

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

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E AÇÃO GENOTÓXICA DE EXTRATOS
ORGÂNICOS E ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* (Líquen) E DERIVADOS
PIRAZÓLICOS SINTÉTICOS**

TAMIRIS ALVES ROCHA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

RECIFE

2015

TAMIRIS ALVES ROCHA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E AÇÃO GENOTÓXICA DE EXTRATOS
ORGÂNICOS E ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* (Líquen) E DERIVADOS
PIRAZÓLICOS SINTÉTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos, para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

RECIFE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Rocha, Tamiris Alves

Avaliação da citotoxicidade e ação genotóxica de extratos orgânicos e ácido úsnico de *Cladonia substellata* (Líquén) e derivados pirazólicos sintéticos/ Tamiris Alves Rocha– Recife: O Autor, 2015.

104 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Nicácio Henrique da Silva

Coorientador: Emerson Peter da Silva Falcão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referências e anexos

- 1. Agentes antineoplásicos 2. Ácidos 3. Câncer I. Silva, Nicácio Henrique da (orientador) II. Falcão, Emerson Peter da Silva (coorientador) III. Título**

612.015

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-051

TAMIRIS ALVES ROCHA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E AÇÃO GENOTÓXICA DE EXTRATOS
ORGÂNICOS E ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* (Líquen) E DERIVADOS
PIRAZÓLICOS SINTÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos, para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovado por:

Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva (Presidente)

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Membro Interno)

Prof.^a Dr.^a Mônica Cristina Barroso Martins (Membro Externo)

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas (Membro Externo)

Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia (Suplente Interno)

Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão (Suplente Externo)

Data: 24/02/2015

A minha família, namorado e amigos;
especialmente aos meus pais pela força durante toda a
minha caminhada, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, senhor da minha vida, que me abençoou e me deu sustento durante toda a minha trajetória, e principalmente por ter colocados pessoas insubstituíveis no meu caminho.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Nicácio 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;

Ao Professor Dr. Emerson Peter da Silva Falcão (Co-orientador) que esteve comigo desde a minha graduação, ajudando-me com os procedimentos experimentais e com seu amplo conhecimento, me abrindo portas para meu sucesso acadêmico;

Ao Professor Dr. Cristiano Aparecido Chagas (Colaborador) pelo seu conhecimento, conselhos, paciência e dedicação;

A Professora Dr^a. Janaína dos Anjos que me recebeu com toda gentileza em seu laboratório, me apoiando e ajudando em meus experimentos.

A Professora Dr^a. Noêmia Santos (Consultora científica) por seu tempo e interesse em colaborar com as pesquisas;

A Professora Dr^a. Mônica Martins pelas sugestões e apoio sempre que precisava;

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

Ao Técnico Rafael pela dedicação em me ajudar no laboratório;

Aos meus amigos de laboratório: Maria Aparecida que foi o meu braço direito não só durante a pesquisa, mas também na minha vida pessoal me dando força e estando sempre ao meu lado; Joelma pelo seu companheirismo; Talita que se dispôs a me ajudar e me passar todo o conhecimento em relação à pesquisa; Maurília por sua amizade e ternura; Sarana e Danielle Feijó pela amizade e disposição em ajudar nas horas que mais precisei;

E muitos outros amigos que me deram força mesmo de longe: Alexsandra, Thiago, Bruna, Cleópatra, Amanda Nunes, Cristiane, Érima, Laurentino, Bruno Luna;

Aos professores do Departamento de Bioquímica pelo conhecimento compartilhado;

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

Ao Pessoal do campus UFPE-CAV: pelo uso do biotério, principalmente ao veterinário Vinícius, e laboratórios de pesquisa;

Aos Técnicos do CAV que sempre mostraram-se disponíveis;

Ao pessoal do grupo de pesquisa de Síntese/CAV;

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

Ao meu pai Junior e minha mãe Adriana por sempre ser meu porto seguro e as pessoas que independente de qualquer coisa estão comigo sempre e a todos os familiares e amigos que sempre estão presentes nos momentos mais importantes da minha vida:

Aos meus Avós: Dona Loura, Cesário e Gerusa (*in memoriam*);

Ao meu namorado Tiago por todo amor e paciência dedicados a me fazer feliz;

Amigos: Sarana, Danielle, Mônica, José Guedes, Milca, Filipe, Artur Felipe, Karla, Rosana, Josy, Tita, Maria José, Aldemir e Marcos.

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

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

*Que a felicidade não dependa do tempo, nem
da paisagem, nem da sorte, nem do dinheiro.
Que ela possa vir com toda simplicidade, de
dentro para fora, de cada um para todos.*

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A incidência de casos de câncer vem crescendo em ritmo acelerado em todo o mundo, o que tem despertado o interesse na busca de tratamentos mais eficazes. Geralmente, as drogas utilizadas nessas terapias, causam algum tipo de efeito colateral podendo também, em certas circunstâncias, ser carcinogênicos. Desta forma ensaios para avaliar a atividade genotóxica desses fármacos são necessários para promover uma segurança na utilização desses terapêuticos. As substâncias líquênicas apresentam várias atividades biológicas, podendo ser candidatas promissoras a drogas antineoplásicas. O objetivo deste estudo foi verificar a atividade citotóxica de extratos orgânicos e ácido úsnico obtido de *Cladonia substellata* bem como efeitos genotóxicos deste metabólito líquênico e seus derivados pirazólicos sintéticos. Os extratos orgânicos foram obtidos a partir da extração por esgotamento a quente em aparelho de Soxhlet do talo de *C. substellata*. O ácido úsnico foi obtido por purificação do extrato etéreo, seguido por sucessivas cristalizações até obtenção de alto grau de pureza da substância. Os derivados pirazólicos foram sintetizados através da reação do ácido úsnico purificado com as fenil-hidrazinas substituídas e quantidade equivalentes de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Análises cromatográficas em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN- ^1H) e Carbono 13 (RMN- ^{13}C), bem como infravermelho (IV) foram realizadas para confirmação estrutural da molécula do ácido úsnico purificado e dos derivados pirazólicos. O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), avaliado os extratos orgânicos e o ácido úsnico purificado de *C. substellata* frente às linhagens de células tumorais NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HEP-2 (carcinoma de laringe humana) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda). Os testes de genotoxicidade *in vivo*, foram feitos pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo. Os extratos orgânicos e o ácido úsnico purificado apresentaram porcentagem de inibição celular muito significativa (>70%), de modo que o extrato etéreo (100%) e o composto 3e (90,3%) apresentaram os melhores resultados para a linhagem celular MCF-7. O ácido úsnico purificado apresentou CI_{50} de 4,97 $\mu\text{g/mL}$ e 2,19 $\mu\text{g/mL}$ às células NCI-H292 e HEP-2 respectivamente, enquanto que o extrato clorofórmico foi o que apresentou maior atividade frente à linhagem celular HL-60 com CI_{50} de 3,34 $\mu\text{g/mL}$. A análise estatística do ensaio cometa e teste do micronúcleo demonstrou que o ácido úsnico e todos os compostos derivados (3a-3f) não apresentaram valores significativos ($p \geq 0,05$) quando comparados com o controle negativo. Desta forma, os compostos testados não foram genotóxicos e mutagênicos. Assim, os dados apresentados são animadores e ampliam os horizontes para realização de novos ensaios com o intuito de se aprofundar o conhecimento acerca destas novas moléculas.

Palavras-chave: atividade antineoplásica; ensaio cometa; teste de micronúcleo; substâncias líquênicas.

ABSTRACT

The incidence of cancer is increasing at a rapid pace worldwide, which has raised interest in the search for more effective treatments. Generally, the drugs used in these therapies cause some kind of side effect may also in certain circumstances be carcinogenic. Thus assays for evaluating the genotoxic activity of these agents are needed to promote safety in using these therapeutics. The liquenic substances have various biological activities and may be promising candidates for anticancer drugs. The objective of this study was to determine the cytotoxic activity of organic extracts and usnic acid obtained from *Cladonia substellata* and genotoxic effects of this lichen metabolite and their synthetic pyrazole derivatives. The organic extracts were obtained from hot extraction in a Soxhlet apparatus depletion of stem *C. substellata*. The usnic acid was obtained by purification of the ether extract, followed by repeated crystallisations to achieve high purity of substance. The pyrazole derivatives were synthesized by the reaction of purified usnic acid with the substituted phenylhydrazines and equivalent amount of sodium bicarbonate (NaHCO₃). Thin layer chromatographic analysis (TLC) and high performance liquid (HPLC), nuclear magnetic resonance of protons (¹H-NMR) and carbon 13 (¹³C-NMR) and infrared (IR) were performed to confirm the structure of the molecule purified usnic acid and pyrazole derivatives. The cytotoxicity assay was performed by the method of 3- [4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT assay), rated the organic extracts and the purified usnic acid of *C. substellata* front of tumor cell lines NCI-H292 (human pulmonary mucoepidermoid carcinoma), HEp-2 (human laryngeal carcinoma) and HL-60 (acute promyelocytic leukemia). The *in vivo* genotoxicity tests were made by the comet assay and micronucleus test. The organic extracts and purified usnic acid showed very significant percentage of cellular inhibition (> 70%), so that the ethereal extract (100%) and Compound 3e (90,3%) showed the best results for cell line MCF-7. The purified usnic acid showed IC₅₀ 4, 97 mg / mL and 2.19 mg / mL to NCI-H292 cells and Hep-2 respectively, while the chloroform extract showed the most activity against the HL-60 cell line with IC₅₀ 3.34 mg / mL. Statistical analysis of the comet assay and micronucleus test showed that the usnic acid and its derivative compounds (3a-3f) showed no significant differences ($p \geq 0.05$) when compared to the negative control. Thus, the compounds tested were not genotoxic and mutagenic. Thus, the data presented are encouraging and broaden the horizons for new tests in order to increase knowledge about these new molecules.

Keywords: antineoplastic activity; comet assay; micronucleus test; liquenic substances.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1-** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma*. 16
- Figura 2.** Esquema representativo da transformação de uma célula normal em célula cancerosa. 17
- Figura 3.** Esquema representativo dos estágios de evolução da célula até chegar ao tumor. 18
- Figura 4.** Classificação do dano do DNA das células analisadas por ensaio cometa. 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) e 4 (dano máximo). 21
- Figura 5.** Esquema da formação de micronúcleos como consequência de um dano no DNA de uma célula em divisão. 22
- Figura 6.** (a) Filamentos do micobionte (*Parmotrema tinctorum*) envolvendo células do fotobionte (*Trebouxia*) visto ao microscópio. (b) Representação da associação mutualística entre fungo e alga. 24
- Figura 7.** Estrutura química do ácido úsnico. 28
- Figura 8-** Vias de biossíntese do ácido úsnico. 29

ARTIGO

- Figura 1.** Esquema reacional de síntese dos derivados pirazólicos. A: Ácido úsnico; B: Fenilhidrazina; C: Derivado pirazólico. 54
- Figura 2.** Classificação do dano do DNA das células analisadas por ensaio cometa. 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) e 4 (dano máximo). 59
- Figura 3.** Cromatografia em camada delgada dos extratos orgânicos e do ácido úsnico purificado. 1 - Padrão do ácido úsnico Merck; 2 – Ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* a partir do extrato etéreo; 3 – Extrato etéreo; 4 – Extrato clorofórmico; 5 – Extrato acetônico. 61
- Figura 4.** Cromatografia em camada delgada dos derivados pirazólicos do ácido úsnico. 1 - Padrão do ácido úsnico; 2 – Ácido úsnico purificado; 3 – Composto 3a; 4 – Composto 3b; 5 – Composto 3c; 6 – Composto 3d; 7- composto 3e; 8- Composto 3f. 62
- Figura 5.** Eritrócitos Normocromáticos corados em verdes; Eritrócitos Policromáticos corados em vermelho; Eritrócitos Policromáticos com Micronúcleo apontados pela seta vermelha. 69

ANEXO

Figura 1- Espectro de RMN- H^1 do composto 3a.	77
Figura 2- Espectro de RMN- H^1 do composto 3b.	77
Figura 3- Espectro de RMN- H^1 do composto 3c.	78
Figura 4- Espectro de RMN- H^1 do composto 3d.	78
Figura 5- Espectro de RMN- H^1 do composto 3e.	79
Figura 6- Espectro de RMN- H^1 do composto 3f.	79
Figura 7- Espectro de RMN- H^1 do ácido úsnico purificado.	80
Figura 8- Espectro de RMN- C^{13} do composto 3a.	80
Figura 9- Espectro de RMN- C^{13} do composto 3b.	81
Figura 10- Espectro de RMN- C^{13} do composto 3c.	81
Figura 11- Espectro de RMN- C^{13} do composto 3d.	82
Figura 12- Espectro de RMN- C^{13} do composto 3e.	82
Figura 13- Espectro de RMN- C^{13} do composto 3f.	83
Figura 14- Espectro de Infravermelho do composto 3a.	83
Figura 15- Espectro de Infravermelho do composto 3b.	84
Figura 16- Espectro de Infravermelho do composto 3c.	84
Figura 17- Espectro de Infravermelho do composto 3d.	85
Figura 18- Espectro de Infravermelho do composto 3e.	85
Figura 19- Espectro de Infravermelho do composto 3f.	86
Figura 20- Espectro de Infravermelho do ácido úsnico purificado.	86
Figura 21- Cromatograma líquido de alta eficiência (CLAE): A- Extrato etéreo TR 25,88 min; B- Extrato clorofórmico TR 25,92; C- Extrato acetônico TR 25,88; D- Ácido úsnico purificado TR 26,39.	87
Figura 22- Cromatograma líquido de alta eficiência (CLAE): A- Composto 3a TR 10,67; B- Composto 3b TR 7,88; C- Composto 3c TR 24,49; D- Composto 3d TR 18,30; E- Composto 3e TR 3,89; F- Composto 3f TR 27,50.	88

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

- Tabela 1.** Determinação da porcentagem de inibição celular dos extratos orgânicos, ácido úsnico purificado e seus derivados pirazólicos. 66
- Tabela 2.** CI₅₀ dos compostos testados frente às linhagens de células neoplásicas. 67
- Tabela 3.** Resultados dos testes de genotoxicidade pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa. 68

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µg/mL	Micrograma por microlitro
µm	Micrômetro
786-0	Carcinoma de rim
A2780	Carcinoma de ovário
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ATP	Adenosina Trifosfato
B16 F10	Melanoma Murino
°C	Grau
C ¹⁴	Carbono 14
CI ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular
Capan-2	Câncer pancreático
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD71	Expressão do receptor de Transferrina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindole
D.P.	Desvio padrão
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenediaminetetraacético
FD	Frequência de dano
g	Gramas
h	Hora
H ₁ N ₁	Influenza A
HCT-116 p53(+/+)	Carcinoma de cólon humano de tipo selvagem
HCT-116 p53(-/-)	Carcinoma de cólon humano p53-nulo
HeLa	Adenocarcinoma cervical
HEp-2	Carcinoma epidermóide de laringe
HL-60	Leucemia promielocítica
HT-29	Adenocarcinoma de cólon
IC	Intervalo de confiança
ID	Índice de dano
IMA	Imazalil
IV	Infravermelho
Jurkat	Leucemia de células T
K562	Leucemia
Kg	Quilograma
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
log P	Lipofilicidade
Malonil-CoA	Malonil-coenzima A

MCF-7	Carcinoma de Mama
MDA-MB-231	Câncer de mama
mg	Miligrama
MN	Teste do Microcúcleo
MMS	Metanossulfonato de metilo
Ms.	Mestre
mL	Mililitro
mg/kg	Miligrama por quilograma de peso
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NCIADR	Ovário resistente a adriamicina
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCI-H 292	Carcinoma de pulmão humano
NCE	Eritrócitos normocromáticos
NF-kB	Fator de transcrição nuclear
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OVCAR 03	Carcinoma de ovário
PBS	Tampão fosfato-salino
Panc-1	Pâncreas
PC-3	Próstata
PCE	Proporção de eritrócitos policromáticos
PCEMn	Proporção de eritrócitos policromáticos micronucleados
Pf	Ponto de Fusão
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ppm	Parte por milhão
RET	Reticulócito
RMN-C ¹³	Ressonância Magnética Nuclear de C ¹³
RMN-H ¹	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SK-BR-3	Adenocarcinoma de mama
CO ₂	Dióxido de Carbono
T-47D	Câncer de mama
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
V79	Fibroblastos de pulmão de hamster chinês

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos sobre o câncer	16
1.2 Genotoxicidade e Mutagenicidade	19
1.2.1 Ensaio Cometa	20
1.2.2 Teste do Micronúcleo	21
1.3 Líquens	23
1.4 A importância dos Líquens	24
1.5 Substâncias liquênicas	27
1.6 Ácido Úsnico	28
1.7 Atividades Biológicas	30
1.8 Síntese de novos análogos estruturais de produtos naturais biologicamente ativos com atividade genotóxica e mutagênica	32
2. REFERÊNCIAS	35
3. OBJETIVOS	47
3.1 Geral	47
3.2 Específicos	47
4. ARTIGO	48
Resumo	50
1 Introdução	52
2 Materiais e Métodos	53
3 Resultados	60
4 Discussão	69
5 Conclusões	72
6 Conflito de Interesses	72
7 Agradecimentos	72
8 Referências	72
5 CONCLUSÃO GERAL	75
6 ANEXOS	76

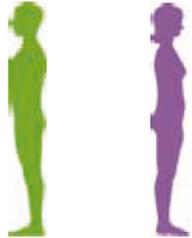
1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos sobre o câncer

A incidência de câncer vem crescendo em ritmo acelerado em todo o mundo, sendo responsável por um número significativo de pacientes. De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012 (FERLAY et al., 2013), da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês International Agency for Research on Cancer), e da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2007), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. No Brasil, a estimativa para o ano de 2014 aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, o que reforça a relevância do problema da doença no país (BRASIL.INCA, 2014).

Na figura 1, estão apresentados os tipos de câncer mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, que acometem homens e mulheres no Brasil. No sexo masculino os cânceres de próstata, de pulmão, brônquio e traqueia foram os mais frequentes, enquanto que no sexo feminino foram os cânceres de mama, de colo e de reto (BRASIL.INCA, 2014).

Figura 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma*.

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

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: BRASIL, INCA 2014.

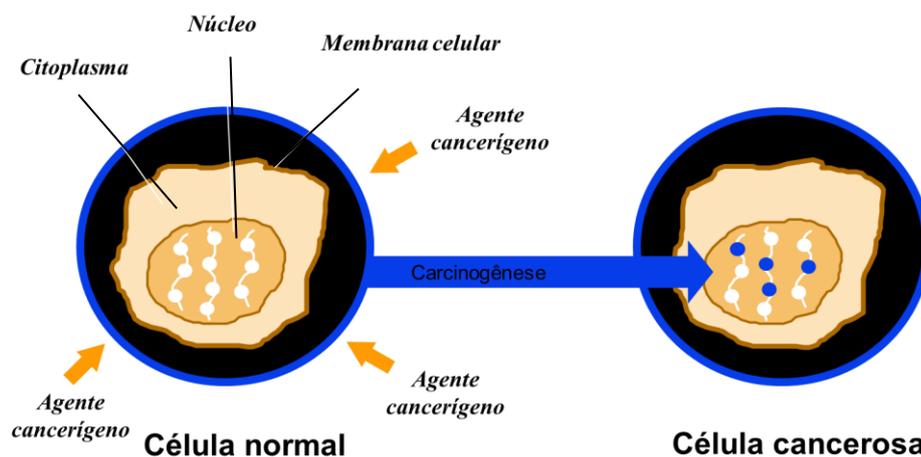
Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (BRASIL, 2014) câncer é classificado como um conjunto de mais de 100 doenças que tem como causa o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo.

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e, em geral, acontece lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa se

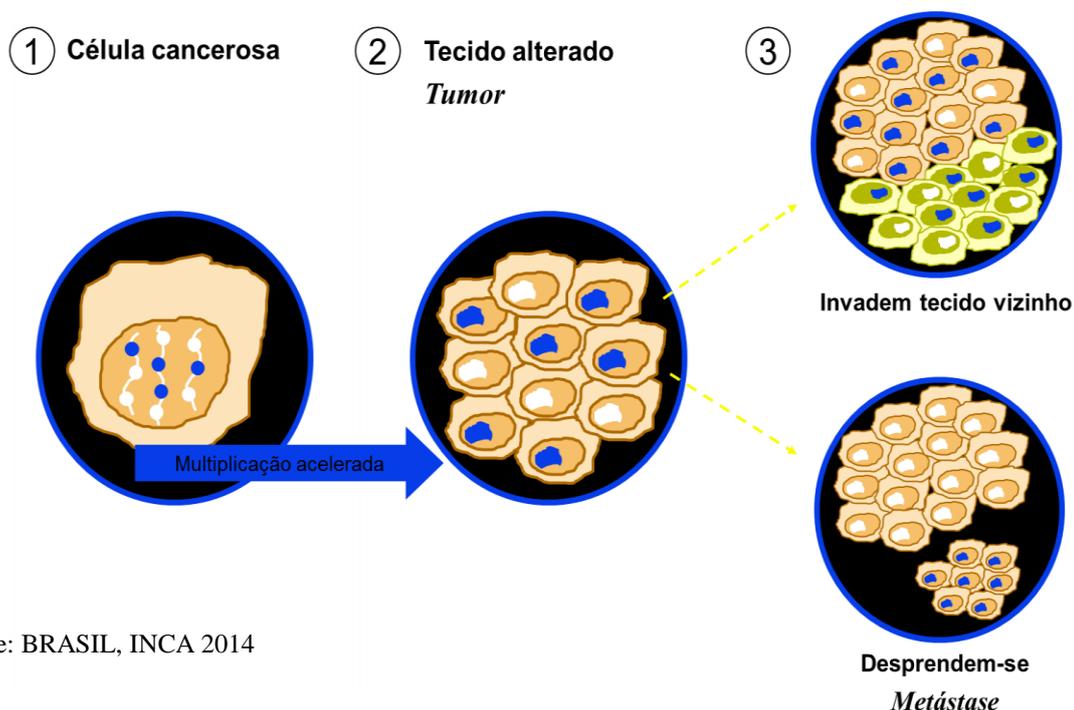
prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo ocorre em três estágios principais, o primeiro estágio é o de iniciação, em que a célula sofre ação dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que são fatores externos (meio ambiente em 80% dos casos, como alimentos, medicamentos, estilos e hábitos de vida) e/ou fatores internos (predisposições genéticas), os quais provocam modificações no DNA da célula (Figura 2). Em seguida, a célula alterada continua a sofrer ação de agentes que estimulam a sua multiplicação (agentes promotores) e transforma-se em células malignas ou cancerosas, este estágio é chamado de promoção (PONDER et. al., 1986; SHERR, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996; DE ALMEIDA et. al., 2005; BRASIL, 2011; SHAH et al. 2014).

Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. O tipo de alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas. O terceiro e último estágio é o de progressão, caracterizado pela proliferação descontrolada e irreversível das células alteradas (Figura 3). Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996; DE ALMEIDA et. al., 2005; SHAH et al. 2014).

Figura 2- Esquema representativo da transformação de uma célula normal em célula cancerosa.



Fonte: BRASIL, INCA 2014.

Figura 3- Esquema representativo dos estágios de evolução da célula até chegar ao tumor.

Fonte: BRASIL, INCA 2014

O aumento no número de casos tem despertado interesse na busca de tratamentos mais eficazes na terapia do câncer. As terapias aplicadas hoje são cirurgias, radioterapias e quimioterapias. Outra forma de tratamento é o uso de anticorpos monoclonais, que são anticorpos produzidos por um único clone de um linfócito B parental, sendo, portanto, idênticos em relação às suas propriedades físico-químicas e biológicas (WAYTECK et. al., 2014). Em geral, a terapia do câncer é combinada, sendo associado mais de um tipo de tratamento ou mais de dois agentes quimioterápicos (DE ALMEIDA et. al., 2005).

Apesar de essas estratégias serem bem sucedidas na maioria dos casos, erradicando tanto os tumores primários, como a divisão das células malignas, as células saudáveis podem ser lesionadas, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, pois as drogas utilizadas como agentes quimioterápicos atuam de forma não específica, promovendo efeitos colaterais tóxicos nos pacientes (DE ALMEIDA et. al., 2005; WAYTECK et. al., 2014).

Os fármacos atualmente utilizados como agentes quimioterápicos afetam, em sua maioria, apenas uma das características das células cancerosas, o processo de divisão celular, sendo, portanto, apenas antiproliferativos. Esses fármacos não exercem nenhum efeito inibitório específico sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou o poder metastático. Além disso, como seu efeito principal é exercido sobre a divisão celular, eles irão afetar todos

os tecidos normais que se dividem rapidamente, produzindo então, em maior ou menor grau, os conhecidos efeitos colaterais de uma quimioterapia. Ressalta-se ainda que os próprios agentes antineoplásicos podem também, em certas circunstâncias, ser carcinogênicos (BERNARDI; JACQUES-SILVA; LENZ, 2003).

Dados epidemiológicos mostraram que cerca de 30 agentes utilizados em quimioterapia estão relacionados com neoplasmas secundários e que dez compostos apresentaram evidências de carcinogenicidade humana (KIKUCHI; PINTO, 2005). Podemos citar como exemplo, a administração de β -caroteno como anticarcinogênico, cujas tentativas de uso clínico foram interrompidas prematuramente quando se descobriu que este tipo de tratamento estava associado a aumento na incidência de câncer. Este acontecimento pode ser explicado pela propriedade de óxido-redução do β -caroteno, podendo agir como aceptor ou como produtor de radical livre, dependendo da concentração testada, estado de oxidação-redução do sistema e propriedades intrínsecas do sistema fisiológico em estudo (KIKUCHI; PINTO, 2005). Diante disso faz-se necessário a avaliação de uma possível atividade genotóxica e/ou mutagênica, para garantir a segurança terapêutica de um agente neoplásico, onde se deve comprovar que o seu uso não traz agravos à saúde humana por meio de estudos farmacológicos, histopatológicos e toxicológicos (AQUINO, 2010).

1.2 Genotoxicidade e Mutagenicidade

Genotoxicidade é a habilidade que algumas substâncias apresentam de induzir modificações no material genético do organismo a ele exposto. Essas substâncias interagem quimicamente com o material genético, causando alterações oxidativas ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos, o dano é reparado pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, as alterações podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação (WHITE; RASMUSSEN, 1998; SASAKI et al. 2000; OBE et al., 2002; WASSON; MCKELVEY-MARTIN; DOWNES, 2008). O efeito genotóxico de um composto pode ser avaliado por meio de ensaios que investiguem o dano cromossômico como o de eletroforese em gel, conhecido como ensaio cometa.

