

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

**ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro e in vivo* DO ÁCIDO SALAZÍNICO ISOLADO  
DE *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (LÍQUEN)**

THIAGO DAVID DOS SANTOS SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva

CO-ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Noemia Pereira da Silva Santos

RECIFE

2014

THIAGO DAVID DOS SANTOS SILVA

**ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro e in vivo* DO ÁCIDO SALAZÍNICO ISOLADO  
DE *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (LÍQUEN)**

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

Recife  
2014

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

Silva, Thiago David dos Santos

Atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (líquen) / Thiago David dos Santos Silva. – Recife: O Autor, 2014.

82 f.: il.

Orientadores: Nicácio Henrique da Silva, Noemia Pereira da Silva Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2014.

Inclui referências e anexos

1. Câncer 2. Farmacologia I. Silva, Nicácio Henrique da (orient.) II. Santos, Noemia Pereira da Silva (coorient.) III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-256

**Thiago David dos Santos Silva**

**ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro e in vivo* DO ÁCIDO SALAZÍNICO ISOLADO  
DE *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (LÍQUEN)**

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/ Orientador)

---

Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva

---

Profa. Dra. Mônica Cristina Barroso Martins

---

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Data: 26/02/2014

A minha Família.

Em especial aos meus pais (Conceição e Fernando) e irmão (Diego)  
que com amor formam os alicerces da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus pela oportunidade concebida e por todas as graças derramadas durante a execução deste projeto e por ter colocado cada pessoa abaixo citada em meu caminho;

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Nicácio Henrique Henrique da Silva por ter me recebido em seu laboratório, investido e acreditado no meu trabalho durante todo trajeto percorrido e por todo conhecimento e disciplina transmitidos;

A Professora Dr<sup>a</sup>. Noemia Pereira (co-orientadora) que com seu conhecimento ajudou-me a entender e avaliar os procedimentos experimentais;

Ao Professor Dr. Peter Falcão (Colaborador) pelo seu conhecimento, conselhos e amizade;

A Professora Dr<sup>a</sup>. Mônica Martins (colaboradora) pelas sugestões e incansáveis conselhos e pela grande participação como apoio físico e espiritual;

Ao Técnico João Virgínio pelo companheirismo e presteza de me fazer entender toda rotina de um laboratório de pesquisa;

Aos meus amigos de laboratório: Cleópatra que foi minha mão amiga durante toda essa trajetória e com quem pude compartilhar muitos momentos alegres; Bruna pela sua amizade e reciprocidade;

E os demais que me acompanharam de longe e mesmo assim estavam firmes na torcida: Rayane, Bruno, Lourdes, Clarissa, Joelma, Alexsandra, Tamiris, Alexandre, Cibele, Ana Paula, Pamella e Renata.

Aos professores do Departamento de Bioquímica pelo conhecimento compartilhado;

Ao Dr. Emerson Grumboski pela identificação do material líquênico;

Ao Pessoal dos Laboratórios de Química Analítica e da Química Fundamental pela agilidade das análises;

Ao Pessoal do Herbário UFP pela agilidade no depósito da exsicata;

Ao Pessoal do campus UFPE-CAV: pelo uso do biotério e laboratórios de pesquisa;

Ao Professor Dr. Francisco Amanajás pelas análises histológicas;

A prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariane Cajubá pelas dúvidas esclarecidas;

Aos Técnicos do CAV que sempre mostraram-se disponíveis;

Ao pessoal do grupo de pesquisa de Síntese/CAV;

A Cybele e em especial a Janice pela amizade, apoio, colaboração, presteza e disponibilidade nos incansáveis ensaios *in vivo*;

Ao Pessoal do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) - UFC:

Ao Professor Dr. Odorico Moraes e a prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia do Ó pela abertura das portas deste laboratório;

A Sr. Juscelino e D. Helisthia pela hospedagem e hospitalidade no Ceará;

Ao secretário Djalma e coordenação da Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia por todo apoio cedido;

Aos Amigos do mestrado, Em especial: Amália, Carolina, Lais, Amanda e Mikaela pelos almoços, risadas e companherismo;

A todos os familiares e amigos que sempre estão presentes nos momentos mais importantes da minha vida:

Tias: Dude, Nailza, Eva Bezerra, Lourdes, Ana Paula, Nadja, Rama, Lúcia;

Aos meus Avós: Heleno e Maria;

Aos Primos que não citarei para não esquecer nenhum pois todos foram muito importante cada um com sua particularidade;

A minha namorada Dayana pelas incansáveis orações;

Amigos: Lizandra, Djanah, Andréia, Naiana, Everton, Marcela, Uiara, Sérgio, Thiago Henrique, Bezerra, Cleide, Claudia Lima, Josivânia, Simone, Elton.

No mais Agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Por fim, porém muito importante, ao CNPq pelo suporte financeiro durante todo período da Pós-Graduação.

*Para ser grande sê inteiro  
Nada teu exagera ou exclui  
Sê todo em cada coisa  
Põe quanto és no mínimo que fazes  
Assim em cada lago a lua inteira brilha porque alta vive.*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

Devido à importância epidemiológica dos processos neoplásicos, inúmeras abordagens terapêuticas vêm sendo desenvolvidas. O aumento mundial do número de casos de câncer tem provocado uma corrida dos pesquisadores na busca de soluções para cura e/ou controle desta patologia através de substâncias bioativas. As substâncias líquênicas apresentam várias atividades biológicas e algumas demonstraram serem fontes promissoras de drogas antitumorais. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. O ácido salazínico foi obtido a partir da extração com acetona até o esgotamento a quente seguido por sucessivas cristalizações até obtenção do alto grau de pureza da substância. Análises cromatográficas de camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE), infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de prótons (RMN  $H^1$ ) foram realizadas para confirmação estrutural da molécula do ácido salazínico. O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método do 3-[4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Foi avaliado o efeito antiproliferativo do ácido salazínico purificado frente as linhagens de células indiferenciadas de *HeLa* (carcinoma cólon de útero) e células ascíticas dos tumores experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. O ensaio de atividade antitumoral foi realizado frente ao tumor sólido experimental Sarcoma 180 e o Carcinoma de Ehrlich em camundongos albinos swiss apresentando peso médio de 35g. Células dos tumores ascítico ( $5,0 \times 10^6$  células  $mL^{-1}$ ) foram inoculadas via subcutânea (s.c) na região axilar direita do animal. O tratamento teve início 24 h após inoculação por 7 dias consecutivos. Injeções de soluções do ácido salazínico purificado foram administrados intraperitonealmente na dose 26,5 mg/kg. Os resultados de CCD e CLAE respectivamente evidenciaram que o ácido salazínico purificado apresentou Rf (0,173) e tempo de retenção de 3,2 min. O efeito citotóxico do ácido salazínico foi dose dependente nas concentrações de 5  $\mu g/mL$ , 10  $\mu g/mL$ , 20  $\mu g/mL$  e 40  $\mu g/mL$ . A dose capaz de inibir 50% da proliferação celular ( $CI_{50}$ ) foi 39,9  $\mu g/mL$  frente a linhagem de *HeLa*, 31,6  $\mu g/mL$  frente as células do Sarcoma 180 e 35,1  $\mu g/mL$  frente as células de Carcinoma de Ehrlich. No estudo da atividade antitumoral *in vivo* observou-se uma inibição de 64,3% para o Sarcoma 180 e 73,2% para o Carcinoma de Ehrlich, quando comparados com o 5- Fluoruracil (5-FU) (20 mg/kg) fármaco comercial com atividade já estabelecida que apresentou 10,22% e 10,24% de inibição tumoral para o Sarcoma 180 e para o Carcinoma de Ehrlich respectivamente. Nas análises histopatológicas foram evidenciadas uma redução de 29,37% e 29,45% dos valores dos índices mitóticos nos tumores tratados com ácido salazínico purificado para os tumores Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180, respectivamente. O ácido salazínico evidenciou significativa ação antitumoral frente aos tumores experimentais testados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, demonstrando-se ser um agente antitumoral promissor.

PALAVRAS CHAVE: ácido salazínico, líquens, *Ramalina complanata*

## ABSTRACT

Due to the epidemiological importance of neoplastic processes, numerous therapeutic approaches have been developed. The worldwide increase in the number of cancer cases has provoked a rush by researchers in the search for solutions to cure and / or control this disease by bioactive substances. The liquênicas substances have various biological activities and some have proven to be promising sources of antitumor drugs. The aim of this study was to evaluate the antitumor activity *in vitro* and *in vivo* salazinic acid isolated from *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. The salazinic acid was obtained by extracting with acetone until the exhaustion of hot followed by successive crystallizations to obtain highly pure substance. Thin-layer chromatographic analysis (TLC) and high performance liquid (HPLC), infrared (IR) and proton nuclear magnetic resonance (RMNH1) were performed for structural confirmation of the salazinic acid molecule. The cytotoxicity assay was performed by the 3-4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. The antiproliferative effect of the purified salazinic acid front strains of undifferentiated cells HeLa (carcinoma of the uterus colon) and ascitic cells of experimental tumors Sarcoma 180 and Ehrlich Carcinoma was evaluated. The antitumor activity assay was conducted against experimental solid tumor Sarcoma 180 and Ehrlich Carcinoma in swiss albino mice with average weight of 35g. Ascites tumor cells ( $5.0 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>) were inoculated subcutaneously (sc) in the right axillary region of the animal. Treatment was started 24 h after inoculation for 7 consecutive days. Injections of purified salazinic acid solutions were administered intraperitoneally at a dose 26.5 mg / kg. The results of TLC and HPLC showed that the purified respectively salazinic acid was Rf (0.173) and retention time of 3.2 min. The cytotoxic effect of salazinic acid was dose-dependent at concentrations of 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL. The dose able to inhibit 50% of cell proliferation (IC50) was 39.9 µg/mL compared to HeLa lineage, 31.6 µg/mL front Sarcoma 180 cells and 35.1 µg/mL front Carcinoma cells Ehrlich. *In vivo* study of antitumor activity was observed an inhibition of 64.3% for Sarcoma 180 and 73.2% for Ehrlich Carcinoma, when compared with the 5-fluorouracil (5-FU) (20 mg / kg) commercial drug with activity already established which showed 10.22% and 10.24% inhibition of tumor for Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma respectively. Histopathological analysis were shown a reduction of 29.37% and 29.45% of the values of the mitotic index in tumors treated with purified acid salazinic for Ehrlich Carcinoma and Sarcoma 180, respectively tumors. The salazinic acid showed significant antitumor activity compared to the experimental tumors tested both *in vitro* and *in vivo*, demonstrating that it is a promising antitumor agent.

**Key Words:** Lichens, *Ramalina complanata*, Salazinic acid.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
<b>1.1 Aspectos gerais sobre o câncer</b>	18
<b>1.2 Aspectos epidemiológicos do câncer</b>	20
<b>1.3 Células neoplásicas e ciclo celular</b>	22
<b>1.4 Agentes utilizados no tratamento do câncer e mecanismo de ação de drogas antineoplásicas</b>	25
<b>1.5 Oncologia experimental</b>	29
<b>1.5.1 Sarcoma 180</b>	29
<b>1.5.2 Carcinoma de Ehrlich</b>	30
<b>1.6 Liquens</b>	30
<b>1.7 Química de liquens</b>	32
<b>2 REFERÊNCIAS</b>	36
<b>3 OBJETIVOS</b>	43
<b>3.1 Geral</b>	43
<b>3.2 Específicos</b>	43
<b>4 ARTIGO</b>	44
<b>Resumo</b>	46
<b>Introdução</b>	47
<b>Materiais e Métodos</b>	48
<b>Resultados</b>	54
<b>Discussão</b>	59
<b>Conclusões</b>	63
<b>Referências</b>	63
<b>5 ANEXOS</b>	79

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1</b> - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012/2013, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas).	21
<b>Figura 2</b> - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012/2013, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas)	21
<b>Figura 3</b> - Esquema representativo do ciclo celular.	23
<b>Figura 4</b> - Esquema representativo de crescimento de um tumor maligno primário	24
<b>Figura 5</b> - Esquema representativo da transformação de uma célula normal em célula cancerosa	25
<b>Figura 6</b> - Fluorouracil e anel pirimidínico	26
<b>Figura 7</b> - Classificação de agentes antineoplásicos de Calabresi e Chabner	27
<b>Figura 8</b> - Esquema representativo do mecanismo de ação da quimioterapia	28
<b>Figura 9</b> - Fotografia do líquen <i>Ramalina complanata</i> (Sw.) Ach.	33
<b>Figura 10</b> - Estrutura química do ácido salazínico	33
<b>Figura 11</b> - Reações biossintéticas de formação de ácido orsenfílico e floroacetofenona por condensação de acetilSCoA e malonilSCoA.	34

### ARTIGO

Fig. 1 - Cromatografia de camada delgada (CCD): 1 – extrato acetônico, 2 – ácido salazínico purificado, 3 – padrão do ácido salazínico	68
Fig. 2 - Cromatograma líquido de alta eficiência (CLAE): 2A – extrato acetônico TR 3,2 min; 2B – ácido salazínico purificado TR 3,2 min; 2C – ácido salazínico padrão TR 3,2 min. O percentual de pureza de acordo com o CLAE foi > 98%.	68
Fig. 3 - Estrutura química do ácido salazínico purificado isolado e purificado da <i>Ramalina complanata</i> (Sw.) Ach.	69
Fig. 4 - Viabilidade celular de <i>HeLa</i> frente ao ácido salazínico purificado nas concentrações de 5; 10; 20 e 40 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os dados representam a média $\pm$ D. P. As diferenças estatísticas do controle foi determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, * P <0,05 para os grupos em comparação com a concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .	69
Fig. 5 - Viabilidade celular do Sarcoma 180 frente ao ácido salazínico purificado nas concentrações de 5; 10; 20 e 40 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os dados representam a média $\pm$ D. P. As diferenças estatísticas do controle foi determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, *P <0,05 para	70

os grupos 40 µg/mL em comparação com a concentração de 5, 10 e 20 (µg/mL).

Fig. 6 - Viabilidade celular do Carcinoma de Ehrlich frente ao ácido salazínico purificado nas 70  
concentrações de 5; 10; 20 e 40 (µg/ mL). Os dados representam a média ± D. P. As diferenças  
estatísticas do controle foi determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \* P <0,05 para  
os grupos 40 µg/mL em comparação com a concentração de 5, 10 e 20 (µg/mL).

Fig. 7 - Média do peso dos animais com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento. Os dados 72  
representam a média ± D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido  
do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos comparados a salina ao 5-FU (5-Fluorouracil),  
ACSZP (ácido salazínico purificado).

Fig. 8 - Média do peso dos animais com Carcinoma de Ehrlich, após 7 dias de tratamento. Os 72  
dados representam a média ± D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA  
seguido do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos comparados a salina ao 5-FU (5-  
Fluorouracil), ACSZ (ácido salazínico purificado)

Fig. 9 - Peso dos tumores (Sarcoma 180) dos grupos tratados com solução salina, 20 mg/ Kg de 73  
peso corpóreo de 5-Fluorouracil e 26,5 mg/ Kg de peso corporal de ácido salazínico purificado.  
Os dados representam a média ± D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por  
ANOVA seguido do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos comparados a salina e ao 5-FU.  
5-FU (5-Fluorouracil), ACSZP (ácido salazínico purificado)

Fig. 10 - Peso dos tumores (Carcinoma de Ehrlich) dos grupos tratados com solução salina, 20 73  
mg /Kg de peso corpóreo de 5-Fluorouracil e 26,5 mg/Kg de peso corporal de ácido salazínico  
purificado. Os dados representam a média ± D. P. As diferenças estatísticas foram determinada  
por ANOVA seguido do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos comparados a salina e ao 5-  
FU. 5-FU (5-Fluorouracil), ACSZP (ácido salazínico purificado)

Fig. 11 - Avaliação da inibição tumoral do Sarcoma 180 a partir do tratamento com 5-FU e ác. 74  
salazínico purificado, O controle (salina) está normatizado para 100%. Os dados representam a  
média ± D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de  
Tukey, \* P <0,05 para os grupos comparados a salina. 5-FU (5-Fluorouracil), ACSZP (ácido  
salazínico purificado)

Fig. 12 - Avaliação da inibição tumoral do Carcinoma de Ehrlich a partir do tratamento com 5- 74  
FU e ác. salazínico purificado, O controle (salina) está normatizado para 100%. Os dados  
representam a média ± D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido  
do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos comparados a salina. 5-FU (5-Fluorouracil),  
ACSZP (ácido salazínico purificado)

Fig. 13 - Fotomicrografia (400X) do tumor experimental Carcinoma de Ehrlich corado pela 75  
Técnica H.E. A seta mostra mitoses típicas (a) e atípicas (b).

Fig. 14 - Efeito da administração de 5-Fluorouracil (20 mg/ Kg), ácido salazínico purificado 75  
(26,5 mg/ Kg de peso corporal) sobre o número de mitoses (Carcinoma de Ehrlich). Os valores

foram normalizados para o controle (100%). Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos comparados a salina.

Fig. 15 - Efeito da administração de 5-Fluorouracil (20 mg/ Kg), ácido salazínico purificado 76 (26,5 mg/ Kg de peso corporal) sobre o número de mitoses (Sarcoma 180). Os valores foram normalizados para o controle (100%). Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos comparados ao controle (salina).

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

**Tabela 1** Estimativa para o ano 2012/2013 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo a localização primária (números arredondados para 10 ou múltiplos de 10) 20

### ARTIGO

Tabela 1- Determinação da  $DI_{50}$  do ácido salazínico purificado - ensaio preliminar 71

Tabela 2 - Determinação da  $DL_{50}$  do ácido salazínico purificado - ensaio definitivo 71

Tabela 3- Pesos dos órgãos em camundongos portadores de tumor sólido CE tratados com ácido salazínico purificado. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. (n = 10). As diferenças estatísticas dos controles foram determinadas por ANOVA seguido do teste de Tukey P <0,05 para os grupos em comparação com o grupo salina. 76

Tabela 4 - Pesos dos órgãos em camundongos portadores de tumor sólido S180 tratados com ácido salazínico purificado. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. (n = 10). As diferenças estatísticas dos controles foram determinadas por ANOVA seguido do teste de Tukey P <0,05 para os grupos em comparação com o grupo salina. 77

Tabela 5 - Parâmetros hematológicos em camundongos portadores de tumor sólido S180 tratados com ácido salazínico purificado. RDW- Indica variação de tamanho de hemácias representando a porcentagem de variação dos volumes obtidos. Hb - Hemoglobina. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. (n = 10). As diferenças estatísticas dos controles foram determinadas por ANOVA seguido do teste de Tukey P <0,05 para os grupos em comparação com o grupo salina. 77

Tabela 6 - Parâmetros hematológicos de camundongos portadores de tumor sólido CE tratados com ácido salazínico purificado. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. (n = 10). As diferenças estatísticas dos controles foram determinadas por ANOVA seguido do teste de Tukey P <0,05 para os grupos em comparação com o grupo salina. 78

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
5-Fu	5-Fluorouracil
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
D.P.	Desvio padrão
DL <sub>50</sub>	Dose letal que pode causar a morte de 50% de uma dada população de organismos
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
G	Grama
H	Hora
HE	Hematoxilina-Eosina
CI <sub>50</sub>	Concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular
IM	Índice Mitótico
I.P.	Intraperitoneal
Kg	Quilograma
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NCI	National Cancer Institute
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
ACSZ	Ácido salazínico

ACSZP	Ácido salazínico purificado
PBS	Tampão fosfato-salino
S 180	Sarcoma 180
CE	Carcinoma de Ehrlich
RMN H <sup>1</sup>	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
S.C.	Subcutânea
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
G0	GAP zero
G1	primeiro GAP (intervalo)
G2	segundo GAP (intervalo)
S	síntese do DNA
M	Fase mitótica
DNA	ácido desoxirribonucleico
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
PI-3	triiodo fosfato
Akt	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AcetilCoA	Acetilcoenzima A

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais sobre o câncer

Em 1930 o patologista Rupert Willis definiu neoplasia/câncer como massa tumoral anormal de tecido, cujo crescimento excede ao crescimento dos tecidos normais e persiste mesmo cessada a causa que o provocou, desta forma sendo considerada a definição mais aceita (CONTRAN et al., 1999). Câncer é um termo comum para todos os tumores malignos, derivados do termo latim caranguejo. Neoplasia significa "novo crescimento", e é então chamado de neoplasma (KUMAR et al., 2005).

