich. Entretanto, para o Sarcoma 180 apenas o BAR purificado na concentração de 40 µg/mL e os extratos etéreo e clorofórmico (50 µg/mL) foram considerados citotóxicos. O teste do micronúcleo (MN) demonstrou que o BAR purificado na concentração de 5 µg/mL não apresentou potencial genotóxico em ambas as linhagens celulares tumorais. Além disso, o extrato clorofórmico e BAR purificado na concentração de 10 µg/mL não foram considerados genotóxicos para o Sarcoma 180. No ensaio cometa, todos os compostos testados induziram danos ao DNA em ambas as linhagens tumorais. Com base nos resultados, considera-se que os extratos orgânicos e o BAR purificado de *C. salzmanni* (Nyl). apresentam atividade citotóxica e genotóxica frente as linhagens celulares tumorais testadas.

PALAVRAS – CHAVE: Depsídeos. Antitumoral. Micronúcleo. Cometa.

ABSTRACT – The secondary metabolites of lichens are responsible for most of their biological activities. Many of these compounds exhibit significant antineoplastic activity. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxic and genotoxic activities of organic extracts and purified barbatic acid from *Cladonia salzmannii* Nyl. The organic extracts were obtained from liquenic thallus (22 g) previously cleaned and dried with the solvents diethyl ether, chloroform and acetone, through hot exhausted method in a Soxhlet apparatus. The barbatic acid was purified from the ether extract (1.3 g). Chemical analysis of the organic extracts and purified BAR was performed by Thin Layer Chromatography (TLC). The purity of purified BAR was observed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The cytotoxic activity of the organic extracts and purified BAR was determined by the MTT method [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] and IPBC (Cytokinesis-Block Proliferation Index). The genotoxic potential of the organic extracts and purified BAR was determined by the micronucleus test and comet assay. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as diluting solvent of the samples in all biological tests. The results for IC₅₀ demonstrated significant cytotoxic potential to the ether extract (Ext E) (50 µg/mL) against the cell lines NCI-H292 (IC₅₀: 29,91 µg/mL), HEp-2 (IC₅₀: 26,75 µg/mL) and HL-60 (IC₅₀: 3,59 µg/mL) and to the purified BAR (25 µg/mL) against the cell lines HEp-2 (IC₅₀: 15,79 µg/mL) and MCF-7 (IC₅₀: 18,28 µg/mL). However, the assessment of cytotoxicity considering the Cytokinesis-Block Proliferation Index (IPBC) showed cytotoxic activity for purified BAR at all concentrations tested (5, 10, 20 and 40 µg/mL) and for all organic extracts (50 µg/mL) against Ehrlich carcinoma cells. However, for Sarcoma 180 only BAR purified at a concentration of 40 µg/mL and ether and chloroform extracts (50 µg/mL) were considered cytotoxic. The micronucleus test (MN) showed that the purified BAR at a concentration of 5 µg/mL showed no genotoxic potential in both tumor cell lines. Furthermore, the chloroform extract and purified BAR at a concentration of 10 µg/mL were not considered genotoxic for Sarcoma 180. In the comet assay, all compounds tested induced DNA damage in both tumor lines. Based on the results, it is considered that the organic extracts and the BAR purified from *C. salzmannii* (Nyl). exhibit cytotoxic and genotoxic activity front of the tested tumor cell lines.

KEY – WORDS: Depsides. Antitumor. Micronuclei. Comet.

INTRODUÇÃO

A crescente relevância do perfil epidemiológico apresentado pelo câncer nas últimas décadas, torna necessário o desenvolvimento de pesquisas que investiguem fontes de novos compostos com atividade antineoplásica. A descoberta de medicamentos para tratamento do câncer está relacionada a pesquisas de produtos naturais, pois cerca de 60% dos medicamentos utilizados apresentam, em alguma instância, sua origem relacionada à uma fonte natural (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

Os líquens são utilizados na medicina tradicional desde a antiguidade. As substâncias liquênicas, denominadas antigamente como “ácidos liquênicos”, são quase em sua totalidade de natureza fenólica, e responsáveis pela maioria das ações benéficas dos líquens. Seus metabólitos secundários apresentam importantes atividades biológicas, como antimicrobiana, cicatrizante, antiinflamatória, antiséptica, antitumoral e citotóxica, sendo fontes potenciais de novos fármacos (BOUSTIE; TOMASI; GRUBE, 2011). As substâncias liquênicas estão descritas na literatura como detentoras de relevante atividade antitumoral (BOGO *et al.*, 2010; KOPARAL; TÜYLÜ; TÜRK, 2006; MICHELETTI *et al.*, 2009). Atualmente, a atividade genotóxica destas substâncias vêm sendo reportadas (GRUJIČIĆ *et al.*, 2014; LEANDRO *et al.*, 2013).

Considerando os dados mencionados, este trabalho teve por objetivo avaliar as atividades citotóxica e genotóxica dos extratos orgânicos e do ácido barbático purificado obtidos a partir do líquen *Cladonia salzmannii* Nyl. contra linhagens celulares tumorais humanas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e Identificação do Material Liquênico: O líquen *Cladonia salzmannii* Nyl. foi coletado em área de tabuleiro arenoso no município de Alhandra- PB, coordenadas geográficas: Latitude- 7° 24' 993" S; Longitude- 34° 57' 734" W, e armazenado em caixas de papelão à temperatura ambiente (28°C±3°C) no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco. O material liquênico foi identificado pela Dr^a. Maria de Lourdes Lacerda Buril, através das características morfológicas e químicas do talo, utilizando os testes de coloração de córtex e medula: Teste K (Hidróxido de Potássio a 10%) e Teste C (Hipoclorito de Sódio a 40%). Uma exsicata encontra-se depositada no herbário UFP- Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, sob o registro nº 47.998.