A mutagenicidade se caracteriza pela indução de alterações transmissíveis e permanentes da quantidade ou da estrutura do material genético (SASAKI et al. 2000; WASSON; MCKELVEY-MARTIN; DOWNES et al., 2008). Apesar de ocorrerem mutações espontâneas que surgem na ausência do efeito de um mutágeno conhecido, a maioria delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais os seres humanos e outros

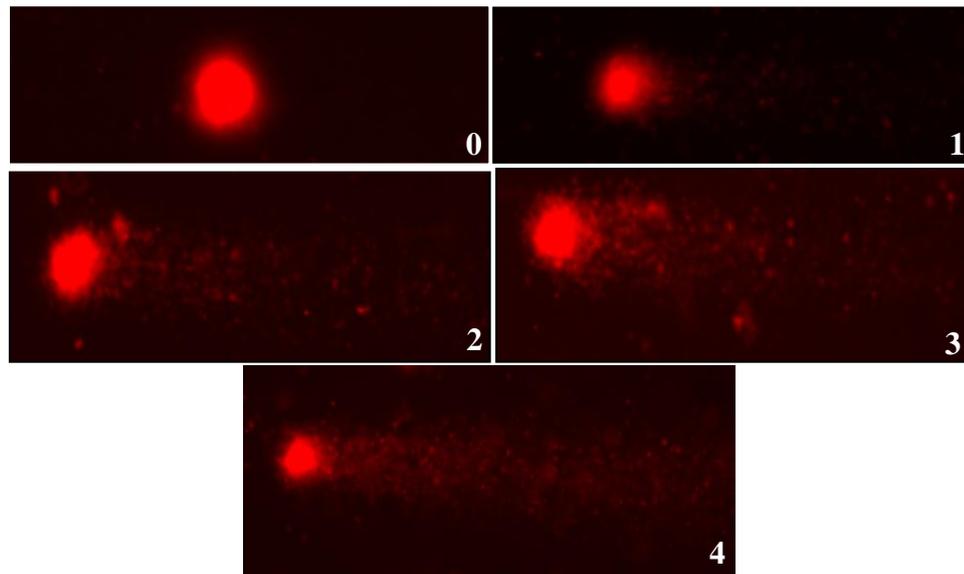
organismos podem ser expostos (GAMEIRO, 2005; CALVIELLO et al., 2006). O potencial mutagênico pode ser determinado através de ensaio *in vitro* ou *in vivo*. Essencial no estudo da mutagênese, o teste do micronúcleo (MN) é um bioindicador do efeito clastogênico (quebra de cromossomos) ou aneugênico (segregação cromossômica anormal), revelando a instabilidade genômica (LINDBERG et al 2007; IARMARCOVAI et al. 2009; THIERENS; VRAL, 2009; MUGHAL et al. 2010; TERRADAS et al. 2010).

1.2.1 Ensaio Cometa

Este ensaio baseia-se na medida de fragmentos de DNA que migram em um campo elétrico. Primeiramente as células são englobadas em gel e espalhadas em uma lâmina, e posteriormente submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração desses fragmentos livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Essas quebras podem ser de fita simples, dupla, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões alcali-lábeis (locais em que a cadeia polinucleotídica sofre quebra quando há incubação do DNA em pH elevado). Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem lesão detectável no DNA. Em contra partida, as células danificadas são identificadas, visualmente, por uma espécie de cauda, semelhante a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (DA SILVA et al., 2003; GONÇALVES; CONCEIÇÃO; RESGALL-JUNIOR, 2003; SPIVAK; COX; HANAWALT, 2009). Existe uma escala visual de dano de acordo com a intensidade ou tamanho da cauda que vai de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) (Figura 4), que pode ser determinada utilizando-se microscopia (COLLINS, 2004).

Este teste tem sido amplamente empregado desde meados da década de 80, com uma extensa aplicação em biomonitoramento de populações, para se testar o impacto de agentes genotóxicos oriundos de dejetos industriais, domésticos e agrícolas, poluentes ambientais e compostos terapêuticos, como também na determinação da capacidade de reparo de danos ao DNA em humanos, animais e populações de plantas, bem como em aplicações clínicas (HARTMANN et al., 2003). Os benefícios do ensaio cometa incluem a sua simplicidade, rápido desempenho e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (DA SILVA et al., 2003; GONÇALVES; CONCEIÇÃO; RESGALL-JUNIOR, 2003; SPIVAK; COX; HANAWALT, 2009).

Figura 4- Classificação do dano do DNA das células analisadas por ensaio cometa. 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) e 4 (dano máximo).



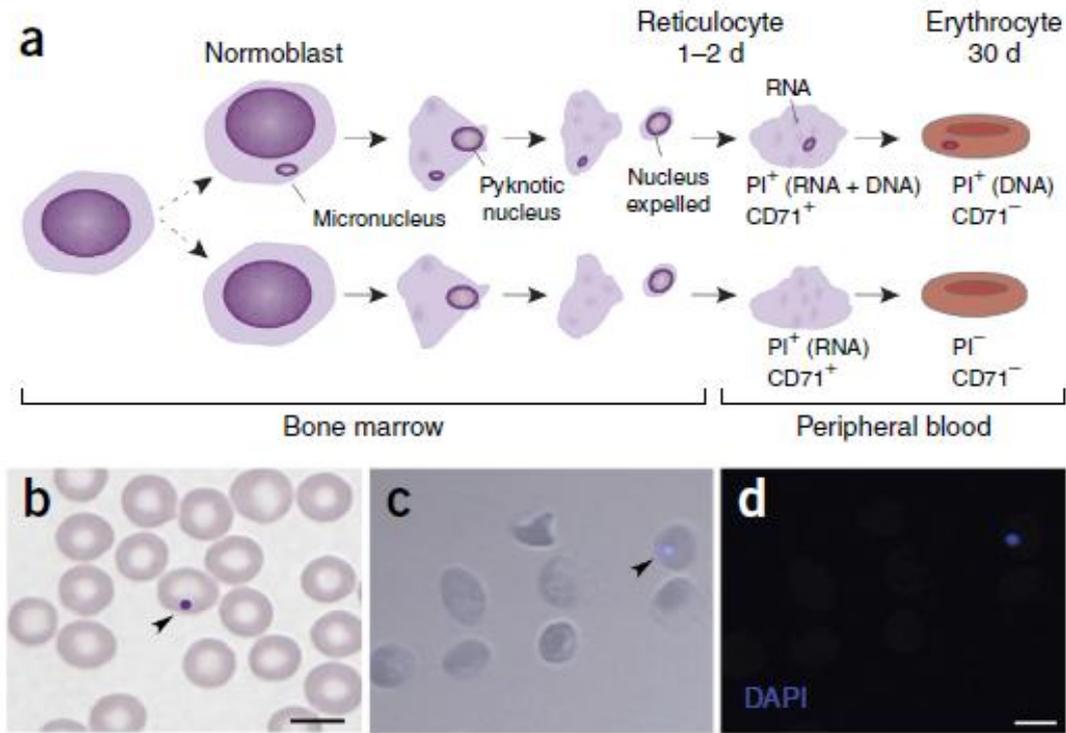
Fonte: Rocha, 2015.

1.2.2 Teste do Micronúcleo

Inicialmente desenvolvido da médula óssea de camundongos (SCHMID, 1976) o teste de micronúcleo tem sido recomendado para estudos de monitoramento ambiental, danos citogenéticos induzidos por radiações, estilo de vida, deficiências em nutrientes e doenças e, principalmente, por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos e aneugênicos solicitando, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito. (SCHMID, 1976; STICH et al., 1998; FENECH, 2000; RIBEIRO; MARQUES, 2003; PASTOR et al., 2003).

Consiste basicamente na exposição das células a agentes mutagênicos, onde micronúcleos, que são pequenos corpúsculos nucleares, são perdidos pelo núcleo principal ou formados por cromossomos inteiros que atrasam na anáfase durante a divisão celular. Esses corpúsculos perdidos ou cromossomos atrasados são envolvidos por uma membrana celular durante a telófase, aparecendo como pequenos núcleos além do núcleo principal (Figura 5) (IARMARCOVAI et al., 2009; THIERENS; VRAL, 2009; CEPPI et al., 2010)

Figura 5- Esquema da formação de micronúcleos como consequência de um dano no DNA de uma célula em divisão. (a) Dentro do normoblasto, a cromatina começa a condensar, e, eventualmente, o núcleo pinótico é expelido, proporcionando uma célula que é conhecido como um reticulócito (RET). Os RETs migram a partir da medula óssea para a circulação periférica, de modo que, 1 ou 2 dias mais tarde amadurece em um eritrócito normocromático, o qual é caracterizado pela degradação do RNA reticular e perda da expressão do receptor de transferrina (CD71). Embora o núcleo seja expelido durante a maturação de células vermelhas do sangue, o micronúcleo é retido. Se as células são genomicamente instável ou os camundongos foram tratados com uma genotoxina, a frequência de formação de micronúcleos aumenta. (b) Fragmento de DNA (micronúcleos) em um eritrócito da amostra de sangue fresco de um rato do tipo selvagem, feito por coloração May-Grünwald-Giemsa. (c, d) eritrócitos micronucleados a partir de uma amostra de sangue preparado pelo método DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindole). As barras de escala, 5 μ M. As setas indicam micronúcleos.



Fonte: Adaptada de Balmus et al., 2014.

A ocorrência dos micronúcleos simboliza uma resposta associada de instabilidade de cromossomos, fenótipos e alterações celulares causadas por defeitos genéticos e ou exposição exógena a agentes genotóxicos, refletindo inúmeras alterações cromossômicas importantes para a carcinogênese.

O Teste de Micronúcleos oferece vantagens sobre a análise cromossômica clássica por ser um procedimento simples, eficaz e realizado a baixo custo. Além disso, a frequência de micronúcleos aparece elevada em tecidos expostos bem antes que qualquer sintoma clínico seja evidente, tornando-o valiosa ferramenta como biomarcador precoce para o risco do desenvolvimento de câncer (GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2001).

1.3 Líquens

O aumento mundial do número de casos de neoplasias tem provocado um avanço na pesquisa na busca de soluções para o controle desta patologia. Há muitos anos os produtos naturais apresentam ser uma importante fonte de moléculas para o tratamento e profilaxia de diversos tipos de doenças permitindo o desenvolvimento de novos medicamentos. Os líquens surgem como uma promissora fonte de estudo, dos quais, muitas substâncias produzidas são exclusivas, não sendo encontradas em nenhum outro grupo de organismos (MATEOS, et al. 1993).

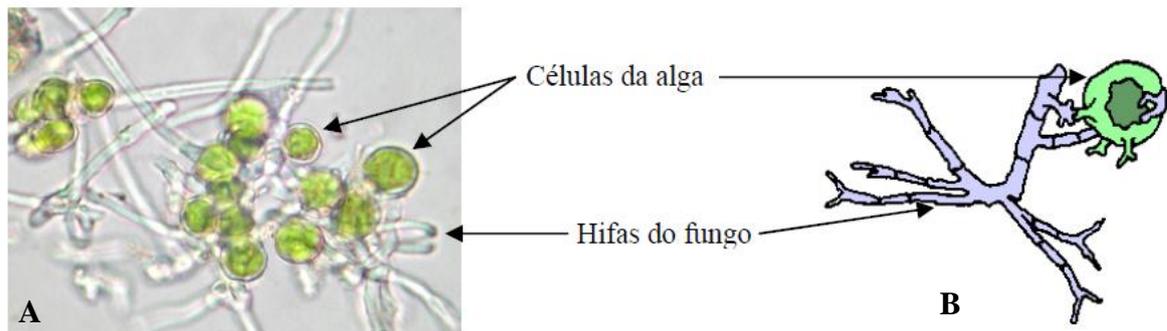
Os líquens são seres vivos que consistem em uma simbiose entre um fungo (micobionte) e uma ou mais algas ou cianobactérias (fotobionte) (HAMMER, 2009) (Figura 6). O micobionte na maioria das vezes pertence ao filo *Ascomycota*, mas também ocorre como *Basidiomycota*, enquanto que o fotobionte se apresenta tanto como *Chlorophyta* quanto *Cyanobacteria* (NASH III, 1996; BENATTI; MARCELLI, 2007). Os líquens possuem uma diversidade de espécies que apresentam praticamente três tipos de talo: os folhosos, semelhantes a pequenas folhas, apresentando-se estratificados com várias camadas, os crostosos, sendo achatados, aderindo-se firmemente ao solo, tendo aspecto de crosta e, finalmente, os fruticosos, com aparência arborescente, com camadas distintas estruturalmente estratificadas (AHMADJIAN, 1993; NASH III, 1996).

A estrutura morfológica dos líquens é composta pelas hifas pertencentes ao fungo, que, em espécies mais complexas, possuem aspectos anatômicos e morfológicos altamente especializados. O fotobionte apresenta sempre células envolvidas por hifas que se localizam próximos a superfície inferior e acima do córtex fúngico. Desta forma, o micobionte é o componente que forma a estrutura dos líquens, sendo o responsável por sua morfologia, proporcionando-os uma organização interna que mimetiza as folhas de plantas superiores, nas quais a absorção de luz pelo fotobionte possa ser maximizada (HALE, 1983; HONEGGER, 1991; NASH III, 1996).

Nessa associação simbiótica as algas produzem carboidratos como fonte energética para elas e para o fungo, enquanto que os fungos conferem uma proteção física contra a radiação excessiva, possibilitam a manutenção de uma alta pressão parcial de dióxido de carbono (em virtude da atividade respiratória), fixação e fornecem suplementos de águas, e nutrientes minerais retirados do substrato (COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002; GALASSO, 2010).

Geralmente a reprodução dos líquens ocorre de forma vegetativa, de modo que independente do fotobionte, o micobionte forma órgãos especializados, como sorédios e isídios. Os sorédios são aglomerados de células do fotobionte com hifas do micobionte, e não apresentam córtex. Os isídios, por sua vez, são dotados de córtex distinto. As estruturas de reprodução são importantes na determinação das espécies de líquens (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976; SPIELMANN, 2006).

Figura 6- (a) Filamentos do micobionte (*Parmotrema tinctorum*) envolvendo células do fotobionte (*Trebouxia*) visto ao microscópio. (b) Representação da associação mutualística entre fungo e alga.



Fonte: Adaptado de Spielmann, 2006.

Os líquens encontram-se largamente difundidos, desde as regiões polares às tropicais e das planícies às montanhas mais altas. Crescem em ambientes de muita luminosidade, ambientes áridos ou em temperaturas extremas, desfavoráveis para plantas vasculares. São encontrados em casca de árvores (corticícolas), folhas (folícolas), rochas alcalinas ou ácidas (saxícolas), solo (terrícolas), lenha (lignícolas) e nos mais diversos substratos desde que encontre as condições necessárias para seu crescimento. Por exemplo, 18 espécies de líquens são encontradas colonizando telhas de alumínio (GALLOWAY, 1993; MOLNÁR; FARKAS, 2010; SHUKLA; JOSHI; RAWAT, 2010).

1.4 A importância dos Líquens

Os líquens apresentam imensa relevância, tanto sob aspectos ecológicos e ambientais, quanto econômicos e farmacêuticos. Os líquens têm sido utilizados desde a Idade Média na indústria de perfumes, onde eram utilizados como bases fixadoras. Também foram utilizados na produção de corantes de tecidos, na obtenção de álcool a partir da hidrólise da liquenina (carboidrato característico dos líquens), e na indústria de bebidas alcoólicas, substituindo o lúpulo da cerveja por um composto liquênico (GMELIN, 1752; JOULAIN; TABACCHI,

2009). Certos pigmentos produzidos por líquens também têm importância econômica como o tornassol, frequentemente utilizado como indicador de pH devido as suas propriedades anfotéricas e as orquilas (orceína) empregadas em técnicas de biologia celular (SMITH, 1921; MOXHAM, 1982; SEU-SALERNO; BLALEWAY, 1987; JOULAIN; TABACCHI, 2009).

Alguns líquens também são comestíveis, como por exemplo, a *Lecanora esculeta*, servindo de alimento principal para renas e caribús (DONKIN, 1981). Líquens contendo cianobactérias são de grande importância na fixação de nitrogênio no solo e são particularmente sensíveis a compostos tóxicos, sendo utilizados no mapeamento de metais pesados e outros poluentes ao redor de pólos industriais e como instrumentos para monitorar a contaminação por substâncias radioativas (GARTY, 2001; PURVIS, 2000; SAIKI et al. 2007; BELIVERMIS et al., 2010). Por serem extremamente sensíveis a poluentes atmosféricos, inclusive os acumulando, os líquens constituem-se em excelentes bioindicadores e biomonitores da qualidade do ar (MULLER, 2001; FUGA, 2006; LEONARDO, 2010).

Devido a sua resistência e lento crescimento, possuem longevidade incomparável a outras plantas (SIPMAN; APTROOT, 2001). Por isso, são usados na geocronologia, para determinação da idade de monumentos arqueológicos ou históricos quando recursos de C¹⁴ não estão disponíveis (calcula-se que alguns tenham 4.500 anos) (ARMSTRONG; SMITH, 2009; EISENREICH; KNISPEL; BECK, 2011). Os líquens também contribuem para o desgaste das rochas e a formação do solo degradando-os por meio dos ácidos liquênicos, tornando possível a sucessão posterior de plantas (MULLER, 2001).

Compostos liquênicos como atranorina, os ácidos fumarprotocetrárico, girofórico, lecanórico, fisódico, protocetrárico, stictico e úsnico também demonstraram efeitos antimicrobianos contra espécies de bactérias e fungos, sendo que o ácido úsnico foi o composto com o maior potencial antimicrobiano (RANKOVIC'; MISIÉ; SUKDOLAK, 2008).

A atividade antifúngica do ácido protocetrárico, metabólito secundário da espécie *Usnea albopunctata*, também foi avaliado contra *Trichophyton rubrum* mostrando-se significativamente melhor que o padrão (NISHANTH et al., 2015). Outras pesquisas também revelaram as propriedades antivirais dos líquens (LAI et al., 2013). Alves et al (2014) avaliaram a atividade expectorante e antioxidante do ácido fumarprotocetrarico produzido pelo líquen *Cladonia verticillaris* em camundongos *Swiss* albinos e concluíram que esse metabólito possui atividade significativa.

Shrestha et al. (2015) comprovaram potente atividade citotóxica em 14 de 17 espécies de líquens testadas contra linfoma de Burkitt (Raji). A atividade citotóxica também foi

determinada por Micheletti *et al.* (2011), em uma série de compostos derivados de 15- ω -aminoalcoxilxantona sintetizada a partir de uma xantona isolada de espécies de líquens. As linhagens testadas foram B16 F10 (melanoma murino), MCF-7 (carcinoma de mama), 786-0 (carcinoma de rim), OVCAR 03 (carcinoma de ovário), NCIADR (ovário resistente a adriamicina) e HT-29 (carcinoma de cólon). As substâncias sintetizadas foram, em geral, ativas em várias linhagens neoplásicas e pelo menos 50% dos compostos testados foram ativos em todas as linhagens. Metabólitos extraídos de duas variedades do líquen *Collema flaccidum* também apresentaram atividade antitumoral significativa (REZANKA; DEMBITSKY, 2006)

Recentemente, a atividade genotóxica de líquens também tem sido bastante estudada, Ceker et al. (2013) avaliaram o efeito genotóxico e antigenotóxico, assim como o efeito antioxidante, de *Usnea articulata* e *U. filipendula* e concluíram que os extratos dessas duas espécies de líquens não possuem qualquer mutagenicidade, mas apresentam fortes efeitos antimutagênicos e antioxidantes que por sua vez estão associados entre si, de modo que a atividade antioxidante destas duas espécies favorecem a inibição de O⁶-metilguanina no sistema de teste MNNG (N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina). Estudos semelhantes com outra espécie de líquen, a *Cetraria islandica*, também demonstraram uma associação entre a alta atividade antioxidante com o seu efeito antigenotóxico (KOTAN et al., 2011).

Outras duas espécies de líquens, a *Peltigera horizontalis* e a *P. praetextata*, foram estudadas quanto suas propriedades genotóxicas, antigenotóxicas e antioxidantes, demonstrando que a atividade antioxidante dessas espécies está estritamente relacionada com a sua potencial atividade genotóxica (NARDEMIR et al, 2013). No entanto, espécies como *Umbilicaria vellea* e *Xantho somloensis* não foram genotóxicos, apresentando fortes atividades antigenotóxicas e antioxidantes (ASLAN et al., 2012).

Líquens como *Parmelia sulcata* e *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. inibiram o crescimento de células humanas de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) em concentrações relativamente baixas, enquanto que para obter atividade genotóxica em linfócitos humanos, são necessárias concentrações mais elevadas (ARI, et al. 2014, 2015).

Turkez, Aydin e Aslan (2014) compararam o efeito genotóxico do extrato aquoso de *Bryoria capillaris* (Ach.) sozinho e em combinação com o fungicida imazalil (IMA) em linfócitos humanos cultivados utilizando aberrações cromossômicas e teste de micronúcleos como parâmetros citogenéticos. Observou-se que o extrato deste líquen não possui potencial genotóxico em si, mas pode reduzir a genotoxicidade do IMA em linfócitos humanos *in vitro*.

1.5 Substâncias liquênicas

Os líquens produzem substâncias que podem ser classificadas em metabólitos primários (produtos intracelulares) e metabólitos secundários (produtos extracelulares). (HALE, 1983; COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002). Os metabólitos primários compreendem carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas. Geralmente são solúveis em água e podem ser extraídos com água quente. Esses compostos não ocorrem apenas em líquens, mas em fungos e algas de vida livre e em plantas superiores (HALE, 1983; NASH III, 1996). Enquanto que os metabólitos secundários são divididos em quatro grupos bioenergeticamente relacionados: depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos e ácidos úsnicos (CULBERSON, 1972; HALE, 1983; NASH III, 1996).

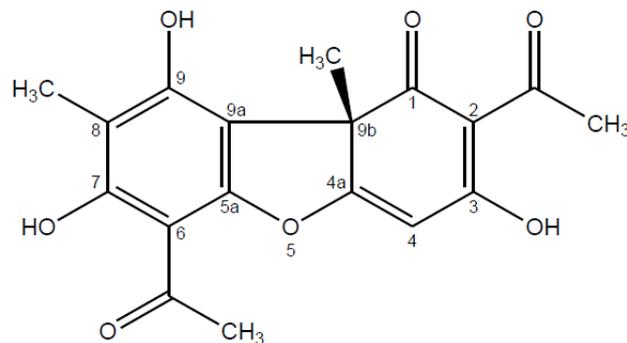
Mais de 630 metabólitos secundários de líquens são conhecidos. A maior parte é sintetizada unicamente pelos líquens e uma pequena minoria, é produzida por fungos de vida livre e plantas superiores (ELIX, 1996).

Existem três rotas biossintéticas de produção das substâncias liquênicas: a do acetato polimalonato, em que são formados os ácidos graxos, depsídeos, depsidonas, quinonas e dibenzofuranos; a do ácido chiquímico, que produz os pigmentos amarelos; e a do ácido mevalônico, que forma os terpenóides e esteróides. São também relatadas as vias dos aminoácidos e dos carboidratos. No entanto, a origem biossintética da maioria dos metabólitos secundários decorre das vias do ácido chiquímico e do acetato polimalonato, que perfazem cerca de 10% do peso do talo seco (HALE, 1983; XAVIER-FILHO, 1989; NASH III, 1996). Estes produtos extracelulares são os responsáveis pela maior parte dos benefícios ecológicos e econômicos advindos dos líquens, conferindo também sua capacidade de adaptação (NASH III, 1996; MULLER, 2001).

1.6 Ácido Úsnico

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7-9-di-hidroxi-8, 9b-dimetil-1, 3 (2H, 9BH)-dibenzofuranodiona] (C₁₈H₁₆O₇) (Figura 7), é derivado do dibenzofurano e foi isolado pela primeira vez em 1844 e desde então se tornou um dos mais bem estudados metabólitos liquênicos (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Pode ser encontrado na natureza em duas formas enantioméricas, (+) e (-), os quais dependem da estereoquímica do grupo metil angular localizado no carbono quiral 9b. Seu aspecto se apresenta em cristais amarelados e seu ponto de fusão é em torno de 204°C. O ácido úsnico é parcialmente solúvel em etanol e facilmente solúvel em acetona, acetonitrila, diclorometano, acetato de etila e misturas de solvente orgânico como dimetilsulfóxido (DMSO)/metanol. É uma substância especialmente abundante nos gêneros *Usnea*, *Cladonia*, *Cetraria*, *Ramalina* e *Parmelia* (INDEX MERCK, 1995; VENKATARAMANA; KRISHNA, 1992; MULLER, 2001; COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; JIN et al., 2013).

Figura 7- Estrutura química do ácido úsnico.



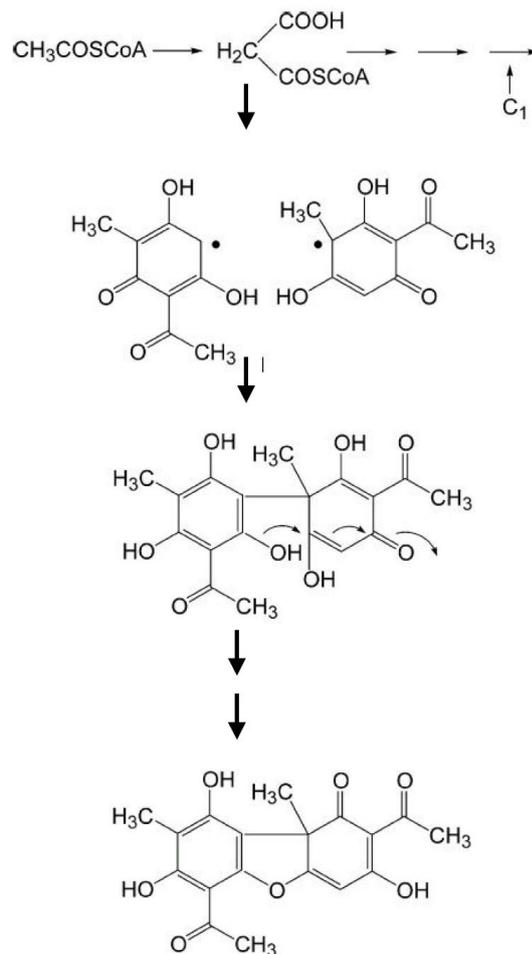
Fonte: Ingólfssdóttir, 2002.