A célula cancerígena caracteriza-se pela perda de função em consequência da ausência desdiferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástases. A origem dessa célula e o desenvolvimento de um tumor benigno ou maligno é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidos por mecanismo como inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (SIEBER, HEINIMANN, TOMLINSON, 2003).

Os tumores benignos são designados com a inclusão do sufixo "oma" na célula de origem, por exemplo, um tumor benigno que surge a partir das células fibroblásticas é denominado fibroma. Adenoma é o termo aplicado a um neoplasma epitelial benigno que forma padrões glandulares assim como tumores derivados de células de glândulas, mas não necessariamente reproduzindo os padrões glandulares. A nomenclatura dos tumores malignos segue o mesmo padrão usado para os neoplasmas benignos, com adição de algumas expressões. Os tumores malignos que surgem do tecido mesenquimal são chamados de sarcomas. Os neoplasmas malignos, originados a partir de células epiteliais são chamados de carcinomas (KUMAR et al., 2005).

O câncer pode ser considerado uma doença genética cujo desenvolvimento se deve a mutações em determinados genes nucleares. Uma mutação em um gene que modula a proliferação ou a diferenciação da célula pode fazer com que seu produto seja hiperativo ou produzido em excesso e, como resultado, tem-se a transformação do fenótipo celular. Esses genes mutantes são, por isso, classificados como oncogenes; ou seja, genes causadores de

câncer. Em contra partida os genes normais expressos durante o desenvolvimento embrionário são denominados protooncogenes (WESTPHAL et. al., 2003)

Os protooncogenes são expressos durante o desenvolvimento embrionário e em células maduras. Muitos deles codificam moléculas que induzem a diferenciação celular, receptores para essas moléculas, proteínas relacionadas a transdução de sinais e fatores de transcrição. Quando ocorrem mutações nos protooncogenes, com sua consequente hiperativação ou superexpressão, pode ser observado o desenvolvimento de uma neoplasia (WESTPHAL et. al., 2003), Um grande número de agentes apresenta capacidade de provocar lesão e induzir transformação neoplásica das células, entre eles citam-se:

- carcinógenos químicos: Agentes de estrutura extremamente diversa, incluindo produtos sintéticos e naturais. Exemplos: agentes alquilantes de ação direta, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aminas aromáticas, corantes nitrogenados, aflatoxina b1, nitrosaminas entre outros.
- energia radioativa: Representados pelos raios UV (ultravioleta) ou como radiação eletromagnética e a radiação de partículas. São capazes de transformar todos os tipos celulares *in vitro* e induzir neoplasmas *in vivo* em humanos e nos modelos experimentais.
- vírus oncogênicos e outros micróbios: diversos vírus de DNA foram associados à etiologia do câncer, dentre eles citam-se: Papilomavírus Humanos, vírus de Epstein- Barr, vírus da Hepatite B e o Herpes Vírus do Sarcoma de Kaposi. Algumas evidências relacionam a infecção gástrica pelo vírus *Helicobacter pylori* na etiologia de carcinomas gástricos e dos linfomas gástricos (ROSSI; HANNINEN, 2012)

Existem grandes diferenças entre as características morfológicas, moleculares e funcionais dos diversos tipos de células neoplásicas, tais como: a) polimorfismo (células diferem muito em tamanho e número); b) aneuploidia (quantidade anormal de cromossomas); c) citoplasma geralmente basófilo, devido à riqueza em ribossomas, visto que se multiplicam muito e d) citoesqueleto desorganizado, características estas que variam de célula para célula neoplásica. O diagnóstico laboratorial do câncer se torna, a cada ano, mais sofisticado e complexo. Dentre os principais métodos utilizados encontram-se: métodos histológicos e citológicos, imuno-histoquímica, diagnóstico molecular, citometria de fluxo e marcadores tumorais (KUMAR et al., 2005).

## 1.2 Aspectos epidemiológicos do câncer

Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais de câncer seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. É também conhecido que aproximadamente um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderiam ser prevenidos (PARKING; BRA; DEVESA, 2001).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2013, válidas também para o ano de 2014, apontaram que ocorreram 518.510 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (BRASIL, 2014) (Tabela 1).

Tabela 1: Estimativa para o ano 2013/2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo a localização primária (números arredondados para 10 ou múltiplos de 10)

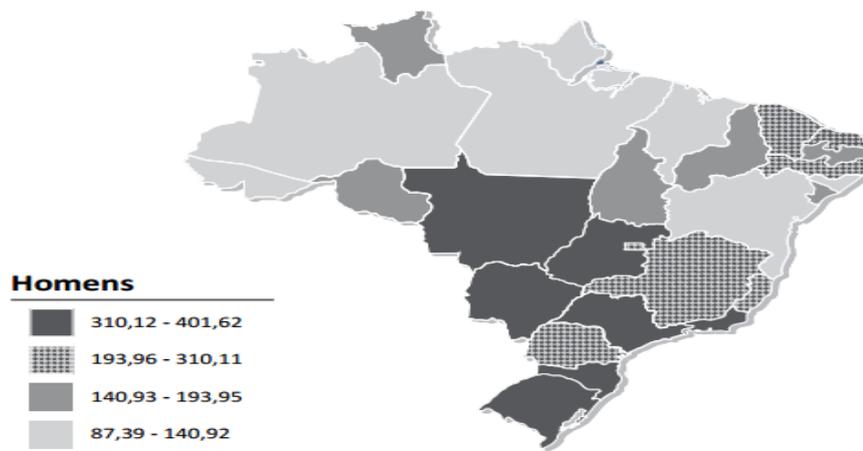
Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Cólon e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tireoide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
<b>Subtotal</b>	<b>195.190</b>	<b>202,85</b>	<b>51.780</b>	<b>248,60</b>	<b>189.150</b>	<b>188,58</b>	<b>59.280</b>	<b>254,86</b>
Pele não Melanoma	62.680	65,17	14.620	70,39	71.490	71,30	15.900	68,36
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>257.870</b>	<b>267,99</b>	<b>66.400</b>	<b>318,79</b>	<b>260.640</b>	<b>259,86</b>	<b>75.180</b>	<b>323,22</b>

Fonte:

BRASIL, 2013/2014. INCA 2013.

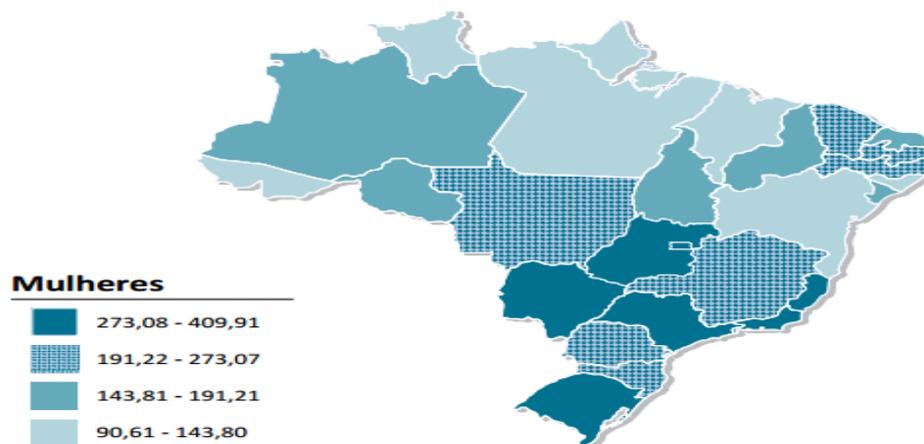
A distribuição dos casos novos de câncer segundo sua localização primária é bem heterogênea entre Estados e Capitais do País. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste mostram as menores (Figura 1 e Figura 2). As taxas de câncer da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário, tanto para homens quanto para mulheres (BRASIL. INCA, 2014).

Figura 1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2013/2014, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas).



Fonte: Brasil, 2013/2014.INCA 2014

Figura 2 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2013/2014, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas)



Fonte: Brasil, 2013/2014.INCA 2014

### 1.3 Células neoplásicas e ciclo celular

O processo básico da gênese de novas células, em que há alternância dos estágios de intérfase e de divisão das células é denominado de ciclo celular e é de fundamental importância seu conhecimento para entendimento do mecanismo de ação de fármacos antineoplásicos e também para estudos relacionados ao câncer (RANG; RITTER; DALE, 2004).

Duas importantes propriedades de uma célula de câncer são: divisão celular desregulada e resistência a apoptose. As células malignas também podem manifestar imortalidade celular (capacidade das células de câncer aumentarem atividade da telomerase), capacidade de induzir angiogênese (crescimento de novos vasos e tecidos) e metástases, isto é, a célula tumoral passa através da membrana basal e da matriz extracelular circundante para os capilares e chegam pelo sangue até um tecido alvo, onde proliferam e formam um tumor secundário (RANG; RITTER; DALE, 2004).

A imortalidade celular representa a capacidade de uma célula produzir infinitas gerações de descendentes. Células mortais, como as epiteliais humanas normais em cultura de células, produzem de 40 a 50 gerações e depois entram em senescência, enquanto que as imortais continuam a se dividir indefinidamente. A proliferação celular e a morte celular são mantidas em equilíbrio em tecidos normais e saudáveis. Na hiperplasia há um aumento tecidual, com manutenção da estrutura e função normais, enquanto que na displasia, as células diferem das normais em forma e tamanho do núcleo. Os ciclos de crescimento de algumas dessas células são anormais, e as células em processos de divisão aparecem em porcentagem maior. Já no carcinoma *in situ* as alterações celulares começam mais pronunciadas, sendo que as células apresentam-se como células tumorais, com características de perda da função, proliferação incontrolada, invasão e metástase (RANG; RITTER; DALE, 2004).

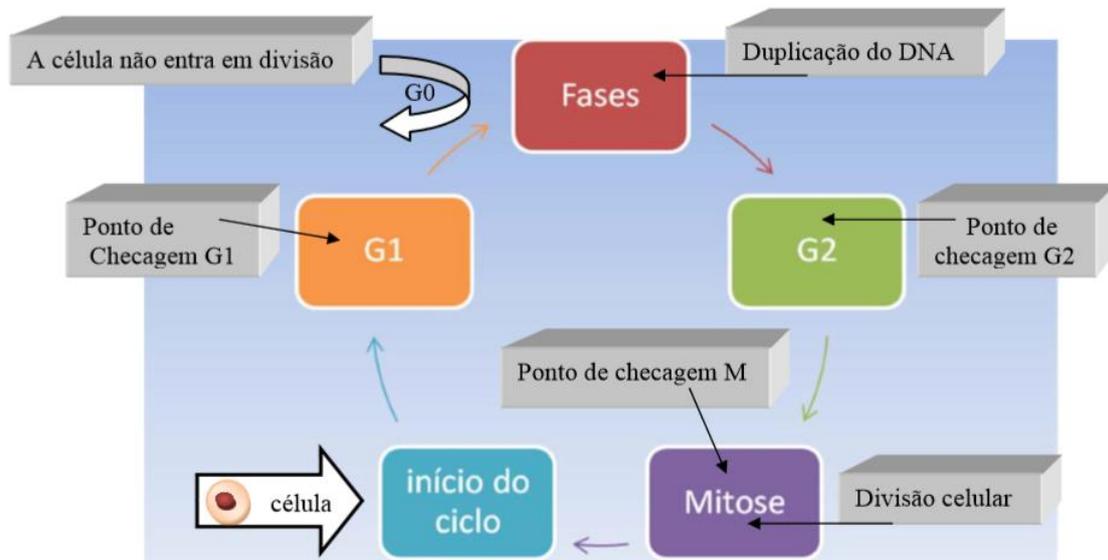
Duas classes de genes, os protooncogenes e os genes supressores de tumor são os mais diretamente relacionados à regulação do ciclo celular. Os protooncogenes são responsáveis pela produção de proteínas que atuam na estimulação do ciclo celular, enquanto os genes supressores de tumor são responsáveis pela produção de proteínas que atuam inibindo o ciclo celular (DE ALMEIDA et al., 2005).

Os genes supressores de tumor quando ativos inibem a ocorrência de divisão celular. O equilíbrio na atuação desses dois grupos de genes resulta no perfeito funcionamento do ciclo celular (SANTOS; WADA, 2005). Sendo assim, o desenvolvimento de um câncer envolve um número de diferentes alterações genéticas ocorrendo sequencialmente na célula,

incluindo a deleção de genes específicos (genes supressores de tumores), a mutação de oncogenes (que podem transformar células normais em tumorais), além de outras aberrações cromossômicas. Essas mudanças sequenciais estão aparentemente associadas à progressão até maiores graus de malignidade (HILL; TANNOCK, 1992).

Considerando o ciclo celular como sendo de fundamental importância no processo de carcinogênese, algumas considerações devem ser feitas. O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M (Figura 3). 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. Quando as células não proliferam, elas entram em estado de quiescência, conhecido como G0. 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)

Figura 3: Esquema representativo do ciclo celular.



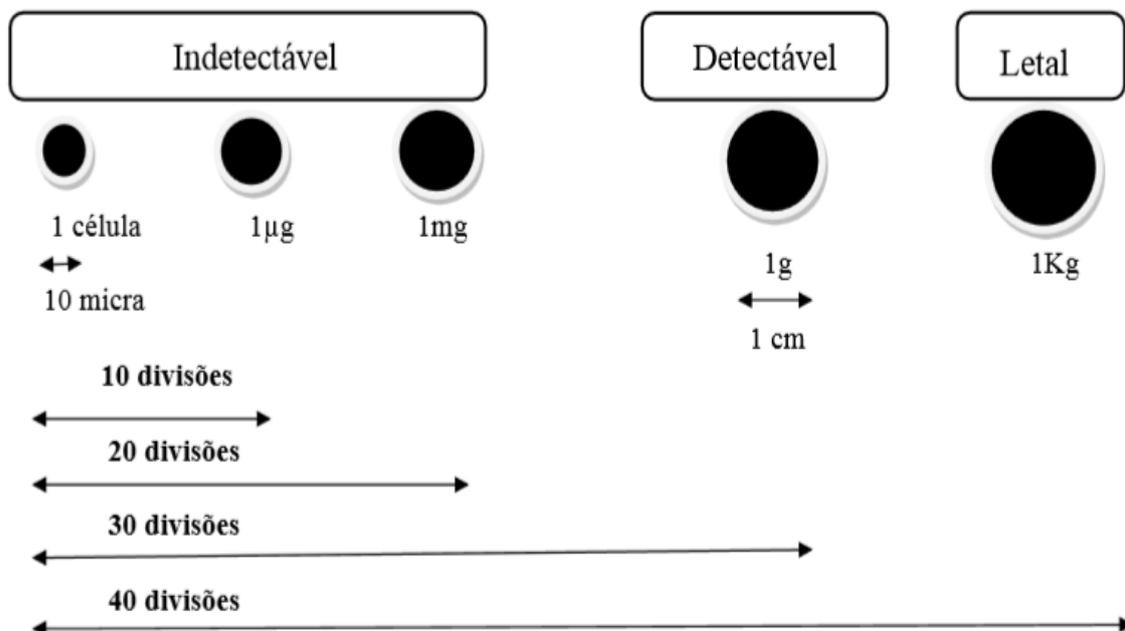
Fonte: Adaptado de DE ALMEIDA et al., 2005.

O ciclo celular é regulado por mecanismos denominados *checkpoints* (pontos de controle) que protegem a transição entre as fases do ciclo garantindo que o estágio precedente tenha sido completado sem erros (KHODJAKOV; RIEDER, 2009). A parada nos pontos de controle permite que as células reparem os defeitos, impedindo a sua transmissão para as células filhas e contribuindo com a manutenção da estabilidade genômica (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Processos oncogênicos ocorrem principalmente em reguladores da progressão da fase G1. No câncer, as células não respondem a estímulos externos que controlam a transição G1/S e, por isso, permanecem no ciclo celular. Como a saída do ciclo celular facilita a maturação e a diferenciação, estes mecanismos também estão prejudicados durante a tumorigênese. Após a passagem do ponto de restrição em G1, a célula se torna comprometida com novo ciclo de divisão, independente dos sinais externos de crescimento. A passagem pelo ponto de restrição é controlada por quinases dependentes de ciclina (CDKs) (SHERR, 1996). Quando a replicação, a reparação do DNA ou a reunião dos cromossomos for aberrante, as células normais detém 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 a célula inicia a apoptose. As alterações do funcionamento de genes controladores do ciclo celular, em decorrência de mutações, são relacionadas ao surgimento de um câncer (SHERR, 1996).

Evidências científicas demonstram que a grande maioria dos tumores é originária de uma única célula, então denominados de tumores monoclonais (Figura 4) (PONDER et. al., 1986)

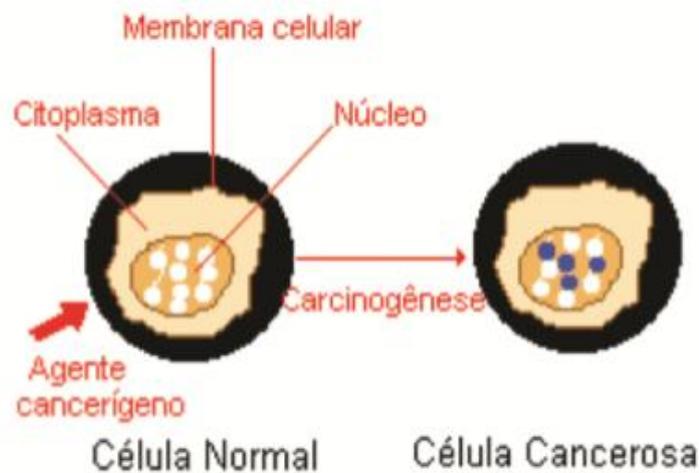
Figura 4: Esquema representativo de crescimento de um tumor maligno primário



Fonte: Adaptado de Schabel (1977). BRASIL. INCA; Fisiopatologia do câncer 2013.

A carcinogênese pode iniciar-se de forma espontânea ou provocada pela ação de agentes carcinogênicos: químicos, físicos ou biológicos (Figura 5). Como o câncer se desenvolve a partir de mudanças dinâmicas que ocorrem no genoma de uma célula, o acúmulo de anormalidades genéticas é o principal responsável pelo desenvolvimento e progressão neoplásica (PONDER et. al., 1986).

Figura 5: Esquema representativo da transformação de um célula normal em célula cancerosa



Fonte: BRASIL, INCA 2013

O equilíbrio na atuação desses dois grupos de genes resulta no perfeito funcionamento do ciclo celular. Mutações nos protooncogenes os transformam em oncogenes (genes causadores de câncer). As 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 (BOENTE; SAMPAIO; DEL GIGLIO, 2010).