Obtenção dos Extratos Orgânicos: A partir de 22 g do material liquênico limpo e seco, foram obtidos os extratos orgânicos com os solventes éter dietílico, clorofórmio e acetona, por sistema

de esgotamento a quente em aparelho de Soxhlet em banho maria a temperatura de ebulição de cada solvente durante 12 h, com 150 mL de cada solvente obedecendo à série eluotrópica. Os extratos orgânicos foram evaporados em rotaevaporador acoplado em banho maria a temperatura de 40 °C e mantidos em dessecador, para posterior cálculo de seus rendimentos.

Isolamento e Purificação do Ácido Barbático (BAR): O extrato etéreo previamente seco 1,3 g, foi submetido a sucessivas lavagens em funil de fundo poroso G4, com 1 mL de clorofórmio (4x), conforme Asahina; Shibata (1954), para obter o BAR purificado.

Análise Química dos Extratos Orgânicos e do BAR Purificado:

Cromatografia em Camada Delgada (CCD): Os extratos orgânicos e a pureza do BAR purificado foi avaliada, qualitativamente, através de CCD ascendente e unidimensional. Os extratos orgânicos, o BAR purificado de *C. salzmännii* e o BAR padrão obtido no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco foram dissolvidos em éter dietílico 50 µL e aplicados 1 µL em placas de sílica gel 60 Merck® F₂₅₄₊₃₆₆ e desenvolvidas no sistema A de solventes (tolueno/ dioxano/ ácido acético 45: 12,5: 2 v/v/v). As bandas do cromatograma foram visualizadas sob luz UV de comprimento de onda curto e longo (254 nm e 366 nm), e posteriormente reveladas através da vaporização com ácido sulfúrico a 10% e aquecimento a 50 °C por 10 minutos em chapa aquecedora. Os resultados foram avaliados mediante observação da coloração das bandas e cálculo de seus valores de R_f, em comparação com o padrão (CULBERSON, 1972).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): A análise em CLAE do BAR purificado foi realizada em cromatógrafo HITACHI modelo 655A-11, acoplado a um detector de UV da marca CG, modelo CG437-B. As condições de cromatografia obedeceram a metodologia de Legaz; Vicente (1983), a citar: coluna de fase reversa MicroPack MCH-18 de 250×4,6 mm com volume de injeção 20 µL; fase móvel isocrática constituída por metanol: água: ácido acético (80: 19,5: 0,5 v/v/v); pressão de 88 atm e temperatura ambiente (28°C±3°C); detector de UV regulado a 254 nm; padrões internos de 0,1 mg.mL⁻¹. O BAR purificado foi diluído em éter dietílico até a concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ e injetado no aparelho. Os resultados foram analisados através da comparação entre os Tempos de Retenção (TR) do BAR purificado e do BAR padrão.

Ensaio para Avaliação da Citotoxicidade e da Genotoxicidade *in vitro*:

Linhagens e Cultura de Células Tumorais: Para a avaliação da atividade citotóxica foram utilizadas as seguintes linhagens de células tumorais humanas: NCI-H292 (carcinoma

mucoepidermoide de pulmão humano), HEp-2 (carcinoma de laringe humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda), fornecidas pelo Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. As células tumorais NCI-H292 e HEp-2 foram mantidas em meio de cultura DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (SIGMA); e as células tumorais MCF-7 e HL-60 foram mantidas em meio de cultura RPMI (criado pelo Roswell Park Memorial Institute). Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

Para os testes de genotoxicidade foram utilizadas células dos tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich em suas formas ascíticas, mantidos em camundongos no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, cedidas pela Prof^a. Dr^a. Noemia Pereira da Silva Santos. As células foram obtidas durante a manutenção semanal dos tumores. As linhagens tumorais foram mantidas através da transferência intraperitoneal do líquido ascítico do animal doador para o receptor. Visto que apenas uma suspensão constituída de 0,6 mL do líquido ascítico aspirado e 0,4 de solução salina 0,9% era inoculada no camundongo receptor, o restante do líquido ascítico aspirado foi utilizado para a realização dos testes *in vitro*. No Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células do Centro Acadêmico de Vitória da UFPE, os tumores ascíticos Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich foram transferidos para tubos falcon e centrifugados por 5 min. a 2.500 rpm. Após o descarte do sobrenadante, uma amostra do precipitado de células 100 µL foi ressuspenso em meio de cultura DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (SIGMA) 900 µL, para contagem das células em câmara de Neubauer. De acordo com a contagem, a concentração de células foi ajustada com o meio de cultura para 10⁶ células/mL.

Teste do MTT: Os extratos orgânicos e o BAR purificado foram submetidos aos ensaios de atividade citotóxica pelo método colorimétrico do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MOSMANN, 1983; ALLEY *et al.*, 1988). As células NCI-H292, MCF-7, HEp-2 (10⁵ células/mL), e HL-60 (0,3x10⁶ células/mL) foram plaqueadas 190 µL em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida, 10 µL das amostras dissolvidas em DMSO (0,5%) (extratos orgânicos: 10 mg/mL e BAR purificado: 5 mg/mL) foram adicionadas aos poços nas concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 µg/mL para o BAR purificado e 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL para os extratos orgânicos. O fármaco doxorrubicina na concentração de 1,25 µg/mL foi utilizado como controle positivo. O DMSO (0,5%) foi utilizado como controle negativo.

Após 72 h de reincubação, foram adicionados 25 µL de MTT (5 mg/mL) e as placas foram novamente incubadas por 3 h. Após este período, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço, a fim de solubilizar os cristais formados.