Nos líquens, o ácido úsnico é provavelmente responsável por sua defesa, de modo que a presença de poluentes parece estimular sua biossíntese, sendo utilizado como indicador para biomonitoramento ambiental. Sua concentração no talo liquênico parece estar relacionada com a quantidade integral dos agentes tóxicos aromáticos (CARDARELLI et al., 1997; MULLER, 2001). Esse metabólito também é responsável por controlar a tolerância de acidez dos líquens. A presença deste metabólito faz com que o líquen tenda a preferir solos com pH em torno de 4,0 e 4,5, formando também uma camada hidrofóbica na superfície do talo que

diminui a tolerância a dióxido de enxofre (SO₂), um poluente atmosférico, sendo um bioindicador de poluição muito eficiente (HAUCK; JURGENS, 2008; FAVERO-LONGO et al., 2009).

Estudos acerca da estrutura deste metabólito secundário demonstraram que os dois anéis laterais dão origem a bandas de absorção de raios ultravioleta, sendo esta uma propriedade responsável pela proteção eficaz contra a radiação solar (GALASSO, 2010). O ácido úsnico é biossintetizado através da via do acetato polimalonato. Inicialmente são sintetizadas unidades fenólicas a partir da acetil-CoA e malonil-CoA, através de sintetases aromáticas, que não possuem subunidades desidrogenadas. Em seguida ocorre o acoplamento estereoespecífico de duas unidades metilfloroacetofenona, originando, portanto o ácido úsnico hidratado; por fim ocorre a desidratação da molécula levando a formação da ligação éter (Figura 8) (TAGUCHI; SANKAWA; SHIBATA, 1969; INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Figura 8- Via de biossíntese do ácido úsnico.



1.7 Atividades Biológicas

Estudos realizados com o ácido úsnico demonstraram diversas atividades biológicas, tais como antibiótica (GUPTA et al., 2012), antiprotozoária (DE CARVALHO et al., 2005), antitumoral (SANTOS et al., 2006), antiproliferativa (BRISDELLI et al., 2013), antiviral (SHTRO et al., 2014) e anti-inflamatória (ZU-QING et al., 2014).

O ácido úsnico extraído de *Usnea dasypoga* foi testado contra isolados clínicos e cepas padrão de *Helicobacter pylori*, demonstrando alta eficácia no tratamento *in vitro* (SAFAK et al., 2009). Ramos e Almeida da Silva (2010) mostraram a atividade do ácido úsnico contra cepas resistentes e suscetíveis de *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobacterias não tuberculosas.

Linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina e meticilina foram submetidas a tratamento com o ácido úsnico e o usnato de sódio, através do teste de difusão de discos e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As substâncias que foram ativas contra as cepas testadas apresentaram a CIM entre 4 e 16 µg/mL, sendo a atividade superior a exibida pela ampicilina (125 µg/mL) (ELO; MATIKAINEN; PELTTARI, 2007).

Segatore *et al.* (2012) confirmaram a atividade antimicrobiana do ácido úsnico e sugeriram que esta substância pode ser um bom candidato como modelo para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos ou combinações de medicamentos para quimioterapia. Maciąg-Dorszyńska, Węgrzyn, Guzow-Krzemińska, (2014) demonstraram que o ácido úsnico causou uma rápida e forte inibição na síntese de DNA e RNA de bactérias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis* e *S. aureus*.

Nanocápsulas contendo ácido úsnico cristalino tiveram alta eficiência no sistema de liberação controlada dependente de temperatura e apresentaram atividade antibiofilme frente à *Staphylococcus epidermis* (MARTINELLI et al., 2014). Sokolov *et al.* (2012) mostraram que o ácido úsnico é um potente agente inibidor da reprodução do vírus da gripe H₁N₁, apresentando também, indiretamente, atividade anti-inflamatória, de modo que o ácido úsnico diminuiu o nível de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) em macrófagos estimulados com lipopolissacárideo (LPS) de maneira dose-dependente (JIN; LI; HE, 2008). O ácido úsnico também apresentou efeitos inibitórios *in vitro* contra a patogenicidade do protozoário *Trypanosoma cruzi* (DE CARVALHO et al., 2005).

Cetin *et al.* (2008) avaliaram o efeito inseticida dos dois isômeros do ácido úsnico contra as larvas de *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório. Ambos os compostos mostraram forte atividade larvicida e causaram 100% de mortalidade dos

terceiro e quarto estágios larvais em 24 h, nas doses de 5 e 10 ppm, sugerindo que o ácido úsnico pode ser útil como inseticidas.

Báčkorová *et al.* (2011) avaliaram *in vitro* o ácido úsnico e mais três metabólitos secundários de líquens (parietina, ácido atranorínico e ácido girofórico) quanto à sensibilidade de nove linhagens de células de câncer humano: A2780 (carcinoma de ovário), HeLa (adenocarcinoma cervical), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), SK-BR-3 (adenocarcinoma de mama), HT-29 (adenocarcinoma de cólon), HCT-116 p53(+/+) (carcinoma de cólon humano de tipo selvagem), HCT-116 p53(-/-) (carcinoma de cólon humano p53-nulo), HL-60 (leucemia promielocítica) e Jurkat (leucemia de células T). Os resultados de viabilidade celular utilizando o ensaio MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólico) demonstraram que o ácido úsnico e a atranorina reduziram significativamente a viabilidade celular quando comparados com parietina e ácido girofórico.

O ácido úsnico isolado de *Cladonia arbuscula* e *Alectoria ochroleuca* apresentou um efeito inibitório sobre o crescimento e a proliferação de duas linhagens de células humanas, T-47D (câncer de mama) e Capan-2 (câncer pancreático), levando à perda do potencial de membrana mitocondrial (EINARSDÓTTIR *et al.*, 2010).

SANTOS *et al.* (2005) investigaram a ação antiproliferativa do ácido úsnico, o qual apresentou uma atividade citotóxica considerável com CI_{50} de 10 e 13,8 $\mu\text{g/mL}$ para o composto em suspensão e encapsulado, respectivamente, frente a células de carcinoma de pulmão humano (NCI-H 292).

Em concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$, o ácido úsnico exibiu propriedades redox-ativas variáveis, atuando como agente antioxidante e pró-oxidante, de acordo com diferentes condições do sistema e do ambiente celular. Também apresentou potente efeito neurotóxico. Estas propriedades pró-oxidantes em sistemas biológicos podem ter sido responsáveis pelos potenciais efeitos neurotoxicológicos do ácido úsnico (RABELO *et al.*, 2012).

A atividade antitumoral do ácido úsnico foi testada em camundongos frente ao tumor experimental sarcoma-180, obtendo-se uma inibição do tumor de 43% (RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2006). Outros estudos também demonstraram uma redução da proliferação celular do carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2), quando aplicado o composto em suspensão e encapsulado (RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2004).

Estudos indicam que altas doses de ácido úsnico, isolado da *Usnea longissima*, reduzem significativamente lesões da ulcera gástrica de ratos, quando comparado a droga padrão, indometacina. O efeito gastroprotetor do ácido úsnico foi atribuído a sua capacidade

de reduzir os efeitos dos danos oxidativos e o efeito inibitório na infiltração dos neutrófilos nos tecidos do estômago dos ratos (ODABASOGLU et al., 2006).

Zu-Qing *et al.* (2014) estudaram o efeito protetor do ácido úsnico na lesão pulmonar aguda e verificaram que o pré-tratamento com ácido úsnico melhorou significativamente o edema pulmonar. O ácido úsnico apresentou forte atividade anti-inflamatória sobre macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7, devido à regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e mediadores da via supressora de NF- κ B (fator de transcrição nuclear) (HUANG et al. 2011).

Leandro *et al.* (2013) avaliaram a genotoxicidade e o potencial antígeno-tóxico do ácido úsnico pelo teste micronúcleo e pelo ensaio cometa em culturas de células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) e em camundongos Swiss. Os animais foram tratados com doses de 25, 50, 100, e 200 mg/kg de peso corporal. As mesmas concentrações de ácido úsnico foram combinadas com metanossulfonato de metilo (MMS) para a avaliação de antigenotoxicidade. Os resultados *in vitro* demonstraram que o ácido úsnico induziu dano no DNA em concentrações de 60 e 120 μ g/mL no ensaio cometa. No entanto, nenhum efeito genotóxico foi observado no ensaio de micronúcleo usando células V79 nas concentrações testadas. Já nos ensaios de antigenotoxicidade, a administração combinada do ácido úsnico com o MMS reduziu significativamente as frequências de micronúcleos e os danos do DNA *in vitro* e *in vivo*, quando comparada com o tratamento com MMS sozinho.

Efeitos genotóxicos e oxidativos do ácido úsnico foram testados em cultura de células sanguíneas humanas pelos testes de alterações cromossômicas e de micronúcleo e capacidade antioxidante total (TAC) e estado oxidativo total (TOS). Observou-se que o ácido úsnico não apresentou efeitos mutagênicos sobre os linfócitos humanos e não alterou os níveis de TAC e TOS (POLAT et al., 2013).

1.8 Síntese de novos análogos estruturais de produtos naturais biologicamente ativos com atividade genotóxica e mutagênica

Produtos encontrados na natureza, a exemplo das substâncias liquênicas, são importantes fontes de compostos biologicamente ativos e muitos deles constituem modelos para a síntese de vários fármacos (WALL; WANI, 1996). Uma das formas mais utilizadas para a obtenção de novos compostos bioativos com grande potencial em diversas atividades biológicas diferentes é o isosterismo, processo onde se modificam as propriedades físicas e químicas de um composto protótipo através da introdução ou substituição de novos grupos

funcionais, seguidas da avaliação do efeito que estas tiveram sobre a atividade biológica (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1982).

A estrutura desses compostos pode ser modificada por síntese com o objetivo de aumentar a atividade desejada e minimizar ou eliminar as propriedades indesejáveis. Dentre as características indesejáveis podemos citar a alta toxicidade e insolubilidade. (SILVERMAN, 1992). Essas estruturas semelhantes podem apresentar a mesma atividade biológica, mas podem apresentar diferentes potências e/ou efeitos colaterais e em alguns casos até mesmo atividades diferentes (GARETH, 2003).

Estudos de modificação molecular junto com avaliação de sua atividade biológica foram realizados com uma série de flavonóides e investigadas suas atividades antiproliferativas em linhagem de câncer de mama (MCF7). A presença do grupo carbonil C-4 em alguns compostos foi essencial para atividade antineoplásica (POUGET et al., 2001).

A escolha das alterações necessárias para produzir análogos de um determinado protótipo é realizada considerando-se as atividades dos compostos com estruturas semelhantes e também a possível química e bioquímica do análogo desejado. Várias são as modificações estruturais capazes de alterar a atividade, bem como melhorar ou diminuir os efeitos de toxicidade, como, alteração do número de grupamentos metileno em uma cadeia e alteração do grau de insaturação, introduzindo ou removendo um sistema de anel (GARETH, 2003).

Parâmetros como lipofilicidade, estrutura química dos compostos, pKa, polaridade, entre outros, devem ser determinados para verificar correlações existentes entre os grupamentos substituintes e o aumento ou diminuição da atividade citotóxica. No caso dos compostos fenólicos estudos indicam que o mecanismo de toxicidade está relacionado com a lipofilicidade, expressa em log P (HANSCH et al., 2000).

Tentativas de correlacionar estrutura química e atividade biológica têm sido realizadas desde 1948. Shibata e Miura (1948) estudaram os efeitos de substituições nos anéis do ácido úsnico na ação antibiótica destes. Takai, Uehara e Beisler (1979) também pesquisaram as relações estrutura-atividade, indicando que a lipofilicidade era fator importante para os efeitos citotóxicos do ácido úsnico (GOMES et al., 2002). Verificaram ainda, através de reações do ácido lecanórico, que a homologação da cadeia carbônica para orselinatos e ácido orselínico conduziu a compostos mais ativos em relação à atividade antibacteriana (GOMES et al., 2003).

Bazin et al. (2008) avaliaram nove conjugados do ácido úsnico frente a linhagens celulares de câncer e observaram que os derivados apresentaram uma atividade citotóxica significativa. Propriedades de cicatrização de derivados do ácido úsnico foram avaliadas

utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*, e foi demonstrada uma baixa citotoxicidade combinada com alto desempenho na cura de feridas, sugerindo seu possível uso na cicatrização de feridas ou como anti-idade para a pele (BRUNO et al., 2013).

Neste sentido, o ácido úsnico se apresenta como uma interessante estrutura protótipo para a síntese de novos análogos potencialmente ativos, apresentando grandes chances de se encontrar diferentes padrões de atividade ou toxicidez dos produtos obtidos. Em adição, existem poucos estudos que relatem possível ação genotóxica de compostos liquênicos, especialmente aqueles relacionados ao ácido úsnico.

2. REFERÊNCIAS

ALVES, G. M. DE B. et al. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 139 - 143, 2014.

AHMADJIAN, V. The Lichen Symbiosis. **2ª ed: New Youk: John Wiley & Sons**, 1993.

AQUINO, I. Efeito Genotóxico Da Artemisinina E Do Artesunato Em Células De Mamíferos. 2010. 81 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Biologia Geral e Aplicada, Departamento de Biomoléculas, Universidade Estadual Paulista "julio Mesquita Filho", Botucatu – Sp, 2010.

ARI, F. et al. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on breast cancer cells. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 804-813, 2014.

ARI, F. et al. Promising anticancer activity of a lichen, *Parmelia sulcata* Taylor, against breast cancer cell lines and genotoxic effect on human lymphocytes. **Cytotechnology**, v. 67, n. 3, p. 531-543, 2015.

ARMSTRONG, R. A.; SMITH, S. N. Carbohydrates in the hypothallus and areolae of the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. **Symbiosis**, v 49, p. 95–100. 2009.

ASLAN, A. et al. Protective role of methanol extracts of two lichens on oxidative and genotoxic damage caused by AFB1 in human lymphocytes in vitro. **Toxicology & Industrial Health**, v. 28, n. 6, p. 505-512, 2012.

BAČKOROVÁ, M. et al. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology In Vitro**, v. 25, p. 37 - 44, 2011.

BALMUS, G. et al. A high-throughput *in vivo* micronucleus assay for genome instability screening in mice. **Nature Protocols**, v. 10, p. 205–215, 2014.

BAZIN, M. et al. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 6860–6866, 2008.

BELIVERMIS, M. et al. The effects of physicochemical properties on gamma emitting natural radionuclide levels in the soil profile of Istanbul. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 163, n. 1, p. 15–26, 2010.

BENATTI, M. N.; MARCELLI, M. P. Gêneros de fungos liquenizados dos manguezais do Sul-Sudeste do Brasil, com enfoque no manguezal do Rio Itanhaém, Estado de São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 4, p. 863-878. 2007.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma** : v. 15, n. 9-10, p. 61-64. 2003.

BRASIL, Instituto Nacional de Câncer. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Instituto Nacional de Câncer. – **Rio de Janeiro: Inca**, 128 p. : il., 2011.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer -INCA. Estimativas 2014, incidências de câncer no Brasil. [Acesso em 8 de dezembro de 2014]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>, 2014.

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

BRUNO, M. et al. (+)- Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 1834–1843, 2013.

CALVIELLO, G. et al. DNA Damage and Apoptosis Induction by the Pesticide Mancozeb in Rat Cells: Involvement of the Oxidative Mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 87 - 96, 2006.

CARDARELLI, M. et al. Antimitotic effects os usnci acid on different biological systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 667 - 672, 1997.

CEKER, S. et al. Genotoxic and antigenotoxic potentials of two *Usnea* species. **Toxicology and Industrial Health**, v. 1, p. 1-10, 2013.

CEPPI, M. et al. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 705, n. 1, p. 11 – 19, 2010.

CETIN, H. et al. Insecticidal activity of major lichen compounds (-) and (+) usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1277-1279, 2008.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 137 - 149, 2002.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 26, n. 3, p. 249 – 261, 2004.

CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the indication of lichen products by standardized thin layer-chromatographic method. **Journal of Chromatography**, v. 72, p. 1113 - 1125, 1972.

DA SILVA, J. et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 941-947, 2003.

DE ALMEIDA, V.L. et al. 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.

DE CARVALHO, E. A. B. et al. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **The International Research and Review Journal for Microscopy**, v. 36, p. 155 - 161, 2005.

DONKIN, R. A. The “manna lichen”. **Anthropos**, v. 76, p. 562-576. 1981.

EINARSDÓTTIR, E. et al. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. **Planta Medica**, v. 76, p. 969 - 974, 2010.

EISENREICH, W.; KNISPEL, N.; BECK, A. Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 445–456, 2011.

ELIX, J. A. Biochemistry and Secondary Metabolites. In: NASH III, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

ELO, K.; MATIKAINEN, J.; PELTTARI, E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resisten enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Naturwissenschaften**, v. 94, p. 465-468. 2007.

FAVERO-LONGO, S. E. et al. Lichens on asbestos-cement roofs: bioweathering and biocovering effects. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, p. 1300-1308. 2009.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n. 1 – 2, p. 81 – 95, 2000.

FERLAY, J. et al. **GLOBOCAN 2012 v. 10, cancer incidence and mortality worldwide**. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC CancerBase, 11). Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

FUGA, A.. Uso de fungos epífitos no biomonitoramento da poluição atmosférica da região metropolitana de São Paulo. **Dissertação (Mestrado)**. São Paulo, 2006

GALASSO V. Probing the molecular and electronic structure of the lichen metabolite usnic acid: A DFT study. **Chemical Physics**, v. 374, p. 138–145, 2010.

GALLOWAY D. J. Global environmental change: lichens and chemistry. **Lichenologist**, v. 53, p. 87-95, 1993.

GAMEIRO, P. H. Efeito antimutagênico do extrato aquoso de *Agaricus brasilienses* em cultura de linfócitos humanos. **Trabalho de conclusão de curso**. Universidade Federal de Pelotas, p. 56, 2005.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. **Toxicology**, v. 165, p. 153-162, 2001.

GARETH T. Química medicinal – uma introdução. **Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Kogan**; 2003.

GARTY J. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 20, p. 309-371, 2001

GMELIN, J. G. Reise durch Siberian. Göttingen. In: Hofmeisters Handbuch der Physiologisch Botanik. II. HERREIRA- CAMPOS, M. L. A. 2006. **Biologia de Líquens. Sistemática e Evolução dos Líquens**. Âmbito Cultural Edições Ltda. I. X, p. 455-466, 1752.

GOMES, A. T. et al. Bioactive derivatives obtained from lecanoric acid, a constituent of lichen *Parmotrema tinctorium* (Nyl.)Hale (Parmeliaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 74-75, 2002.

GOMES, A. T. et al. Antimicrobial activity of orsellinates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 194-196. 2003.

GONÇALVES, L. M.; CONCEIÇÃO, M.B.; RESGALL-JUNIOR, C. Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão *Perna perna* através do Ensaio do Cometa. In: **II Simpósio Brasileiro De Engenharia Ambiental**. Livro de Resumos. v.1, UNIVALI, p. 384, 2003.

GUPTA, V. K. et al. Membrane-damaging potential of natural L(-) usnic acid in *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 12, p. 3375-3383, 2012.

HAMMER, S. Lichens. **3^a ed: Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)**, p. 142–152. 2009.

HANSCH, C. et al. Comparative QSAR evidence for a free radical mechanism of phenol-induced toxicity. **Chemical and Biological Interaction**, v. 127, p. 61-72, 2000.

HARTMANN, A. et al. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. **Mutation Research**, v. 536, p.27–38, 2003.

HALE, M.E. **The Biology of Lichen**, v.3, p. 90, 1983.

HAUCK, M., JURGENS S. Usnic acid controls the acidity tolerance of lichens. **Environmental Pollution**, 156 115 -122, 2008.

HONEGGER, R. Functional aspects of the lichen symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 553-578. 1991.

HUANG, Z. et al. Anti-inflammatory Effects and Mechanisms of Usnic Acid. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater**, vol. 26, n. 5, pp. 955 - 959, 2011.

IARMARCOVAI, G. et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. **Mutation Research**, Amsterdam v. 659, n. 3, p. 274–283, 2009.

INDEX. MERCK. Encyclopedia of chemical, drugs and biologicals. 12 ed. **New Jersey: Merck**, p. 9806, 1995.

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

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

JIN, J. et al. Solubility of (+)-Usnic Acid in Water, Ethanol, Acetone, Ethyl Acetate and n-Hexane. **Journal of Solution Chemistry**, v. 42, p. 1018 – 1027, 2013.

JOULAIN, D.; TABACCHI, R. Lichen extracts as raw materials in perfumery. part 1: oakmoss. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, n. 2, p. 49-61. 2009.

KIKUCHI I. S; PINTO, T. DE J. A. A prática clínica em doenças reumáticas: Implicações clínicas de drogas antineoplásicas mutagênicas. **Grupo Editorial Moreira**, 2005.

KOROKOLVAS, A., BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacéutica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Dois, 1982.

KOTAN, E. et al. Protective role of methanol extract of *Cetraria islandica* (L.) against oxidative stress and genotoxic effects of AFB₁ in human lymphocytes *in vitro*. **Toxicology & Industrial Health**, v. 27, n. 7, p. 599-605, 2011.

LAI, D. et al. Phenolic compounds with *in vitro* activity against respiratory syncytial virus from the Nigerian lichen *Ramalina farinacea*. **Planta Médica**, v. 79, n. 15, p. 1440-1446, 2013.

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

LEONARDO, L. Utilização de Líquens como bioindicadores de contaminação atmosférica por radionuclídeos naturais e metais por região impactada por TENORM. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, p. 136, 2010.

LINDBERG, H. K. et al. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 617, n. 1 – 2, p. 33 – 45, 2007.

MACIĄG-DORSZYŃSKA, M.; WĘGRZYN, G.; GUZOW-KRZEMIŃSKA, B.; Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 353, n. 1, p. 57 - 62, 2014.

MARTINELLI, A. et al. Release behavior and antibiofilm activity of usnic acid-loaded carboxylated poly(L-lactide) microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 2, p. 415–423, 2014.

MATEOS, J. L. et al. Involvement of phytochrome-mediated cyclic AMP in the synthesis and deposition of fumarprotocetraric acid on the cortical hyphae of *Cladonia verticillaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 31, p. 667-674, 1993.

MICHELETTI, A. C. et al. Chemical modifications of a natural xanthone and antimicrobial activity against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and cytotoxicity against human tumor cell lines. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 1014-1020, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. - CONTAPP. "Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco". **Instituto Nacional De Câncer**. Coordenação Nacional De Controle De Tabagismo - Rio de Janeiro, 1996.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 65, p. 157 – 173, 2010.

MOXHAM, T. H. Lichens and litmus. **Bulletin Lichen Society**, v. 50, p. 1-3. 1982.

MUGHAL, A. et al. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 700, n. 1-2, p. 86-94, 2010.

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

NARDEMIR, G. et al. Genotoxic, antigenotoxic and antioxidant properties of methanol extracts obtained from *Peltigera horizontalis* and *Peltigera praetextata*. **Toxicology & Industrial Health**. 2013.

NASH III, T.H. Lichen Biology. **Cambridge University Press**. 1^a ed. 303p, 1996.

NISHANTH, K. S. et al. Protocetraric acid: an excellent broad spectrum compound from the lichen *Usnea albopunctata* against medically important microbes. **Natural Product Research**, v. 29, n. 6, 574-577, 2015.

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

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **CID-10**: classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde. 10. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, v. 3, 2007.

PASTOR, S. CREUS, A. et al. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 249–58, 2003.

POLAT, Z. et al. In vitro risk assessment of usnic acid compound. **Toxicology & Industrial Health**. 2013.

PONDER, B.A.J. et al. Direct examination of the clonality of carcinogen-induced epithelial dysplasia in chimeric mice. **Journal of Natural Cancer Institute**. v. 77 p. 967. 1986.

POUGET, C. et al. Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 3095 - 3097, 2001.

PURVIS, O. W.; **Lichens**. Singapore: Craft Print, 2000.

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

RAMOS, D. F.; ALMEIDA DA SILVA, P. E. Antimycobacterial activity of usnic acid against resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 260, 2010.

RANKOVIC´, B.; MISIÉ, M.; SUKDOLAK, S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1239-1242, 2008.

REZANKA, T.; DEMBITSKY, V. M. The colleflaccinosides, two chiral bianthraquinone glycosides with antitumor activity from the lichen *Collema flaccidum* collected in Israel and Russia. **Natural Product Research**, v. 20, n. 10, p. 969 – 980, 2006.

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

RIBEIRO-COSTA, R. M. et al. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA- microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 371-384, 2004.

SAFAK, B. et al. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of usnic acid. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 955, 2009.

SAIKI, M. et al. Biomonitoring of the atmospheric pollution using lichens in the metropolitan area of São Paulocity, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 127, n. 1, p 213-219, 2007.

SANTOS, N. P. et al. Usnic acid-loaded nanocapsules: na evaluation of cytotoxicity. **Journal Drug Delivery Science Techonology**, v. 15, p. 355-361, 2005.

SANTOS, N. P. et al. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 64, p. 154-160, 2006.

SASAKI, Y.F. et al. The comet assay with mouse multiple organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database. **Critical Reviews Toxicology**, London, v. 30, n. 6, p. 629-799, 2000.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Principles and Methods for Their Detection (ed. Hollaender,A.). **Plenum Press, New York**, v.4, p.31-53, 1976.

SEGATORE, B. et al. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillinresistant Staphylococcus aureus clinical isolates determined by FICI and E model methods. **Phytomedicine**, v. 19, p. 341– 347. 2012.

SEU-SALERNO. M.; BLALEWAY, J. El perfume. **Investigación y Ciencia**, v. 132, p. 38-48. 1987.

SHAH, M. A. et al. A global assessment of cancer genomic alterations in epigenetic mechanisms. **Epigenetics & Chromatin**, v. 7, p. 29, 2014.

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

SHIBATA S, MIURA Y. Antibacterial effects of lichen substances, II – Studies on didimic acid and related compounds. Japan Med. **Journal of science in Biology**, v. 2, p. 22-24, 1948.

SHRESTHA, G. et al. Anticancer activities of selected species of north american lichen extracts. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 1, p. 100-107, 2015.

SHTRO, A. A. et al. Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 24, p. 6826-6836, 2014.

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

SILVERMAN, R. B. The organic chemistry of drug design and drug action. **Academic Press, Inc.**, California, 1992.