#### 1.4 Agentes utilizados no tratamento do câncer e mecanismo de ação de drogas antineoplásicas

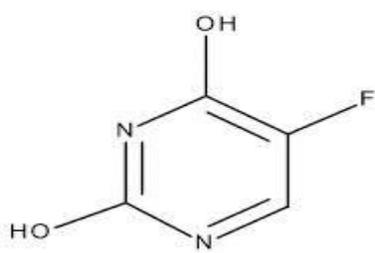
Os agentes utilizados no tratamento anticâncer incluem uma grande variedade de compostos que agem por vários mecanismos, porém apresentam significativa toxicidade sobre os tecidos normais (BOENTE; SAMPAIO; DEL GIGLIO, 2010). Com isso, se faz necessário uma pesquisa contínua por novas drogas mais eficazes, mais seletivas e menos tóxicas.

Os derivados pirimidínicos apresentam uma promissora atividade antitumoral e esta atividade varia em função das substituições efetuadas na molécula. As pirimidinas 2,4-dissubstituídas e 2,4,6-trissubstituídas apresentam potente atividade anticancerígena como: inibidores de CDK, inibidores de  $\alpha$ -TNF, inibidores de proteína tirosina quinase, inibidores da quinase (PI-3 e AKT) e inibidores de citocina (XIE et al., 2009) e seu afeito citotóxico ainda pode ser atribuído à sua atuação como: inibidores de quinases dependentes de ciclina, inibidores de xantina oxidase, antagonistas do receptor de adenosina (GHORAB et al., 2010).

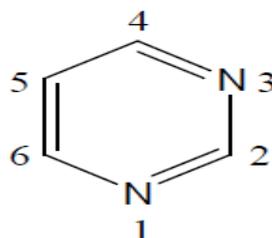
De uma forma geral, os análogos da pirimidina, como gencitabina, citarabina (AraC; também chamado citosina arabinósido), 5-fluorouracil, floxuridina e outros têm a capacidade de inibir a biossíntese dos nucleotídeos de pirimidina. A Gencitabina, por exemplo, atua incorporando-se ao DNA inibindo o alongamento das cadeias de DNA nascente (CHABNER et al., 2001).

O 5-fluorouracil (Figura 6) atua como um antimetabólito e age como um inibidor irreversível da timidilato-sintase (BOENTE; SAMPAIO; DEL GIGLIO, 2010), além de ser análogo dos antifolatos. Estes inibidores apresentam uma especificidade elevada sendo bastante úteis como agentes terapêuticos (VOET; VOET; PRATT, 2006). Os compostos pirimidínicos, possivelmente atuam por mecanismo semelhante, tendo em vista a similaridade química dos seus núcleos fundamentais.

Figura 6 – Estrutura química das substâncias 5-Fluorouracil e anel pirimidínico



5-fluorouracil



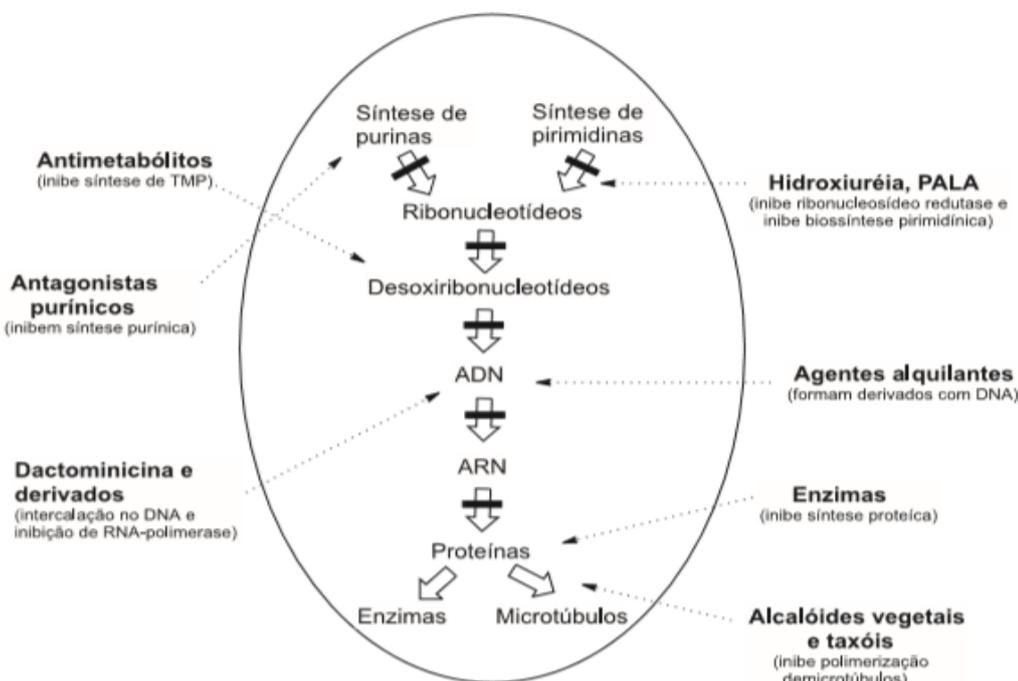
anel pirimidínico

Fonte: merckbiosciences.com; acessado em 02/12/2013

Contudo, a variedade de tipos de compostos utilizados em quimioterapia oncológica é tão grande, que tal classificação só pode ser feita indiretamente. Calabresi; Chabner (1995),

descreveram uma classificação conveniente dos fármacos antineoplásicos onde o critério classificatório baseia-se no ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e transdução (Figura 7). Entretanto, os autores consideram esta classificação arbitrária pois, por exemplo, os agentes hormonais, entre outros, não são classificáveis desta forma.

Figura 7: Classificação de agentes antineoplásicos de Calabresi; Chabner (1995)



Fonte: Calabresi e Chabner 1995

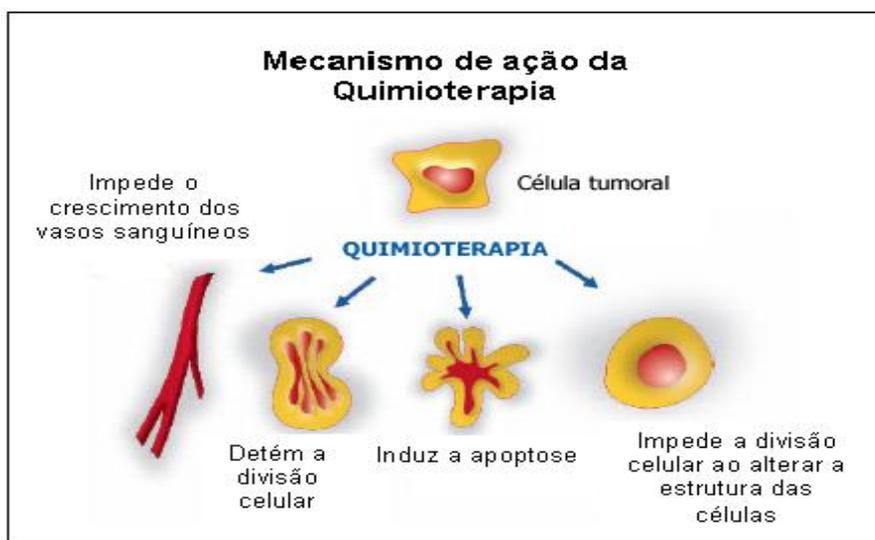
Os fármacos ideais para o tratamento do câncer deveriam erradicar as células cancerosas sem erradicar as células normais do paciente. O uso clínico dessas drogas exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, procurando um índice terapêutico favorável (KATZUNG, 2006).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre células que se encontram no ciclo celular, portanto, denominados de fármacos ciclo-específicos, entre eles citam-se: alcalóides da vinca, antimetabólitos, epipodofilotoxinas e taxanos. Um outro grupo denominado fármacos ciclo-não-específicos tem a capacidade de esterilizar as células tumorais, independente de estarem atravessando o ciclo ou em repouso. São exemplos de

agentes ciclo-não-específicos: agentes alquilantes, análogos da platina, antibióticos antitumorais, antraciclinas e campotecinas (KATZUNG, 2006).

Diversas abordagens moleculares estão em fase de investigação, para o uso de alvos seletivos para atuação dos agentes anticâncer, incluem por exemplo: drogas que atuam na expressão gênica, na inibição da angiogênese, drogas citotóxicas e indutoras de apoptose conforme figura ilustrativa do mecanismo de ação dos quimioterápicos, (Figura 8), (BERNARDI et al., 2003).

Figura 8: Esquema representativo do mecanismo de ação da quimioterapia



Fonte: adaptado de drcarlosrey.blogspot.com, acesso em 30/11/2013.

Embora a quimioterapia seja amplamente utilizada no tratamento do câncer, várias são as desvantagens de sua utilização: quase todos os agentes são dirigidos contra a proliferação celular, mais do que para metastatização propriamente dita, portanto pode ocorrer desenvolvimento de resistência, além do fato de que a eliminação total das células malignas não é possível com doses terapêuticas e a resposta imune do hospedeiro não consegue lidar com as células remanescentes (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

Extensivas pesquisas realizadas a partir da metade do século passado com ingredientes ativos de frutas e vegetais têm identificado vários alvos moleculares que potencialmente poderão ser usadas, não apenas para a prevenção de câncer, mas também para seu tratamento. Dentre eles incluem-se: curcumina, resveratrol, genisteína, s-alil-cisteína, eugenol, beta-caroteno, limoneno (AGGARWAL et al., 2006). Outra contribuição para o aprimoramento da terapia do câncer é a utilização da farmacogenética que estuda a correlação entre as variações

genéticas e a resposta aos fármacos. Além do mais, em vários casos, a seletividade e eficiência destes agentes têm sido aumentadas por uso de mecanismos de liberação controlada e ou de cito-proteção (DE ALMEIDA et al., 2005).

## 1.5 Oncologia experimental

A cultura de células tem sido utilizada com freqüência na pesquisa de produtos naturais, semi-sintéticos e de síntese, permitindo a análise imediata do impacto destes compostos sobre a célula, fornecendo respostas rápidas, importantes na seleção destes novos fármacos antineoplásicos (BELLAMY, 1992; CARVALHO, 1996). Diversas linhagens celulares utilizadas nas pesquisas biológicas multiplicam-se facilmente, apresentando grande número de células uniformes.

Outros sistemas também empregados na pesquisa do câncer são tumores espontâneos, induzidos por carcinogênicos e/ ou por vírus primários. A utilização destes modelos experimentais tem apresentado fundamental importância na descoberta de novos fármacos antineoplásicos, bem como no aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças em medicina humana (GOLDIN et al., 1979; GIULIANI et al., 1979; FÁVARO et al., 1990).

### 1.5.1 Sarcoma 180

A descoberta de inúmeros compostos utilizados no tratamento clínico de neoplasia tem ocorrido devido a evolução da oncologia experimental (POTT, 1987). A quimioterapia do câncer, seja em animais experimentais ou em humanos, tem como objetivo a redução do número de células neoplásicas viáveis, abaixo do qual, as células que sobrevivam ao tratamento com uma determinadas drogas não sejam capazes de reestabelecer a doença (PESSOA, 2000).

O Sarcoma 180 foi inicialmente identificado no Croker Laboratory em 1914, é um tumor de natureza sólida que foi inicialmente classificado como carcinoma mamário, por surgir espontaneamente na região axilar de camundongo (SCHABEL, 1977). Em 1919, após muitos transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa e mantém-se sem alterações até os dias atuais. A forma sólida caracteriza-se por ter um rápido crescimento atingindo uma

média de 18x14x10 mm por volta de sete dias do transplante. Pode causar metástase para os pulmões o que pode ocorrer quando os tumores estão com mais de quatro semanas de evolução (SCHABEL, 1977).

Em 1951, após a inoculação intraperitoneal do fluido leitoso do Sarcoma 180 (sólido) em camundongos swiss, Charlotte Friend desenvolveu a forma ascítica do tumor nos animais, sendo observado que muitos tumores a partir da terceira semana de implante desenvolvem necrose, sendo a morte dos animais ocasionada por desnutrição, toxemia e septicemia.

### 1.5.2 Carcinoma de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi descrito por Ehrlich em 1905 (EHRlich; APOLANT, 1905) e em 1906 pelos mesmos autores foi descrito como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, é que surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais (LOEWENTHAL; JAHN, 1932).

Devido a suas características e fácil manuseio experimental, este tumor tem sido utilizado como um modelo para vários estudos, tais como a influência do estresse sobre câncer (PALERMO-NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001), (PALERMO-NETO; MASSOCO; SOUZA, 2003), resposta imunológica ao tumor (SEGURA; BARBERO; MÁRQUEZ, 2000; PINTO, 2003), efeito antiangiogênico e antiproliferativo (KUMAR et al., 2009), marcadores de proliferação celular (SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006), na avaliação do crescimento tumoral sob o efeito de toxinas (MADY, 2002), extratos vegetais (RAJESHKUMAR et al., 2002), drogas antiinflamatórias (PAL et al., 2001), agentes químicos, derivados como fluorouracil, cisplatina (YONEDA et al., 1999; VALADARES; QUEIROZ, 2002) e vitaminas A e B1 (OLORIS; DAGLI; GUERRA, 2002).

### 1.6 Liquens

O aumento mundial do número de casos de neoplasias tem provocado um avanço na pesquisa na busca de soluções para o controle desta patologia. Apesar dos inúmeros compostos naturais e sintéticos, utilizados no tratamento das neoplasias, as particularidades biológicas inerentes a cada tipo de tumor associadas aos mecanismos intracelulares de

resistência farmacológica (de etiologia multifatorial) aos quimioterápicos que as células tumorais podem desenvolver, e efeitos colaterais graves, impulsionam a pesquisa de novos compostos com ação antineoplásica (GOMES et al., 2006).

Líquens são organismos simbióticos compostos por um fungo (denominado micobionte) e uma ou mais algas ou cianobactérias (denominada fotobionte). Embora possuam uma descrição simples, estes organismos são, na verdade, comunidades extremamente complexas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). O componente fotossintético é constituído por algas unicelulares pertencentes às divisões Chlorophycophyta e Cyanophycophyta. Os fungos são na maioria Ascomycota, e em menor porção, Basídio e Deuteromicota, formadores dos Asco, Basídio e Deuterolíquens (NASH III, 1996).

Uma das características dos líquens é possuir uma alta afinidade com o ambiente em que vivem, indicando desde a umidade do ar até a acidez do substrato rochoso, além de demonstrarem alta sensibilidade a inúmeros tipos de poluentes, sendo portanto ótimos bioindicadores de ambientes e da qualidade do ar uma vez que possuem a capacidade de absorver e reter contaminantes atmosféricos em suas células, funcionando também como biomonitores (MOTA-FILHO et al., 2007)

As substâncias liquênicas são responsáveis pela maioria das utilidades econômica e dos benefícios curativos advindos dos líquens (NASH III, 1996), tais como: atividade antitumoral, antibacteriana, antipirética, anti-inflamatória, antiviral, analgésica, e ainda como indicador biogeográfico, possui também a capacidade de produzir óleos essenciais e substâncias fixadoras de perfume, corantes de tecidos, graxas e óleos (MOTA-FILHO et al., 2007).

Os líquens também se mostram efetivos de acordo com as propriedades, como antiproliferativa (OGMUNSDOTTIR et al., 1998; BUCAR et al., 2004; BURLANDO et al., 2009; KUMAR; MULLER, 1999), antibiótico, preferencialmente sobre as bactérias Gram-positivas (BÉZIVIN, 2003; TURK et al., 2006), antioxidantes (BHATTARAI et al., 2008; GULLUCE et al., 2006; HIDALGO; FERNANDEZ; QUILHOT, 1994), anti-HIV (NEAMATI et al., 1997), Anti-cancer (BEZIVIN et al., 2003, BEZIVIN et al., 2004; MAYER et al., 2005; REN et al., 2009), e anti-protozoários; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2008), inseticida e moluscicida (MARTINS, 2013; REN et al., 2009).

As propriedades medicinais de alguns líquens são mencionados também nos sistemas de Ayurveda e Unani onde eles são usados para tratar uma ampla gama de doenças comuns, incluindo doenças do sangue, doenças cardíacas, bronquite, sarna, lepra, inflamações da asma e distúrbios estomacais (SHUKLA; JOSHI; RAWAT, 2010). Um dos mais importantes usos

de líquens é exemplificado pela indústria de perfumes (RICHARDSON, 1988; VICENTE; CAMBON; GARCIA-JUNCEDA, 1992). Os fungos liquenizados estão entre as possibilidades mais promissoras com mais de 1.000 substâncias químicas secundárias identificadas. O uso de produtos secundários liquênicos como drogas anti-câncer remonta ao final dos anos 1960 (SHIBATA et al., 1968).

### 1.7 Química de líquens

As substâncias químicas produzidas pelos líquens são agrupadas de acordo com a localização do talo em produtos intracelulares e extracelulares, sendo o talo liquênico uma estrutura composta. Alguns compostos são sintetizados pelo fungo outros pela alga. Os produtos intracelulares estão ligados à parede do fungo (carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas) (HALE JR., 1983).

Os produtos extracelulares frequentemente chamados de metabólitos secundários, são encontrados na medula e no córtex do fungo. A concentração de metabólitos secundários pode variar de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo liquênico embora em alguns casos a concentração possa ser mais alta (HALE JR., 1983; GALUN; SHOMER-ILAN, 1988; HUNECK; YOSHIMURA, 1996). O estudo sistemático das substâncias químicas resultantes do metabolismo secundário teve início com os trabalhos de Berbet em 1831, Alms em 1832 e Knop em 1844, que isolaram os ácidos pulvínico, picrolíquênico e úsnico respectivamente (YOSHIMURA et al., 1996).

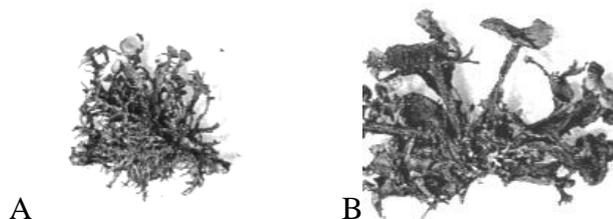
A maior parte dos metabólitos secundários de líquens são compostos oriundos da via do acetatopolimalonato. Esta via conduz à formação de compostos alifáticos como os ácidos graxos de cadeia longa e as substâncias aromáticas do tipo ácidos fenólicos. A acetilSCoA pode sofrer ativação de átomos de hidrogênio alfa ao grupo metila por ação do sítio de caráter básico presente na enzima que toma parte no processo sintético (HONDA; VILEGAS, 1999).

Os ácidos graxos que ocorrem em líquens apresentam semelhança com aqueles que ocorrem em fungos não liquenizados porém não são idênticos. A biossíntese de ácidos graxos de cadeias longas procede de maneira semelhante aquela já estabelecida em diversos organismos (VICENTE; LEGAZ, 1988; GEISSMAN; CROUT, 1969; BLOMER; HOFFMAN, 1969; MOSBACH, 1973; LUCKNER, 1990).

A *Ramalina complanata* tem apotécio bem desenvolvido (Figuras 9a e 9b), produz uma grande quantidade de ascósporos curtos, fusiformes e 1-septado, com um comprimento

de 13 mm (HONNEGER, 1996). o pigmento produzido pela *Ramalina complanata* é castanho escuro (YAMAMOTO, 2000).

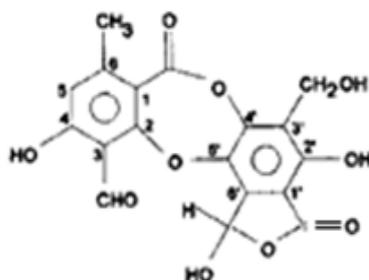
Figura 9: Fotografia do líquen *Ramalina complanata* (Sw.) Ach.



Fonte: Emerson Luiz Gumboski (2013), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS).