A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em quintuplicatas. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas de acordo com a percentagem de inibição; 95-100% alto potencial, 70-90% potencial moderado, < 50% sem potencial (RODRIGUES *et al.*, 2014). A concentração que inibe 50% do crescimento em relação ao controle negativo (CI₅₀) foi determinada de acordo com os resultados da percentagem de inibição.

Teste do Micronúcleo: As células tumorais (10⁶ células/mL) foram plaqueadas (900 µL) em placas de 24 poços. Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (0,5%) foram adicionadas aos poços (100 µL) em concentração final de 50 µg/mL para os extratos orgânicos, e de 20 e 40 µg/mL para o BAR purificado. Os fármacos ciclofosfamida e colchicina (50 µg/mL) foram utilizados como controles positivos. O DMSO (0,5%) foi utilizado como controle negativo. As células foram espalhadas em lâmina histológica previamente codificada e coradas com laranja de acridina 0,04M.

As lâminas foram analisadas em teste cego, em microscópio de fluorescência Axio Imager.M2 (Zeiss), com aumento de 1000 vezes e filtro Alexa Fluor 488 (AF488). O critério para a análise dos micronúcleos e das células binucleadas foi realizado de acordo com Fenech (2000). O experimento foi realizado em triplicata, portanto para cada tratamento foram avaliadas 3000 células (1000 células/lâmina). O Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) foi determinado através da avaliação do número de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas encontradas em 1500 células analisadas por tratamento (500 células/lâmina). O IPBC foi calculado de acordo com a OECD (2014) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{IPBC} = \frac{[(\text{N}^\circ \text{ de células mononucleadas}) + (2 \times \text{N}^\circ \text{ de células binucleadas}) + 3 \times \text{N}^\circ \text{ de células multinucleadas})]}{(\text{Total de células})}$$

Ensaio Cometa: As células tumorais (10⁶ células/mL) foram plaqueadas e tratadas nas mesmas condições descritas para o teste do micronúcleo. As células em cultura tratadas por 6 h com as amostras foram retiradas da placa, centrifugadas e ressuspendidas em novo meio (DMEM). O ensaio cometa foi realizado de acordo com Speit; Hartmann (2006). O corante utilizado foi o

brometo de etídeo e a análise realizada em microscópio de fluorescência Axio Imager.M2 (Zeiss), com aumento de 40 vezes e filtro Alexa Fluor 546 (AF546). Um total de 300 células foram analisadas por tratamento (100 células/lâmina).

A extensão do DNA que migrou do núcleo foi analisada de acordo com uma classificação visual descrita por Collins *et al.* (2008). A partir da classificação das células analisadas, os resultados foram avaliados de acordo com dois parâmetros: Índice de Dano – ID (0-400) e Frequência de Dano – FD (0-100%). O ID resulta da somatória do número de células encontradas em cada classe multiplicado pelo valor da sua respectiva classe. A FD é obtida através do número total de células analisadas subtraído do número de células classificadas com grau 0, resultando no valor percentual de células que apresentam qualquer grau de dano detectável (1-4).

Análise Estatística: A percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0. A CI_{50} e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism* 5.0.

A frequência de micronúcleos, o IPBC e os parâmetros determinados no ensaio cometa (ID e FD) foram analisados estatisticamente utilizando o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010) e admitindo-se nível de significância de 5%. O IPBC foi analisado através do teste de Fischer. Os ID e FD foram analisados utilizando o teste ANOVA e o pós-teste de Tukey.

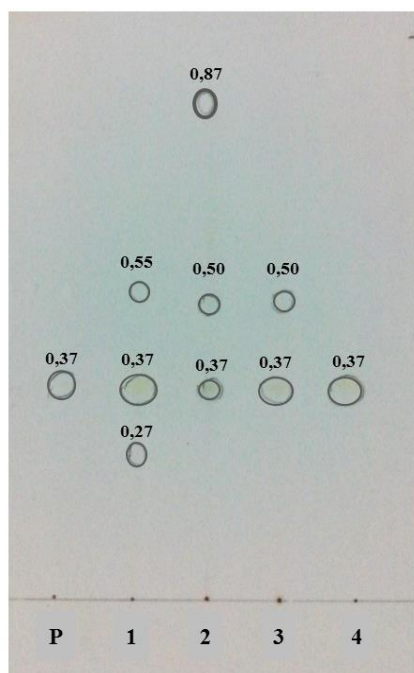
RESULTADOS:

Obtenção dos Extratos Orgânicos e Análise Química das Amostras

O rendimento em percentual dos extratos orgânicos obtidos através da extração por esgotamento a quente demonstrou a eficiência do éter dietílico (7,65%) no processo de extração utilizado, uma vez que o seu rendimento foi maior do que as extrações com clorofórmio (0,04%) e acetona (0,03%).

A análise em CCD revelou a presença do BAR em todos os extratos orgânicos (R_f : 0,37) (Figura 1). Outras bandas não identificadas também foram evidenciadas nos extratos. O ponto 4, que corresponde ao BAR purificado, apresentou apenas uma banda, compatível com o R_f do BAR padrão (0,37).