SIPMAN, H. J. M.; APTROOT, A. Where are the missing lichens? **Mycological Research**, v, 105, p. 1433-1439. 2001.

SMITH, A. L. Lichens. **Cambridge University Press**. Cambridge. 1921.

SOKOLOV, D. N. et al. Anti-viral activity of (-)- and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 7060–7064, 2012.

SPIELMANN, A. A.; Fungos liquenizados (líquens). **Relatório de estágio á docência**. São Paulo, 2006.

SPIVAK, G. COX, R. A.; HANAWALT, P. C. New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. **Mutation Research**, v. 681. p. 44-50, 2009.

STICH, H.F. et al. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. **International Journal of Cancer**, v. 42, p. 195–199, 1998.

TAGUCHI, H.; SANKAWA, U.; SHIBATA, S. Biosynthesis of natural products. VI Biosynthesis of usnic acid in lichen (1). A general scheme of biosynthesis of usnic acid. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, p. 2054-2060, 1969.

TAKAI, M.; UEHARA, Y.; BEISLER, J. A. Usnic acid derivates as potencial antineoplastic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 1380-1384, 1979.

TERRADAS, M. et al. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research**, Amsterdam, v. 705, n. 1, p. 60 – 67, 2010.

THIERENS, H.; VRAL, A.; The micronucleus assay in radiation accidents. **Annali dell' Institute Superiore de Sanità, Roma**, v. 45, n.3, p. 260-264, 2009.

TURKEZ, H.; AYDIN, E.; ASLAN, A. Role of aqueous *Bryoria capillaris* (Ach.) extract as a genoprotective agent on imazalil-induced genotoxicity *in vitro*. **Toxicology & Industrial Health**, v. 30, n. 1, p. 33-39, 2014.

VENKATARAMANA, D.; KRISHNA, D.R. Highperformance liquid chromatographic determination of usnic acid in plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v.575, n.1, p.167-170, 1992.

XAVIER-FILHO, L.; RIZZINI, C.T. **Manual de Liquenologia Brasileiro**. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 1976.

XAVIER-FILHO, L.; Inibição fotooxidativa de β caroteno por cloroatranorina de *Parmelia tinctorum* Nyl.. 91 f. **Tese para Professor Titular** - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba, 1989.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and Taxol: From discovery to cyclic. **Journal Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254, 1996.

WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, J.; DOWNES, C.S.; The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis, Swasea**. v.23, n.3, p. 153 – 162, 2008.

WAYTECK, L. et al. A personalized view on cancer immunotherapy. **Cancer Letters**, v. 352, p. 113–125, 2014.

WHITE, P. A; RASMUSSEN, J. B. The Genotoxic Wastes in Surface Waters. **Mutation Research**, v. 410, p. 223-236, 1998.

ZU-QING S. et al. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. **International Immunopharmacology**, v. 22, p. 371–378, 2014.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

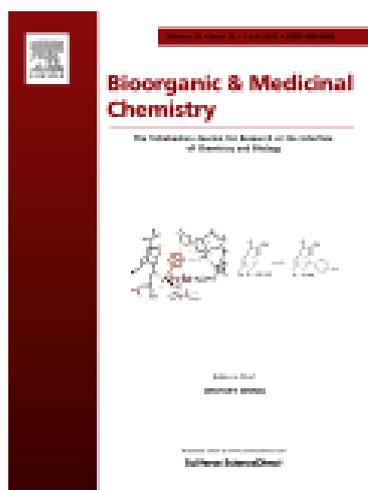
Verificar a atividade citotóxica e genotóxica de extratos orgânicos de *Cladonia substellata*, ácido úsnico isolado dessa espécie e derivados pirazólicos deste composto.

3.2. Específicos

- Obter os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico do talo *in natura* de *C. substellata*.
- Isolar, purificar e identificar o ácido úsnico obtido de *C. substellata*;
- Sintetizar derivados pirazólicos do ácido úsnico isolado de *C. substellata*;
- Caracterizar quimicamente o extrato etéreo, o ácido úsnico isolado de *C. substellata* e os compostos derivados sintéticos através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN-H¹) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN-C¹³).
- Verificar a citotoxicidade dos extratos orgânicos, do ácido úsnico e dos compostos derivados nas linhagens de células tumorais: NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HEp-2 (carcinoma de laringe humana) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda).
- Avaliar a frequência de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico de camundongos tratados com ácido úsnico e os compostos derivados sintéticos.
- Analisar a frequência de danos ao DNA, pelo ensaio cometa, em células sanguíneas de camundongos tratados com ácido úsnico de *C. substellata* e os compostos derivados sintéticos.

4. Artigo

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E AÇÃO GENOTÓXICA DE EXTRATOS ORGÂNICOS E ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* (Líquen) E DERIVADOS PIRAZÓLICOS SINTÉTICOS



Artigo a ser submetido no periódico Bioorganic & Medicinal Chemistry (FI: 3. 147; QUALIS CB II: B1).

Avaliação da citotoxicidade e ação genotóxica de extratos orgânicos e ácido úsnico de *Cladonia substellata* (líquen) e derivados pirazólicos sintéticos

Rocha, T. A.^a; Gonçalves, J. P.^a; Lira, M. A. C.^e; Souza, T. G. S.^b; Martins, M. C. B.^a; Silva, T. G.^c; Anjos, J. V.^d; Chagas, C. A.^b; Falcão, E. P. S.^e; Silva, N. H.^{a*}

^aLaboratório de Química de Produtos Naturais. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

^bLaboratório de Biotecnologia de Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

^cLaboratório de Antibióticos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

^dLaboratório de Síntese Orgânica, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

^eLaboratório de Síntese e Isolamento Molecular (SIM). Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco.

*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

O ácido úsnico é um dos metabólitos secundários de líquens mais estudados devido suas diversas atividades biológicas tais como: antitumoral, antibacteriana, antipirética, antiinflamatória. Mesmo apresentando várias atividades biológicas, a utilização do ácido úsnico na terapêutica é muito limitada devido a algumas propriedades físico-químicas desfavoráveis, como a baixa hidrofobicidade e ainda devido a sua hepatotoxicidade, o que desperta o interesse na modificação de sua molécula estrutural visando solucionar essas dificuldades. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo descrever a modificação estrutural do ácido úsnico isolado e purificado do extrato etéreo de *C. substellata*, bem como verificar a ação citotóxica *in vitro* dos extratos orgânicos, ácido úsnico purificado e seus derivados pirazólicos frente à diferentes linhagens de células tumorais e a genotoxicidade *in vivo* dos compostos derivados do ácido úsnico. Os extratos orgânicos foram obtidos a partir da extração em diferentes solventes por esgotamento a quente do talo *in natura* de *C. substellata*. O ácido úsnico foi obtido e purificado a partir do extrato etéreo, seguido por sucessivas cristalizações até obtenção de alto grau de pureza da substância. Os derivados pirazólicos foram sintetizados através da reação do ácido úsnico purificado com fenil-hidrazinas substituídas e quantidades equivalentes de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Análises cromatográficas em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE), infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de prótons (RMN-H¹) e ressonância magnética de Carbono 13 (RMN-C¹³) foram realizadas para análise dos extratos orgânicos, do ácido úsnico purificado e derivados pirazólicos sintéticos. O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólico), utilizando-se linhagens de células tumorais NCI-H292, HEp-2, HL-60 e MCF-7. Os testes de genotoxicidade *in vivo*, foram feitos pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo. Os extratos orgânicos e o ácido úsnico purificado apresentaram porcentagem de inibição celular muito significativa (>70%), de modo que o extrato etéreo (100%) e o composto 3e (90,3%) apresentaram os melhores resultados para a linhagem celular MCF-7. O ácido úsnico purificado apresentou CI₅₀ de 4,97 µg/mL e 2,19 µg/mL às células NCI-H292 e HEp-2 respectivamente, enquanto que o extrato clorofórmico foi o que apresentou maior atividade frente à linhagem celular HL-60 com CI₅₀ de 3,34 µg/mL. A análise estatística do ensaio cometa e teste do micronúcleo demonstrou que o ácido úsnico purificado e todos os compostos derivados (3a-3f) não apresentaram valores significativos ($p \geq 0,05$) quando comparados com o controle negativo. Desta forma, os compostos testados não foram genotóxicos e mutagênicos. Assim, os dados apresentados são animadores e ampliam os horizontes para realização de novos ensaios com o intuito de se aprofundar o conhecimento acerca destas novas moléculas.

Palavras-chave: atividade genotóxica; ensaio cometa; hepatotoxicidade; hidrofolicidade.

Abstract

The usnic acid is one of the most studied secondary metabolites of lichens due to their various biological activities such as antitumor, antibacterial, anti-pyretic, anti-inflammatory. Even with multiple biological activities, the use of usnic acid in therapy is very limited due to some unfavorable physicochemical properties, such as low hydrophilicity and also because of its hepatotoxicity, which arouses the interest in modifying their structural molecule order to solve these difficulties. Thus, this paper carried out the structural modification of the isolated and purified usnic acid organic extracts of *C. substellata* and verified the cytotoxic activity *in vitro* organic extracts, usnic acid and its derivatives across the different tumor cell lines and genotoxicity *in vivo* of the compounds derived from usnic acid. The organic extracts were obtained from the extraction in different solvents by exhausting hot. The usnic acid was obtained by purification from ether extract, followed by repeated crystallisations to achieve high purity. The pyrazole derivatives were synthesized by the reaction of usnic acid with substituted phenylhydrazines and equivalent amounts of sodium bicarbonate (NaHCO_3). Thin layer chromatographic analysis (TLC) and high pressure liquid (HPLC), infrared (IR) and nuclear magnetic resonance of protons ($^1\text{H-NMR}$), and Carbon 13 magnetic resonance ($^{13}\text{C-NMR}$) were measured for the analysis of extracts, the usnic acid and synthetic products. The cytotoxicity assay was performed by the MTT method using tumor cell lines NCI-H292, HEp-2, HL-60 and MCF-7. The *in vivo* genotoxicity tests were made by the comet assay and micronucleus test. The organic extracts usnic acid showed very significant percentage of cellular inhibition ($> 70\%$), so that the ethereal extract (100%) and Compound 3e (90.3%) showed the best results for cell line MCF-7. The usnic acid showed IC_{50} 4,97 mg/mL and 2.19 mg/mL to NCI-H292 cells and Hep-2 respectively, while the chloroform extract showed the most activity against the HL-60 cell line with IC_{50} 3.34 mg/mL. Statistical analysis of the comet assay and micronucleus test showed that the usnic acid and its derivative compounds (3a-3f) showed no significant differences ($p \geq 0.05$) when compared to the negative control. Thus, the compounds tested were not genotoxic and mutagenic. Thus, the data presented are encouraging and broaden the horizons for new tests in order to increase knowledge about these new molecules.

Keywords: genotoxic activity; comet assay; hepatotoxicity; hidrofolicidade.

1 Introdução

Dentre os diversos compostos isolados de líquens com atividade comprovada, o ácido úsnico tem sido um dos principais alvos de pesquisas. Essa substância pode ser encontrado principalmente nos gêneros *Usnea*, *Cladonia*, *Cetraria*, *Ramalina* e *Parmelia* [1-3] e apresenta diversas atividades biológicas, como antitumoral [4], antibacteriana [5], antiprotozoária [6], anti-inflamatória [7], antiviral [8] e antiproliferativa [9]. O ácido úsnico isolado de *Cladonia arbuscula* e *Alectoria ochroleuca* apresentou um efeito inibitório sobre o crescimento e a proliferação de duas linhagens de células humanas, T-47D (câncer de mama) e Capan-2 (câncer pancreático), e levou à perda do potencial de membrana mitocondrial [10].

Em ensaios *in vivo*, o ácido úsnico foi testado em camundongos frente ao tumor experimental sarcoma-180, obtendo-se uma inibição do tumor de 43% [5, 11]. Outros estudos demonstraram uma redução da proliferação celular *in vitro* do carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2), quando o composto foi aplicado em suspensão e encapsulado [11].

Zu-Qing et al. [7] estudaram o efeito protetor do ácido úsnico na lesão pulmonar aguda e verificaram que o pré-tratamento com ácido úsnico melhorou significativamente o edema pulmonar. O ácido úsnico apresentou forte atividade anti-inflamatória sobre macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7, devido à regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e mediadores da via supressora de NF- κ B (factor de transcrição nuclear) [12].

Leandro et al. [13] também avaliaram a genotoxicidade e o potencial antigenotóxico do ácido úsnico pelos teste micronúcleo e ensaio cometa em culturas de células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) e em camundongos Swiss. Os animais foram tratados nas doses de 25, 50, 100, e 200 mg/kg de peso corporal. As mesmas concentrações de ácido úsnico foram combinadas com metanossulfonato de metilo (MMS) para a avaliação de antigenotoxicidade. Os resultados *in vitro* demonstraram que o ácido úsnico induziu dano no DNA em concentrações de 60 e 120 μ g/mL no ensaio de cometa. No entanto, nenhum efeito genotóxico foi observado no ensaio de micronúcleo usando células V79 nas concentrações testadas. Já nos ensaios de antigenotoxicidade, a administração combinada do ácido úsnico com o MMS reduziu significativamente as frequências de micronúcleos e os danos do DNA *in vitro* e *in vivo*, quando comparada com o tratamento com MMS sozinho.

Mesmo apresentando várias atividades biológicas, a utilização do ácido úsnico na terapêutica é muito limitada devido a algumas propriedades físico-químicas desfavoráveis, como a baixa hidrofiliabilidade e ainda devido a sua hepatotoxicidade [16]. Deste modo, a utilização do ácido úsnico torna-se bastante restrita sendo necessárias alternativas para

contornar suas limitações físico-químicas, diminuir seus efeitos tóxicos e manter suas atividades biológicas [14-18]. Uma das formas já citadas na literatura é o bioisosterismo, processo mais utilizado para a obtenção de novos compostos bioativos, onde se modificam as propriedades físicas e químicas de um composto protótipo através da introdução ou substituição de novos grupos funcionais [19]. Neste sentido o ácido úsnico é certamente uma estrutura protótipo com grande potencial, sendo elevadas as chances de se encontrar diferentes padrões de atividade ou toxidez dos produtos obtidos. Em adição, existem poucos estudos que relatem possível ação genotóxica de compostos liquênicos, especialmente aqueles relacionados ao ácido úsnico.

Desta forma, o presente trabalho descreve a modificação estrutural do ácido úsnico isolado e purificado do extrato etéreo de *Cladonia substellata*, visando a melhoria de seu potencial biológico e o aumento de sua solubilidade em solventes orgânicos, bem como verificar a ação citotóxica *in vitro* dos extratos orgânicos, ácido úsnico e seus derivados frente à diferentes linhagens de células tumorais e a genotoxicidade *in vivo* dos compostos derivados do ácido úsnico.

2 Materiais e Métodos

2.1 Coleta do material liquênico

O material liquênico foi coletado no município de Mamanguape – PB a uma longitude -35° 07' 34" e latitude -06° 50' 19" e armazenado em caixas de papelão no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. O líquen foi identificado pelas características morfológicas e químicas do talo, pela taxonomista MSc. Lourdes Buriel. Uma exsicata foi depositada no Herbário UFPE - Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de tombamento UFP 77.682.

2.2 Obtenção dos extratos orgânicos a partir do talo *in natura*

Para obter os extratos orgânicos, o material liquênico (75 g) foi pesado, limpo e seco. Em seguida, foram adicionados 300 mL de éter dietílico em aparelho de Soxhlet a 40°C por 72 h em banho maria. Posteriormente, o extrato foi filtrado e concentrado até a secura em rotaevaporador acoplado a banho-maria a 40 °C. O resíduo foi mantido em dessecador até

peso constante para posterior cálculo de seu rendimento. O mesmo processo foi repetido para obtenção dos extratos clorofórmico e acetônico.

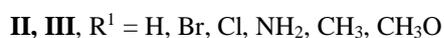
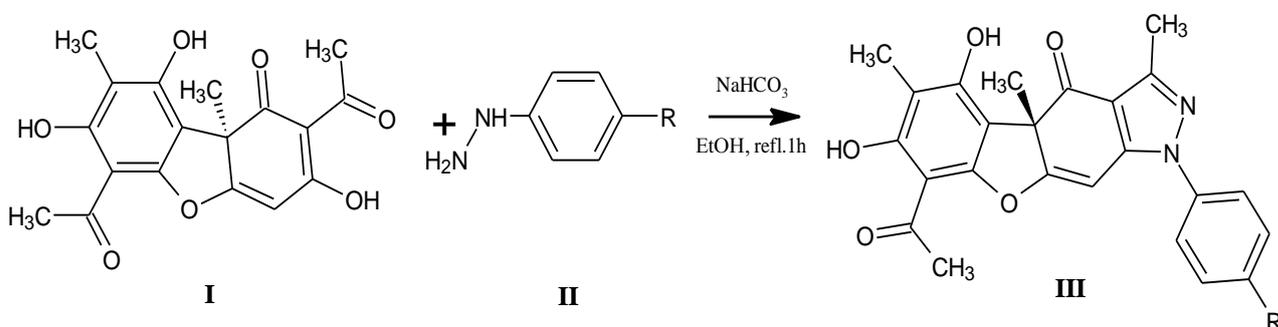
2.3 Isolamento, purificação e análise química do ácido úsnico

Para purificação da substância (ácido úsnico), o extrato etéreo de *C. stellata* foi fracionado em coluna de sílica Gel (porosidade 70-230) e eluída com o sistema de solvente clorofórmio: n-hexano (80:20 v/v) conforme a metodologia de Odabasoglu et al. [20].

2.4 Síntese dos derivados pirazólicos do ácido úsnico purificado

Os compostos pirazólicos derivados do ácido úsnico purificado (200 mg) foram obtidos através de reação com quantidades equivalentes de fenilhidrazinas devidamente substituídas em meio etanólico com quantidades equivalentes de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), à temperatura de refluxo, e sob agitação [21] (Figura 1). A reação foi acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Ao final da reação, o solvente foi filtrado em funil de fundo poroso G4 e evaporado até a secura. Os compostos obtidos da reação foram mantidos em dessecador até peso constante. As substâncias resultantes da síntese tiveram suas estruturas confirmadas através de métodos usuais de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-H^1), Carbono 13 (RMN-C^{13}) e Infravermelho (IV) (Tabela 1).

Figura 1. Esquema reacional da síntese dos derivados pirazólicos. A: Ácido úsnico purificado; B: Fenilhidrazina; C: Derivado pirazólico do ácido úsnico purificado.



Fonte: Rocha, 2015.

2.5 Análise química dos compostos

Os extratos orgânicos (etéreo, clorofórmico e acetônico), o ácido úsnico purificado e os derivados pirazólicos sintéticos foram submetidos a análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Também foram feitas análises de RMN- H^1 , RMN- C^{13} e IV do ácido úsnico purificado e seus derivados.

2.5.1 Cromatografia em camada delgada (CDD)

Os extratos orgânicos, o ácido úsnico purificado, o padrão de ácido úsnico Merck e os derivados pirazólicos sintéticos foram submetidos a CCD ascendente, unidimensional [22]. Amostras foram dissolvidas em 1 μ L de metanol e aplicadas sobre as placas de sílica Gel F₂₅₄₊₃₆₆ Merck, e desenvolvidas no sistema de solventes (tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 v/v/v). Após a evaporação dos solventes, as placas foram observadas sob luz UV curta e longa (254nm e 366nm). Posteriormente, foram borrifadas com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 60 °C por 10 min para reação de coloração e posterior revelação. Os resultados foram avaliados mediante valores do fator de retenção (Rf) das amostras testadas e coloração das bandas, comparados ao ácido úsnico padrão Merck.

2.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os ensaios em CLAE seguiram a metodologia de Vicente e Legaz [23], em cromatógrafo líquido Thermo acoplado a detector de UV com arranjo de Diador (DAD) 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 a temperatura de 20°C. Os extratos orgânicos, o ácido úsnico purificado e os derivados pirazólicos sintéticos foram dissolvidos em 1 mg/mL⁻¹ de clorofórmio espectroscópico e injetados 20 μ L na coluna. Os resultados foram avaliados mediante tempo de retenção (TR) das substâncias na coluna e área dos picos cromatográficos.

2.5.3 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- C^{13})

Os espectros de RMN- H^1 e RMN- C^{13} do ácido úsnico purificado e seus derivados pirazólicos sintéticos foram registrados em espectrofotômetro Varian Unity Plus a 300 MHz,

utilizando DMSO-d₆ como solvente em tubos de 5 mm a temperatura ambiente realizado no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

2.5.4 Espectroscopia do Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho obtido a partir do ácido úsnico purificado e seus derivados pirazólicos sintéticos, foram realizados em espectrômetro acoplado a transformador Bruker Fourier (modelo IF 566), pela técnica de pastilhas de brometo de potássio (KBr), sendo utilizado na resolução de 4.0 cm⁻¹.

2.6 Ensaio de Citotoxicidade

A atividade citotóxica dos extratos orgânicos, do ácido úsnico purificado e dos derivados pirazólicos sintéticos foi avaliada através do método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] [24, 25]. As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano) e HEP-2 (carcinoma de laringe humana) mantidas em meio de cultura DMEM, MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) mantidas em meio de cultura RPMI. Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina (200µM).

As células foram cultivadas em placas de 96 poços nas seguintes concentrações: 2 x 10⁵ células/mL (NCI-H292, MCF-7 e HEP-2) e 0,3 x 10⁶ células/mL (HL-60), incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂, durante 24 h. Em seguida, os extratos orgânicos, o ácido úsnico purificado e os derivados pirazólicos sintéticos foram dissolvidos em concentração estoque de 10 mg/mL e 5 mg/mL de DMSO (0,5 %), respectivamente, e adicionados aos poços nas concentrações seriadas (0.195 - 25 µg/mL) para os compostos puros (ácido úsnico purificado e derivados pirazólicos sintéticos e (0,39 - 50 µg/mL) para os extratos orgânicos. O fármaco doxorrubicina (0,009 - 5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo e DMSO (10 mg/mL) como controle negativo. Após 72 h de reincubação, foram adicionados em cada poço 25 µL de MTT (5 mg/mL) e após 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância dos compostos foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Para triagem inicial dos extratos orgânicos, ácido úsnico purificado e derivados pirazólicos sintéticos, o percentual de inibição do crescimento celular (IC%) foi determinado considerando a média do controle negativo como 100% de proliferação. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%), com moderada atividade (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e com alta atividade (inibição de crescimento celular variando de 90 a 100%) [26]. As substâncias que causaram uma inibição maior que 70% foram submetidas ao ensaio de determinação da concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle negativo (CI₅₀). A porcentagem de inibição x log da concentração foi registrada, e suas CI₅₀ e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism 5.0*. Os experimentos foram realizados em quintuplicatas e a porcentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism 5.0*.

2.7 Ensaio de Genotoxicidade

Foram utilizados 30 camundongos *swiss albino* machos, com aproximadamente 8 semanas de idade, pesando em torno de 30 a 50 g. Durante o experimento, os animais foram acomodados em caixas de polipropileno adequadas (5 camundongos por caixa), que foram mantidas a temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $50 \pm 5\%$, com ciclo de 12 h/12 h luz/escuro. Os animais receberam água potável e comida *ad libitum*. O experimento teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) sob o nº 23076.052055/2014-21.

Os animais foram distribuídos igualmente em seis grupos (n = 5) e organizados de acordo com os tratamentos realizados. Três grupos receberam os derivados pirazólicos sintéticos (3a, 3b e 3e). Outro grupo recebeu o ácido úsnico purificado. Cada grupo tratado recebeu uma dose de 15 mg/kg de peso do animal. O grupo controle negativo recebeu apenas 100 µL de DMSO e PBS (Tampão fosfato-salino), o veículo no qual o ácido úsnico purificado e os derivados pirazólicos sintéticos foram dissolvidos; um grupo controle positivo recebeu a ciclofosfamida, um agente mutagênico bem estabelecido na literatura científica. Os grupos tratados, controle negativo e positivo receberam seus tratamentos por via intraperitoneal.

Os camundongos foram anestesiados com xilazina 100 mg/Kg e quetamina 10 mg/Kg, por via intraperitoneal. O sangue periférico foi coletado por punção retro-orbital 48 h após o

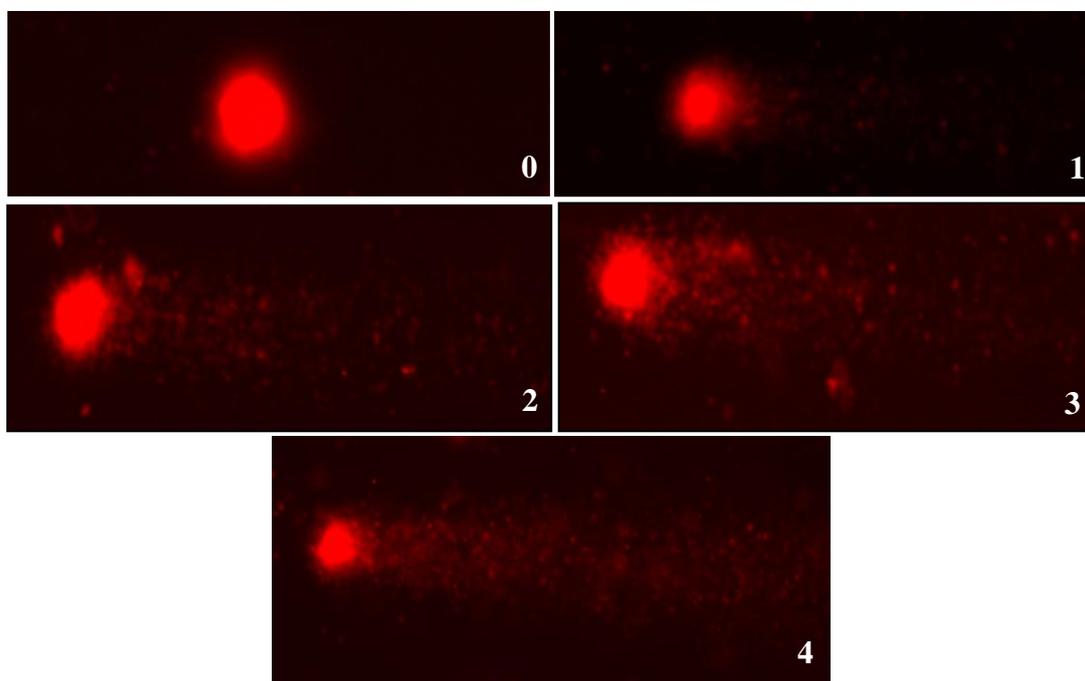
tratamento. Logo depois da coleta do sangue, os animais foram eutanasiados com mais uma injeção de combinação de xilazina e quetamina.