As estruturas químicas tais como a do ácido salazínico (Figura 10) que é uma depsidona originária do  $\beta$ -orcinol são mais complexas do que aquelas derivadas do orcinol. Pode ocorrer em alguns compostos um anel heterocíclico com oxigênio entre os substituintes das posições 1' e 6', se estes forem grupos carboxila e aldeído, respectivamente. (ASAHINA; SHIBATA, 1954)

Figura 10: Estrutura química do ácido salazínico

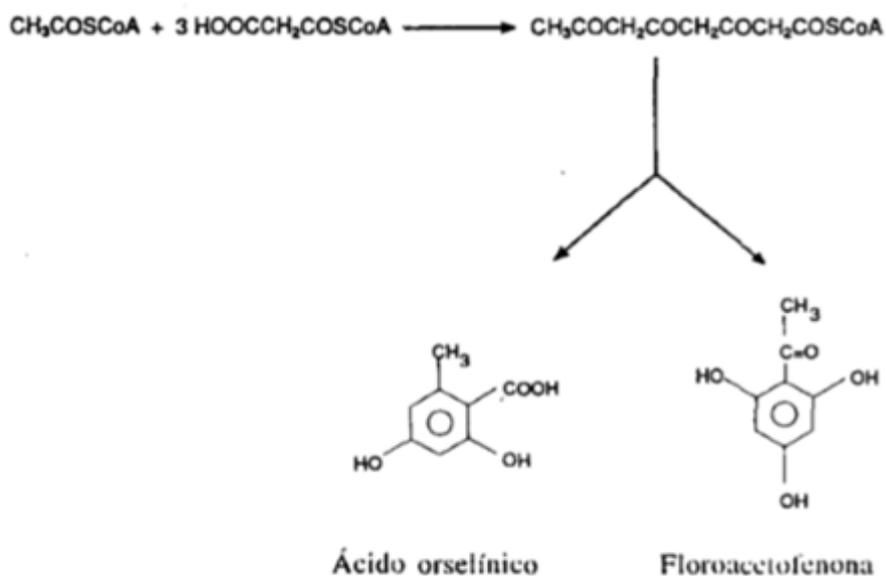


Fonte: ASAHINA; SHIBATA (1954).

Em geral compostos aromáticos comumente presentes em líquens são formados pela esterificação de duas ou três unidades fenólicas, como por exemplo, derivados do ácido orselínico. Duas unidades fenólicas sem substituintes na posição 3 podem formar compostos denominados depsídeos. 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. O ácido orselínico (Figura 11) é a unidade fundamental da biossíntese de depsídeos e depsídonas (MOSBACH, 1973).

Figura 11: Reações biossintéticas de formação de ácido orselínico e floroacetofenona por condensação de acetilSCoA e malonilSCoA.



Os compostos fenólicos também atuam como agentes mutagênicos e carcinogênicos (STICH, 1991). Os efeitos farmacológicos e fisiológicos devem ser originários de suas propriedades antioxidantes, e esta atividade pode estar relacionada a estrutura dos compostos fenólicos. (CAI et al., 2006). Estas diferenças nas atividades antioxidantes podem ser atribuídas a diferenças estruturais quanto a hidroxilações, glicosilações e metoxilações (CAI et al., 2006).

Compostos fenólicos isolados de várias espécies de líquens demonstraram atividades, como inibição da ativação do vírus Epstein-Barr, biossíntese de melanina, crescimento de células animais e microorganismos. Compostos fenólicos monocíclicos, derivados de ácidos orselínicos, atuam como agentes nematocidas (YAMAMOTO et al., 1998). Os orselinatos (substâncias fenólicas derivadas dos ácido lecanórico) obtidos através de reações do ácido com álcool foram avaliadas em ensaios com *Artemia salina*, microorganismos e quanto a atividade antioxidante (GOMES et al., 2006).

Os fenóis podem ser classificados em dois principais grupos: os doadores de elétrons que inibem o crescimento celular pelos substituintes doadores de elétrons e os receptores de

elétrons, através de substituintes receptores de elétrons. Apoptose, captação de radicais, antioxidantes e características pró-oxidantes são os principais mecanismos de ação da atividade antitumoral dos compostos fenólicos e vários estudos quantitativos de estrutura-atividade têm sido realizados (SELASSIE et al., 2005; ODABASOGLU et al., 2005; NANDI; VRACKO; BAGCHI, 2007). De acordo com Thompson et al. (1993), os compostos fenólicos são facilmente oxidados via radical fenoxi para uma quinona mais reativa, que podem posteriormente alquilar proteínas celulares e/ou DNA para induzir citotoxicidade.

O aumento da incidência de câncer pode ser consequência do aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento desta patologia é favorecido também com o envelhecimento do organismo (VERWEIJ; JONGE, 2000). A importância clínica dos agentes antineoplásicos induz a necessidade de estudo sistemático, o que primeiramente deveria ser feito com o uso de classificações químicas de substâncias, levando-se em conta os diferentes grupos funcionais presentes na estrutura das moléculas dos agentes anticancerígenos devido ao processo tumoral depender da maior ou menor exposição aos agentes carcinogênicos. Portanto os avanços recentes no campo da medicina resultam na exploração das atividades biológicas de produtos derivados de líquens tais como o ácido úsnico e alguns estudos sugerem que as substâncias químicas produzidas por esses simbioses forneça uma promissora fonte de futuras terapias de drogas (VERWEIJ; JONGE, 2009).

## 2 REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B.; BHARAT, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**; v. 7, p.1397-1421. 2006.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. Chemistry of Lichen Substances. Japan Society from the **Promotion of Science**. Tokyo, p. 240. 1954.
- BELLAMY, W. T. Prediction of Responses to Drug Therapy of Cancer. **Drug**, v. 44 (5) p. 690-708. 1992.
- BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma** : v. 15(9-10), p. 61-64. 2003.
- BÉZIVIN, C.; TOMASI, F.; LOHÉZIE-LE, D.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**; v. 10, p. 499-503. 2003.
- BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; ROUAUD, I.; DELCROS J. G.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*. **Planta Medica**. v. 70(9), p. 874-877. 2004
- BHATTARAI, H.D.; PAUDEL, B.; HONG, S.G.; LEE, H.K.; YIM, J.H. Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents of lichens from Antarctica. **Journal of Natural Medicine**. v.62, p. 481-484. 2008.
- BLOMER, J.L.; HOFFMAN, W.F. On the origin of the C3-unit in (+) protolichesterinic acid. **Tetrahedron Letters**.p. 4339. 1969.
- BOENTE, P. C.; SAMPAIO, C.; DEL GIGLIO, A. Agentes Antineoplásicos. *In*: SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 8 ed. 2010.
- BRASIL. Instituto Nacional do Câncer -INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acesso em 4 de fevereiro de 2014]. **Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>**
- BRASIL. Instituto nacional do Câncer-INCA. Estimativa 2013/2014. Incidência de câncer no Brasil. [acesso em out 2013]. **Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>**.
- BRASIL. Instituto Nacional do Câncer -INCA. Fisiopatologia do câncer. [Acesso em 4 de dezembro de 2013]. **Disponível em: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>**
- BRASIL. Instituto Nacional do Câncer -INCA..[Acesso em fevereiro de 2013]. **Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=335](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335)**.
- BUCAR, F.; SCHNEIDER, I.; OGMUNSDOTTIR, H.; INGOLFSDDOTTIR, K. Antiproliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. **Phytomedicine**. v. 11, p. 602 - 606. 2004.

BURLANDO, B.; RANZATO, E.; VOLANTE, A.; APPENDINO, G.; POLLASTRO, F.; VEROTTA, L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. **Planta Medica**. v.75, p. 607–613. 2009.

CAI, Y.Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life sciences**; v. 78 p. 2872-2888. 2006.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Em: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**; Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p. 903-949. 1995.

CARVALHO, T.U. Cultura de células animais. In: Benchimol, M.; Attias, M.; Cunha-Silva, N. L.; Carvalho, T.U. Métodos de estudo da célula. Rio de Janeiro. Editoração Eletrônica Fenorte/Uenf, p. 47-58. 1996.

CHABNER, B. A.; RYAN, D. P.; PAZ-ARES, L.; GARCIA-CHABONERO, R.; CALABRESI, P.; Antineoplastic agents. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed) Goodman and Gilman's: **the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-HILL, P. p.1389-1459. 2001.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS pathologic Basis of Disease. 6th. WB Saunders International. **Chapters** v. 1,2,4,6 e 8. 1999.

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

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mausetumoren. Berl. Klin. Wschr. v.28, p.871-874. 1905.

FÁVARO, O.C. N.; OLIVEIRA, M.M.; ROSSINI, A.; KAMARA, C. R.; PINTO, A. V.; PINTO, M.C. Seleção por meio de Células KB de Substâncias e Extratos potencialmente Ativos em Quimioterapia do Câncer. **Anais Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro. v. 62 (3) p. 217-224. 1990.

GALUN, M.; SHOMER-ILAN, A. Secondary metabolic products. In . **CRC Handbook of Lichenology**, V. III, M. Galun (ed.), CRC Press Inc. Boca Raton, p. 3-8. 1988.

GEISSMAN, T.A.; CROUT, D.H. Organic Chemistry of Secondary Metabolism. **Freeman**, San Francisco. p. 592. 1969.

GHORAB, M. M.; RAGAB, F. A.; ALQASOUMI, S. I.; ALAFEEFY, A. M.; ABOULMAGD, S. A. Synthesis of some new pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives of expected anticancer and radioprotective activity. **European Journal Medical Chemistry**, v. 45, p. 171–178. 2010.

GIULIANI, F.; MARCO, A. D.; CASAZZA, A. M.; SAVI, G. Combination Chemotherapy and surgical Adjuvant Chemotherapy on MS-2 Sarcoma and Lung Metastases in Mice. **European Journal of Cancer**. v.15 p.715-721. 1979.

- GOLDIN, A.; SCHEPARTZ, S. A.; VENDITTI, J. M.; DEVITA, V. T. Historical Development and Current Strategy of the National Cancer Institute Drug Development Program. In: *Meth. C. Res.*, v. XVI (5) p. 165-229. 1979.
- GOMES, A. T.; HONDA, N. K.; ROESE, F. M.; MUZZI, R. M.; SAUER, L. Cytotoxic activity of orsellinates. **Zeitschrift Naturforsch**; v. 61 p. 653-657, 2006.
- GULLUCE, M.; ASLAN, A.; SOKMEN, M.; SAHIN, F.; ADIGUZEL, A.; AGAR, G.; SOKMEN, A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Plasmatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. **Phytomedicine**.v. 13 p. 515-521, 2006.
- HALE JR., M. E. **The Biology of Lichens**, 3rd ed. London, Edward Arnold. 1983.
- HIDALGO, M. E.; FERNANDEZ, E.; QUILHOT, W. Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry**. v. 37 p. 1585-1587. 1994.
- HILL, P. H.; TANNOCK, I. F. Introduction: Cancer as a Cellular Disease. In: **The Basic Science of Oncology**. Tannock, I.F.; Hill, R.P. 2<sup>nd</sup> ed. USA: McGraw-Hill. 1992
- HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos liquens. **Quimica Nova**; v. 22 p. 110-125. 1999.
- HONNEGER, R. Morphogenesis. In. *Lichen Biology*, Nash III, T. H. (ed.) 1st. ed. Cambridge, **Cambridge University Press**. 1996.
- HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. Identification of Lichen Substances. **Springer-Verlag, Berlin**. p. 493. 1996.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p. 991. 2006.
- KHODJAKOV, A.; RIEDER, C. L. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. **Journal of Biology**. v. 8 (10) p. 88. 2009.
- KUMAR, K. C. S; MÜLLER, K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. **Journal of Natural Products**.v. 62 p. 821-823. 1999.
- KUMAR, V; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS; COTRAN. **Patologia - bases Patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro, Elsevier. 2005.
- KUMAR, A.; D'SOUZA, S.S.; TICKOO, S.; SALIMATH, B.P.; SINGH, H.B. Antiangiogenic and proapoptotic activities of allyl isothiocyanate inhibit ascites tumor growth *in vivo*. **Integr. Cancer Therapy**. v. 8, p.75-88. 2009.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.. **Principles of Biochemistry**, 5<sup>rd</sup> ed., Worth Publishing: New York. 2011.
- LOEWENTHAL, H.; JAHN, G. Übertragungversuche mit carcinomatöser Mause Ascites flüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und Chemische Einwirkungen. *Ztschr F Krebsforsch*, v.12, p.37-439. 1932.

LUCKNER, M. Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals. 3a ed. **Springer-Verlag, Berlin**. p. 563. 1990.

MADY, E.A. Antitumor and biochemical effects of *Echis coloratus* Crude venon on Ehrlich ascite carcinoma cells in vivo. **Journal of Venon Animals Toxins**, v.8, p.283-296. 2002.

MALUMBRES, M.; BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Natural Revist of Cancer**. v. 9 (3) p. 153-166. 2009.

MAYER, M., O'NEILL, M. A., MURRAYR, K. E.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; CARNEIRO-LEAO, A. M. A.; THOMPSON, A. M.; APPLEYARD, V. C. L. Usnic acid: A non-genotoxic compound with anti-cancer properties. **Anti-Cancer Drugs**. v. 16(8) p. 805-809. 2005.

MARTINS, M. C. B. Aplicações biotecnológicas de compostos obtidos dos líquens 2013. 300p. Tese (Doutorado) Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE. 2013.

MOSBACH, K. Biosynthesis of Lichen Substances. In: The Lichens. Ahmadjian, V. & Hale, M. E. **Academic Press**, New York. p. 523-546. 1973.

MOTA-FILHO, F. O; PEREIRA, E. C. Influência de poluentes atmosféricos em Belo jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1072-1076. 2007.

NANDI, S.; VRACKO, M.; BAGCHI, M. C. Anticancer activity of selected phenolic compounds: QSAR studies using ridge regression an neural networks. **Chemical Biology and Drug Design**. v. 70: p. 424-436. 2007.

NASH III, T.H. Introduction. In: Nash III, T.H.(ed) Lichen Biology. Cambridge: **Cambridge University Press**. p. 1-7. 1996.

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

ODABASOGLU, ASLAN A.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; KARAGOZ, Y.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; Antioxidant activity, reducing power phenolic content of some lichen species. **Fitoterapia**.v. 76 p. 216- 219. 2005.

ÖGMUNDSÓTTIR, H. M.; ZOÉGA, G. M.; GISSURASSON, S.R.; INGÓLGSÓTTIR, K. Antiproliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 50 p. 107-115. 1998.

OLORIS, S.C.S.; DAGLI, M.L.Z.; GUERRA, J.L. Effect of bcarotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Science**. v. 71, p.717-24. 2002.

PAL, S.; CHOUDHURI, T.; CHATTOPADHYAY, S.; BHATTACHARYA, A.; DATTA, G.K.; DAS, T. & SA, G. Mechanisms of curcumininduced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. **Biochemistry and Biophysics Research Common**. v.288, p.658-65. 2001.

- PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.A.; FAVARE, R.C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 23, p. 497-507. 2001.
- PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.O.; SOUZA, W.R. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior Immunology**. v.17, p. 43-54. 2003.
- PARKING, D.M.; BRA, Y.F.I.; DEVESA, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of cancer**. v.37, suppl 8, p.4-66. 2001
- PESSOA, C. Determinação do mecanismo de ação citotóxica de alguns compostos extraídos de plantas do nordeste brasileiro, 2000. 129 f Dissertação de mestrado - curso de pós-graduação em farmacologia, Fortaleza. 2000.
- PONDER, B.A.J.; JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L.; WEATHERALL, D.J. Direct examination of the clonality of carcinogen-induced epithelial dysplasia in chimeric mice. **Journal of Natural Cancer Institute**. v. 77 p. 967. 1986.
- POTT, P. Cirurgical observations relative to cancer of the scrotum. In: HOLLEB, A; RANDERS-PEHRSON, M.(Ed) Classics in oncology. New York: **American cancer society**, P 9-17. 1987.
- RAJESHKUMAR, N.V.; JOY, K.L.; KUTTAN, G.; RAMSEWAK, R.S.; NAIR, M.G. & KUTTAN, R. Antitumour and anticarcinogenic activity of Phyllanthus amarus extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81, p. 17-22. 2002
- RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. In: **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 904. 2004.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Biologia Vegetal 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2007
- REN, D.L.; WANG, J.Z.; NODA, H.; AMANO, H.; OGAWA, S. The effects of an algal polysaccharide from Gloiopeltis tenax on transplantable tumors and immune activities in mice. **Planta Medica**; v. 61, p. 120-125. 2009
- RICHARDSON, D.S.H. Medicinal and other economic aspects of lichens; In **CRC Handbook of Lichenology**, V.III. Ed. CRC Press, Flórida, p.93. 1988.
- ROSSI, M; HANNINEN, M.L. *Helicobacter spp.* other than *H. pylori*. *Helicobacter*. 17 Suppl v. 1, p. 56-61. 2012.
- SANTOS JR, A.R.; WADA, M.L.F. Diferenciação celular. In: **A célula**. São Paulo: Editora Manole Ltda. 2005
- SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology and Therapeutics**.v.1, p. 411-435. 1977.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; TAPIA, A.; LIMA, B.; PERTINO, M.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.; ROJAS DE ARIAS A, FERESIN GF; A new antifungal and antiprotozoal

depside from the andean lichen *Protousnea poeppigii*. **Phytotherapy Research**. v. 22(3) p. 349–355. 2008.

SELASSIE, C.D.; KAPUR, S.; VARMA, R.P.; ROSARIO, M. Cellular apoptosis and cytotoxicity of phenolic compounds: Quantitative structure-activity relationship study. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 48 p. 7234 – 7242. 2005.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**. v. 274 (5293), p. 1672-1677. 1996.

SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M. **Chemical and Pharmaceutica Bulletin**; v. 16 p. 2362. 1968.

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

SIEBER, O. M, HEINIMANN K, TOMLINSON IPM. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. **Nature Review**. v. 3 p. 701-708. 2003.

SILVA, A. E.; SANTOS, F.G.A.; CASSALI, G.D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. v.58, p.658-661. 2006

STICH, H. F. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. **Mutation Research**. v. 259 p.307-324. 1991.

THOMPSON, D. C.; THOMPSON J. A.; SUGUMARAN, M.; MODEUS, P. Biological and Toxicological Consequences of Quinone Methide Formation. **Chemico-Biological Interactions**. v. 86, p. 129-162. 1993.

TURK, H; YILMAZ, M; TAY, T.; TURK, A. O; KIVANC M; Anti- microbial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin, and olivetoric acid constituents. **Z Naturforsch** v. 61(7–8) p. 499–507, 2006.

VALADARES, M.C.; QUEIROZ, M.L.S. The effect of a titanocene dichloride derivative, Ti IV (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> NCS<sub>2</sub>, on the haematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. **European Journal of Pharmacology**. v.439, p.35–42. 2002.

VERWEIJ, J.; JONGE, M.J.A. Achievements and future of Chemoterapy. **European Journal of Cancer**. v. 36 p. 1479-1487. 2009.

VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Lichen Enzymology. In. CRC Handbook of Lichenology, v.I. Galun, M.(ed.) CRC Press Inc. p. 239-284. 1988.

VICENTE, C., CAMBON C.; GARCIA-JUNCEDA, E. Kinetic comparison between soluble and polyacrylamide-entrapped depsidone ether hydrolase from the lichen *Pseudevernia furfuracea*. **Planta Science**. v. 85 p. 143-149. 1992.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**: a vida em nível molecular. 2. ed. Porto Alegre: Artmed. 2006.

WESTPHAL, M.; HILT, D.C.; BORTEY, E.; DELAVAUULT, P.; OLIVARES, R.; WARNKE, P.C.; RAM, Z. A phase 3 trial of focal chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel® wafers) in patients with primary malignant glioma. **Neuro-oncology**. v. 5(2). 2003.