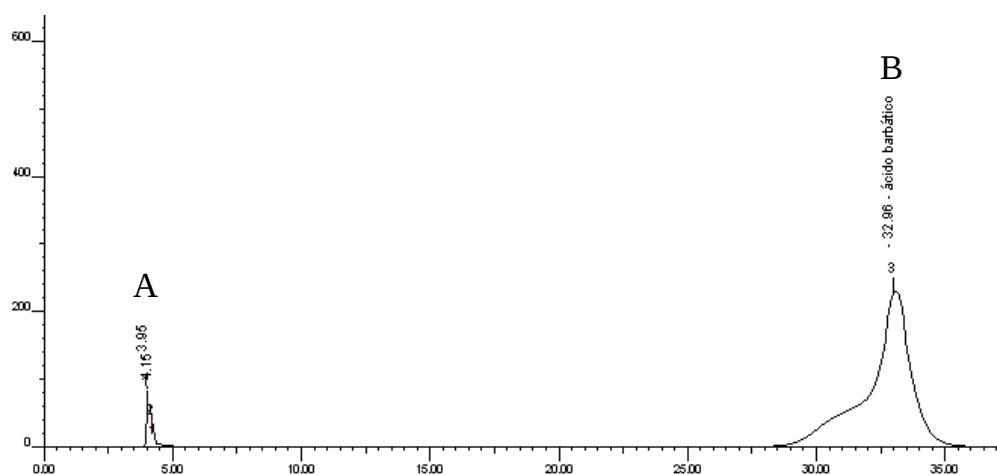
Figura 1. Cromatografia em Camada Delgada dos extratos orgânicos de *C. salzmännii* Nyl. e do BAR purificado a partir do extrato etéreo.



P- BAR padrão; 1- Extrato etéreo (Ext. E); 2- Extrato clorofórmico (Ext. C); 3- Extrato acetônico (Ext. A); 4- BAR purificado.

As amostras do BAR purificado e do padrão foram submetidas a CLAE, e os dados da CCD foram confirmados. Observou-se o pico correspondente ao BAR purificado (Tr: 32,96 min.), apresentando um percentual de pureza de 96,3% (Figura 2).

Figura 2. Cromatograma (CLAE): A- Éter dietílico (Tr: 4,15 min.); B- BAR purificado (Tr: 32,96 min.).



Atividade Citotóxica dos Extratos Orgânicos e do BAR purificado

A porcentagem de inibição dos extratos orgânicos, do BAR purificado e da doxorrubicina (controle positivo) sobre o crescimento das células tumorais encontra-se descrita na Tabela 1. O

extrato etéreo apresentou porcentagem de inibição moderada (inibição de crescimento celular variando entre 70-90%) frente as linhagens celulares testadas NCI-H292, HEP-2 e HL-60, entretanto, para a linhagem MCF-7 o extrato etéreo não apresentou potencial citotóxico. O extrato clorofórmico demonstrou inibição moderada frente as linhagens celulares HEP-2 e MCF-7, e não apresentou porcentagem de inibição significativa frente as linhagens celulares NCI-H292 e HL-60. O extrato acetônico demonstrou alta atividade inibitória (95-100% de inibição) frente a linhagem celular NCI-H292, inibição moderada frente a linhagem celular MCF-7, e não inibiu significativamente o crescimento das linhagens celulares HEP-2 e HL-60. O BAR purificado apresentou porcentagem de inibição moderada frente as linhagens celulares HEP-2 e MCF-7, e a porcentagem de inibição sobre as linhagens celulares NCI-H292 e HL-60 não foi significativa.

O BAR purificado e os extratos orgânicos que apresentaram atividade inibitória a partir de moderada (> 70% de inibição) em duas linhagens celulares, foram submetidos a determinação da CI_{50} . A doxorrubicina na concentração de 1.25 $\mu\text{g/mL}$ foi utilizada como controle positivo.

Tabela 1. Porcentagem de inibição sobre o crescimento celular de linhagens celulares tumorais humanas.

Amostras	% de inibição				Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
	NCI-H292	HEP-2	HL-60	MCF-7	
Ext. E	80,12 $\pm$ 4,97	89,55 $\pm$ 4,25	83,92 $\pm$ 4,48	50,87 $\pm$ 2,28	50
Ext. C	58,66 $\pm$ 2,13	73,40 $\pm$ 3,61	58,00 $\pm$ 3,09	71,98 $\pm$ 1,28	50
Ext. A	98,42 $\pm$ 0,92	62,57 $\pm$ 1,32	37,96 $\pm$ 1,63	71,26 $\pm$ 0,98	50
BAR Purificado	8,73 $\pm$ 0,45	86,53 $\pm$ 3,91	41,45 $\pm$ 3,15	71,14 $\pm$ 4,40	25
Doxorrubicina	94,15 $\pm$ 1,99	79,39 $\pm$ 2,65	92,91 $\pm$ 0,63	74,77 $\pm$ 2,09	1,25

BAR purificado; Ext. E; Ext. C; Ext. A.

Os valores da CI_{50} do extrato etéreo e do BAR purificado encontram-se demonstrados na Tabela 2. Considerando os valores de CI_{50} obtidos, os compostos apresentaram potencial citotóxico relevante contra todas as linhagens testadas, com destaque para a atividade apresentada pelo extrato etéreo contra a linhagem celular neoplásica HL-60 (CI_{50} = 3,59 $\mu\text{g/mL}$). Nos outros extratos e em algumas linhagens não foi possível determinar a CI_{50} pois os valores de inibição não atingiram acima de 70% de inibição em duas linhagens celulares nas concentrações testadas.

Tabela 2. CI_{50} do extrato etéreo e do BAR purificado.

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
	NCI-H292	HEp-2	HL-60	MCF-7	
Ext. E	29,91 26,20 - 34,14	26,75 22,13 - 32,35	3,59 2,38 - 5,41	Nd	50
BAR purificado	nd	15,79 13,59 - 18,34	nd	18,28 13,05 - 25,62	25
Doxorrubicina	0,08 0,06 - 0,12	0,31 0,26 - 0,36	0,06 0,05 - 0,07	0,12 0,08 - 0,15	1,25

Ext. E; BAR purificado; nd = não determinado.