2.7.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com a metodologia de Umbuzeiro e Roubicek et al. [27]. O sangue coletado foi homogeneizado com agarose de baixo ponto de fusão (LM) e depositado nas lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão; estas lâminas foram cobertas com lamínulas e, em seguida, levadas para o refrigerador a temperatura de 4°C, por 10 minutos. Depois da refrigeração, as lamínulas foram retiradas e as lâminas depositadas em cubas com solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10). Todo procedimento após a coleta do material foi feito em uma sala com luz vermelha (sem a presença de luz branca), pois o experimento é fotossensível. Após o tempo necessário para a lise (48 h até uma semana), seguiu-se o processo de eletroforese, em que as células lisadas foram submetidas a uma corrente de ± 300 mA, com diferença de potencial de 32V, por 20 minutos, em uma cuba contendo solução tampão alcalina (1M NaOH e 200 mM EDTA, pH 13). Logo depois, as lâminas foram neutralizadas com tampão (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) e coradas com 30 μ L de brometo de etídio (0, 0002%, p/v) por lâmina. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio (200 mM), de modo que as lâminas previamente preparadas com o sangue são mergulhadas por 10 minutos em uma cuba com 170 mL de tampão de eletroforese e 30 mL de peróxido de hidrogênio 10 volumes.

A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência (Zeiss M2) com filtro Alexa flúor 546. Foram feitas duas lâminas para cada animal, sendo analisados 100 nucleoides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleoide analisado foi classificado visualmente em uma de cinco classes: 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) e 4 (dano máximo). Desta forma, os valores obtidos para cada indivíduo podem variar de 0 (nenhum dano: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4); a este valor damos o nome de índice de dano (ID) por animal. A frequência de danos (FD) também foi calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides com algum dano (classe 1 a classe 4) em relação ao total de nucleoides contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total) (Figura 2) [28].

Figura 2- Classificação do dano do DNA das células analisadas por ensaio cometa. 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) e 4 (dano máximo).



Fonte: Rocha, 2015.

2.7.2 Teste do Micronúcleo

Para esse teste, foi utilizada a técnica descrita por Hayashi et al. [29]. Foram colocados 5 μ L de sangue periférico sobre lâminas previamente preparadas com laranja de acridina, cobrindo-se com uma lamínula para espalhar uniformemente o material. Foi estabelecida a proporção de eritrócitos policromáticos (EPC) em relação ao total de eritrócitos da seguinte maneira: $EPC / (EPC + ENC)$, onde ENC significa eritrócitos normocromáticos. Uma comparação entre a proporção de EPC de cada animal tratado foi feita com a do grupo controle negativo. A não ser que a proporção de EPC em um dado grupo seja menor do que 20% da proporção de EPC no grupo controle negativo (caso em que o animal será descartado do estudo), 2000 EPC serão contados por grupo para se quantificar a presença de EPC micronucleados (EPCMn) [30]. Os eritrócitos policromáticos foram analisados em microscópio de epifluorescência (Zeiss M2) com filtro Alexa flúor 488.

2.7.3 Análise Estatística

A análise estatística foi feita por análise de variância, comparando-se os grupos tratados com o grupo controle negativo, tanto para o teste do micronúcleo, quanto para o ensaio cometa. Análises de diferença entre as variâncias e de normalidade foram feitas previamente para a escolha entre um teste paramétrico (ANOVA) e um teste não-paramétrico (Kruskal-Wallis), sempre com $\alpha = 5$, considerando $p \leq 0,05$. O *software R 3.1.0* foi usado para todas as análises.

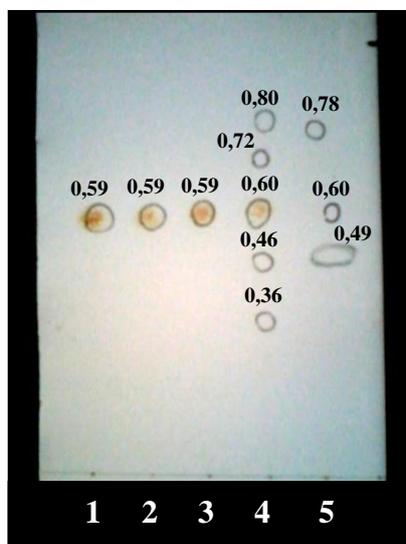
3 Resultados

3.1 Análises químicas dos extratos orgânicos e do ácido úsnico purificado de *C. substellata* e derivados pirazólicos sintéticos

Os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico obtido da *C. substellata* apresentaram como quimiotipo principal o ácido úsnico. Os extratos etéreo, clorofórmio, acetônico, bem como o ácido úsnico purificado apresentaram rendimento de 6,48%, 4,2%, 1,8%, 2,43%, respectivamente. A cromatografia em camada delgada (CCD) demonstrou a presença de uma banda no extrato etéreo (Rf 0,59), compatível com a banda do padrão de ácido úsnico Merck (Rf 0,59), bem como o ácido úsnico purificado (Rf 0,59), além de uma banda (Rf 0,60) nos extratos clorofórmico e acetônico que correspondem provavelmente ao ácido úsnico e outras 4 bandas correspondentes a possíveis compostos fenólicos não identificados no extrato clorofórmico (0,80; 0,72; 0,46; 0,36) e duas bandas no extrato acetônico (0,78; 0,49) (Figura 3).

Estes resultados estão de acordo com a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O tempo de retenção (TR), dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico foi de 25,88 min, 25,92 min e 25,88 min, respectivamente. Tais resultados condizem com o tempo de retenção do padrão do ácido úsnico Merck (TR 26,39 min), sendo o percentual de pureza em torno de 95% (Figura 21 em anexo).

Figura 3. Cromatografia em camada delgada dos extratos orgânicos e do ácido úsnico purificado. 1 - Padrão do ácido úsnico Merck; 2 - Ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* a partir do extrato etéreo; 3 - Extrato etéreo; 4 - Extrato clorofórmico; 5 - Extrato acetônico.



Fonte: Rocha, 2015.

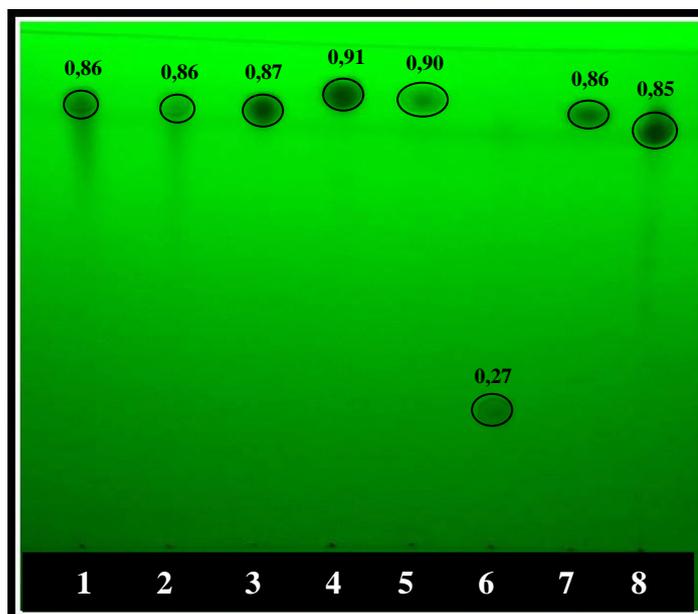
Após isolado, o ácido úsnico purificado teve sua estrutura confirmada por análises dos espectros de IV e RMN- H^1 . Os dados espectrométricos estão apresentados a seguir:

Cristais amarelos, com ponto de fusão determinado Pf = 201-203°C, rendimento de 2,43%, Rf (0,59) determinado através de CCD, utilizando-se sistema de eluição tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 (v/v/v), seu TR (26,39) foi determinado através de CLAE, utilizando-se sistema de eluição metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v). IV (KBr, $\lambda_{\max}^{cm^{-1}}$): 3069 (-OH), 2929 (R-O-R), 1632 (C=O_{symm}), 1540 e 1454 (C=C), 1290 (-C-O-C- éter), 840 (C-H aromático_{axial}). RMN- H^1 (DMSO- d_6 , 300 MHz), δH : (s, 3H, CH₃-14), 2,00 (s, 3H, CH₃-19), 2,50 (s, 3H, CH₃-23), 2,65 (s, 3H, CH₃-17), 6,26 (s, 1H, C-7-H), 11,23 (s, 1H, C-10-OH), 13,36 (s, 1H, C-12-OH), 18,89 (s, 1H, C-6-OH).

3.2 Síntese dos derivados pirazólicos (3a-f) do ácido úsnico purificado

Os compostos pirazólicos sintéticos devidamente substituídos apresentaram-se cristalinos e estáveis com elevadas temperaturas de fusão. A pureza dos compostos foi monitorada através de CCD que demonstrou a presença de uma única banda para todos os compostos derivados (Figura 4).

Figura 4. Cromatografia em camada delgada dos derivados pirazólicos do ácido úsnico purificado. 1 - Padrão do ácido úsnico Merck; 2 – Ácido úsnico purificado; 3 – composto 3a; 4 – Composto 3b; 5 – Composto 3c; 6 – Composto 3d; 7- Composto 3e; 8- Composto 3f.



Fonte: Rocha, 2015.

As estruturas químicas foram confirmadas através de técnicas usuais de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C e IV, sendo os respectivos dados transcritos a seguir.

3.2.1 16-Acetil-13,15-diidroxi-3,6,14-trimetil-1-(8-fenil)-1*H*-[1]benzofuro[9,5-*f*]indazol 10(2*H*)-ona (**3a**)

Cristais amarelos, com ponto de fusão determinado Pf = 192-194°C, rendimento reacional de 72%, Rf (0,87) determinado através de CCD, utilizando-se sistema de eluição tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 (v/v/v), TR (10,87) determinado através de CLAE, utilizando-se sistema de eluição metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v). IV (KBr, $\lambda_{\text{max}}^{\text{cm}^{-1}}$): 3109 (-OH), 2925 (R-O-R), 1631 (C=O *symm*), 1595 e 1475 (C=C), 1290 (-C-O-C-, éter), 1047 (-C-N- *axial*), 845 (C-H aromático *axial*). RMN- ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz), δH : 1,75 (s, 3H, CH₃-17), 1,97 (s, 3H, CH₃-27), 2,48 (s, 3H, CH₃-31), 2,62 (s, 3H, CH₃-19), 6,53 (s, 1H, C-H-10), 7,59 (m, 5H, H₂₁, H₂₂, H₂₃, H₂₄ e H₂₅), 11,20 (s, 1H, C-13-OH), 13,34 (s, 1H, C-15-OH). RMN- ^{13}C (DMSO- d_6 , 300 MHz), δC : 7,43 (s, 1C, C₂₇), 13,0 (s, 1C, C₁₇), 30,04 (s, 1C, C₁₉), 30,98 (s, 1C, C₃₁), 59,71 (s, 1C, C₃), 89,88 (s, 1C, C₁₀), 101,14 (s, 1C, C₁₂), 104,29 (s, 1C, C₁₃), 106,35 (s, 1C, C₁₄), 110,14 (s, 1C, C₅), 123,79 (s, 2C, C₂₁ e C₂₅), 128,58 (s, 1C, C₂₃), 129,12 (d, 1C, C₉), 129,67 (s, 2C, C₂₂ e C₂₄), 137,48 (s, 1C, C₂₀), 148,39 (s, 1C, C₆),

150,23 (s, 1C, C₁₁), 156,49 (d, 1C, J= 410 Hz, C₂), 162,43 (s, 1C, C₁₅), 172,12 (s, 1C, C₁₆), 196,12 (s, 1C, C₄), 200,90 (s, 1C, C₂₉).

3.2.2 16-Acetil-13,15-diidroxí-3,6,14-trimetil-1-(8-bromofenil)-1*H*-[1]benzofuro[9,5-*f*]indazol 10(2*H*)-ona (**3b**)

Cristais amarelos, com ponto de fusão determinado Pf = 165-167°C, rendimento reacional de 82%, Rf (0,91) determinado através de CCD, utilizando-se sistema de eluição tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 (v/v/v), TR (7,88) determinado através de CLAE, utilizando-se sistema de eluição metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v). IV (KBr, $\lambda_{\max}^{\text{cm}^{-1}}$): 3100 (-OH), 2929 (R-O-R), 1505 e 1480 (C=C), 1622 (C=O_{symm}), 1289 (-C-O-C-, éter), 1045 (-C-N-_{axial}), 847 (C-H aromático_{axial}). RMN-¹H (DMSO-d₆, 300 MHz), δH : 1,70 (s, 3H, CH₃-17), 1,91, (s, 3H, CH₃-27), 2,45 (s, 3H, CH₃-32), 2,57 (s, 3H, CH₃-19), 6,52 (s, 1H, C-H-10), 7,52 (d, 2H, H₂₂ e H₂₄, J=0,02), 7,62 (d, 2H, H₂₁ e H₂₅, J=0,02), 11,07 (s, 1H, C-13-OH), 13,25(s, 1H, C-15-OH). RMN-¹³C (DMSO-d₆, 300 MHz), δC : 7,38 (s, 1C, C₂₇), 12,97 (s, 1C, C₁₇), 30,06 (s, 1C, C₁₉), 30,91 (s, 1C, C₃₂), 59,73 (s, 1C, C₃), 89,79 (s, 1C, C₁₀), 101,06 (s, 1C, C₁₂), 104,16 (s, 1C, C₁₃), 106,41 (s, 1C, C₁₄), 110,28 (s, 1C, C₅), 121,32 (s, 1C, C₂₃), 125,67 (s, 2C, C₂₁ e C₂₅), 132,57 (s, 1C, C₂₀), 136,74 (s, 2C, C₂₂ e C₂₄), 148,55 (s, 1C, C₆), 149,52 (d, 1C, C₉), 150,50 (s, 1C, C₁₁), 156,41 (d, 1C, J= 488 Hz, C₂), 162,44 (s, 1C, C₁₅), 172,19 (s, 1C, C₁₆), 196,00 (s, 1C, C₂₉), 200,73 (s, 1C, C₄).

3.2.3 16-Acetil-13,15-diidroxí-3,6,14-trimetil-1-(8-clorofenil)-1*H*-[1]benzofuro[9,5-*f*]indazol 10(2*H*)-ona (**3c**)

Cristais amarelos, com ponto de fusão determinado Pf = 108-110°C, rendimento reacional de 30,5%, Rf (0,90) determinado através de CCD, utilizando-se sistema de eluição tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 (v/v/v), TR (24,49) determinado através de CLAE, utilizando-se sistema de eluição metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v). IV (KBr, $\lambda_{\max}^{\text{cm}^{-1}}$): 3102 (-OH), 2925 (R-O-R), 1626 (C=O_{symm}), 1507 e 1476 (C=C), 1288 (-C-O-C-, éter), 1046 (-C-N-_{axial}), 845 (C-H aromático_{axial}). RMN-¹H (DMSO-d₆, 300 MHz), δH : 1,74 (s, 3H, CH₃-17), 1,97 (s, 3H, CH₃-27), 2,49 (s, 3H, CH₃-32), 2,62 (s, 3H, CH₃-19), 6,59 (s, 1H, C-H-10), 7,65 (d, 2H, H₂₂ e H₂₄), 7,70 (d, 2H, H₂₁ e H₂₅), 11,16 (s, 1H, C-13-OH), 13,33 (s, 1H, C-15-OH). RMN-¹³C (DMSO-d₆, 300 MHz), δC : 7,42 (s, 1C, C₂₇), 12,98 (s, 1C, C₁₇), 30,00 (s, 1C, C₁₉), 30,96 (s, 1C, C₃₂), 59,76 (s, 1C, C₃), 89,87 (s, 1C, C₁₀), 101,136 (s, 1C, C₁₂), 104,27 (s, 1C, C₁₃), 106,38 (s, 1C, C₁₄), 110,25 (s, 1C, C₅), 125,51 (s, 2C, C₂₁ e C₂₅),

129,64 (s, 2C, C₂₂ e C₂₄), 132,91 (s, 1C, C₂₃), 136,32 (s, 1C, C₂₀), 148,67 (s, 1C, C₆), 149,55 (d, 1C, C₉), 150,42 (s, 1C, C₁₁), 156,46 (d, 1C, J= 426 Hz, C₂), 162,43 (s, 1C, C₁₅), 172,28 (s, 1C, C₁₆), 196,13 (s, 1C, C₂₉), 200,84 (s, 1C, C₄).

3.2.4 16-Acetil-13,15-diidroxio-3,6,14-trimetil-1-(8-carboxamidafenil)-1*H*-[1]benzofuro[9,5-*f*]indazol 10(2*H*)-ona (**3d**)

Cristais amarelos claros, com ponto de fusão determinado Pf = 189-191°C, rendimento reacional de 53,2%, Rf (0,27) determinado através de CCD, utilizando-se sistema de eluição tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 (v/v/v), TR (18,30) determinado através de CLAE, utilizando-se sistema de eluição metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v). IV (KBr, $\lambda_{\max}^{\text{cm}^{-1}}$): 3068 (-OH), 2929 (R-O-R), 1627 (C=O_{symm}), 1523 e 1479 (C=C), 1289 (-C-O-C-, éter), 1046 (-C-N-_{axial}), 845 (C-H aromático_{axial}). RMN-H¹ (DMSO-d₆, 300 MHz), δ H: 1,69 (s, 3H, CH₃-17), 1,96 (s, 3H, CH₃-27), 2,49 (s, 3H, CH₃-33), 2,61 (s, 3H, CH₃-19), 6,63 (s, 1H, C-H-10), 7,52 (d, 2H, H₂₂ e H₂₄, J=0,02), 8,09 (d, 2H, H₂₁ e H₂₅, J=0,02), 11,15 (s, 1H, C-13-OH), 13,33 (s, 1H, C-15-OH). RMN-C¹³ (DMSO-d₆, 300 MHz), δ C: 7,44 (s, 1C, C₂₇), 13,01 (s, 1C, C₁₇), 30,04 (s, 1C, C₁₉), 30,98 (s, 1C, C₃₃), 59,80 (s, 1C, C₃), 90,03 (s, 1C, C₁₀), 101,15 (s, 1C, C₁₂), 104,28 (s, 1C, C₁₃), 106,41 (s, 1C, C₁₄), 110,38 (s, 1C, C₅), 123,29 (s, 2C, C₂₁ e C₂₅), 128,50 (s, 1C, C₂₃), 128,96 (s, 2C, C₂₂ e C₂₄), 133,89 (s, 1C, C₂₀), 139,57 (d, 1C, C₉), 148,68 (s, 1C, C₆), 150,38 (s, 1C, C₁₁), 156,47 (d, 1C, J= 426 Hz, C₂), 162,44 (s, 1C, C₁₅), 166,78 (s, 1C, C₃₁), 172,36 (s, 1C, C₁₆), 196,19 (s, 1C, C₂₉), 200,82 (d, 1C, C₄).

3.2.5 16-Acetil-13,15-diidroxio-3,6,14-trimetil-1-(8-metilfenil)-1*H*-[1]benzofuro[9,5-*f*]indazol 10(2*H*)-ona (**3e**)

Cristais brancos, com ponto de fusão determinado Pf = 166-168°C, rendimento reacional de 81%, Rf (0,88) determinado através de CCD, utilizando-se sistema de eluição tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 (v/v/v), TR (3,89) determinado através de CLAE, utilizando-se sistema de eluição metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v). IV (KBr, $\lambda_{\max}^{\text{cm}^{-1}}$): 3108 (-OH), 2925 (R-O-R), 1626 (C=O_{symm}), 1520 e 1483 (C=C), 1288 (-C-O-C-, éter), 1045 (-C-N-_{axial}), 809 (C-H aromático_{axial}). RMN-H¹ (DMSO-d₆, 300 MHz), δ H: 1,72 (s, 3H, CH₃-17), 1,94 (s, 3H, CH₃-27), 2,39 (s, 3H, CH₃-31), 2,46 (s, 3H, CH₃-32), 2,59 (s, 3H, CH₃-19), 6,47 (s, 1H, C-H-10), 7,38 (d, 2H H₂₂ e H₂₄, J=0,02), 7,54 (d, 2H, H₂₁ e H₂₅, J=0,02), 11,20 (s, 1H, C-13-OH), 13,31 (s, 1H, C-15-OH). RMN-C¹³ (DMSO-d₆, 300 MHz), δ C: 7,41 (s, 1C, C₂₇), 12,98 (s, 1C, C₁₇), 20,62 (s, 1C, C₃₂), 30,05 (s, 1C, C₁₉), 30,94 (s, 1C, C₃₁), 59,64 (s, 1C, C₃), 89,85 (s, 1C, C₁₀), 101,09 (s, 1C, C₁₂), 104,25 (s, 1C, C₁₃), 106,34 (s,

1C, C₁₄), 110,02 (s, 1C, C₅), 123,63 (s, 2C, C₂₁ e C₂₅), 130,04 (s, 2C, C₂₂ e C₂₄), 135,10 (s, 1C, C₂₃), 138,25 (s, 1C, C₂₀), 148,20 (s, 1C, C₆), 149,15 (d, 1C, C₉), 150,10 (s, 1C, C₁₁), 156,48 (d, 1C, C₂), 162,43 (s, 1C, C₁₅), 171,92 (s, 1C, C₁₆), 196,0 (s, 1C, C₂₉), 200,84 (s, 1C, C₄).

3.2.6 16-Acetil-13,15-diidroxí-3,6,14-trimetil-1-(8-metoxifenil)-1*H*-[1]benzofuro[9,5-*f*]indazol 10(2*H*)-ona (**3f**)

Cristais marrons, com ponto de fusão determinado Pf = 195-197°C, rendimento reacional de 56,3%, Rf (0,85) determinado através de CCD, utilizando-se sistema de eluição tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 (v/v/v), TR (27,50) determinado através de CLAE, utilizando-se sistema de eluição metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v). IV (KBr, $\lambda_{\text{max}}^{\text{cm}^{-1}}$): 3068 (-OH), 2929 (R-O-R), 1522 e 1477 (C=C), 1627 (C=O_{symm}), 1678 (CH₃-O-metoxi), 1290 (-C-O-C-, éster), 1047 (-C-N- axial), 831 (C-H aromático axial). RMN-H¹ (DMSO-d₆, 300 MHz), δ H: 1,71 (s, 3H, CH₃-17), 1,94 (s, 3H, CH₃-27), 2,46 (s, 3H, CH₃-33), 2,59 (s, 3H, CH₃-19), 6,42 (s, 1H, C-H-10), 7,39 (d, 2H H₂₂ e H₂₄, J=0,02), 7,53 (d, 2H, H₂₁ e H₂₅, J=0,02), 11,22 (s, 1H, C-13-OH), 13,31 (s, 1H, C-15-OH). RMN-C¹³ (DMSO-d₆, 300 MHz), δ C: 7,39 (s, 1C, C₂₇), 12,96 (s, 1C, C₁₇), 30,07 (s, 1C, C₁₉), 30,93 (s, 1C, C₃₃), 55,53 (s, 1C, C₃₂), 59,59 (s, 1C, C₃), 89,75 (s, 1C, C₁₀), 101,06 (s, 1C, C₁₂), 104,21 (s, 1C, C₁₃), 106,31 (s, 1C, C₁₄), 109,83 (s, 1C, C₅), 114,68 (s, 2C, C₂₂ e C₂₄), 125,36 (s, 2C, C₂₁ e C₂₅), 130,49 (s, 1C, C₂₃), 148,16 (s, 1C, C₂₀), 149,04 (d, 1C, C₉), 149,92 (s, 1C, C₆), 156,48 (d, 1C, C₂), 159,18 (d, 1C, C₁₁), 162,41 (s, 1C, C₁₅), 171,74 (s, 1C, C₁₆), 195,90 (s, 1C, C₂₉), 200,80 (s, 1C, C₄).

3.3 Atividade Citotóxica

O ácido úsnico purificado e derivados pirazólicos sintéticos foram testados na concentração de 25 µg/mL, enquanto que extratos orgânicos foram testados na concentração de 50 µg/mL, apresentando porcentagem de inibição celular conforme descrito na tabela 2:

Tabela 1. Determinação da porcentagem de inibição celular dos extratos orgânicos, ácido úsnico purificado e derivados pirazólicos sintéticos.

Amostras	% de Inibição ±SEM			
	NCI-H292	Hep-2	HL-60	MCF-7
Extrato etéreo	11,67 ± 0,23	98,03 ± 2,80	87,24 ± 0,30	100,0 ± 0,00
Extrato clorofórmico	18,22 ± 2,26	90,48 ± 2,51	85,46 ± 0,76	77,89 ± 2,94
Extrato acetônico	82,08 ± 3,32	92,68 ± 2,20	87,69 ± 0,67	58,75 ± 2,33
Ácido úsnico purificado	83,58 ± 4,38	89,31 ± 1,64	85,94 ± 0,45	71,82 ± 4,83
Composto 3a	63,2 ± 1,9	87,1 ± 1,4	59,1 ± 4,7	79,2 ± 4,3
Composto 3b	35,0 ± 0,0	77,2 ± 3,7	66,5 ± 4,7	84,9 ± 1,2
Composto 3e	41,5 ± 2,2	61,9 ± 5,3	73,0 ± 4,1	90,3 ± 0,5
Doxorrubicina	94,15 ± 1,99	79,39 ± 2,65	92,91 ± 0,63	74,77 ± 2,09

SEM = standard erro médium. Extratos orgânicos: 50µg/mL. Ácido úsnico purificado e derivados pirazólicos sintéticos: 25 µg/mL. Doxorrubicina: 5 µg/mL.

Fonte: Rocha, 2015.

Os resultados demonstram que o extrato etéreo apresentou porcentagem de inibição alta (inibição de crescimento celular variando de 90 a 100%) frente à linhagem celular Hep-2 e MCF-7, atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) frente à linhagem HL-60, enquanto que a linhagem celular NCI-H292 não apresentou atividade (inibição de crescimento menor que 50%).

O extrato clorofórmico demonstrou alta atividade inibitória (90 a 100% de inibição) frente à linhagem celular Hep-2, inibição moderada frente às linhagens celulares HL-60 e MCF-7 e não apresentou porcentagem de inibição significativa frente à linhagem celular NCI-H292. O extrato acetônico demonstrou alta atividade inibitória frente à linhagem celular HEp-2, inibição moderada frente às linhagens celulares NCI-H292 e HL-60 e baixa atividade frente à linhagem celular MCF-7.