XIE ,F.; H. ZHAO; L. ZHAO; L. LOU; Y. HU, Synthesis and biological evaluation of novel 2,4,5-substituted pyrimidine derivatives for anticancer activity, **Bioorganism Medical Chemistry Letters**. v. 19, p. 275–278. 2009.

YAMAMOTO, Y.; KINOSHITA, Y.; MATSUBARA, H.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, K.; KUROKAWA, T.; YOSHIMURA, I. Screening of biological activities and isolation of biological-active compounds from lichens. *Recent Res. Devel in Phytochemistry*. p. 23-34. 1998.

YAMAMOTO, Y.; MIURA, M.; KINOSHITA, Y.; HIGUCHI, M.; YAMADA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter induced Epstein-Barr virus activation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 43(8) p. 1388-1390, 2000.

YONEDA, K.; YAMAMOTO, T.; UETA, E.; OSAKI, T. The inhibitory action of BOF- A2, a 5-fluorouracil derivative, on squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**. v. 25, p.17- 25, 1999.

YOSHIMURA, I., KINOSHITA, Y., YAMAMOTO, Y., HUNECK, S.; YAMADA, Y. Analysis of Secondary Metabolites from Lichen by High Performance Liquid Chromatography with a Photodiode Array Detector. **Phytochemistry Anal** v. 5, p. 197-205. 1996.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico de *Ramalina complanata* frente a diferentes tumores experimentais

#### 3.2 Específicos

- Isolar e purificar o ácido salazínico a partir da *R. complanata*
- Caracterizar quimicamente o ácido salazínico purificado
- Realizar ensaios *in vitro* com o ácido salazínico purificado frente a diferentes linhagens celulares.
- Realizar ensaios de toxicidez aguda
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do ácido salazínico purificado de *R. complanata* frente aos tumores: Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich

#### 4 ARTIGO

**Artigo: Atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (liquen).**

.



Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Ethnopharmacology* no formato *Original Research Article* (FI: 2.755; QUALIS CB II: B1).

**Atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (liquen).**

Silva, T.D.S.<sup>a</sup>; Oliveira, J.V.<sup>b</sup>; Silva, C.R..<sup>a</sup>; Martins, M.C.B.<sup>a</sup>; Pereira, E.C.<sup>c</sup>; Falcão, E.P.S.<sup>b</sup>; Santos, N.P.S.<sup>b,d</sup>; N.H. Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Química de Produtos Naturais. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Biotecnologia de Fármacos, Centro acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Geografia Ambiental (LAGEAM), Departamento de Ciências Geográficas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

<sup>d</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

\*Autor para Correspondencia

Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Professor Moraes Rego, s/n, B. Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-Pernambuco, Brasil. 55 81 21268541, 55 81 21268540 (219), e-mail: nicacio\_hsilva@hotmail.com

## Resumo

Líquens são associações simbióticas entre um fungo e uma ou mais algas. Estes organismos produzem no seu metabolismo secundário substâncias de natureza fenólica que apresentam diversas atividades biológicas tais como antimicrobianas, antineoplásicas, citotóxicas entre outras. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. O ácido salazínico foi isolado por cristalização. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo método colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) utilizando a linhagem celular indiferenciada *HeLa* (adenocarcinoma epidermóide de Cólono de útero) e células ascíticas do tumor experimental Sarcoma-180 (S180) e Carcinoma de Ehrlich (CE). Os ensaios antitumorais foram realizados frente aos tumores sólidos S180 e CE. Células dos tumores ascítico ( $5,0 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) foram inoculadas via subcutânea (s.c) na região axilar direita do animal. O tratamento teve início 24 h após inoculação por 7 dias consecutivos. Injeções de soluções do ácido salazínico purificado foram administrados intraperitonalmente na dose 26,5 mg/kg. O efeito citotóxico do ácido salazínico purificado foi de forma dose dependente nas concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL. A dose capaz de inibir 50% da proliferação celular (CI<sub>50</sub>) foi 39,95 µg/mL frente a linhagem de *HeLa*, 31,65 µg/mL, para as células do S180 e 35,17 µg/mL para as células de CE. No estudo da atividade antitumoral observou-se uma inibição de 64,36% e 73,22% nos pesos dos tumores S180 e CE respectivamente, quando comparados com o 5-FU (controle positivo). Na análises histopatológicas foram evidenciadas uma redução significativa dos valores dos índices de mitoses nos tumores tratados com ácido salazínico purificado. A inibição da divisão celular foi de 29,45% para o Carcinoma de Ehrlich e 29,37% para Sarcoma 180. Estes resultados indicam que o ácido salazínico purificado apresentou um potencial antitumoral promissor frente aos tumores experimentais de Sarcoma- 180 e Carcinoma de Ehrlich.

Palavras chaves: ácido salazínico, *Ramalina complanata* (Sw.) Ach., atividade antitumoral

## 1. Introdução

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (Inca, 2013).

A busca de substâncias promissoras por meio de *screening* racional de produtos naturais como fonte de substâncias antineoplásicas como subsídio alternativo para o tratamento de câncer têm norteado inúmeras pesquisas para obtenção de novos fármacos (Magalhães, 2005).

Estudos revelaram que 61% das pequenas moléculas introduzidas como fármacos foram derivadas de produtos naturais. Este valor sobe para 74% na área antitumoral (Rouhi; Washington, 2003). Pesquisas norte-americanas mostraram que 118 das 150 drogas mais prescritas foram originalmente derivadas de organismos vivos: 74% de plantas, 18% de fungos, 5% de bactérias e 3% de vertebrados (Assad; Ferro, 2005).

Nas últimas décadas, o câncer vem se apresentando como um problema de saúde pública mundial, despertando o interesse urgente na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral. A descoberta de medicamentos para o câncer está relacionada a incontáveis pesquisas, sendo que cerca de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância, sua origem relacionada à uma fonte natural. Dada a biodiversidade do país, as fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (Costa- Lotufo et al., 2010).

Algas, fungos, líquens, macrofungos e plantas superiores constituem importantes fontes para pesquisas de novas moléculas bioativas, ou através do uso direto de metabólitos secundários ou empregando compostos derivados por biossíntese, produzidos no intuito de aumentar a efetividade e a absorção ou diminuir a toxicidade (Cragg; Newman, 2005)

Muitas substâncias isoladas de líquens apresentaram atividades biológicas e algumas demonstraram ser fonte promissora de drogas antitumorais. (Boustie; Tomasi; Grube, 2011). Na avaliação da atividade antiproliferativa, os testes de citotoxicidade *in vitro* com células neoplásicas são os mais amplamente utilizados (Holbeck, 2004) por causa da possibilidade de avaliação de grande número de substâncias em pouco tempo (Suggitt et al., 2005). Pode-se também avaliar a resposta das substâncias no organismo vivo, possibilitando simular o

comportamento das drogas frente aos intempéries tais como: luz, umidade e temperatura. Portanto este trabalho visa avaliar a atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico purificado de *Ramalina complanata* (líquen) como fonte promissora de droga antitumoral.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

O ácido salazínico (ASZP) padrão foi obtido do laboratório de Química de Produtos Naturais/UFPE. O 5-Fluorouracil (5-Fu), Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). O ácido acético, metanol, acetona e DMSO foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), todos de grau analítico. O Meio de cultura RPMI (Invitrogen®) foi adquirido da Vitrocell. As células do Sarcoma-180 (S180) e do Carcinoma de Ehrlich (CE) foram fornecidas pelo Departamento de Antibióticos da UFPE, Brasil. A linhagem indiferenciada de células *HeLa* foi obtida a partir do banco de células de Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Os camundongos adultos machos albinos swiis, foram obtidos do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-(LIKA), UFPE, Brasil.

### 2.2 Coleta e identificação da *Ramalina complanata* (Sw.) Ach.

A *R. complanata* (500g) foi coletada no Município de Saloá, localizado na Mesorregião do Agreste de Pernambuco, Microrregião de Garanhuns. RPPN (Reserva Particular de Patrimônio Natural) Fazenda Brejo - Latitude - 8°58'32,70" e Longitude - 36°41'01,63".

O líquen foi identificado pelas características morfológicas e químicas do talo pelo Dr. Ermerson Luiz Gumboski - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS). Uma exsicata da *R. complanata* (Sw.) Ach. foi depositada no Herbário UFP - Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de tombamento UFP 74.408.

### 2.3 Extração e purificação do ácido salazínico da *R. complanata*

As amostras líquênicas de *R. complanata*, 25 g, foram submetidas à extração com 50 mL de acetona por esgotamento a frio, para obtenção do extrato orgânico. Ao extrato, previamente pesado, 9,8 gramas, foi adicionado clorofórmio e submetido a cinco lavagens sucessivas em funil G4. O resíduo foi dissolvido em 10 mL de acetona e centrifugado a 3000 RPM por 5 minutos, o procedimento foi repetido três vezes. O pó amorfo obtido foi submetido as análises por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN  $H^1$ ) e infravermelho (IV), (ASAHINA; SHIBATA, 1954).

### 2.4 Caracterização química do ácido salazínico de *R. complanata*

#### 2.4.1 Cromatografia de camada delgada (CCD)

O extrato acetônico, o ácido salazínico purificado e o padrão do ácido salazínico foram submetidos a CCD ascendente, unidimensional (Culberson, 1972). Amostras foram aplicadas sobre a placa de sílica Gel PF<sub>254+366</sub> Merk®, e desenvolvida no sistema de solventes A (tolueno/dioxano/ácido acético, 90:25:4, v/v/v). Após a evaporação dos solventes, o cromatograma foi visualizado sob luz UV curta e longa (254 e 366 nm), e, posteriormente, pulverizado com ácido sulfúrico a 10%, e aquecido a 50 °C por 30 minutos. Os resultados foram avaliados mediante comparação dos valores do fator de retenção (Rf) do extrato acetônico, do ácido salazínico purificado e do padrão de ácido salazínico.

#### 2.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os ensaios em CLAE seguiram a metodologia de Vicente; Legaz (1983), em cromatógrafo líquido Hitachi modelo 655-11 acoplado a detector de UV da marca CG, modelo 437-B a 254 nm, coluna C18 de fase reserva, usando metanol/água/ácido acético (80:19,5:05, v/v/v) como fase móvel, em sistema isocrático. O extrato acetônico, o ácido salazínico purificado e o padrão do ácido salazínico (0,1 mg/mL) foram dissolvidos em metanol espectroscópico e injetados (20  $\mu$ L) na coluna. Os resultados foram avaliados

mediante tempo de retenção (TR) das substâncias na coluna e, área dos picos cromatográficos respectivamente.

#### 2.4.3 Espectroscopia do Infravermelho (IV)

O espectro de infravermelho obtido a partir do ácido salazínico purificado, foi realizado em espectrômetro acoplado a transformador Bruker Fourier (modelo IF 566), pela técnica de pastilhas de KBr, sendo utilizado na resolução de  $4.0\text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.4.4 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Protóns $\text{H}^1$

O espectro em  $\text{RMNH}^1$  do ácido salazínico purificado foi registrado em espectrofotômetro Varian Unity Plus a 300 MHz, utilizando  $\text{DMSO}-d_6$  como solvente em tubos de 5 mm a temperatura ambiente realizado no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### 2.5 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células do Centro Acadêmico de Vitória/ UFPE utilizando as células adenocarcinoma epidermoide de cólon de útero (*HeLa*), em fase exponencial de crescimento. Também foram utilizadas células dos tumores experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. As células foram mantidas em estufa (Sedas, Milão-Itália) a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  e 80% de umidade em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/ml) e 1% de L-glutamina 200Mm (Santos et al., 2005)

#### 2.5.1 A avaliação da citotoxicidade

O estudo da atividade citotóxica foi realizado pelo método de cultura de tecidos. A viabilidade celular, foi determinada utilizando o corante vital Azul de Tripán 0,4% p/v, em tampão fosfato (PBS).

Uma suspensão celular ( $10^5$  células/ml) foi distribuída em placa de cultura com 96 poços (220  $\mu$ l/ poço). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa (Sedas, Milão-Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h de incubação o ácido salazínico purificado foi dissolvido em DMSO e DMEM, e adicionado à placa de cultura (22  $\mu$ l/poço) obtendo-se as concentrações finais no poço de 40; 20; 10; 5  $\mu$ g/mL. Foram realizados controles com DMSO e DMEM. 72 h após o tratamento, os efeitos citotóxicos das amostras testes foram avaliados de acordo com o protocolo do National Câncer Institute (NCI) (Geran *et al.*, 1972), utilizando o método colorimétrico de MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).

A leitura da absorbância foi realizada em leitor de Elisa, utilizando comprimento de onda de 490 nm. A média das absorbâncias do grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade. Com isso, os resultados foram avaliados pela determinação da inibição da proliferação celular em relação ao controle. Os resultados foram apresentados pela média  $\pm$  D.P.

## 2.6 Ensaios de atividade antitumoral

### 2.6.1 Animais experimentais

Os animais utilizados foram camundongos albinos swiss, (*Mus-musculus*), machos com idade de 35 a 60 dias e peso médio de 30,0 g, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-Lika-UFPE, considerando-se peso, sanidade e aspecto geral. Os animais foram mantidos no biotério do Centro Acadêmico de Vitória/UFPE à temperatura de 25 °C  $\pm$  2 °C, sob ciclo dia/noite (12h luz e 12h escuro), com livre acesso de água e alimento durante o experimento e distribuídos em grupos segundo delineamento experimental.

### 2.6.2 Delineamento experimental do estudo antitumoral *in vivo*

Os tumores experimentais, Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich, foram cedidos pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os tumores foram mantidos em camundongos albinos swiss machos na forma ascítica com frequência de manutenção de 7 dias. Células do tumor ascítico ( $5,0 \times 10^6$  células ml<sup>-1</sup>) foram inoculadas via subcutânea (s.c) na região axilar direita do camundongo desenvolvendo-se o tumor sólido.

O tratamento teve início 24 h após inoculação e foi realizado por 7 dias consecutivos. Injeções de soluções do ácido salazínico purificado foram administrados intraperitonealmente numa dose equivalente a 26,5 mg/kg de peso vivo do animal. A solução de ácido salazínico purificado foi preparada em solução estéril salina a 0,9% contendo Tween 80 a 0,05% (v/v).

Os animais do grupo controle negativo foram tratados com solução salina a 0,9% estéril + tween, assim como os animais do grupo controle positivo tratados com 5 - Fluorouracil (20mg/kg de peso corporal) em idênticas condições. Foram utilizados para a experimentação *in vivo* grupos formados por 30 animais divididos igualmente entre os tratamentos, ou seja, grupo 1: solução salina (10), grupo 2: 5-FU (10) e grupo 3: ácido salazínico purificado (10).

Um dia após término do tratamento, os animais foram anestesiados com urethane (1,25g/kg), sendo realizadas coletas de sangue por punção cardíaca para análises hematológicas, e consecutivamente foram sacrificados por overdose de anestésico. Tumores e órgãos (fígado, rins e baço) foram dissecados e fixados em solução de formol e em seguida submetidos a análises histopatológicas.

A inibição tumoral foi determinada a partir do peso médio dos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle não tratado:  $IT\% = C - T / C \times 100\%$ , onde C é o peso médio dos animais do grupo controle (solução salina) e T corresponde ao peso médio dos animais dos grupos tratados (ácido salazínico purificado e/ou 5-Fluorouracil).

Para o cálculo da média dos pesos dos tumores dos grupos controle foi desconsiderado aqueles cujos pesos corresponderam a 0,39 g ou menos, denominados "no-takes" (Geran et al, 1972).

Os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE (Recife, Brasil), Processo nº 23076.016437/2013-18.

### 2.6.3 Toxicidade aguda em camundongos

O ensaio foi realizado através da toxidez aguda, seguindo a metodologia proposta pelo Karber; Berhrens (1964) e modificado por Berlion (1988), onde o animal recebe um única dose do ácido salazínico purificado. Esta determinação foi realizada seguindo duas considerações: Um estudo preliminar e um estudo definitivo. Os animais utilizados foram camundongos albinos swiss, divididos em grupos de 4 lotes com 4 animais cada. O ácido salazínico purificado foi administrado por via intraperitoneal. Na fase preliminar, os animais

foram divididos em grupos de 4 animais e receberam o ácido salazínico purificado (ACSZP) numa dose única, em concentrações crescentes (tabela 2), na sequência de uma progressão geométrica com uma razão comum de 2,0.

O objetivo foi determinar a dose mais elevada não letal (D1) e a menor dose letal (D2). Uma vez que estes dados foram obtidos, inicia-se a fase definitiva. Os animais receberam doses do composto variando entre D1 e D2, depois de uma progressão geométrica com uma razão comum de 1,3. Os animais foram então observados durante quatro horas e monitorados por períodos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados finais foram determinados utilizando a seguinte fórmula:  $DI_{50} = Df - \Sigma (ab) / n$ ; onde, Df = menor dose letal, a = diferença entre duas doses consecutivas, b = número de animais mortos entre duas doses consecutivas, n = número de camundongos por lote.

#### 2.6.4 Análise histomorfométrica dos tumores/ Determinação do índice mitótico

Posterior ao sacrifício o tumor dos animais foi removido, fixado em solução tamponada de formalina a 10% para posterior inclusão em parafina. Os cortes, realizados em micrótomo ajustado para 4  $\mu$ m, foram submetidos à técnica de coloração Hematoxilina-Eosina (H.E.). As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por câmera digital (Moticam 3.0) acoplada ao microscópio óptico (Nikon-E200), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 10 campos por lâmina com aumento final de 400X. As fotomicrografias das lâminas foram avaliadas através do software Image J versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.), onde em cada uma das amostras histológicas foram avaliados o número de mitoses (anáfase, telófase e prófase) por campo, determinando a partir destes a média do número de mitoses por cada imagem de cada tumor dissecado. Para confecção do gráfico, os valores obtidos foram normalizados para o controle, igual a 100%.

### 2.6.5 Análises hematológicas

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca dos camundongos tratados com solução salina, 5-FU e ACSZP foram submetidas as determinações de índices hematimétricos para que fossem analisados o hematócrito, número total de hemácias e leucograma (contagem total e diferencial de leucócitos) afim de serem observados alterações hematológicas.

### 2.6.6 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD). A significância estatística foi determinada por análise de variância one-way ANOVA seguido de testes da Turkey.  $P < 0,05$  análises significantes. Todas as análises foram realizadas utilizando software Prisma (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, versão 5.01).

## 3. Resultados

### 3.1 Caracterização química do ácido salazínico purificado (ACSZP)

O extrato acetônico obtido da *R. complanata* coletada em Saloá/PE apresentou como quimiotipo principal o ácido salazínico (ACSZP). O cromatograma em camada delgada (CCD) demonstrou a presença de uma banda, compatível com a banda do padrão de ácido salazínico (ACSZ) (Rf 0,173), bem como o ACSZ purificado (Rf 0,173) além de outras bandas correspondentes a possíveis compostos fenólicos não identificado (Rf 0,79 e Rf 0,92) (Fig. 1).

Estes resultados foram confirmados através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Fig. 2), cujo tempo de retenção (TR), do ACSZ contido no extrato acetônico foi de 3,2 min (Fig. 2 A), e o ACSZ purificado foi de 3,2 min (Fig. 2 B), onde os mesmos condizem com o tempo de retenção do padrão do ACSZ (TR 3,2 min), sendo o percentual de pureza superior a 98% (Fig. 2 C).