O IPBC médio das linhagens celulares tumorais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich encontram-se descritos na Tabela 3. O BAR purificado na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, e os extratos etéreo e clorofórmico na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram valores de IPBC estatisticamente diferentes do controle negativo para ambas as linhagens tumorais, sendo portanto considerados citotóxicos. Além disso, o BAR purificado nas concentrações de 20, 10 e 5 $\mu\text{g/mL}$ e o extrato acetônico na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram valores de IPBC estatisticamente diferentes do controle negativo para o Carcinoma de Ehrlich. Portanto, todas as amostras testadas demonstraram atividade citotóxica frente a linhagem tumoral do Carcinoma de Ehrlich.

Tabela 3. Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) médio das linhagens celulares tratadas com os extratos orgânicos e BAR purificado ($\mu\text{g/mL}$) obtidos a partir de *C. salzmännii* Nyl.

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	IPBC médio	
		Sarcoma 180	Carcinoma de Ehrlich
BAR purificado	40	1,17 $\pm$ 0,04*	1,21 $\pm$ 0,01*
BAR purificado	20	1,38 $\pm$ 0,01	1,39 $\pm$ 0,01*
BAR purificado	10	1,39 $\pm$ 0,01	1,42 $\pm$ 0,01*
BAR purificado	5	1,39 $\pm$ 0,01	1,44 $\pm$ 0,01*
Ext. E	50	1,09 $\pm$ 0,01*	1,12 $\pm$ 0,01*
Ext. C	50	1,23 $\pm$ 0,01*	1,19 $\pm$ 0,02*
Ext. A	50	1,36 $\pm$ 0,02	1,31 $\pm$ 0,03*
DMSO (C.N.)	0,5%	1,41 $\pm$ 0,01	1,53 $\pm$ 0,03

BAR purificado; Ext. E; Ext. C; Ext. A; DMSO = Dimetilsulfóxido; C.N. = Controle Negativo.

* Valor estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,005$ -Sarcoma 180 / $p < 0,002$ -Carcinoma de Ehrlich)

Atividade Genotóxica dos Extratos Orgânicos e do BAR purificado

A Tabela 4 demonstra a frequência do número médio de micronúcleos (MNs) encontrados por tratamento frente as linhagens celulares tumorais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. Os resultados para o Sarcoma 180 demonstram que houve diferença estatística significativa para todos os tratamentos em relação ao controle negativo (DMSO), com exceção dos tratamentos com o extrato clorofórmico na concentração de 50 µg/mL e com o BAR purificado nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Entretanto, para o Carcinoma de Ehrlich todos os tratamentos foram estatisticamente diferentes do controle negativo (DMSO), com exceção do BAR purificado na concentração de 5 µg/mL.

Tabela 4. Frequência média de micronúcleos (MNs) em células binucleadas tratadas com os extratos orgânicos e BAR purificado (µg/mL) obtidos a partir de *C. salzmännii* Nyl.

Amostras	Concentração (µg/mL)	Frequência Média de MNs	
		Sarcoma 180	Carcinoma de Ehrlich
BAR purificado	40	35 ± 6,37*	21,3 ± 3,23*
BAR purificado	20	32 ± 5,09*	19,7 ± 2,64*
BAR purificado	10	18 ± 3,00	15,3 ± 3,51*
BAR purificado	5	16,3 ± 4,04	9,7 ± 1,53
Ext. E	50	39,3 ± 6,21*	30,7 ± 3,42*
Ext. C	50	18,3 ± 4,46	14,3 ± 4,41*
Ext. A	50	24,7 ± 6,18*	20,3 ± 4,59*
Ciclofosfamida (C.P.)	50	54,7 ± 2,84*	35 ± 4,24*
Colchicina (C.P.)	50	69 ± 2,93*	45,7 ± 3,38*
DMSO (C.N.)	0,5%	9,3 ± 3,39	3,0 ± 1,61

MNs= Micronúcleos; BAR purificado; Ext. E; Ext. C; Ext. A; DMSO; C.P. = Controle positivo; C.N. = Controle negativo.

* Valor estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05)

De acordo com o ensaio cometa, todas as amostras testadas induziram danos ao DNA, tanto para o Sarcoma 180 como para o Carcinoma de Ehrlich (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Frequência de Dano (FD) média para as linhagens celulares tratadas com os extratos orgânicos e BAR purificado (µg/mL) obtidos a partir de *C. salzmännii* Nyl.

Tratamentos	Concentração (µg/mL)	Frequência de Dano (FD) média	
		Sarcoma 180	Carcinoma de Ehrlich
BAR purificado	40	92,3 ± 1,26*	91 ± 2,00*
BAR purificado	20	86,7 ± 1,41*	78,6 ± 2,51*
BAR purificado	10	71,7 ± 2,31*	68,6 ± 3,21*
BAR purificado	5	41,3 ± 2,51*	67,6 ± 4,51*
Ext. E	50	93,3 ± 0,54*	87,3 ± 1,52*
Ext. C	50	79,3 ± 1,73*	80,6 ± 2,51*
Ext. A	50	45,7 ± 1,41*	38,6 ± 2,51*
Ciclofosfamida (C.P.)	50	100 ± 0,00*	98,6 ± 1,15*
Colchicina (C.P.)	50	99,7 ± 0,54*	99,6 ± 0,57*
DMSO (C.N.)	0,5%	17,0 ± 1,63	11,3 ± 2,08

BAR purificado; Ext. E; Ext. C; Ext. A; DMSO; C.P.; C.N.