O ácido úsnico purificado apresentou porcentagem de inibição moderada frente a todas as linhagens celulares testadas. Já os compostos derivados 3a e 3b apresentaram inibição moderada apenas para as linhagens HEp-2 e MCF-7, enquanto que o composto 3e apresentou alta atividade para linhagem celular MCF-7 e moderada atividade para HL-60.

Determinando-se a concentração que inibe 50% do crescimento em relação ao controle negativo (CI₅₀) com respectivos intervalos de confiança (IC 95%), calculados a partir da regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.0 (Tabela 3), podemos dizer que o ácido

úsico purificado apresentou maior atividade citotóxica frente às células Hep-2 e NCI-H292, enquanto que o extrato clorofórmico foi o que apresentou maior atividade frente a linhagem celular HL-60. Assim, os extratos orgânicos testados, o ácido úsico purificado e os derivados pirazólicos sintéticos mostraram uma atividade citotóxica potencial frente às linhagens de células tumorais testadas.

Tabela 2. CI₅₀ dos compostos testados frente às linhagens de células neoplásicas.

Linhagens	CI ₅₀ (µg/mL)			
	Intervalo de confiança			
	NCI-H292	HEp-2	HL-60	MCF-7
Extrato etéreo	n.t.	10,05 7.73 – 13.06	5,10 3.73 – 6.96	-
Extrato clorofórmico	n.t.	14,87 11.13 – 19.86	3,34 2.31 – 4.82	-
Extrato acetônico	5,24 4.58 – 6.00	5,35 3.96 – 7.23	6,33 4.48 – 8.94	n.t.
Ácido úsico purificado	4,97 3.91 – 6.32	2,19 1.64 – 2.93	22,48 19.39 – 26.07	-
Composto 3a	n.t.	-	n.t.	-
Composto 3b	n.t.	-	n.t.	-
Composto 3e	n.t.	n.t.	13,0 10.5 – 16.0	-
Doxorrubicina	0,08 0.06 – 0.12	0,31 0,26 – 0,36	0,06 0,05 – 0,07	0,12 0.08 – 0.15

n.t. = não testado

Fonte: Rocha, 2015.

3. 4 Atividade Genotóxica

Nos testes de ensaio cometa foram avaliados os compostos derivados do ácido úsico purificado (**3a-3f**) e o ácido úsico purificado. No tratamento foi utilizado uma dose de 15 mg/kg para todos os compostos (3a-3f), correspondente a décima parte da DL₅₀ do ácido úsico descrita por Santos et al. [4].

De acordo com os resultados calculados para o índice de dano, que mede a intensidade do dano no DNA e para a frequência de dano, que mostra se houve dano ou não no DNA através do teste estatístico ANOVA e pós-teste de Tukey, os compostos não se mostraram genotóxicos, exceto o composto 3c. Houve diferença significativa quando comparamos todos os compostos com o controle positivo ($p \leq 0,05$), mas quando comparados entre si e com o controle negativo não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$), exceto para o composto 3c que

apresentou um dano genético maior que o controle negativo como também em relação aos outros compostos (Tabela 4).

Tabela 3 - Resultados dos testes de genotoxicidade pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa.

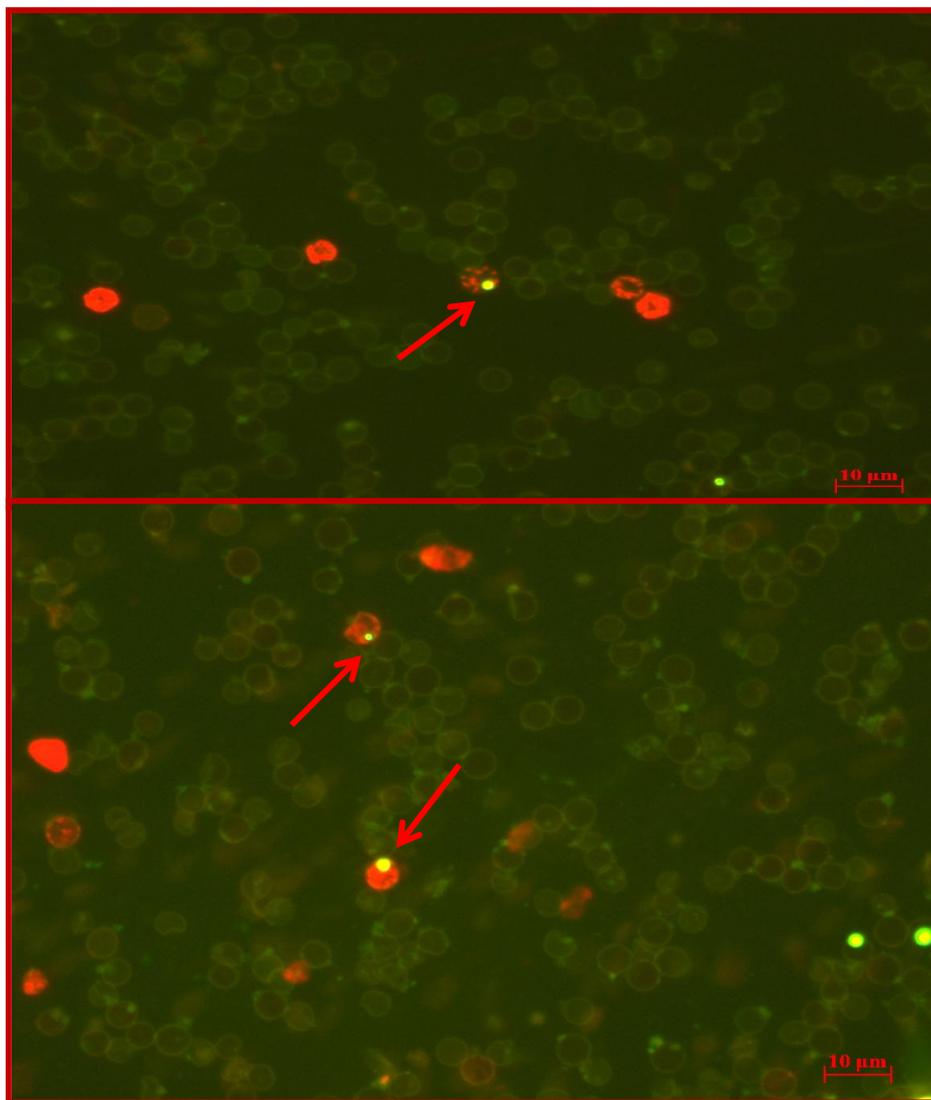
TESTES			
Grupos	MN	ID	FD
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Composto 3a	2.2 ± 2.9	24.2 ± 19.9	19.0 ± 15.2
Composto 3b	1.0 ± 1.4	45,2 ± 38,3	25.0 ± 14.5
Composto 3c	4,2 ± 4,7	168,8 ± 29,2* **	88,6 ± 9,7
Composto 3d	4,8 ± 3,6	36,0 ± 30,4	21,4 ± 13,4
Composto 3e	2.4 ± 2.5	43.4 ± 34.0	26.2 ± 18.1
Composto 3f	3,8 ± 2,7	119,4 ± 100,3	59,2 ± 24,7
Ácido úsnico purificado	2.4 ± 2.3	79.0 ± 51.0	40.6 ± 24.7
DMSO+PBS	1.0 ± 0,7	53.4 ± 33.5	28.4 ± 15.2
Ciclofosfamida	33.4 ± 13.0*	-	-
Peróxido de hidrogênio	-	351 ± 31.3*	100 ± 0.0*

DP: desvio padrão; MN: micronúcleo; ID: índice de dano pelo ensaio cometa; FD: fator de dano em percentagem pelo ensaio cometa; * diferença significativa com o controle negativo; ** diferença significativa com todos os grupos.

Fonte: Rocha, 2015.

Também foram analisados os eritrócitos policromáticos com micronúcleo (EPCMn) dos animais tratados com os compostos (**3a-3f**) e o ácido úsnico purificado. De acordo com as análises estatísticas, constatou-se que houve diferença ($p \leq 0,5$) quando cada grupo foi comparado com o controle positivo, mas não houve diferença significativa comparando-se os grupos tratados com o controle negativo e comparando-se os compostos entre si. Sendo assim, os agentes tratados não se mostraram mutagênicos no teste do micronúcleo. Os EPCMn foram encontrados em todos os grupos tratados (Figura 5).

Figura 5. Eritrócitos Normocromáticos corados em verdes; Eritrócitos Policromáticos corados em vermelho; Eritrócitos Policromáticos com Micronúcleo apontados pela seta vermelha.



Fonte: Rocha, 2015.

4 Discussão

Grande parte dos fármacos utilizados nos dias de hoje têm em sua constituição moléculas encontradas na natureza, despertando o interesse para o uso de produtos naturais. Cerca de 30% do mercado farmacêutico mundial é representado por drogas derivadas de produtos naturais [31]. Neste contexto, a maioria das substâncias liquênicas apresenta uma estrutura química muito simples facilitando a produção de derivados em laboratório, e fornecendo grandes quantidades de materiais sem afetar o ecossistema [32]. Desta forma, o ácido úsnico é certamente uma estrutura protótipo para modificação estrutural com grande

potencial, sendo grandes as chances de se encontrar diferentes padrões de atividade biológica ou toxidez dos produtos obtidos.

Neste sentido, o presente trabalho se propôs a estudar a possível citotoxicidade e a genotoxicidade de derivados pirazólicos sintéticos do ácido úsnico purificado e extratos orgânicos obtidos a partir de *C. substellata*.

A modificação estrutural do ácido úsnico purificado possibilitou um aumento da solubilidade que foi observada em todos os compostos sintetizados, podendo ser atribuído a substituição da hidroxila do carbono 3. Luzina et al. [21] também obtiveram derivados fenilhidrazínicos (halo alquilo, alcóxi e nitro) do ácido úsnico, entretanto, utilizaram como solvente reacional o metanol, enquanto que neste trabalho, utilizou-se etanol de acordo com uma química “verde” que não agride o meio ambiente.

A atividade citotóxica do ácido úsnico isolado e purificado do líquen *C. substellata* e seus derivados pirazólicos sintéticos, juntamente com seus extratos orgânicos foi avaliada em quatro linhagens de células neoplásicas (HEp-2, NCI-H292, HL-60, MCF-7). Os compostos 3a e 3e apresentaram porcentagem de inibição muito significativa frente à linhagem celular MCF-7, evidenciando que a modificação da estrutura do ácido úsnico purificado levou ao aumento da atividade citotóxica quando comparado com o ácido úsnico purificado, considerando também que esta linhagem de célula tumoral é responsável pelo tipo de câncer mais incidente no Brasil, o câncer de mama [33]. Uma elevada atividade citotóxica também foi verificada para o extrato clorofórmico que apresentou uma CI_{50} de 3,34 frente à linhagem celular HL-60 e para o ácido úsnico purificado com CI_{50} de 2,19 frente à linhagem HEp-2, de modo que são considerados com uma potente atividade antineoplásica aqueles compostos que apresentam $CI_{50} < 30$ [34]. Os resultados apresentados confirmam o estudo feito por Correché et al. [35] que realizaram ensaios *in vitro* de citotoxicidade frente à cultura de linfócitos de baço de ratos Hoffmam, confirmando também uma quase total inibição do crescimento celular, quando a cultura foi incubada com o ácido úsnico e seus derivados nas concentrações de 10 a 80 $\mu\text{g/mL}$. Cardarelli *et al.* [36] também reportaram que a propriedade do ácido úsnico sobre a proliferação de células da linhagem HE-50 e K562 foi dose e tempo dependente. Outros estudos demonstraram que o ácido úsnico apresenta atividade antiproliferativa contra as linhagens de células humanas malignas T-47D (mama), Panc-1 (pâncreas) e PC-3 (próstata) [37].

Em relação ao sistema teste empregado para a avaliação da genotoxicidade, o ensaio cometa detecta danos ao DNA tais como quebras de fitas simples e duplas, sítios álcali lábeis, locais de reparo incompleto e instabilidade genômica [38]. Este ensaio tem se mostrado ser

muito sensível e é, portanto, útil para a detecção de danos genéticos em células individuais. O sistema-teste de micronúcleo é um ensaio amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos e está sendo empregado como um método de triagem no desenvolvimento de novos fármacos [39]. É importante ressaltar que o potencial de muitos compostos naturais de modelar os efeitos genotóxicos tem sido identificado utilizando-se o teste do micronúcleo como parâmetro de análise [40].

Al-Bekairi et al. [41] avaliaram a genotoxicidade do ácido úsnico (+) após a administração oral em camundongos. O ácido úsnico induziu a formação de micronúcleos na medula óssea, mas os valores não foram estatisticamente significativos quando comparados com o controle negativo. Recentemente, Leandro et al. [13] avaliaram a genotoxicidade e o potencial antígeno-tóxico do ácido úsnico pelos teste de micronúcleo e ensaio cometa e observaram que não houve efeito genotóxico nas diferentes concentrações testadas do ácido úsnico. Estes resultados corroboram com os resultados do presente trabalho, em que não foram observados frequência de micronúcleo significativa, bem como dano expressivo no DNA das células dos grupos animais tratados com o ácido úsnico purificado e seus derivados pirazólicos. No entanto, a presença de atividade genotóxica para o composto 3c pode ser causada pela presença do elemento cloro que possui toxicidade comprovada e está presente na estrutura química do composto [42].

A ausência da ação genotóxica e mutagênica da maioria dos compostos sintetizados testados tende a ser um ponto positivo para o desenvolvimento de novos fármacos, pois compostos químicos que apresentam indícios de genotoxicidade ou mutagenicidade e que interagem de alguma forma com o DNA, podem causar alterações no funcionamento normal da célula, de modo que, em tratamentos sucessivos, pode acabar ocasionando danos mais efetivos ao material genético, representando um risco ao consumo humano, especialmente em situações em que o contato com a substância ocorre de forma repetida, como nos tratamentos medicinais. Sendo assim, a pesquisa da potencial atividade genotóxica é uma etapa importante do desenvolvimento de novos fármacos [43].

Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho mostram elevados índices de citotoxicidade demonstrada para os extratos orgânicos, ácido úsnico purificado e seus derivados quando testados em várias linhagens de células tumorais como também não foram encontrados propriedades genotóxicas e mutagênicas para compostos testados. No entanto, futuros testes deverão ser realizados a fim de elucidar melhor o potencial biológico dessas moléculas e os possíveis ajustes de suas estruturas químicas para os cuidados na sua utilização ou indicação como potencial fármaco.

5 Conclusões

O procedimento de extração e as técnicas de recristalização utilizados foram adequados para a obtenção do ácido úsnico e dos extratos orgânicos, apresentando rendimentos satisfatórios. A abordagem sintética proposta foi considerada bastante satisfatória e ecologicamente mais adequada. Os compostos tiveram as estruturas previstas confirmadas para técnicas de RMN-H¹, RMN-C¹³ e IV, e foram obtidos em rendimentos satisfatórios. O efeito citotóxico do ácido úsnico purificado e dos extratos orgânicos de *C. substellata* foi determinado e mostrou que o ácido úsnico purificado apresentou melhor atividade frente às linhagens de células neoplásicas NCI-H292 com CI₅₀ de 4, 97 µg/mL e HEP-2 com CI₅₀ de 2,19 µg/mL. Os compostos analisados pelo ensaio cometa não se mostraram genotóxicos em relação ao índice de dano e a frequência de dano. A análise de micronúcleo também demonstrou que as substâncias testadas não são mutagênicas para os animais tratados. Os dados apresentados são animadores e ampliam os horizontes para realização de novos ensaios com o intuito de se aprofundar o conhecimento acerca destas novas moléculas.

6 Conflito de Interesses

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

7 Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro e pela concessão de bolsa a Rocha, T. A.

8 Referências

1. Muller, K. Appl. Microbiol. Biotechnol. **2001**, 56, 9.
2. Cocchietto, M.; Skert, N.; Nimis, P. L. Naturwissenschaften. **2002**, 89, 137.
3. Ingólfssdóttir, K. Phytochemistry. **2002**, 61, 729.
4. Santos, N. P.; Nascimento, S. C.; Wanderley, M. S. O.; Telles, N.; Castro, C.M.M.B.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H.; Honda, N. K.; Santos-Magalhães, N. S. Eur J Pharm Biopharm. **2006**, 64, 154.
5. Gupta, V. K.; Verma, S.; Gupta, S.; Singh, A.; Pal, A.; Srivastava, S. K.; Srivastava, P. K.; Singh, S. C.; Darokar, M. P. Eur. j. clin. microbiol. infect. dis. **2012**, 31, 3375.

6. De Carvalho, E. A. B.; Andrade, P. P.; Silva, N. H.; Pereira, E. C.; Figueiredo, R. C. B. Q. *The Int. Res. and Rev. J. for Microscopy*. **2005**, 36, 155.
7. Zu-Qing S.; Zhi-Zhunmo; Jin-Bin L.; Xue-Xuan F.; Yong-Zhuo L.; Xie Z.; Yu-Hong L.; Xiao-Ying C.; Zhi-Wei C.; Zi-Ren S.; Xiao-Ping L. *Int Immunopharmacol*. **2014**, 22, 371.
8. Shtro, A. A.; ZarubaeV, V. V.; Luzina, O. A., Sokolov, D. N.; Kiselev, O. I.; Salakhutdinov, N. F. *Bioorg. Med. Chem*. **2014**, 22, 6826.
9. Brisdelli, F.; Perilli, M.; Sellitri, D.; Piovano, M.; Garbarino, J. A.; Nicoletti, M.; Bozzi, A.; Amicosante, G.; Celenza, G. *Phytother Res*. **2013**, 27, 431.
10. Einarsdóttir, E.; Groeneweg, J.; Bjornsdóttir, G. G.; Harethardottir, G.; Omarsdóttir, S.; Ingólfssdóttir, K.; Ogmundsdóttir, H. M. *Planta Medica*. **2010**, 76, 969.
11. Ribeiro-Costa, R. M.; Alves, A. J.; Santos, N. P.; Nascimento, S. C.; Gonçalves, E. C. P.; Silva, N. H.; Honda, N. K.; Santos-Magalhães, N. S. *J Microencapsul*, **2004**, 21, 371.
12. Huang, Z.; Zheng, G.; Tao, J.; Ruan, J. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater*. **2011**, 26, 955.
13. Leandro, L. F.; Munari, C. C.; Sato, V. L. F. L.; Alves, J. M.; Oliveira, P. F. De; Mastrocola, D. F. P.; Martins, S. De P. L.; Moraes, T. Da S.; Oliveira, A. I. De; Tozatti, M. G.; Cunha, W. R.; Tavares, D. C. *Mutation Res*. **2013**, 753, 101.
14. Erba, E.; Pocar, D.; Rossi, L. M. *II Farmaco*. **1998**, 53, 718.
15. Pramyothin, P.; Janthasoot, W.; Pongnimitprasert, N.; Phrukudomc, S.; Ruangrunsi, N. J. *Ethnopharmacol*. **2004**, 90, 381.
16. Han, D.; Matsumaru, K.; Rettorib, D.; Kaplowitz, N. *Biochem. Pharmacol*. **2004**, 67, 439.
17. Jin, J.; Rao, Y.; Bian, X.; Zeng, A.; Yang, G. *J. Solution Chem*. **2013**, 42, 1018.
18. Moreira, C. T.; Oliveira, A. L.; Comar, J. F.; Peralta, R. M.; Bracht, A. *Chem Biol Interact*. **2013**, 203, 502.
19. Korokolvas, A.; Burckhalter, J.H. *Química Farmacéutica*; Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Dois, **1982**.
20. Odabasoglu, F.; Cakir, A.; Suleyman, H.; Aslan, A.; Bayir, Y.; Halici, M.; Kazaz, C. J. *Ethnopharmacol*. **2006**, 103, 59.
21. Luzina, O. A.; Polovinka, M. P.; Salakhutdinov, N. F.; Tolstikov, G. A. *Org Lettvol*. **2009**, 45, 1783.
22. Culberson, C. F. *The University of North Carolina Press: Chapel Hill*. **1969**, 348.

23. Vicente, C.; Legaz, M.E. Lichen Enzymology. In: CRC Handbook of Lichenology, v.I. Galun, M.(ed.) CRC Press Inc. **1988**, 239.
24. Mosmann, T. J Immunol Methods. **1983**, 65, 55.
25. Alley, M. C. et al. Cancer Res. **1988**, 48, 589.
26. Rodrigues, F. A. R. et al. Chem Biol Drug Des. **2014**, 83, 126.
27. Umbunzeiro, G. A.; Roubicek, D. A. Genotoxicidade Ambiental. In: Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações, São Carlos. **2006**, capítulo 14.
28. Collins, A. R.; Oscozl, A. A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C. C.; Stetina, R. Mutagenesis. **2008**, 23, 143.
29. Hayashi M. et al. Mutation Res. **1994**, 312, 293.
30. Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects: Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, França. Acessado em 08 de setembro de **2014**.
31. Basso, L. A.; Silva, L. H. P.; Fett-Neto, A. G.; Junior, W. F. A.; Moreira, I. S.; Palma, M. S.; Calixto, J. B.; Filho, S. A.; Santos, R. R.; Soares, M. B. P.; Santos, D. S. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **2005**. 100, 575.
32. Shukla, V.; Joshi, G. P.; Rawat, M. S. M. Phytochemistry Rev. **2010**, 9, 303.
33. BRASIL. Instituto Nacional do Câncer -INCA. **2014**. Estimativas 2014, incidências de câncer no Brasil. [Acesso em 8 de dezembro de 2014]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>.
34. Itharat, A.; Houghton, P.J.; Eno-Amooquaye, E.; Burke, P.J.; Sampson, J.H.; Raman, A.; J. Ethnopharmacol. **2004**, 90, 33.
35. Correché, E. R., Carrasco, M., Escudero M E, Velázquez L, Guzmán, A M S, Giannini, F, Enriz R.D, Jaúregui E A, Ceñal J P. And Giordano O.S. Fitoterapia. **1998**, 59, 493.
36. Cardarelli, M.; Serino, G.; Campanella, L.; Ercole, P.; Nardone, F.; Alesiane, O.; Rossiello, F. Cell Mol Life Sci. **1997**, 53, 667.
37. Kristmundsdóttir T, Jónsdóttir E, Ögmundsdóttir Hm, Kristín I. Eur J Pharm Sci. **2005**, 24, 539.
38. Nessler, F.; Zennouche, N.; Simar-Meinti Eres, S.; Talahari, I.; Nkilimboui, E. N.; Marzin, D. Mutation Res. **2007**, 630, 28.
39. Hayashi, M.; Macgregor, J. T.; Gatehouse, D. G.; Adler, I.; Blakey, D. H.; Dertinger, S. D.; Krishna, G.; Morita, T.; Russo, A.; Sutou, S. Environ Mol Mutagen. **2000**, 35, 234.
40. Azevedo, L.; Gomes, J. C.; Strigheta, P. C.; Gontijo, A. M.; Padovani, C. R.; Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. Food Chem. **2003**, 41, 1671.

41. Al-Bekairi, A. M.; Qureshi, S.; Chaudhry, M. A.; Krishna, D. R.; Shah, A.H. J. *Ethnopharmacol.* **1991**, 33, 217.
42. Ahmad, S.; Ahmad, A.; Neeves, K.B.; Hendry-Hofer, T.; Loader, J.E.; White, C.W.; Veress, L. J. *Vis. Exp.* **2014**, 87, 8.
43. Hartmann, A.; Elhajouji, A; Kiskinis, E.; Poetter, F.; Martus, H.; Fjallman, A.; Frieauff, W.; Sutter, W. *Food Chem Toxicol.* **2001**, 39, 843.

5. CONCLUSÃO GERAL

- ✓ O procedimento de extração e as técnicas utilizados foram adequados para a obtenção dos extratos orgânicos (etéreo, clorofórmico e acetônico).
- ✓ O ácido úsnico foi obtido através de técnicas de extração por esgotamento e cristalização a partir do extrato etéreo do talo in natura de *Cladonia substellata*. Análises cromatográficas, Ressonância Magnética Nuclear de Protóns e Carbono e Infravermelho, comprovaram a pureza desta substância liquênica.
- ✓ A abordagem sintética dos derivados pirazólicos do ácido úsnico apresentou rendimento satisfatório.
- ✓ O efeito citotóxico dos extratos orgânicos, ácido úsnico purificado e derivados pirazólicos sintéticos mostraram ser capaz de inibir mais de 50% de proliferação celular.
- ✓ Os compostos analisados pelo ensaio cometa e teste de micronúcleo não se mostraram genotóxicos e mutagênicos, respectivamente.

6. ANEXOS

Anexo 1

Espectros de RMN- H^1 , RMN- C^{13} , IV e CLAE do ácido úsnico e derivados pirazólicos sintéticos

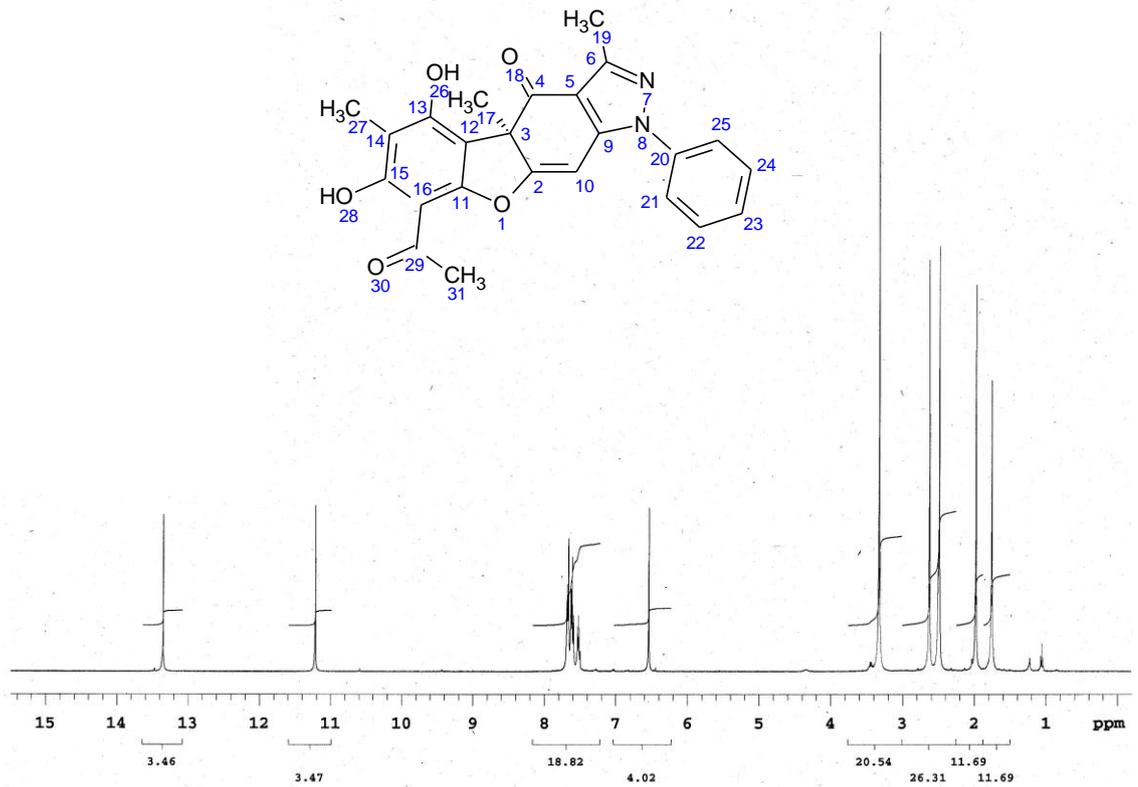


Figura 1- Espectro de RMN-H¹ do composto 3a.