As análises dos espectros de infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMNH<sup>1</sup>) confirmaram a estrutura química do ácido salazínico purificado, resultando

nos seguintes dados: IV (KBr)  $\lambda$   $\text{cm}^{-1}$ : 3452 (-OH); 2926 (R-O-R); 1769 (anel lactônico); 1727 (-CO-O-); 1666 (Ar-CHO); 1574 e 1438 (C=C); 1296 e 1077 (duas bandas correspondentes ao éster), RMNH<sup>1</sup> (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ H: 1,22 (3H, s, Me-9), 3,35 (H<sub>2</sub>O, s, DMSO-d<sub>6</sub>), 4,63 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-8'), 6,87 (1H, s, H-9), 8,31 (1H, s, Ar-OH-2'), 10,42 (1H, s, Ar-CHO-8), 10,04 (1H, s, Ar-OH-4) (Fig. 3).

### 3.2 Estudo da Viabilidade celular

#### 3.2.1 Viabilidade das células

A Fig. 4 demonstra o percentual de viabilidade das células *HeLa*. As Fig. 5 e 6 demonstram a ação citotóxica do ácido salazínico purificado frente aos tumores ascíticos experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich respectivamente.

As células *HeLa* quando incubada com diferentes concentrações do ácido salazínico (40, 20, 10 e 5 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )) apresentou um efeito dose dependente, revelando uma expressiva redução de 48,1% na proliferação celular na concentração de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 4). Enquanto nas concentrações de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentou inibição no crescimento de 30,12%, 12,66% e 7,17%, respectivamente.

Por outro lado, quando as células do Sarcoma 180 (Fig. 5) foram tratadas com o ácido salazínico purificado nestas mesmas concentrações 40, 20, 10 e 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foram evidenciadas relevantes inibições no crescimento celular de 62,50%, 30,76%, 19,68% e 11,62%, respectivamente. Estes dados apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes concentrações testadas.

Também nas células do tumor experimental ascítico Carcinoma de Ehrlich (Fig. 6) foi possível notar uma significativa redução na viabilidade celular (49,18%) quando as células foram tratadas na concentração de 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ácido salazínico purificado. Avaliando as demais concentrações testadas 20, 10, 5 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) também foi observada relevantes inibições de 39,97%, 28,54% e 15,71% respectivamente.

Comparando estes resultados de citotoxicidade destas células testadas frente ao controle positivo 5-FU observa-se que o ácido salazínico purificado foi mais ativo na redução da proliferação celular frente as células de Sarcoma 180 na concentração de 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Os percentuais de inibição do 5FU foram 11,98%; 16,91%; 20,25%; 22,93% para as células de Sarcoma-180 e 2,22%; 3,2%; 16,55% e 32,31% frente as células de Carcinoma de Ehrlich, respectivamente, nas mesmas doses testadas (5; 10; 20; 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Com as concentrações do ácido salazínico purificado e 5-Fluorouracil testadas foram calculados os valores de  $CI_{50}$  baseados nos perfis dose-resposta obtidos na viabilidade celular. Assim a redução na viabilidade celular em 50% células *HeLa* foi 39,95  $\mu\text{g/mL}$ . Em contrapartida quando analisadas a viabilidade do composto frente as linhagens de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich obteve-se uma  $CI_{50}$  de (31,65 e 35,17)  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Por outro lado a  $CI_{50}$  não foi determinada quando estas células foram tratadas com o controle positivo 5FU.

### 3.3 Atividade antitumoral *in vivo*

#### 3.3.1 Avaliação da Inibição tumoral de camundongos swiss implantados com tumores experimentais Sarcoma180 e Carcinoma de Ehrlich tratados com ácido salazínico purificado.

O ácido salazínico purificado demonstrou resultados promissores quanto a atividade antiproliferativa *in vitro*, para as linhagens Sarcoma 180, *HeLa* e Carcinoma de Ehrlich, tornando-se bastante relevante avaliar esse efeito *in vivo*. Após a administração do ácido salazínico purificado na concentração de 26,5 mg/kg (10% da  $DL_{50}$ ) de acordo com a tabela 2, os animais foram observados e avaliados quanto aos sinais físicos e comportamentais nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Decorrido esse tempo não houve ocorrência de reação adversa tais como: piloereção, respiração ofegante ou tremores. Tanto os animais tratados quanto os animais do grupo controle (negativo (solução salina 0,9%) e positivo (5 -FU)) apresentaram comportamento normal.

#### 3.3.2 Média dos pesos dos animais com sarcoma após 7 dias de tratamento

Durante o tratamento foram mensurados o peso de todos os animais a fim de verificar quaisquer alterações com relação a este parâmetro conforme demonstrado nas Fig. 7 e 8. Não foram observadas mudanças significativas na massa corporal dos camundongos de um mesmo grupo. A diferença de peso dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos deve-se à maneira como eles foram agrupados, onde animais de massas próximas foram reunidos no mesmo grupo, não refletindo erros, uma vez que a dose utilizada no tratamento foi realizada de acordo com o peso dos animais, fazendo com que o tratamento fosse dose/peso dependente.

### 3.4 Avaliação do peso dos tumores e inibição tumoral frente aos tumores Sólidos Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich.

A avaliação do peso dos tumores (Fig. 9 e 10) e inibição tumoral (Fig. 11 e 12), nos animais com Sarcoma 180 (Fig. 9) e Carcinoma de Ehrlich (Fig. 10) foi realizada comparando-se os diferentes grupos de tratamento solução salina (controle negativo), 5-Fluorouracil (controle positivo) e o ácido salazínico purificado. Após o tratamento, houve uma mudança no peso de tumores, sendo observada uma maior redução no peso do tumores do grupo tratado com ácido salazínico purificado quando comparado ao grupo controle positivo e negativo. Todos os animais sobreviveram ao final do tratamento sem alterações clínicas ou comportamentais.

Os animais do grupo controle negativo (salina) exibiram tumor com uma massa média em gramas de  $4,4 \pm 0,7$  e de  $4,56 \pm 0,64$  para o Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich respectivamente. Enquanto os animais tratados com ácido salazínico purificado apresentaram uma massa tumoral em gramas de  $1,57 \pm 0,38$  e de  $1,12 \pm 0,17$  respectivamente para o Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich, quando comparado ao 5-FU ( $3,94 \pm 0,45$ ) Sarcoma 180 e 5-FU ( $3,93 \pm 0,41$ ) Carcinoma de Ehrlich. Estes resultados demonstram que o ácido salazínico purificado evidenciou um maior efeito regressivo na massa tumoral inclusive em relação ao 5-Fluorouracil.

Os animais tratados com ácido salazínico purificado apresentaram uma inibição satisfatória, 64,36%, para o Sarcoma 180 e 73,22% para o Carcinoma de Ehrlich, mostrando-se de acordo com os protocolos do NCI que consideram como satisfatórios os resultados cujo percentual de inibição tumoral apresentam-se acima de 60%. Enquanto o grupo tratado com 5-Fluorouracil apresentou uma inibição de 14,47% e 10,22% respectivamente para o S180 e CE (Fig: 11 e 12).

### 3.5. Determinação do Índice Mitótico (IM)

A análise histológica foi realizada com os tumores sólidos (Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich) através da técnica de H.E. Foi realizada uma análise morfológica e contagem das mitoses (Fig. 13A), a fim de se determinar o índice mitótico nos grupos estudados.

Independente do grupo estudado, o tumor invadiu a musculatura e o tecido ósseo ocorrendo também depósito de gordura. Foram observadas áreas de necrose e hemorragia. As células neoplásicas apresentaram-se arranjadas predominantemente em padrão sólido, pleomórficas, grandes, com citoplasma abundante e sem bordas definidas. Os núcleos apresentaram-se hipercromáticos, grandes, variando de ovais a alongados. Foram observadas um grande quantidade de mitose, algumas atípicas (Fig. 13B)

A inibição da divisão celular para o Carcinoma de Ehrlich foi analisada através dos valores dos índices mitóticos (Fig. 14) demonstrando que os animais tratados com ácido salazínico purificado apresentaram uma maior inibição do número de mitoses, 29,45%, quando comparado ao controle.

Do mesmo modo que a análise da inibição tumoral realizada a partir da contagem de mitoses presente em lâminas de Sarcoma 180 (Fig. 15) evidenciaram que os animais tratados com ácido salazínico purificado apresentaram uma menor número de mitoses, 29,37%, quando comparado ao controle. Em contra partida não houve diferença significativa entre o ácido salazínico purificado e o 5-FU.

### 3.6. Determinação dos parâmetros biológicos e hematológicos

#### 3.6.1 Análises hematológicas de camundongos albinos Swiss implantados com tumor sólido Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich.

De acordo com os parâmetros biológicos para camundongos portadores do tumor sólido Carcinoma de Ehrlich (Tabela 3) e Sarcoma 180 (Tabela 4) quando comparados a solução salina aos demais grupos tratados em relação ao peso de órgãos, tanto o fígado quanto o baço e o rins não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Houve um aumento tanto no número de plaquetas quanto no número de leucócitos (Tabela 5), quando comparados o ácido salazínico purificado ao 5-FU, sendo o aumento de leucócitos (\*\*\*) três vezes mais significante para o ácido salazínico. Porém quando comparados o número de leucócitos do controle com o 5-FU (controle x 5-FU)\* apresentou-se menos significante. Os demais grupos analisados não foram estatisticamente significantes.

Em relação aos parâmetros hematológicos do tumor sólido Carcinoma de Ehrlich (Tabela 6), foram comparados através do teste de Turkey ( $p < 0,05$ ) os grupos entre si, sendo notada variações que estão evidenciadas através de (\*) e quanto maior a quantidade de asterisco, mais significante será a variação frente ao composto analisado.

Os parâmetros hematológicos na avaliação de animais implantados com este tumor mostraram-se significantes para o RDW indicando que houve uma redução do valor deste parâmetro no grupo tratado com ACSZP, quando comparado ao 5-FU e com a salina (5-FU x ACSZP)<sup>\*\*\*</sup>, (salina x ACSZP)<sup>\*\*\*</sup>, o mesmo acontece com os valores de hemoglobina (5-FU x ACSZP)<sup>\*\*\*</sup>,(salina x ACSZP)<sup>\*\*</sup>. Em relação as Plaquetas todos os grupos analisados foram significantes, quando comparada salina ao ácido foi evidenciado uma diminuição no número de plaquetas (Salina x ACSZP)<sup>\*\*\*</sup>,(5-FU x salina)<sup>\*\*</sup>, (5-FU x salina)<sup>\*\*\*</sup>. O número de leucócitos apresentou-se muito maior nos grupos tratados com salina quando comparados com 5-FU e ACSZP respectivamente (5-FU x salina)<sup>\*\*\*</sup>, (salina x ACSZP)<sup>\*\*\*</sup>.

#### 4. Discussão

Estudos relevam a versatilidade e importância biológica dos líquens, e sua ampla distribuição no Brasil. Para este estudo o ácido salazínico foi isolado da *R. complanata* coletado no município de Saloá, Mesorregião do Agreste de Pernambuco.

A padronização e aperfeiçoamento de procedimentos CCD analíticos utilizados para detectar e comparar os metabólitos líquênicos encontrados nesta espécie foi relatado por Culberson e colaboradores (Culberson, 1972). A CCD obtida dos extratos orgânicos da *R. complanata* foi avaliada através do fator de retenção (Rf) (Culberson, 1976; Nourish et al., 1976). Na análise em cromatografia líquida de alta eficiência, através de um sistema isocrático foram visualizados picos correspondentes ao padrão de ácido salazínico utilizado. Conforme Culberson e Culberson (Culberson, 1978; Lumbsch; Elix, 1985), métodos isocráticos produzam resultados satisfatórios, uma vez que extratos orgânicos de líquens contêm metabólitos de ampla hidrofobicidade (Feige et. al., 1986).

De acordo com nossos resultados, utilizando métodos analíticos cromatográficos e espectrais de RMNH<sup>1</sup>, o ácido salazínico constitui-se, portanto como composto majoritário desta espécie de líquen, *Ramalina complanata* (Sw.) Ach., estes dados estão compatíveis com a literatura (Huneck; Yoshimura, 1996).

A determinação da atividade citotóxica tem se mostrado eficaz na descoberta de novos agentes antitumorais (Cragg; Newman, 2005).

Neste estudo o perfil citotóxico foi avaliado através de análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), para formazan, pela atividade da enzima succinil desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (Mosmann, 1983). Assim foi possível quantificar a percentagem de células vivas

frente a diferentes concentrações testadas (5-40 µg/mL) do ácido salazínico purificado através da leitura da absorvância ( Berridge et al, 1996).

A atividade citotóxica do ácido salazínico isolado e purificado do líquen *R. complanta* foi avaliada frente as células do tumor ascítico Sarcoma-180 e Carcinoma de Ehrlich, e células indiferenciadas *HeLa*. O ácido salazínico purificado apresentou atividade dose dependente frente as linhagem indiferenciada *Hela* em todas as concentrações testadas 5, 10, 20 e 40 µg/mL, o valor da  $CI_{50}$  foi de 39,95 µg/mL. De acordo com o resultados obtidos é possível confirmar que o aumento da concentração do composto gera um decréscimo na viabilidade celular, significando aumento da mortalidade celular corroborando com Zhang, 2007.

A atividade citotóxica visualizada na *HeLa* corrobora com o trabalho de Carneiro-Leão et. al. em 1997, onde, espécies de *Ramalina* testadas apresentaram-se biologicamente ativas produzindo alfa-glucanas que se mostraram citotóxicas contra células HeLa (Carneiro-Leão et al., 1997) e produziram ativação de macrófagos, atuando como modificadores da resposta biológica (Stuelp-Campelo et al., 2002).

A realização de testes *in vitro* e *in vivo*, para detectar a atividade antitumoral de novas substâncias, é de vital importância para descoberta de novos quimioterápicos. Testes *in vivo* aplicados à cancerologia experimental têm sido os mais recomendáveis, apesar de serem dispendiosos, com respostas não muito rápidas (Fávaro et al., 1990).

Os ensaios *in vitro* eliminam estes problemas, mas exigem confirmação *in vivo*. Não obstante, a necessidade da resposta *in vivo*, os testes *in vitro* auxiliam a triagem de substâncias naturais com potencial ação antineoplásica. Estes ensaios permitem a análise de um grande número de amostras, viabilizando a localização dos princípios ativos em determinadas frações obtidas durante o processo de extração de produtos de origem natural (Fávaro et al., 1990; Rodrigues, 2001).

A atividade citotóxica dos compostos de acordo com a escala do National Cancer Institute (NCI) (Cocco et.al., 2006) onde os compostos são considerados sem atividade citotóxica quando a inibição percentual apresenta-se no intervalo de 1 - 20%, com pouca atividade quando essa percentagem situa-se entre 20 e 50%, atividade moderada quando a inibição é de 50 para 70% e de alta atividade, quando o intervalo de inibição fica entre 70 a 100%.

O 5-Fluorouracil foi utilizado como controle positivo por ser um fármaco clinicamente efetivo contra câncer em humanos e em camundongos (Zhang et. al., 2012) e a salina,

placebo, como controle negativo a fim de simular os intempéries do manuseio, administração pela mesma via além de ser possível a comparação com o composto testado no que se diz respeito a taxa de inibição tumoral, por exemplo.

A avaliação da atividade antitumoral foi relacionada à regressão do tumor nos animais, à redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os não tratados. (Schabel, et. al., 1977), sendo por tanto possível notar que o ácido salazínico purificado (26,5mg/kg) apresentou-se como bastante promissor na busca por um fármaco antitumoral pois apresentou inibição entre 64,36% - 73,22% da massa tumoral para os tumores experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich.

Vários autores realizaram estudos com outros modelos tumorais para obtenção da percentagem de redução da massa tumoral. Kudunguti et al. (2011) investigaram o efeito do ácido pentil éster cafeico (CAPE) em várias linhagens de melanoma (entre elas, B16 F10) e estudaram *in vivo* seu efeito no modelo tumoral de melanoma subcutâneo em camundongos C57BL/6. O CAPE (10mg/kg/dia) causou significativa inibição do crescimento tumoral (61%). Este modelo subcutâneo também foi utilizado para verificar o efeito do interferon alfa no crescimento de células B16 F10, *in vitro* e *in vivo*. Os autores verificaram uma redução de 77,74% no peso tumoral e 70,8% na proliferação celular (Conesa et al., 2009).

Meneguelo e colaboradores (2005) avaliaram a massa de tumor primário do modelo B16 F10 de camundongos Swiss tratados com a fosfoetanolamina sintética, molécula encontrada na membrana neuronal, nesse estudo, foi obtida uma redução de 88% da massa tumoral para os animais tratados com a dose de 6,6 mg/kg. Em outro trabalho, utilizando também o modelo B16 F10 subcutâneo, camundongos tratados com a dihidrocucurbitacina-B (10 mg/kg ) advinda de *Wilbrandia ebracteata*, apresentaram redução do tumor primário em cerca de 84% (Kudunguti et al. 2011).

Outro trabalho, com camundongos C57Bl6 portadores do melanoma humano ANDO-2 foram tratados oralmente com a dose de 50 mg/kg do extrato da planta *Calendula officinalis*, rica em flavonóides e saponinas, apresentando redução de cerca de 75% do volume tumoral (Jiménez-Medina et al., 2006). Lavhale et al. (2009) observaram 80% de redução do volume do tumor primário com o alquilante cisplatina (100 µg), e uma redução bem menor (cerca de 22%) em animais tratados com o antitumoral taxano paclitaxel (20 µg).

Dentre os estudos envolvendo extratos de plantas, podemos exemplificar a atividade antitumoral do extrato aquoso de *Indigofera suffruticosa* (planta típica do nordeste brasileiro) rica em alcalóides, flavonóides e proteínas e com alta atividade citotóxica, no tratamento de

camundongos BALB/C com Sarcoma 180 na dose de 50 mg/kg, via i.p., por sete dias, gerando uma redução tumoral de cerca de 75% (Vieira et al., 2007).

Postergando os índices de inibição tumorais também foram essenciais a avaliação dos parâmetros hematológicos que são amplamente utilizados como indicadores do comportamento fisiológico do animal em resposta a alterações endógenas e também como biomarcadores de diagnósticos. As alterações destes parâmetros podem sugerir lesões em órgãos ou tecidos e ainda auxiliar no sistema de criação das espécies, pois estas modificações podem indicar infestações e/ou infecções ou ainda alterações no ambiente (Shahsavani, 2010).

As hemácias levam o oxigênio dos pulmões para todos os outros tecidos do organismo. A escassez de glóbulos vermelhos (anemia) causa fraqueza, cansaço e problemas respiratórios. Em contra partida as plaquetas são células que, na medula provêm de megacariócitos, participam dos mecanismos da coagulação, sua escassez é chamada trombocitopenia e pode resultar em sangramentos excessivos e aparecimento de hematomas.

Os glóbulos brancos, também chamados de leucócitos, ajudam a defender o organismo contra vírus, bactérias e fungos e há vários tipos deles, cada um com um papel especial na defesa do organismo contra as infecções. Os três principais tipos são granulócitos, monócitos e linfócitos sendo estes últimos as principais células do tecido linfático, o principal componente do sistema imunológico, composto por diferentes tipos de células que trabalham juntas para combater infecções e alguns tipos de câncer. Esse sistema também reage contra tecidos estranhos ao organismo, como órgãos transplantados, por exemplo.

Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW ) é rotineiramente examinada com o hemograma completo (CBC) de teste que mostra a heterogeneidade do tamanho dos eritrócitos . É utilizado clinicamente para distinguir diferentes tipos de anemia . Estudos recentes têm relatado a associação entre níveis elevados de RDW e aumento da mortalidade na população em geral (Patel et. al., 2009), Apesar existirem poucos relatos sobre a relação entre RDW e tumores malignos (Seretis et. al., 2013) são conhecidos por evocar a inflamação crônica e desnutrição (Mantovani, et. al.,2008).