* Valor estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,002)

Tabela 6. Índice de Dano (ID) médio para as linhagens celulares tratadas com os extratos orgânicos e BAR purificado ($\mu\text{g/mL}$) obtidos a partir de *C. salzmännii* Nyl.

Tratamentos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de Dano (ID) médio	
		Sarcoma 180	Carcinoma de Ehrlich
BAR purificado	40	$255 \pm 7,81^*$	$254,6 \pm 12,50^*$
BAR purificado	20	$237,7 \pm 6,50^*$	$172,3 \pm 3,78^*$
BAR purificado	10	$165,7 \pm 5,50^*$	$150,6 \pm 11,92^*$
BAR purificado	5	$82,7 \pm 8,14^*$	$149,3 \pm 5,77^*$
Ext. E	50	$244,7 \pm 8,38^*$	$233,6 \pm 3,51^*$
Ext. C	50	$169,7 \pm 11,80^*$	$181,3 \pm 5,85^*$
Ext. A	50	$71,7 \pm 4,50^*$	$63,6 \pm 5,50^*$
Ciclofosfamida (C.P.)	50	$308,7 \pm 6,65^*$	$278 \pm 2,00^*$
Colchicina (C.P.)	50	$329,3 \pm 7,57^*$	$314 \pm 4,00^*$
DMSO (C.N.)	0,5%	$19 \pm 2,64$	$12 \pm 2,64$

BAR purificado; Ext. E; Ext. C; Ext. A; DMSO; C.P.; C.N.

* Valor estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,002$)

DISCUSSÃO

A análise química através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) revelou a presença do BAR em todos os extratos orgânicos obtidos de *C. salzmännii*, sendo este o principal composto da espécie de estudo, como descrito por AHTI; STENROOS; XAVIER-FILHO (1993).

A atividade citotóxica das amostras avaliadas através do teste do MTT, considerando-se os valores de CI_{50} obtidos, demonstrou considerável potencial citotóxico para o extrato etéreo e para o BAR purificado frente as linhagens celulares tumorais testadas. O extrato etéreo apresentou alto potencial citotóxico contra a linhagem celular HL-60 ($\text{CI}_{50} = 3,59 \mu\text{g/mL}$). Porém, a avaliação da citotoxicidade considerando o Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC), demonstrou atividade citotóxica relevante para o BAR purificado nas concentrações de 5, 10, 20 e $40 \mu\text{g/mL}$ e para todos os extratos orgânicos na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ frente as células do Carcinoma de Ehrlich. Contudo, para o Sarcoma 180 apenas o BAR purificado na concentração de $40 \mu\text{g/mL}$ e os extratos etéreo e clorofórmico na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ foram considerados citotóxicos. Portanto, as células do Carcinoma de Ehrlich demonstraram elevada sensibilidade para as amostras testadas.

Em estudo anterior, o extrato etéreo nas concentrações de 6.5, 12, 25 e $50 \mu\text{g/mL}$ e o BAR purificado nas concentrações de 2.5, 5.0, 10 e $20 \mu\text{g/mL}$ obtidos do líquen *C. aggregata* foram avaliados em relação ao potencial citotóxico contra as linhagens celulares tumorais HEP-2 (Carcinoma Epidermóide de Laringe), NCI-H292 (Carcinoma Mucoepidermóide de Pulmão) e KB (carcinoma epidermóide nasofaríngeo) (MARTINS *et al.* 2013 – Dados ainda não

publicados). Os resultados demonstraram maior potencial citotóxico para o extrato etéreo, sugerido pelos autores como resultado da atividade sinérgica dos componentes presentes no extrato. Além disso também observou-se atividade citotóxica dose-dependente para ambas as amostras em todas as linhagens celulares tumorais testadas.

Um estudo mais recente, avaliou a citotoxicidade do BAR purificado obtido de *C. salzmannii* frente as linhagens celulares J774 (Macrófagos), Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich nas concentrações de 40; 20; 10; 5 e 2,5 µg/mL (TAVARES, 2014 – Dados ainda não publicados). O 5-fluorouracil foi utilizado como controle positivo. Foram utilizadas as formas livre e encapsulada do BAR purificado. Os resultados também demonstraram que o potencial citotóxico do BAR purificado é dose-dependente. Sendo relatada alta citotoxicidade frente as linhagens celulares tumorais na concentração de 40 µg/mL em todas as formas do BAR purificado testadas. Entretanto, o BAR purificado não demonstrou citotoxicidade significativa contra a linhagem celular J774 em nenhuma das concentrações.

A avaliação da genotoxicidade demonstrou o efeito genotóxico de todas as amostras testadas no ensaio cometa para o Sarcoma 180 e para o Carcinoma de Ehrlich, porém de acordo com o teste do micronúcleo o BAR purificado na concentração de 5 µg/mL não mostrou-se genotóxico em ambas as linhagens celulares tumorais. Por outro lado, o extrato clorofórmico e o BAR purificado na concentração de 10 µg/mL não foram considerados genotóxicos para o Sarcoma 180. Na literatura encontram-se reportados outros estudos que avaliaram a genotoxicidade de substâncias provenientes do metabolismo secundário dos líquens. A genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* do ácido úsnico obtido a partir de *Usnea steineri* foi avaliada através dos ensaios do micronúcleo e cometa (LEANDRO *et al.*, 2013). Células V79 (Fibroblastos de Pulmão de Hamster Chinês) foram tratadas com o ácido úsnico nas concentrações de 15, 30, 60 e 120 µg/mL e camundongos Swiss foram tratados nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg/kg. Os resultados *in vitro* demonstraram danos ao DNA nas concentrações de 60 e 120 µg/mL no ensaio cometa, porém nenhuma das concentrações apresentou potencial genotóxico contra as células V79 no teste do micronúcleo. Na análise *in vivo* não foram observados efeitos genotóxicos em nenhuma das concentrações testadas.