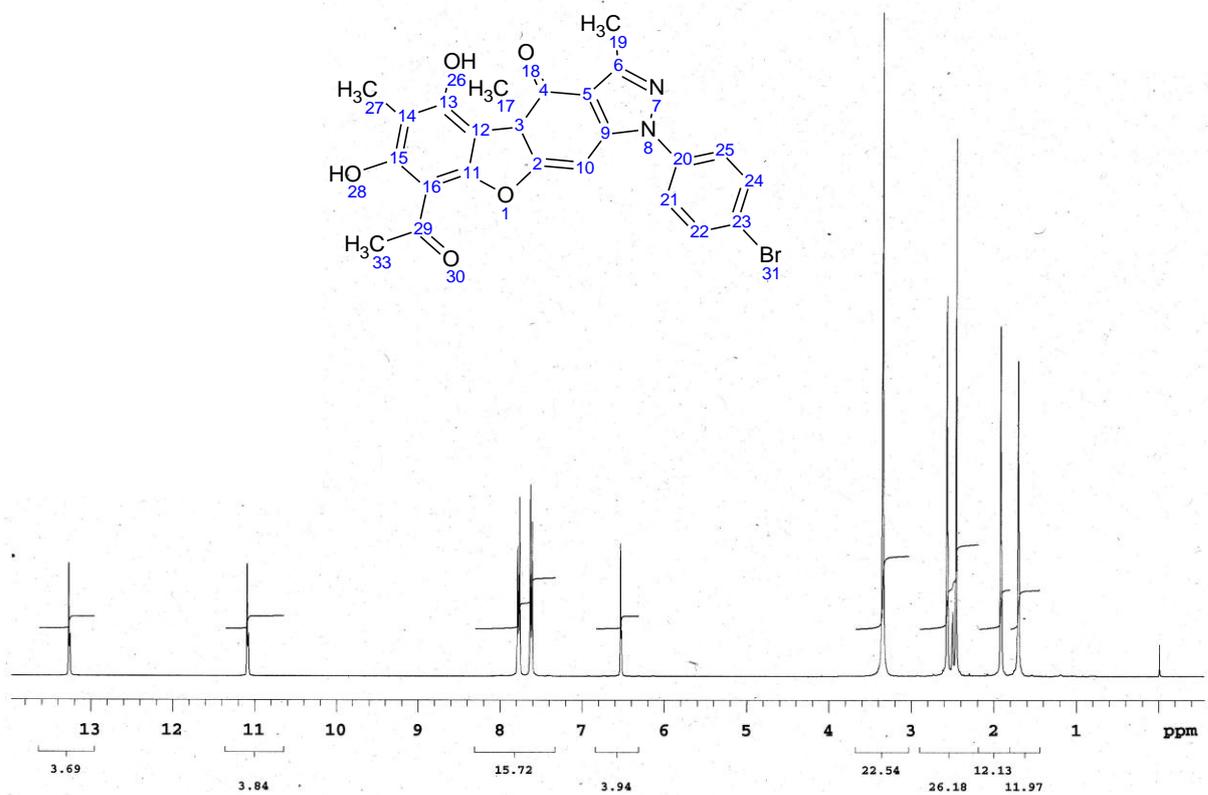


Figura 2- Espectro de RMN-H¹ do composto 3b.

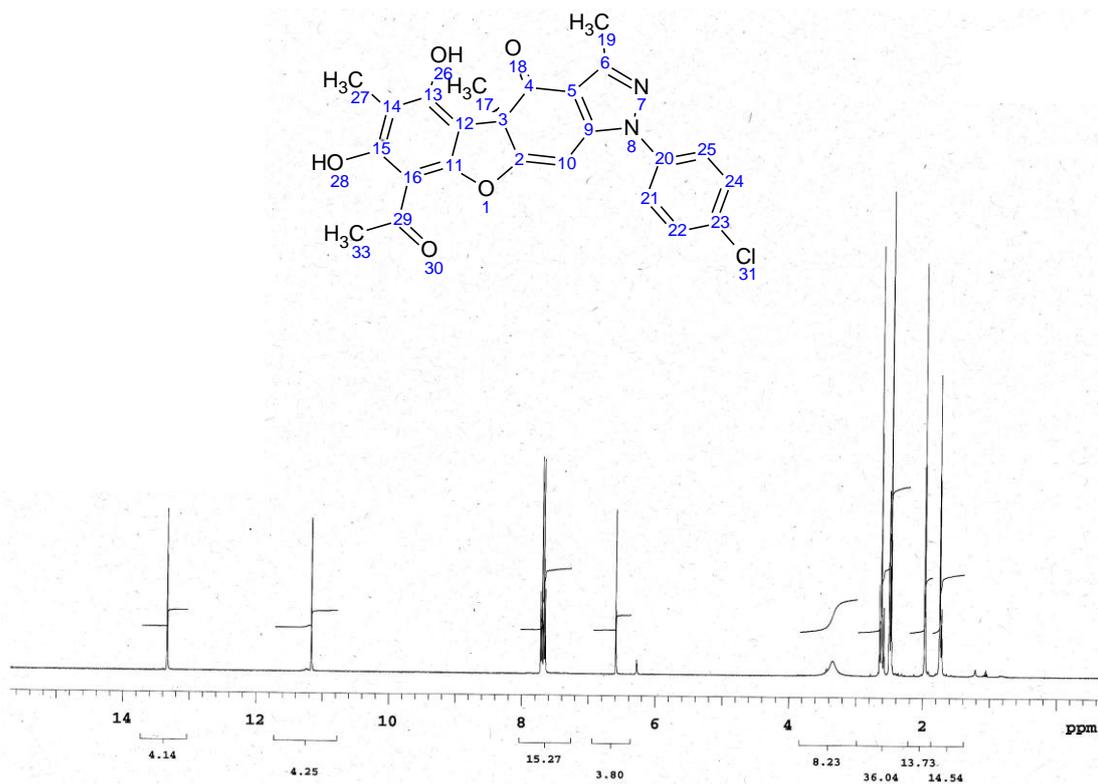


Figura 3- Espectro de RMN-H¹ do composto 3c.

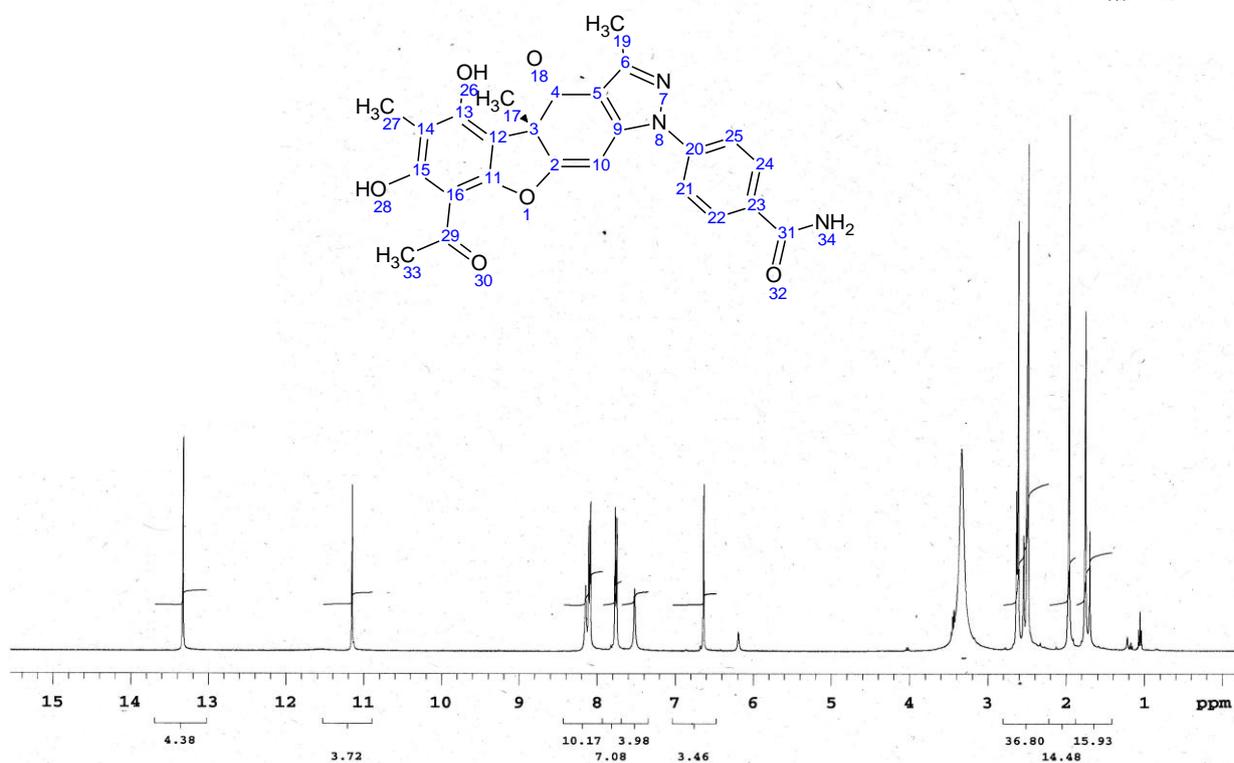


Figura 4- Espectro de RMN-H¹ do composto 3d.

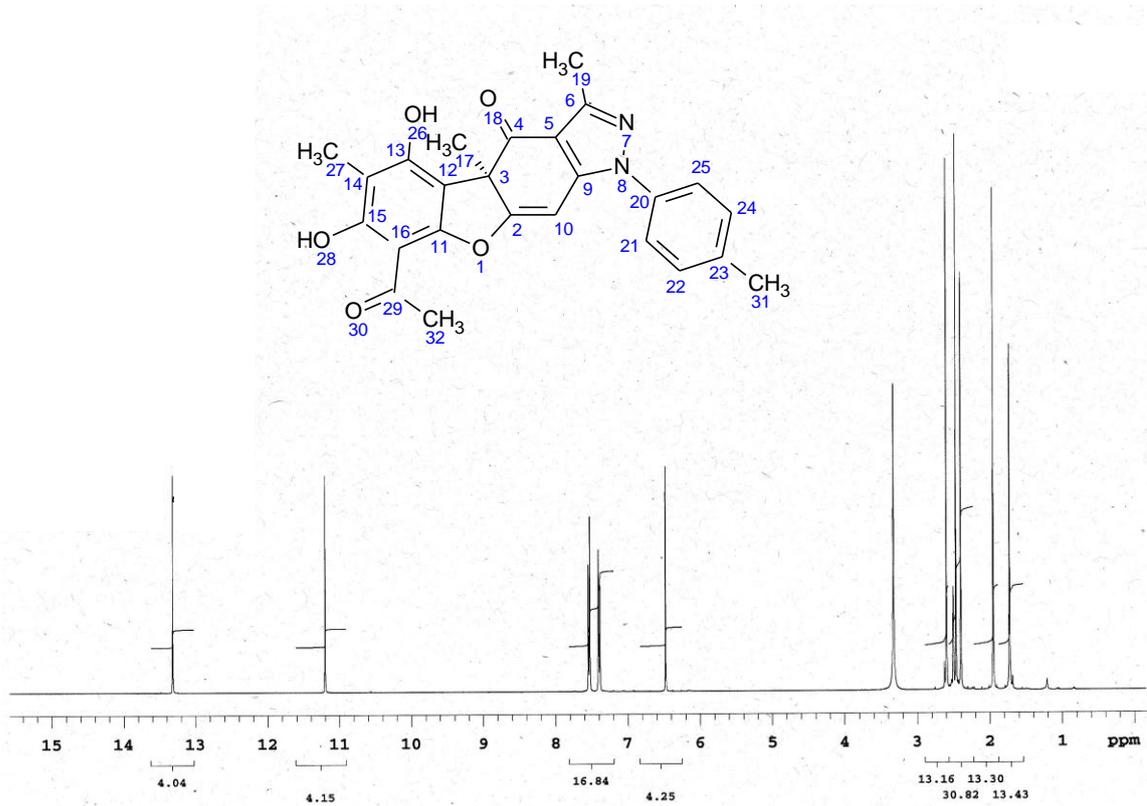


Figura 5- Espectro de RMN-H¹ do composto 3e.

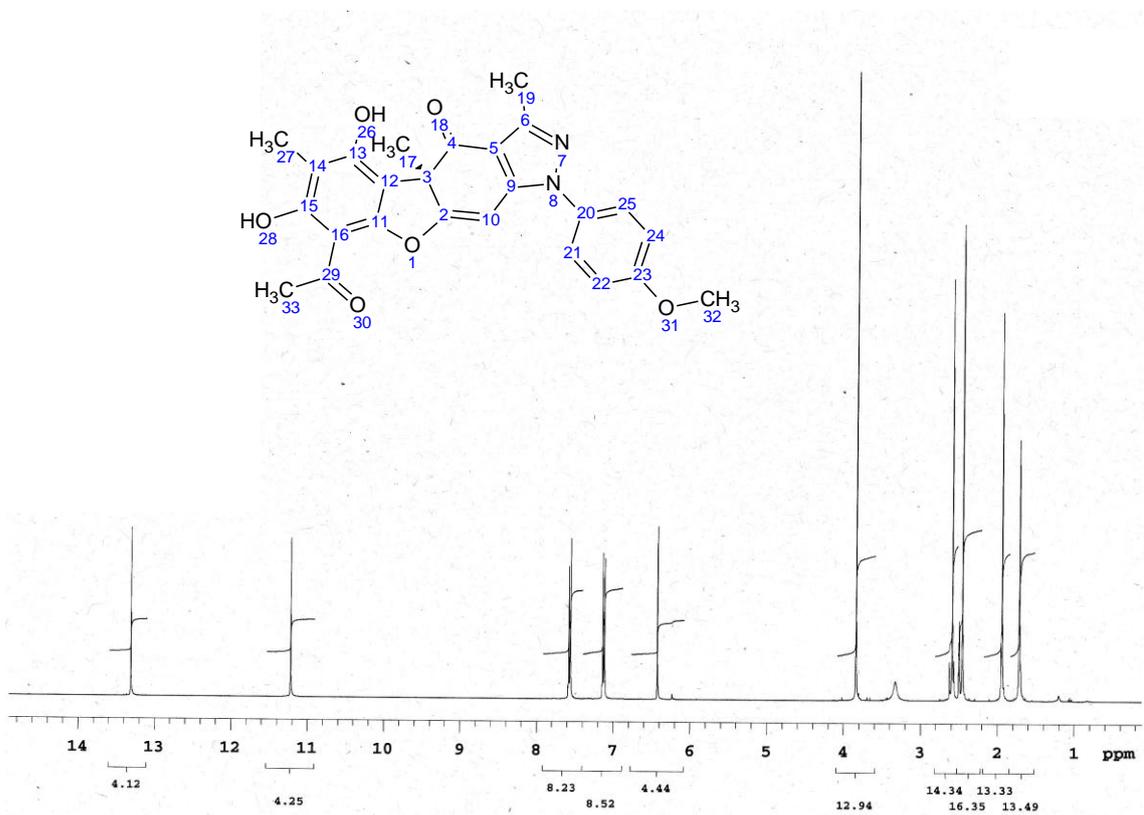


Figura 6- Espectro de RMN-H¹ do composto 3f.

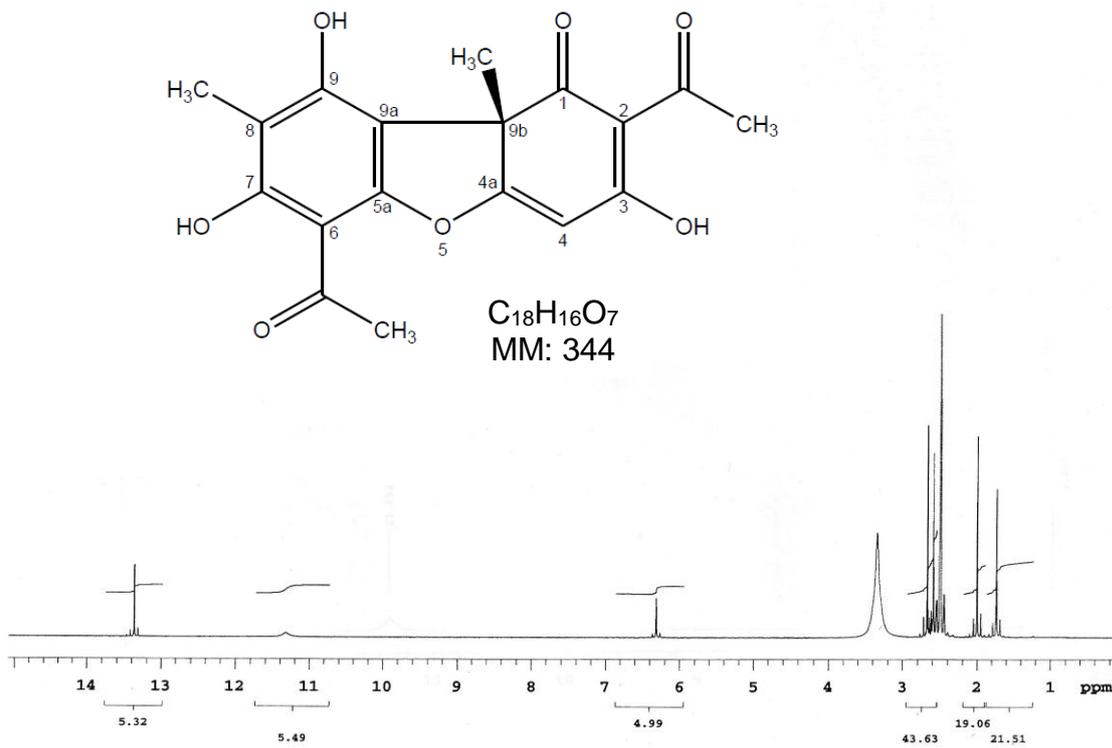


Figura 7- Espectro de RMN- H^1 do ácido úsnico purificado.

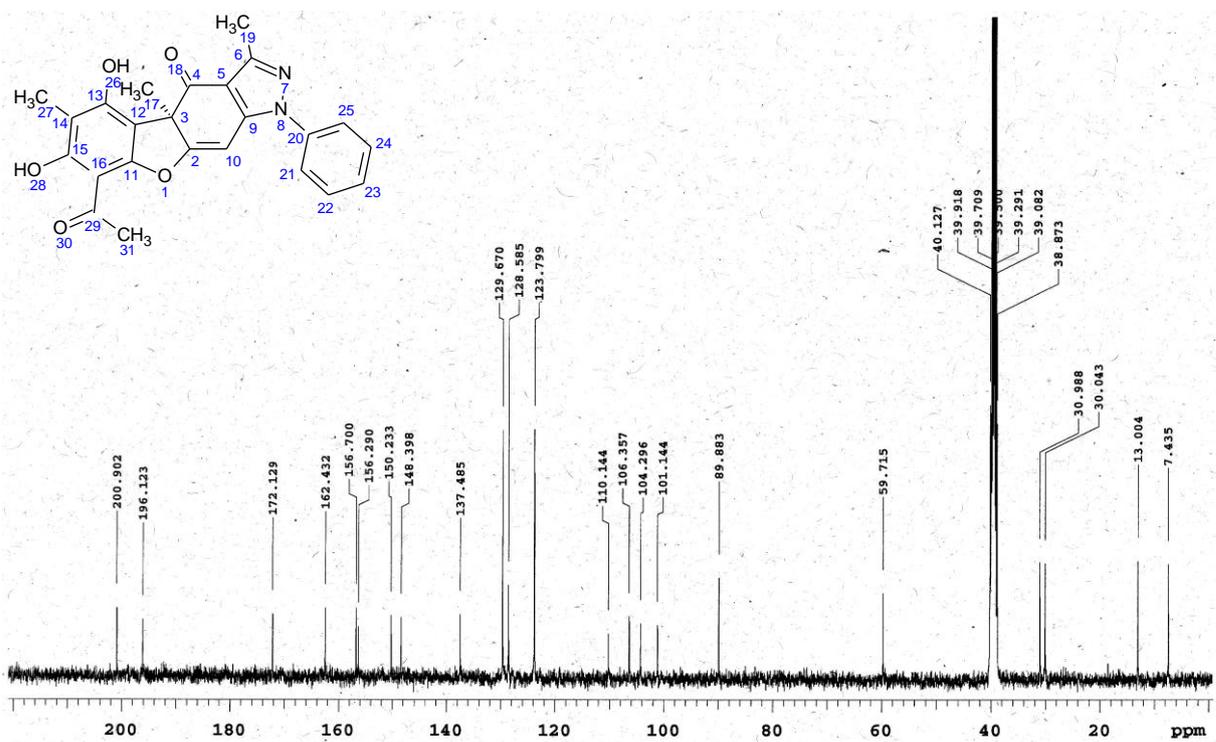


Figura 8- Espectro de RMN- C^{13} do composto 3a.

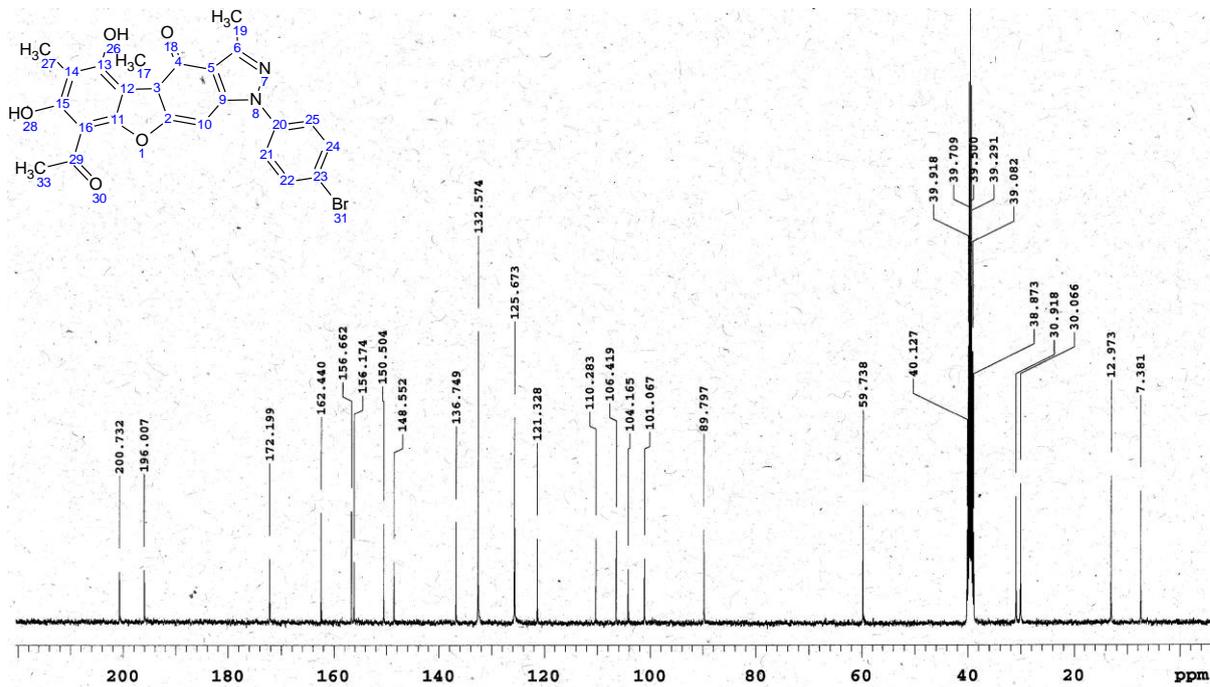


Figura 9- Espectro de RMN-C¹³ do composto 3b.

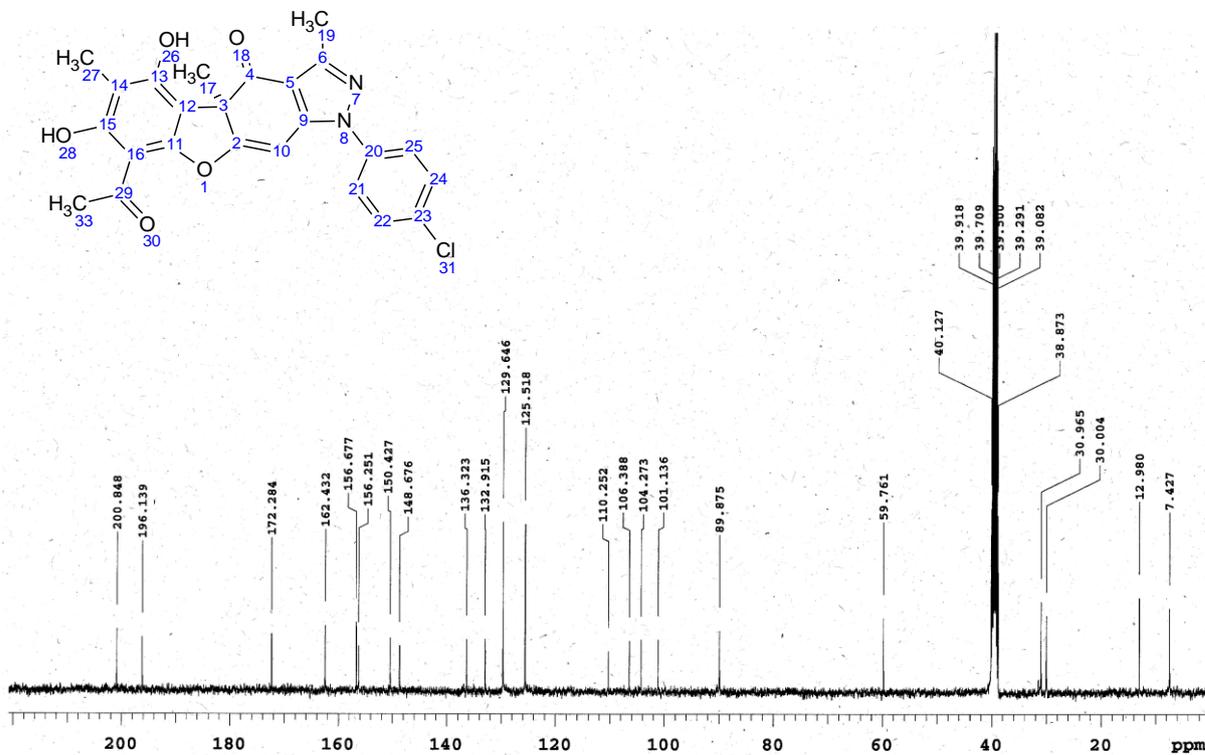


Figura 10- Espectro de RMN-C¹³ do composto 3c.