A determinação destes valores, quando corretamente interpretados, pode demonstrar precisamente as condições do animal no momento da amostragem (padrão nutricional, condição de doenças, estresse devido ao cativeiro ou manejo), bem como a qualidade do seu habitat (Pérez et al, 2003).

O método de coloração por Hematoxilina e Eosina (H/E) permite diferenciar o citoplasma da núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise morfológicas e histológicas de tecidos dos animais tratados permitem identificar

alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir efeitos tóxicos da droga. O número de mitoses expressa a atividade da divisão celular, então quanto maior a atividade proliferativa de um tecido, maior será o número de mitoses verificadas (Brasil, 2013) sendo a análise do índice mitótico um importante indicador de proliferação adequada das células (Gadano et. al., 2002), possibilitando o conhecimento do nível de atividade celular do tecido em estudo, fornecendo informações sobre o seu comportamento biológico (Barros; Freitas, 1997).

## 5. Conclusões

O ácido salazínico purificado foi obtido através de técnicas de extração por esgotamento e cristalização a partir de talo in natura de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. Análises cromatográficas, Ressonância Magnética Nuclear de Protóns e infravermelho, comprovaram a pureza deste composto liquênico. O efeito citotóxico do ácido salazínico purificado foi dose dependente nas concentrações testadas. A dose capaz de inibir 50% da proliferação celular foi 39,95 µg/mL, 35,17 µg/mL e 31,65 µg/mL frente as células de *HeLa*, Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich, respectivamente. A inibição antitumoral foi de 64,36% e 73,22% frente os tumores sólidos experimentais de Sarcoma- 180 e Carcinoma de Ehrlich, respectivamente. A inibição da divisão celular foi de 29,45% para o Carcinoma de Ehrlich e 29,37% para Sarcoma 180. Estes resultados indicam que o ácido salazínico purificado apresentou um potencial antitumoral promissor frente aos tumores experimentais de Sarcoma-180 e Carcinoma de Ehrlich.

## Conflito de Interesses

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesse no presente trabalho.

## Agradecimentos

Este Trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referencias

Assad, A.L.D, Ferro, A.F.P., 2005. Biodiversidade e sua utilização na geração de fitoterápicos. *Fármacos e Medicamentos*. nov./dez; Ano VI, 37.

- Atopkina, L.N; Malinovskaya, G.V.; Elyakov, G.B.; 1999. Cytotoxicity of natural ginseng glycosides and semisynthetic analogues. *Planta Medica*. 65: 30-34.
- Barros, S. S. L. V; Freitas, R. A., 1997. Argyrophilia in nucleolar organizer regions in epithelial dysplasia of the oral mucosa, *Revista de Odontologia*. UNESP 26 (1), 189- 202.
- Berridge, M. 1996. The biochemical and celular basis of cell proliferation assays. That use tetrazolium salts. *Biochemical.V*. 4 p.14-19
- Bézivin, C.; Tomasi, F.; Iohézle-le, D.; Boustie, J., 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine.*; v. 10: p. 499-503.
- Boustie, J.; Tomasi, S.; Grube, M., 2011. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. *Phytochemistry Rev*; 10:287-307.
- Brasil, 2013. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Fisiopatologia do câncer. [Acesso em 2 de dezembro de 2013]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>
- Culberson and A. Johnson, J.,1976. *Chromutography.*, 128; 253.
- Culberson and W.L. Culberson,1978. *Experientia of Mycology.*, 2; 245.
- Culberson, 1972. *Bryologist*, 75; 54.
- C.F. Culberson, 1972. *J. Chromatography.*, 72; 113.
- Cain, B.F., 1961. Potential Anti-tumour Agents. Part I. Polyporic Acid Series. *Journal of Chemical Society*. p. 936- 940.
- Carneiro-Leão, A. M. A., Freitas Buchi, D., Iacomini, M., Gorin, P. A. J. & Oliveira, M. B. M..1997. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology* 29: 503–509.
- Cocco M.T., C. Congiu, V. Lilliu, V. Onnis, 2006. Synthesis and *in vitro* antitumoral activity of new hydrazine pyrimidine-5-carbonitrile derivates, *Bioorganics Medicinal Chemistry*. 14, 366-372.
- Conesa, C. M.; Sánchez, N. A.; Ortega, V. V.; Reverte, J. G.; Carpe, F. P.; Aranda, M. C., 2009. *In vitro* and *in vivo* effect of IFNa on B16F10 melanoma in two models: Subcutaneous (C57BL6J mice) and lung metastasis (Swiss mice). *Biomedical Pharmacother*.
- 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., 2010. 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*; 2 (1):47-58.
- Cragg, M. G.; Newman, D. J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacology*,v.100 n1/2 p.72-79.

- Fávaro, O. C. N.; Oliveira, M. M.; Rossini, A.; Kamara, C. R.; Pinto, A. V.; Pinto, M.C., 1990. Seleção por meio de Células KB de Substâncias e Extratos potencialmente Ativos em Quimioterapia do Câncer. Anais da Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro. v. 62 (3) p. 217-224.
- Feige, B. G. B. Viethen, M. Geyer and G. Folhmann, J.,1986. Hattori Botany Lnb., 60; 143.
- Gadano, A. Gurni, P. López, G. Ferraro, M. Carballo, 2002. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. Ethnopharmacology 81, 11-16.
- Holbeck, S. L., 2004. Update on NCI *in vitro* drug screen utilities. European Journal of Cancer.; 40:785-793.
- Huneck, S. and Yoshimura, I.,1996. Identification of Lichen Substances. Springer, Berlin.
- Jiménez-Medina, E.; Garcia-Lora, A.; Paco, L.; Algarra, I.; Collado, A.; Garrido, F., 2006. A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. Biomedical center of Cancer. 6: 119., 133.
- Kudugunti, S. K.; Vad, N. M.; Ekogbo, E.; Moridani, M. Y., 2011. Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in skin B16-F0 melanoma tumor bearing C57BL/6 mice. Investigation of a New Drugs.; 29:52-62
- Lavhale, M. S.; Kumar, S.; Mishra, S. H.; Sitasawad, S. L., 2009. A Novel Triterpenoid Isolated from the Root Bark of *Ailanthus excelsa* Roxb (Tree of Heaven), AECHL-1 as a Potential Anti- Cancer Agent. PLoS ONE.; 4(4):1-11.
- Lumbsch, H.T. and J.A. Elix, PI., 1985. Systematics and Evolution., 150 275.
- Magalhães, F. I. E., 2005. Atividade Antitumoral (*in vitro* e *in vivo*) das fisalinas B e D isoladas da *Physalis angulata* LIN.[Dissertação].Ceará: Universidade do Ceará.
- Mantovani, A.; Allavena, P; Sica, A; Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. Nature 454: 436-444.
- Meneguelo, R.; Maria, D. A.; Chierice, G. O., 2005. Efeitos antitumorais da fosfoetanolamina sintética no melanoma murino B16F10. Cad Res 5º EncoBio.; 26
- Ministério da Saúde, BRASIL. Manual de Bases técnicas APAC/ ONCO, 2013. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/decas/neoplas.mansia.htm>.> Acesso em: 10 nov. 2013.
- Mosmann, T. ,1983. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: Application to proliferation and citotoxicity assay. Journal of Immunology Methods, v. 65 n1/2 p.55-63, DEC.
- Nourish, R. and R.W.A. olivier, in D.H. brown, D.L. Hawksworth and R.H. Bailey (Editors), 1976. Lichenology: Progress and Problems, Academic Press, London, p. 185.

Patel, K. V.; Ferrucci, L.; Ershler, W. B.; Longo, D. L.; Guralnik, J. M., 2009. Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults. *Archives of Internal Medicine* 169: 515-523.

Pérez, J. M; González, F. J.; Granados, J. E.; Pérez, M. C.; Fandos, P.; Soriguer, R. C., 2003. Hematologic and biochemical reference intervals for Spanish ibex. *Journal of Wildlife Disease*. Jan; 39(1): 209-215.

Rodrigues, O. G., 2001. Estudo *in vitro* para avaliação das alterações morfológicas das células Hep2, NCIH-292 e TVT Canino produzidas por imunoparvum e *in vivo* para verificação dos seus efeitos terapêuticos. 127p. Tese (Doutorado) Ciências Biológicas Universidade Federal de Pernambuco, UFPE.

Rouhi, A. M.; Washington, C., 2003. Rediscovering natural products. *Chemical & Engineering News.*; 81(41): 77-91.

Schabel, F., 1977. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. *Pharmacology and Therapy.*,v.1, p. 411-435.

Seretis, C.; Seretis, F.; Lagoudianakis, E.; Gemenetzis, G.; Salemis, N. S., 2013. Is red cell distribution width a novel biomarker of breast cancer activity? Data from a pilot study. *Clinical Medicine and Research* 5: 121-126.

Shahsavani, D.; Kazerani, H. R.; Kaveh, S.; Gholipour-Kanani, H., 2010. Determination of some normal serum parameters in starry sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) during spring season. *Comparative Clinical Pathology*; 19: 57–61.

Stuelp-Campelo, P. M.; Oliveira, M. B. M.; Carneiro-Leão, A. M. A.; Carbonero, E. R.; Gorin, P. A. J. & Iacomini, M., 2002. Effect of a soluble  $\alpha$ -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. *International Immunopharmacology* 2: 691–698.

Suffness, M.; Pezzuto, 1991. *Methods in Plant Biochemistry, Assays for Bioactivity*. London: Academic Press.

Suggit, M.; Bibby, M. C., 2005. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target- driven approaches. *Clinical Cancer Research.*; 11:971-981.

Vieira, J. R. C.; Souza, I. A.; Nascimento, S. C.; Leite, S. P., 2007. *Indigofera suffruticosa*: An Alternative Anticancer Therapy. *Annals of Oncology*; 4(3):355-359.

Yamamoto, Y.; Miura, M.; Kinoshita, Y.; Higuchi, M.; Yamada, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H.; Koshimizu, K., 2000. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter induced Epstein-Barr virus activation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.*; v. 43(8) p. 1388-1390.

Zhang, C, G. LI, Y. Wang, F. Cuib, J. Zhang, Q. Huang, 2012. Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded PLLA–PEG/PEG nanoparticles by a novel supercritical CO<sub>2</sub> technique, *International Journal Pharmaceutics*.436, 272– 281.

Zhang, S. H. Z. Lee, S. Feng, 2007. Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery, *Biomaterials* 28, 1889–1899

### **Conclusão Geral**

O ácido salazínico foi obtido através de técnicas de extração por esgotamento e cristalização a partir de talo in natura de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. Análises cromatográficas, Ressonância Magnética Nuclear de Protóns e Infravermelho, comprovaram a pureza desta substância liquênica.

O efeito citotóxico do ácido salazínico purificado foi dose dependente nas diferentes concentrações testadas. A dose capaz de inibir 50% da proliferação celular foi 39,95 µg/mL, 35,17 µg/mL e 31,65 µg/mL frente as células de *HeLa*, Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich, respectivamente.

A inibição antitumoral foi de 64,36% e 73,22% frente os tumores sólidos experimentais de Sarcoma- 180 e Carcinoma de Ehrlich, respectivamente.

A inibição da divisão celular foi de 29,45% para o Carcinoma de Ehrlich e 29,37% para Sarcoma 180.

Estes resultados indicam que o ácido salazínico purificado apresentou uma atividade antitumoral promissora frente aos tumores experimentais de Sarcoma- 180 e Carcinoma de Ehrlich.

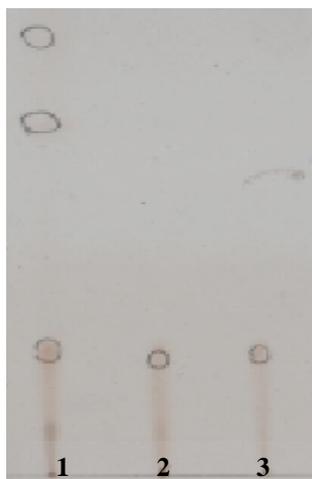


Fig. 1- Cromatografia de camada delgada (CCD): 1 - Extrato acetônico, 2- ácido salazínico purificado, 3- padrão do ácido salazínico.

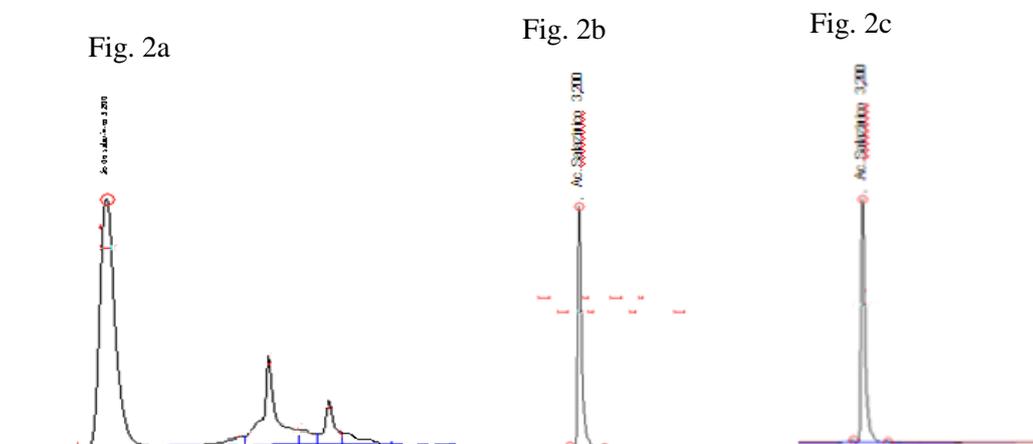


Fig. 2 : Cromatograma líquido de alta eficiência (CLAE): 2A- extrato acetônico TR 3,2 min; 2B- ácido salazínico purificado TR 3,2 min; 2C- ácido salazínico padrão TR 3,2 min. O percentual de pureza do ácido salazínico purificado de acordo com a CLAE foi > 98%.

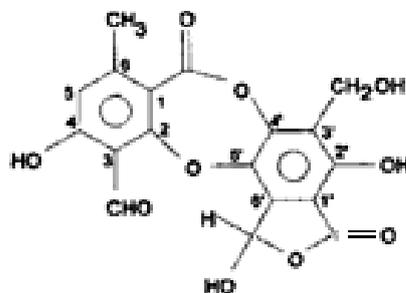


Fig. 3 - Estrutura química do ácido salazínico isolado e purificado da *Ramalina complanata* (Sw.) Ach.

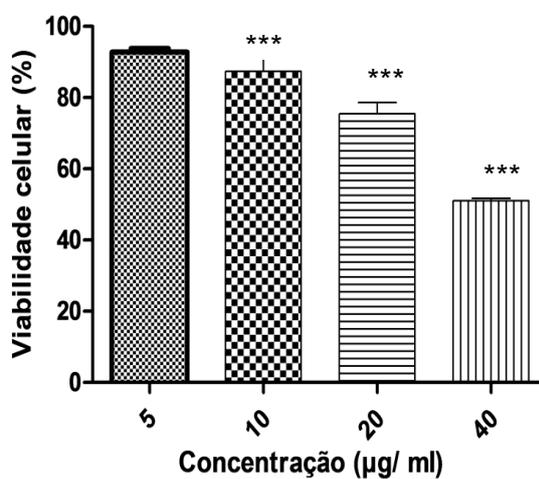


Fig. 4 - Viabilidade celular de *HeLa* frente ao ácido salazínico purificado nas concentrações de 5; 10; 20 e 40 µg/ mL. Os dados representam a média ± D. P. As diferenças estatísticas do controle foi determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos em comparação com a concentração de 5 µg/mL.

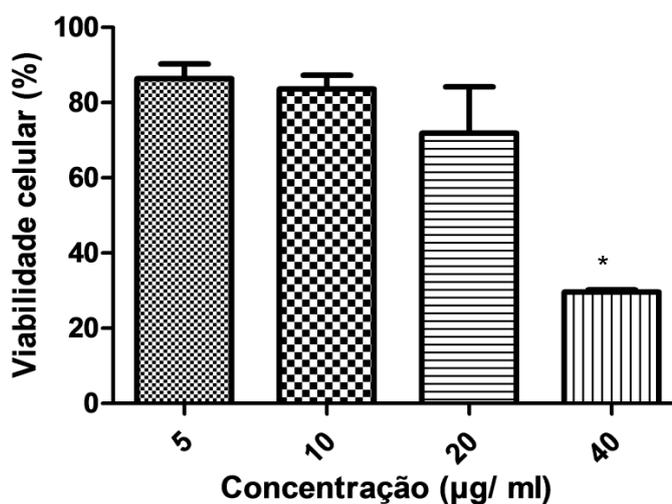


Fig. 5 - Viabilidade celular do Sarcoma 180 frente ao ácido salazínico purificado nas concentrações de 5; 10; 20 e 40 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas do controle foi determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos 40  $\mu\text{g/mL}$  em comparação com a concentração de 5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ .

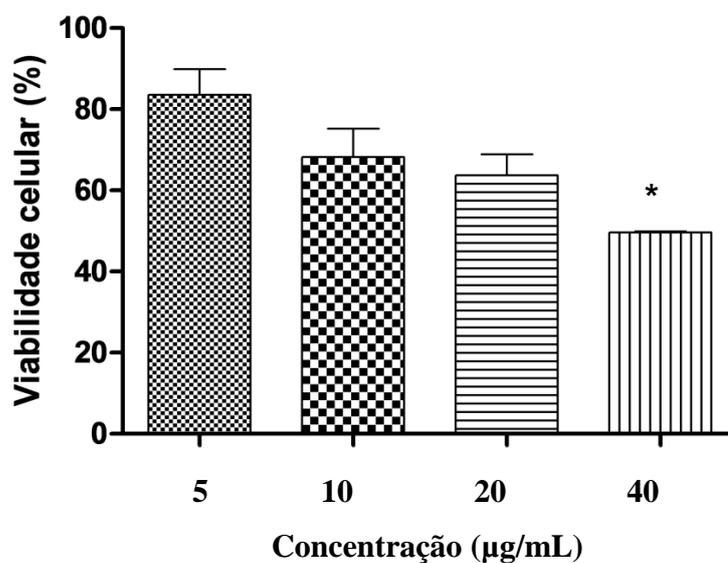


Fig. 6 - Viabilidade celular do Carcinoma de Ehrlich frente ao ácido salazínico purificado nas concentrações de 5; 10; 20 e 40 ( $\mu\text{g/mL}$ ). Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas do controle foi determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos 40  $\mu\text{g/mL}$  em comparação com a concentração de 5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabela 1: determinação da DL<sub>50</sub> do ácido salazínico purificado - ensaio preliminar

Dose (mg/Kg)	N. Morte/Lotes (48hs)
125	0 / 4
250	2 / 4
500	4 / 4
1000	4 / 4

Tabela 2: Determinação da DL<sub>50</sub> do ácido salazínico purificado - ensaio definitivo

Dose ( mg/Kg)	Diferença entre Duas doses Consecutivas (a)	Número de Mortes/lotes Após 48h.	Média Mortes/lotes Entre 2 doses (b)	(a.b)
125		0 / 5		
	37,5		0	0
162,5		0 / 5		
	48,75		1.0	48,75
211,25		2 / 5		
	63,38		2.5	158,45
274,63		3 / 5		
	82,38		3.5	288,33
357,01		4 / 5		
	107,103		4.5	481,9635
464,113		5 / 5		

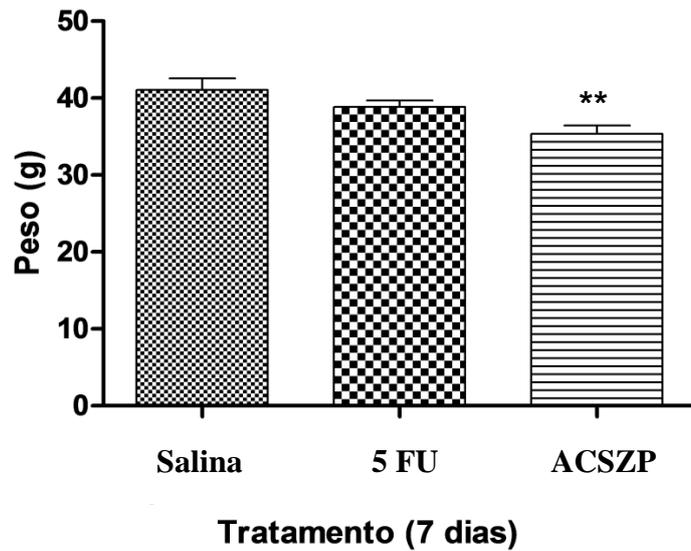


Fig. 7 - Média do peso dos animais com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos comparados a salina e ao 5-FU (5-Fluorouracil), ACSZP (ácido salazínico purificado).