Recentemente, a genotoxicidade do extrato metanólico obtido a partir de *Cetraria islandica* foi avaliada (GRUJIČIĆ *et al.*, 2014). Os resultados demonstraram que o mencionado extrato aumentou a frequência de micronúcleos (MNs) de maneira dose-dependente em linfócitos de sangue periférico, porém o aumento mostrou-se significativo apenas nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, sendo estas as maiores concentrações testadas.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho demonstram relevante potencial citotóxico e genotóxico *in vitro* dos extratos orgânicos e do BAR purificado obtidos a partir do líquen *C. salzmannii*. Os dados referentes ao potencial citotóxico *in vitro* das amostras testadas, corroboram com os dados descritos na literatura, que demonstram o perfil antineoplásico promissor das substâncias líquênicas frente a diversas linhagens celulares tumorais, podendo tornar-se futuros fármacos utilizados para o tratamento do câncer. A avaliação da genotoxicidade das amostras testadas revelou que elas induziram alterações no material genético das células tumorais testadas.

REFERÊNCIAS

- AHTI, T., STENROOS, S., XAVIER-FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Biology**, v. 7, p. 55-70, 1993.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS-HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589-601, 1988.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. Chemistry of Lichen Substances. Tokyo: Japan Society for the Promotion of Science, p. 1-240, 1954.
- BOGO, D.; MATOS, M. F.; HONDA, N. K.; PONTES, E. C.; OGUMA, P. M.; SANTOS, E. C.; CARVALHO, J. E.; NOMIZO, A. *In vitro* antitumour activity of orsellinates. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 65, p. 43-48, 2010.
- BOUSTIE, J.; TOMASI, S.; GRUBE, M. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 287-307, 2011.
- COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143-151, 2008.
- COSTA- LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the indication of lichen products by standardized thin layer-chromatographic method. **Journal of Chromatography**, v. 72, p. 1113-1125, 1972.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- GRUJIČIĆ, D.; STOŠIĆ, I.; KOSANIĆ, M.; STANOJKOVIĆ, T.; RANKOVIĆ, B.; MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ, O. Evaluation of *in vitro* antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica*. **Cytotechnology**, v. 66, p. 803-813, 2014.

KOPARAL, A. T.; TÜYLÜ, B. A.; TÜRK, H. *In vitro* cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. **Natural Product Research**, v. 20, p. 1300-1307, 2006.

LEANDRO, L. F.; MUNARI, C. C.; SATO, V. L. F. L.; ALVES, J. M.; OLIVEIRA, P. F.; MASTROCOLA, D. F. P.; MARTINS, S. P. L.; MORAES, T. S.; OLIVEIRA, A. I.; TOZATTI, M. G.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)- usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays. **Mutation Research**, v. 753, p. 101-106, 2013.

LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant Physiology**, n.71, p.300-302, 1983.

MARTINS, M. C. B. Aplicações biotecnológicas de compostos obtidos dos líquens. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A.; LIMA, D. P.; HONDA, N. K.; PESSOA, C. O.; MORAES M. O.; LOTUFO, F. V.; MAGALHÃES, H. I. F.; CARVALHO, N. C. P. Chemical constituents of *Parmotrema ichexanthonicum* Eliasaro & Adler - isolation, structure modification and evaluation of antibiotic and cytotoxic activities. **Química Nova**, v. 32, p. 12-20, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

OECD. Guideline for the Testing of Chemicals. No. 487. *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development - OECD, 2014.

R. DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing, 2010. Disponível em: <http://www.R-project.org> [Acesso em: 25 de novembro de 2014].

RODRIGUES, F. A.; BOMFIM, I. S.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; GONÇALVES, R. S.; WARDELL, J. L.; WARDELL, S. M.; SOUZA, M. V. Mefloquine–oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 83, p. 126–131, 2014.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v. 314, p. 275-286, 2006.

TAVARES, C. A. Lipossomas furtivos contendo ácido barbático de *Cladonia sallzmanii*: desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral. Dissertação apresentada

ao Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco. Vitória de Santo Antão, 2014.

5. CONCLUSÃO

Os metabólitos secundários liquênicos são amplamente descritos na literatura por seu potencial biológico, destacando-se a atividade antitumoral relatada para muitos destes compostos. Os dados obtidos neste trabalho demonstram relevante potencial citotóxico e genotóxico *in vitro* dos extratos orgânicos e do BAR purificado obtidos a partir do líquen *C. salzmannii* em linhagens de células tumorais. As substâncias liquênicas apresentam um perfil antineoplásico promissor, podendo tornar-se futuros fármacos utilizados para o tratamento do câncer. A avaliação da genotoxicidade das amostras testadas revelou que elas induziram alterações no material genético das células tumorais testadas.

ANEXO A - GUIDE FOR AUTHORS

(MUTATION RESEARCH – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis)



MUTATION RESEARCH - GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS

A section of Mutation Research

AUTHOR INFORMATION PACK

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes papers advancing knowledge in the field of genetic toxicology. Papers are welcomed in the following areas:

New developments in genotoxicity testing of chemical agents (e.g. improvements in methodology of assay systems and interpretation of results). Alternatives to and refinement of the use of animals in genotoxicity testing. Nano-genotoxicology, the study of genotoxicity hazards and risks related to novel man-made nanomaterials. Studies of epigenetic changes in relation to genotoxic effects. The use of structure-activity relationships in predicting genotoxic effects. The isolation and chemical characterization of novel environmental mutagens. The measurement of genotoxic effects in human populations, when accompanied by quantitative measurements of environmental or occupational exposures. The application of novel technologies for assessing the hazard and risks associated with genotoxic substances (e.g. OMICS or other high-throughput approaches to genotoxicity testing).