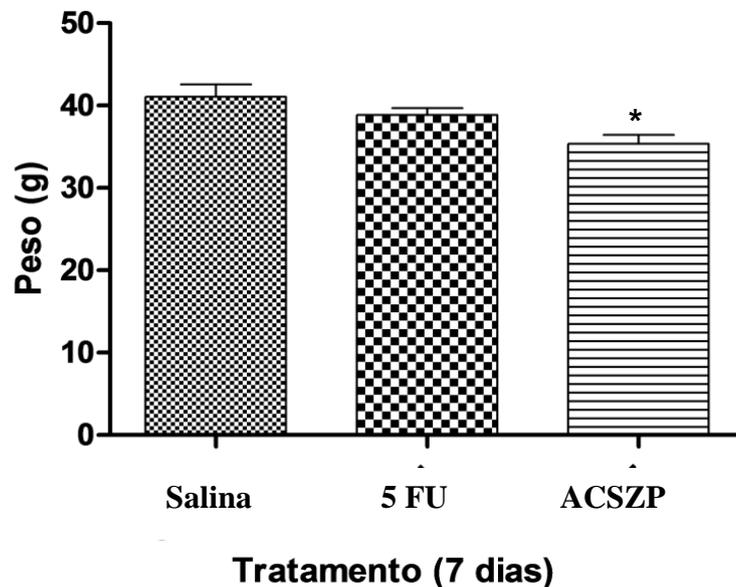


Fig. 8 - Média do peso dos animais com Carcinoma de Ehrlich, após 7 dias de tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos comparados a salina e ao 5-FU(5-Fluorouracil), ACSZP (ácido salazínico purificado).

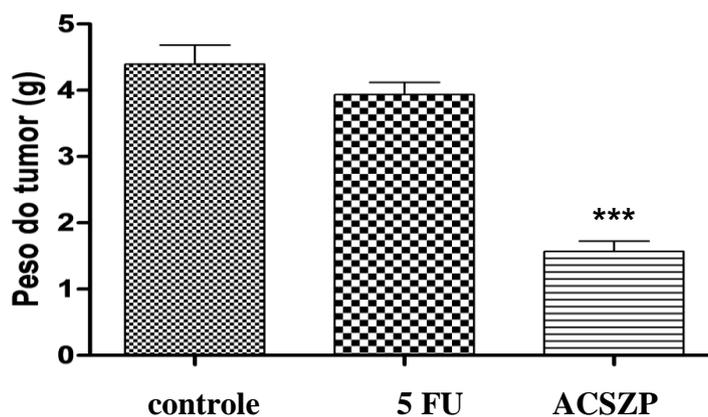


Fig. 9 - Peso dos tumores (Sarcoma 180) dos grupos tratados com solução salina, 20 mg/ Kg de peso corpóreo de 5-Fluorouracil e 26,5 mg/ Kg de peso corporal de ácido salazínico purificado. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos comparados a salina e ao 5-FU. 5-FU (5Fluorouracil), ACSZP (ácido salazínico purificado).

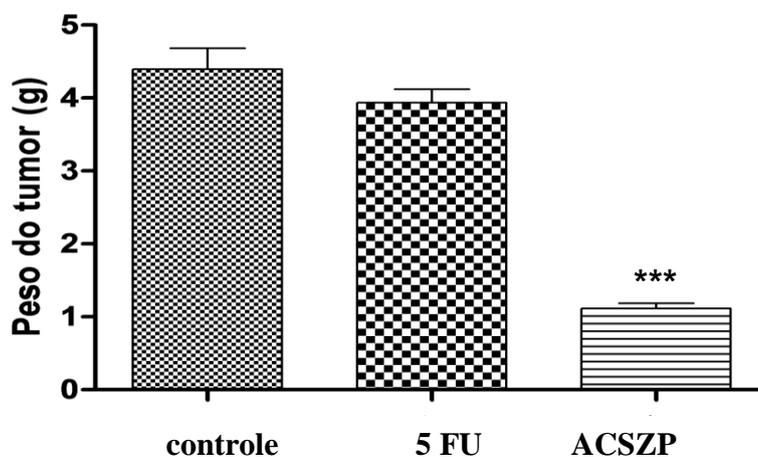


Fig. 10 - Peso do tumor (Carcinoma de Ehrlich) dos grupos tratados com solução salina, 20mg/ Kg de peso corpóreo de 5-Fluorouracil e 26,5 mg/ Kg de peso corporal de ácido salazínico purificado. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos comparados a salina e ao 5-FU. 5-FU(5-Fluorouracil), ACSZP (ácido salazínico purificado).

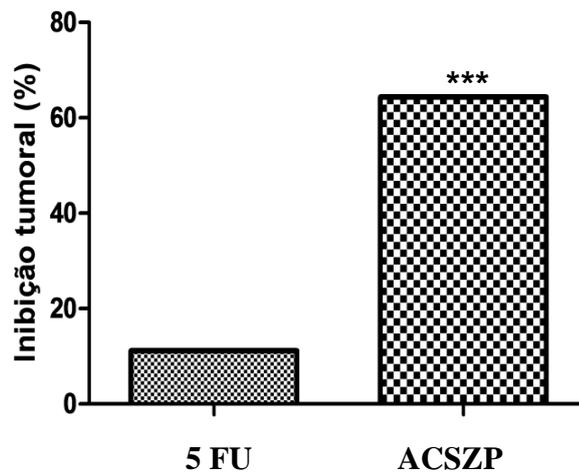


Fig. 11 - Avaliação da inibição tumoral do Sarcoma 180 a partir do tratamento com 5-FU e ác. salazínico purificado, O controle (salina) está normatizado para 100%. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos comparados a salina. 5-FU(5-Fluorouracil), ACSZP (ácido salazínico purificado).

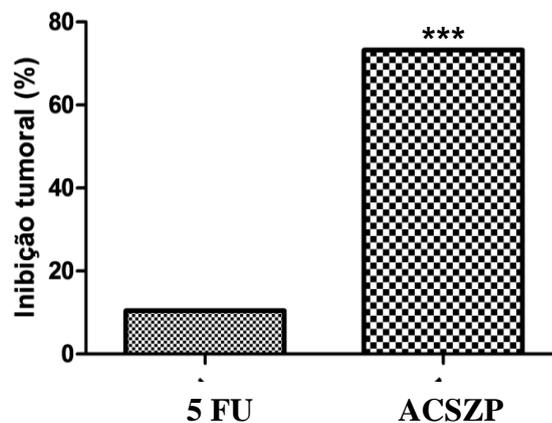


Fig. 12 - Avaliação da inibição tumoral do Carcinoma de Ehrlich a partir do tratamento com 5-FU e ác. salazínico purificado, O controle (salina) está normatizado para 100%. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos comparados a salina. 5-FU(5-Fluorouracil), ACSZP (ácido salazínico purificado).

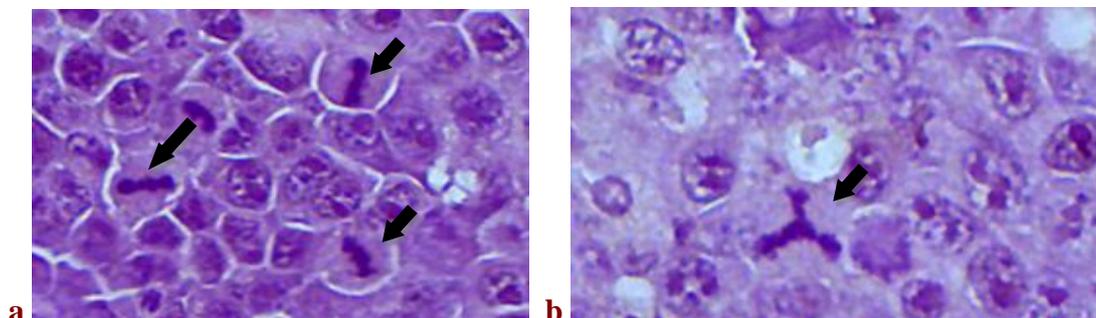


Fig. 13 - Fotomicrografias do tumor experimental Carcinoma de Ehrlich (400X) H.E.  
Legenda: A seta mostra mitoses típicas (a) mitose atípica (b).

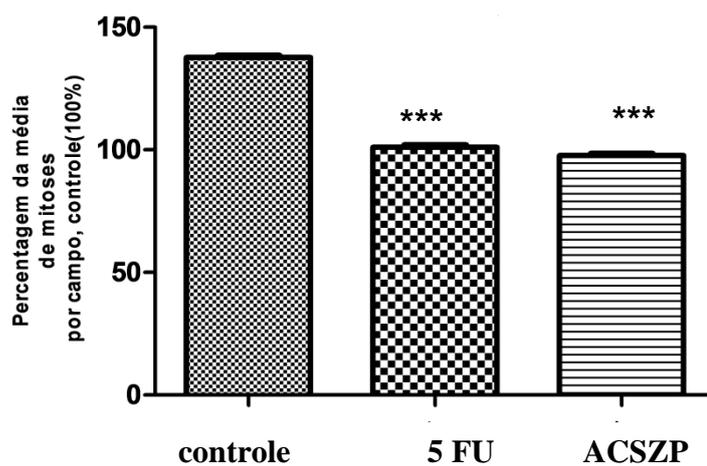


Fig. 14 - Efeito da administração de 5-Fluorouracil (20 mg/ Kg), ácido salazínico purificado (26,5 mg/ Kg de peso corporal) sobre o número de mitoses (Carcinoma de Ehrlich). Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos comparados a salina.

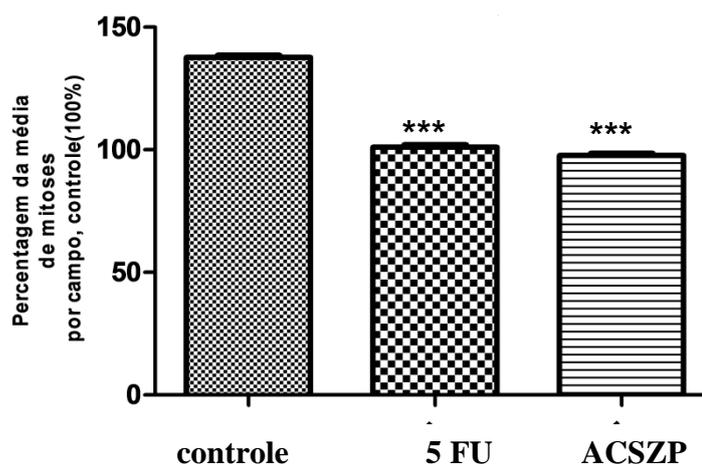


Fig. 15 - Efeito da administração de 5-Fluorouracil (20 mg/ Kg), ácido salazínico purificado (26,5 mg/ Kg de peso corporal) sobre o número de mitoses (Sarcoma 180). Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos comparados ao controle (salina).

Tabela 3 - Parâmetros biológicos (peso dos órgãos) em camundongos portadores de tumor sólido CE tratados com ácido salazínico purificado, Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \*  $P < 0,05$  para os grupos em comparação ao controle (salina).

Peso dos órgãos	Grupos		
	Salina	5-FU	ACSZP
<b>Fígado</b>	2,02 $\pm$ 0,79	2,29 $\pm$ 0,35	2,03 $\pm$ 0,40
<b>Baço</b>	0,31 $\pm$ 0,14	0,26 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,08
<b>Rins</b>	0,49 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,03

Tabela 4 - Pesos dos órgãos em camundongos portadores de tumor sólido S180 tratados com ácido salazínico purificado. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos em comparação ao controle (salina).

Peso dos órgãos	Grupos		
	Salina	5-FU	ACSZP
<b>Fígado</b>	2,49 $\pm$ 0,92	2,31 $\pm$ 0,38	2,11 $\pm$ 0,46
<b>Baço</b>	0,33 $\pm$ 0,15	0,23 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,13
<b>Rins</b>	0,55 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,06	0,52 $\pm$ 0,03

Tabela 5 - Parâmetros hematológicos em camundongos portadores de tumor sólido S180 tratados com ácido salazínico purificado. RDW- Indica variação de tamanho de hemácias representando a porcentagem de variação dos volumes obtidos. Hb - Hemoglobina. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. (n=10) As diferenças estatísticas foram determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos comparados ao controle (salina).

Parâmetros	Grupos		
	Salina	5-FU	ACSZP
<b>Hematológicos</b>			
<b>RDW</b>	15,62 $\pm$ 1,53	14,72 $\pm$ 1,23	15,02 $\pm$ 1,54
<b>Hb (%)</b>	12,1 $\pm$ 2,84	12,07 $\pm$ 0,74	12,78 $\pm$ 1,47
<b>Plaquetas</b>	948400 $\pm$ 182790,32	607000 $\pm$ 173702,33	1315800 $\pm$ 466056,01**
<b>Leucócitos</b>	7760 $\pm$ 3308,02	3020 $\pm$ 626,10*	11100 $\pm$ 1996,25***

Tabela 6 - Parâmetros hematológicos de camundongos portadores de tumor sólido CE tratados com ácido salazínico purificado. Os dados representam a média  $\pm$  D. P. (n=10) As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido do teste de Tukey, \* P <0,05 para os grupos em comparação ao controle (salina).

Parâmetros	Grupos		
	Salina	5-FU	ACSZP
<b>Hematológicos</b>			
<b>RDW</b>	22,9 $\pm$ 1,3	23,1 $\pm$ 0,66	15,43 $\pm$ 1,07***
<b>Hb (%)</b>	12,06 $\pm$ 0,92**	13,86 $\pm$ 1,08***	9,4 $\pm$ 1,87
<b>Plaquetas</b>	1563500 $\pm$ 299998***	1127167 $\pm$ 269721,6**	436000 $\pm$ *** 193132
<b>Leucócitos</b>	11700 $\pm$ 2284,256***	3485 $\pm$ 1478,929***	2605 $\pm$ 971,5525

## 5. ANEXOS

### Anexo 01

#### Carta de Aprovação do Comitê de Ética Animal

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 02 de maio de 2013.

Ofício nº 569/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Prof Nicacio Henrique da Silva**  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Bioquímica  
Processo nº 23076.016437/2013-18

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Atividade Antitumoral *In vitro* e *in vivo* do ácido salazínico de *Ramalina complanata* (Liquen)**"

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-Lika/UFPE. Animais: camundongos; Linhagem: Albino Swiss; Idade: 35-60 dias; Peso: 25 g; sexo: machos; nº total de animais: 40 camundongos.

Atenciosamente,

Prof. Maria Teresa Jansen  
Presidente do CEEA

## Anexo 02

### Ficha de Identificação Botânica



Nº 23076.016437/2013-18

Fam.: Ramalinaceae

Sp.: *Ramalina complanata*

Nome Vulgar:

Col.: Thiago Silva, Bruno Rodrigues, Lourdes Buriil (nº 01-04/III/2012)

Det.: Emerson Luiz Gumboski II/2013

Proc.: Brasil, Pernambuco, Saloá – RPPN Fazenda Brejo-  
Latitude -8°58'32,70" e Longitude -36°41'01,63"

Obs.: Local de clima seco e frio, solo árido, temperatura próxima de 23°C.

Anexo 03  
Guide for Authors  
(Journal of Ethnopharmacology)

# JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

## Guide for Authors

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

**Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited.** It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

## Classification of your paper

Please note that upon submitting your article you will have to select **at least one classification** and **at least three of the given keywords**. You can preview the list of classifications and keywords (here). This information is needed by the Editors to more quickly process your article. In addition to this, you can submit free keywords as described below under "Keywords".

## The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here](#).

For more details on how to write a world class paper, please visit our Pharmacology Author Resources page.

**Authors are encouraged to submit video material or animation sequences** to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

## Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome. Outlines for potential reviews need to include:

- A detailed abstract using the structure provided in the guidelines
- An annotated table of contents
- A short CV of the lead author

5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor [j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk](mailto:j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk) with an outline.
7. Conference announcements and news.



**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>.

## **Policy and ethics**

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

**Animal and clinical studies** - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

**Biodiversity rights** - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

## **Author contributions**

For each author the contribution to the publication should be mentioned.

## **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>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

## **Submission declaration and verification**

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 in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **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.

### **Article transfer service**

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

### **Copyright**

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

*For subscription articles*  
 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 an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

*Retained author rights*  
As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

### **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 their research funder

**Subscription**

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

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution (CC BY):** lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to 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-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**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.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

**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**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

**Additional information**

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., et al. (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302.

Matteucci, E., Giampietro, O. (2008) Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 163-172.

Froede, T.S.A. and Y.S. Medeiros, Y.S. (2008) Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 173-183. Gertsch J. (2009) How

scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 177-183.

Chan K., et al. (2012) Good practice in reviewing and publishing studies on herbal medicine, with special emphasis on traditional Chinese medicine and Chinese Materia Medica. *Journal of Ethnopharmacology* 140: 469-475.

Heinrich, M., Edwards. S., Moerman. D.E.. and Leonti. M. (2009), Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *J. Ethnopharmacol*, 124: 1-17.



## Preparation

### Reference

### formatting

References in the manuscript should be given with the name of the first author (in case of 2 authors, both names, and in case of more first author et al.), and the year of publication, in the reference list any style or format can be used as long as the style is consistent. In the list all author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/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:

**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.

***Theory/calculation***

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

***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.

***Glossary***

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

***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.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case 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 phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be 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 author should divide the abstract with the headings ***Ethnopharmacological relevance, Materials and Methods, Results, and Conclusions.*** Click here to see an example.

## Graphical

## abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. 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 also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

### **Keywords**

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found here.

In addition, you can provide a maximum of 6 specific 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.

### **Chemical**

### **compounds**

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below: Chemical compounds studied in this article Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865) More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

### **Plant**

### **names**

In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org) mentioning the data of accessing that website.

In case of commercially procured material should mention the source, batch number, quality control data. Data on chemical characterization (metabolomics, chromatographic methods) should also be presented, in case of known active compounds their quantitative analysis should be presented.

## 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.).

## Database

## linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click 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.

## Math

## formulae

Present simple formulae in the line of 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, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### Table

### footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

## 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 printed 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.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

#### *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) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print 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 that 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**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### **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 "Unpublished results". "*Personal communication*" will not be accepted as a reference. 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.

#### **Reference**

#### **management**

#### **software**

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, 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 which is described below.

### **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 number/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:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...."

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Please use full journal names.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communication*. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

When a web citation with a link is being used as a reference, the link should be checked, and that date reported with the link as "accessed on March 29, 2012":

American Chemical Society. 2012. Ethical guidelines to publication of chemical research.<http://pubs.acs.org/userimages/ContentEditor/1218054468605/ethics.pdf>. Accessed on March 31, 2012.

## **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 50 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**

**data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution 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>.

## 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 (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- 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://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/89/p/8045/](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/). 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>.