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

Types of Paper

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes the following types of article: (I) Research papers- papers reporting results of original, fundamental research. (II) Short communications of up to 5 printed pages. (III) Rapids - are accelerated publications - research papers identified by the Editor as being of significant quality and thereby qualifying for rapid reviewing, and publication within 8-10 weeks of acceptance. (IV) Current issues are generally short,

1-2 page comments on a topical theme, and are published within 10 weeks of acceptance. (V) Volunteered and invited Mini-reviews of less than 10 printed pages, using references generally no later than 2 years old. The journal accepts Letters to the Editor.

Please note that Full-length reviews comprehensively covering and critically analysing a topic are published in *Mutation Research Reviews*. Also published in the Reviews section are invited papers in the series *Reflections in Mutation Research*, in which research and techniques that have played an important part in the development of the field of mutation research are revisited and their significance discussed. Special issues, comprising multiple original and/or review articles written from a particular viewpoint, on a central theme, are published on a regular basis in the appropriate section of *Mutation Research* by topic or article type.

Any submissions that report the results of studies on extracts or complex mixtures (e.g., solvent extracts of herbal preparations; soil, air, or water samples) will receive preliminary review by an Editor. Unless such manuscripts offer significant new insight, such as the chemical identification of previously unknown mutagens or anti-mutagens, they will be returned to the authors without being sent for further review. For further clarification of this journal policy please refer to the [Editorial](#) published in *Mutation Research* 391 (1997) 1.

It is the policy of the Editors to conduct a preliminary review of each submitted manuscript that reports the results of molecular epidemiology studies.

- (i) As with any studies involving human subjects, approval by an appropriately constituted ethicsreview board and informed consent by participants are required.
- (ii) Authors are advised to collaborate with qualified epidemiologists with respect to study design andinterpretation.
- (iii) In studies of the potential genotoxic effects of exposure to environmental agents, it is stronglyrecommended that quantitative evidence of exposure (such as analysis of personal monitoring devices or measurement of urinary biomarkers, for example) be obtained.

Manuscripts which do not conform to these requirements will be returned to the authors without being sent for further review.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

The Journal requires full disclosure of all potential conflicts of interest. Please declare any financial or personal interests that might be viewed to inappropriately influence the work presented. Interests could include employment, consultancies, stock ownership and honoraria. If there are no conflicts of interest, the authors should state, "The authors declare that there are no conflicts of interest". If there are any financial or personal interests please state so here and include this statement as an Acknowledgement in your submitting manuscript. Signed copies of the *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* Conflict of Interest policy form are required upon submission. The Conflict of Interest policy form can be downloaded [here](#). In order to minimize delays, we strongly advise that the signed copies of these statements are prepared before you submit your manuscript.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

A Chinese version of the submission instructions for MUTGEN can be found [here](#).

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see

<http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re) use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3250**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and begins from the publication date of the issue your article appears in.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to four individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

Free access to scientific publications for public institutions in developing countries:

The Health InterNetwork Access to Research Initiative (HINARI) is an initiative to provide free or nearly free access to the major journals in biomedical and related social sciences, to public institutions in developing countries. Starting in January 2002 with over 2000 journals from Elsevier and other leading biomedical publishers, HINARI is part of the Health InterNetwork, which was introduced by the United Nations' Secretary General Kofi Annan at the UN Millennium Summit in the year 2000.

For further information and registration, please check the HINARI site: <http://www.who.int/hinari/en/>

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which

the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should be up to 300 words of size.**

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide between 3 to 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. **e-CRC**

General points: Elsevier can only accept MS Word, LaTeX, or postscript/PDF documents as electronic camera-ready copy (e-CRC). Electronic files can be stored on CD or may be transferred to Elsevier via FTP (details available from Customer support: <http://support.elsevier.com>). Please note: always send the source file (Word or LaTeX) together with any PDF files as this can contribute to better quality final PDF files and help in the conversion to XML.

MS Word file: Please ensure that you use normal fonts as much as possible in your documents, such as Times New Roman, Arial, Symbol, Helvetica, or Times (TrueType or Type 1 fonts). Special fonts, such as those used in the Far East (Japanese, Chinese, Korean, etc.) may cause problems during processing. If you use a lot of special fonts, please convert the document to PDF with Adobe Acrobat (see below, and also Elsevier's Quickguide: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Please place figures in a logical place within the document (see also the section on *Preparation of electronic illustrations* at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>). To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-checker' function of your wordprocessor.

LaTeX documents: Please use a LaTeX setup that uses Type 1 fonts instead of the sometimes default bitmap fonts (Type 3, or pk fonts). For instance, using the LaTeX Times package may be enough to enable this adjustment. For information on LaTeX see <http://www.elsevier.com/latex>. Please provide all document-related and temporary files on submission, as well as the resulting postscript or PDF file.

Postscript/PDF files: Please create postscript files, making sure all fonts are embedded. When creating PDF files with Adobe Acrobat, please use version 4.05 or higher, and use the standard "Press Optimized" settings, as provided by Adobe.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) and in the printed version (unless you specify otherwise). Please indicate your preference for color: in print and on the Web, or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template

available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/mutation-research-genetic-toxicology-and-environmental-muta>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume and issue/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be

placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)• Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web and in print, or to be reproduced in color on the Web and in black-and-white in print. There are no color charges for Web and/or print reproduction
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.