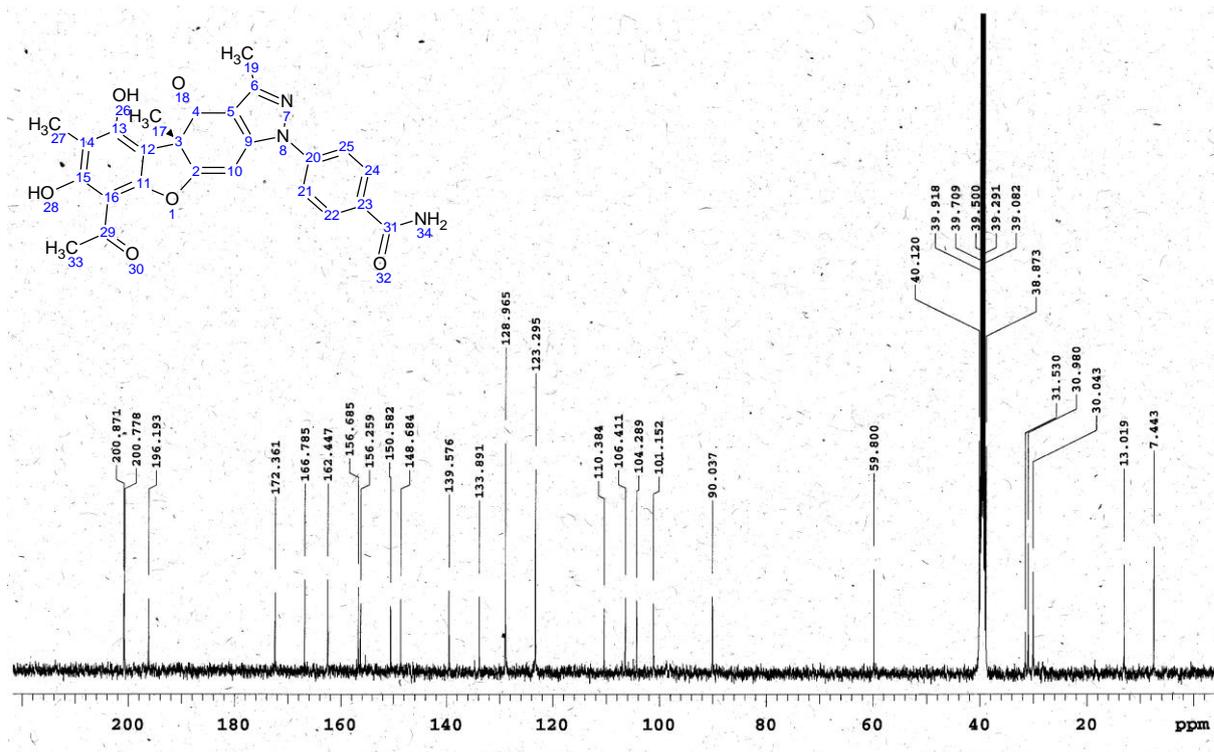


Figura 11- Espectro de RMN-C¹³ do composto 3d.

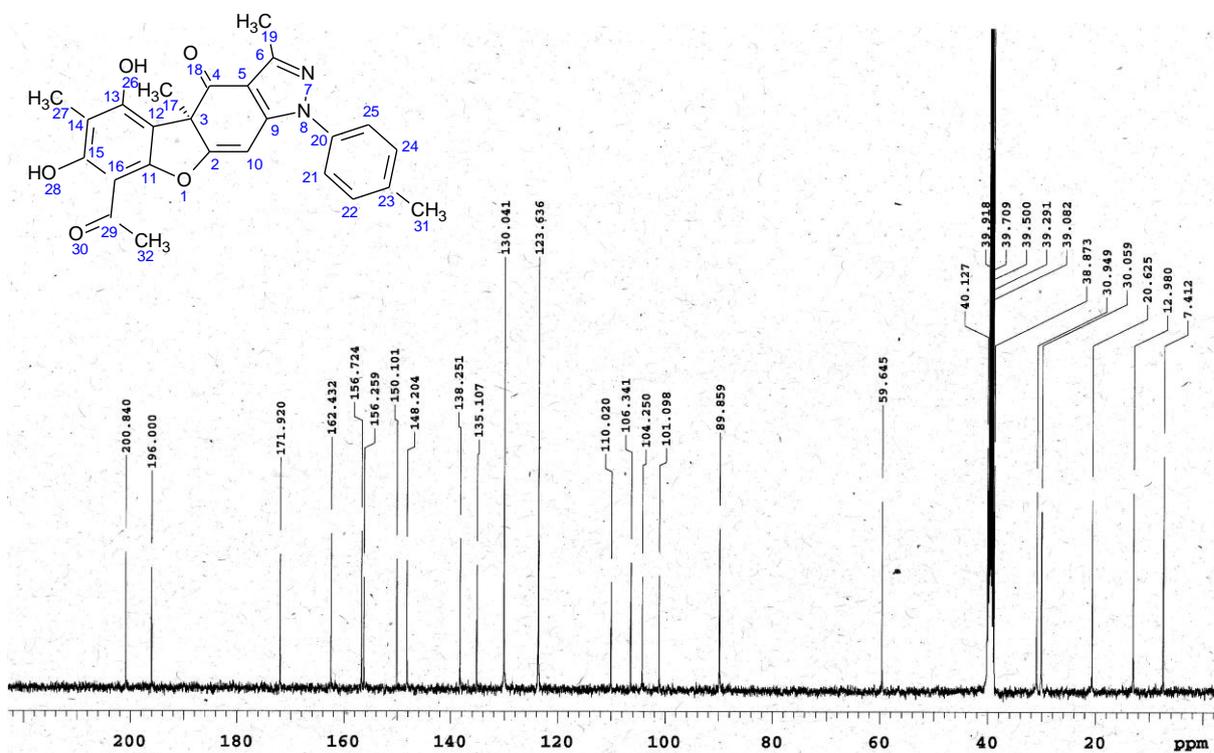


Figura 12- Espectro de RMN-C¹³ do composto 3e.

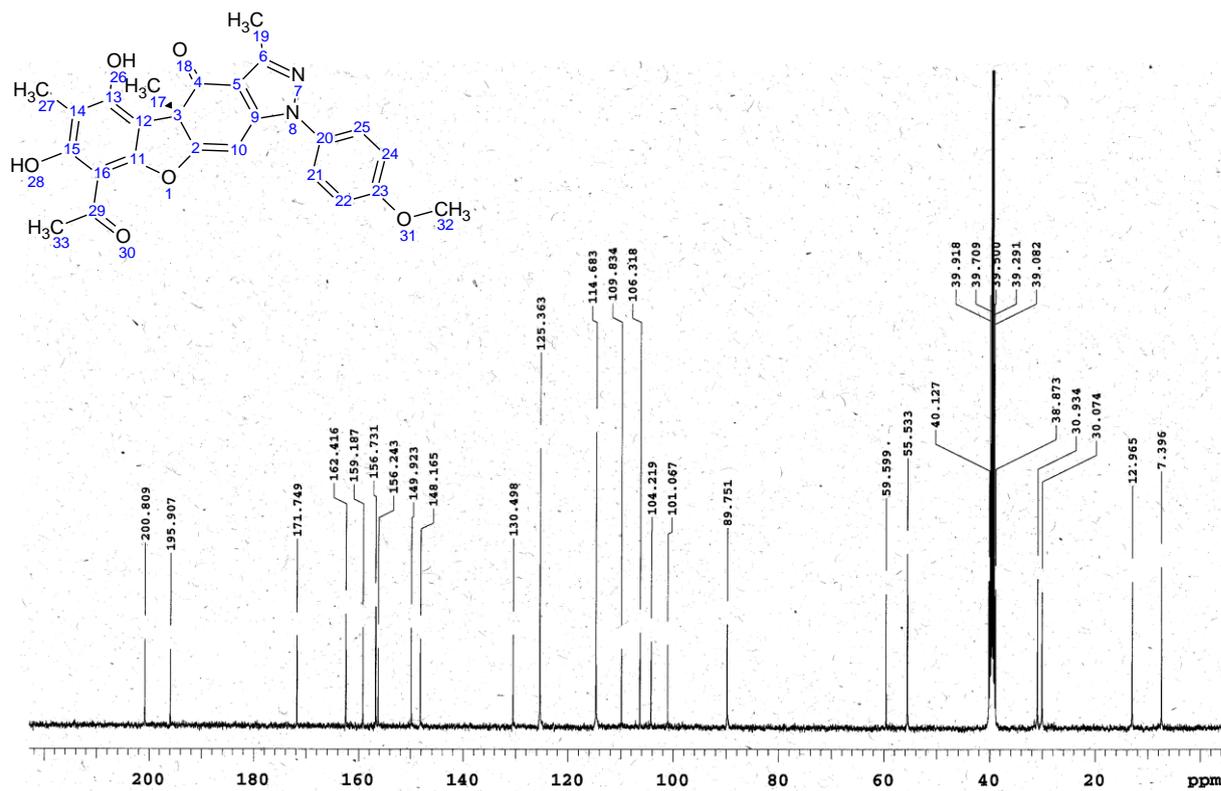


Figura 13- Espectro de RMN- C^{13} do composto 3f.

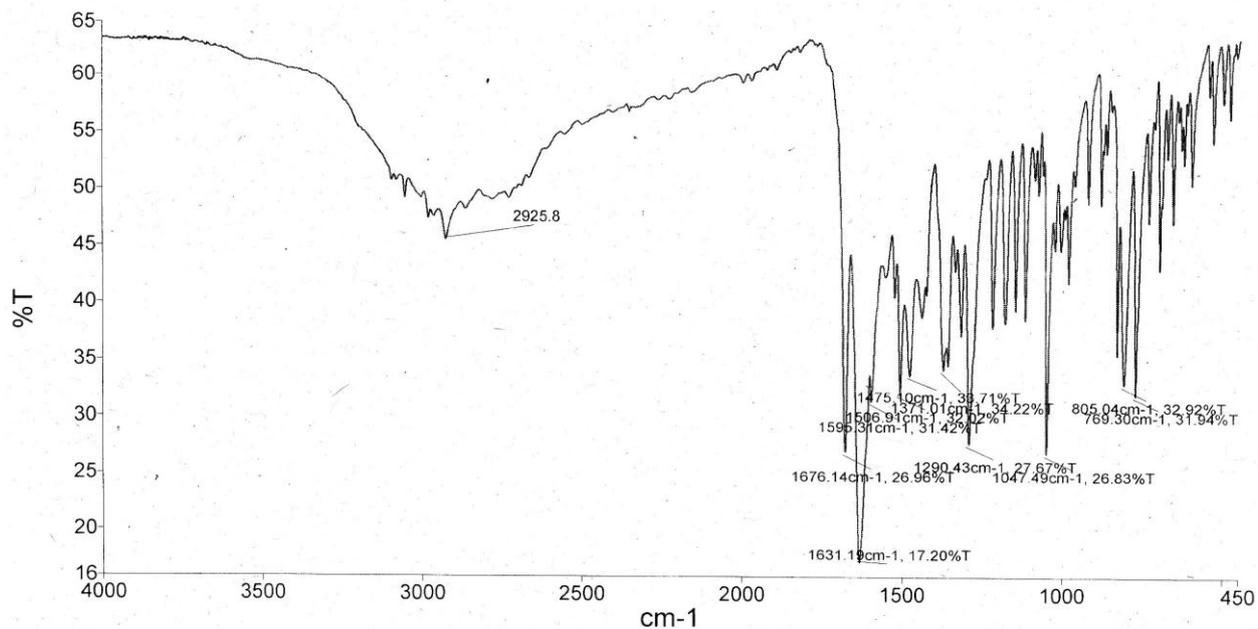


Figura 14- Espectro de Infravermelho do composto 3a.

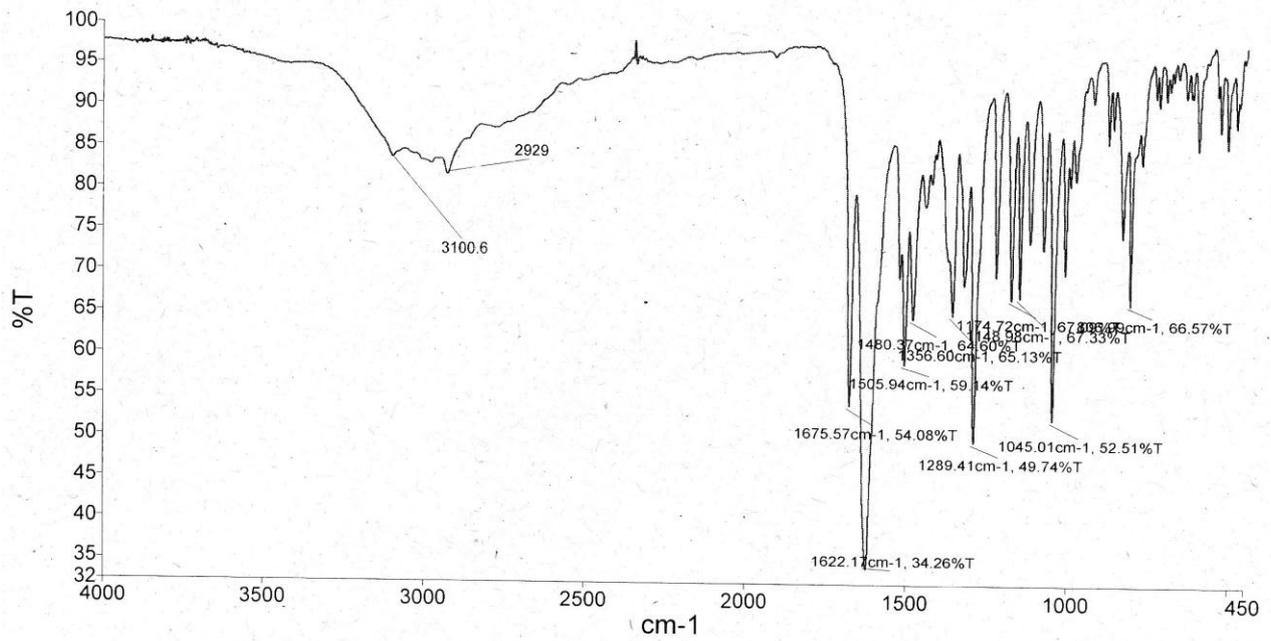


Figura 15- Espectro de Infravermelho do composto 3b.

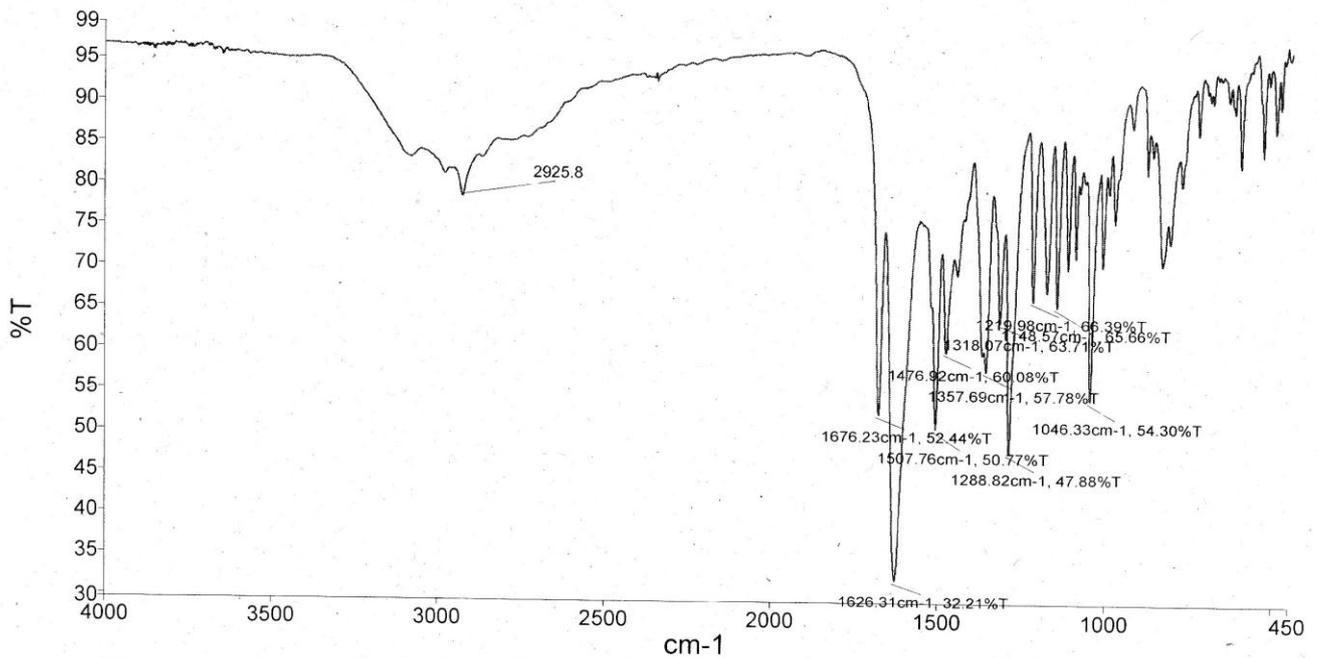


Figura 16- Espectro de Infravermelho do composto 3c.

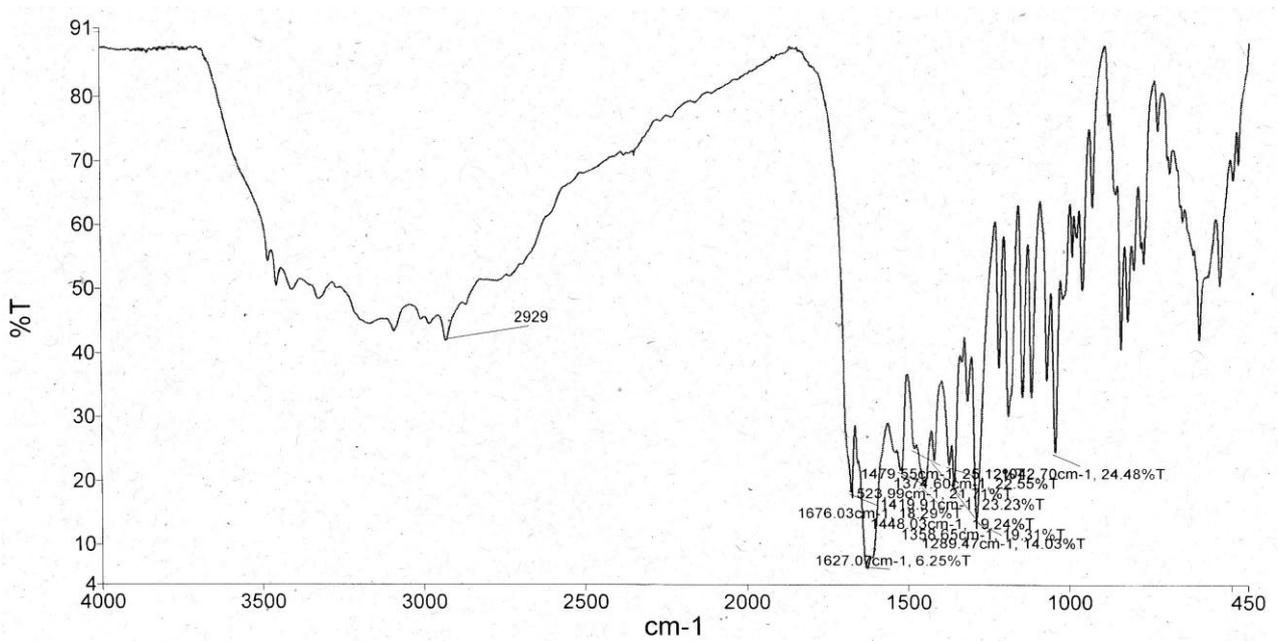


Figura 17- Espectro de Infravermelho do composto 3d.

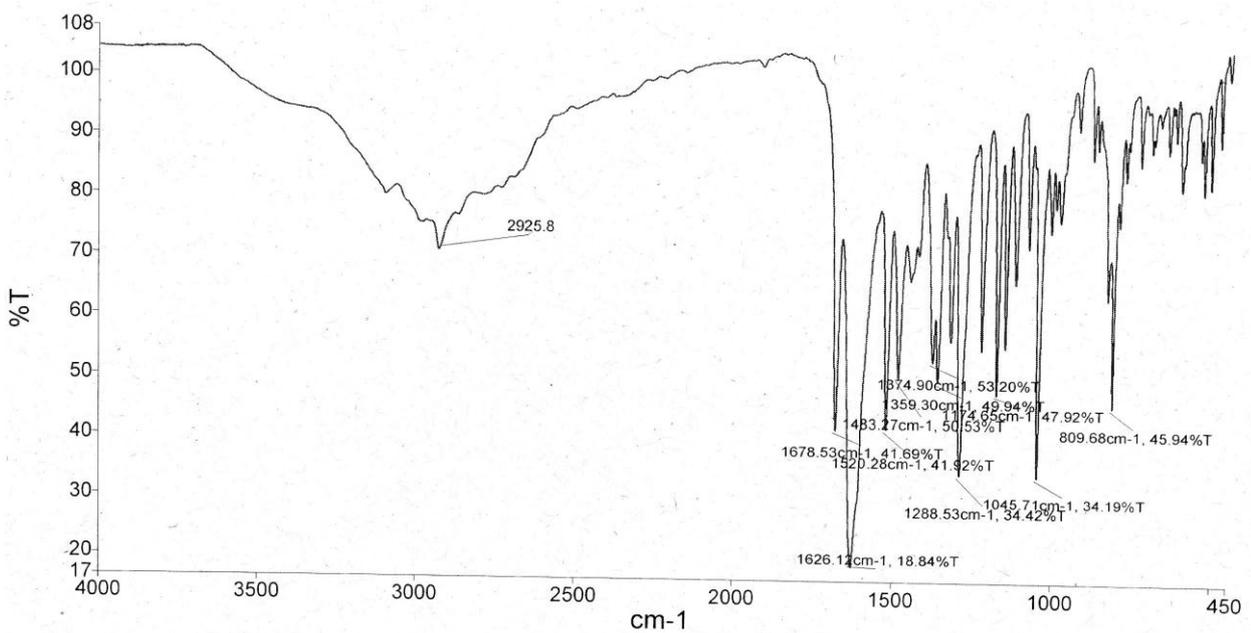


Figura 18- Espectro de Infravermelho do composto 3e.

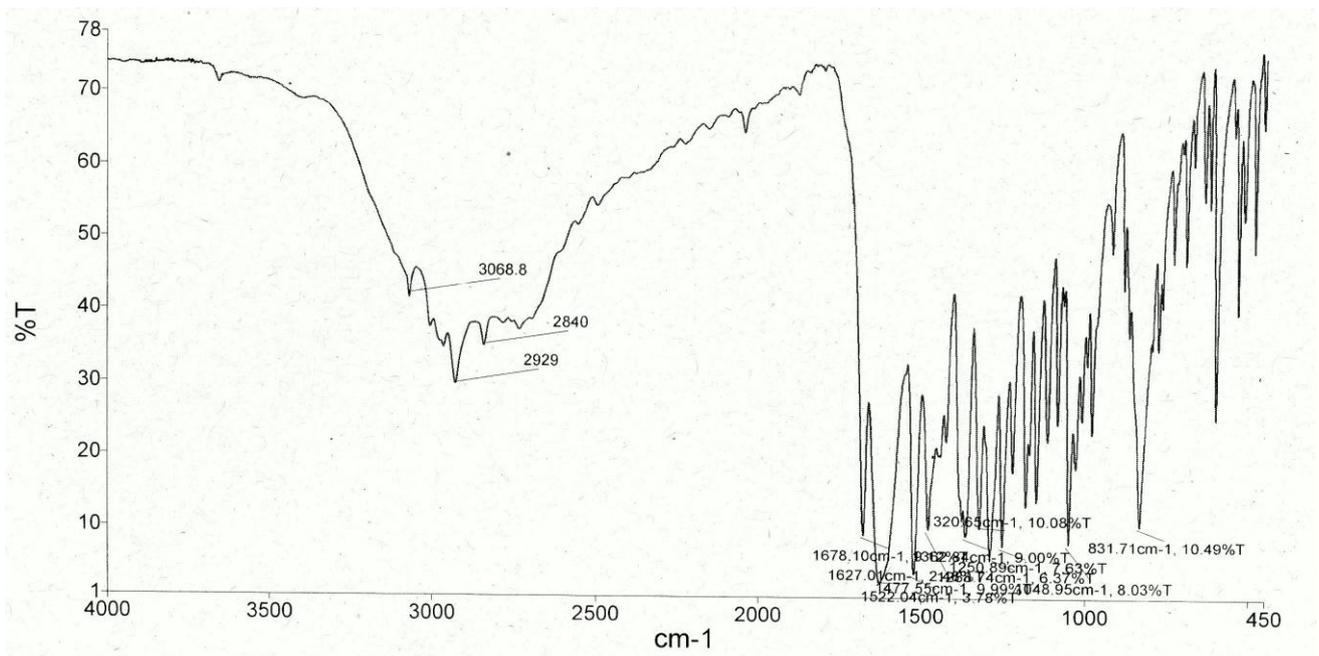


Figura 19- Espectro de Infravermelho do composto 3f.

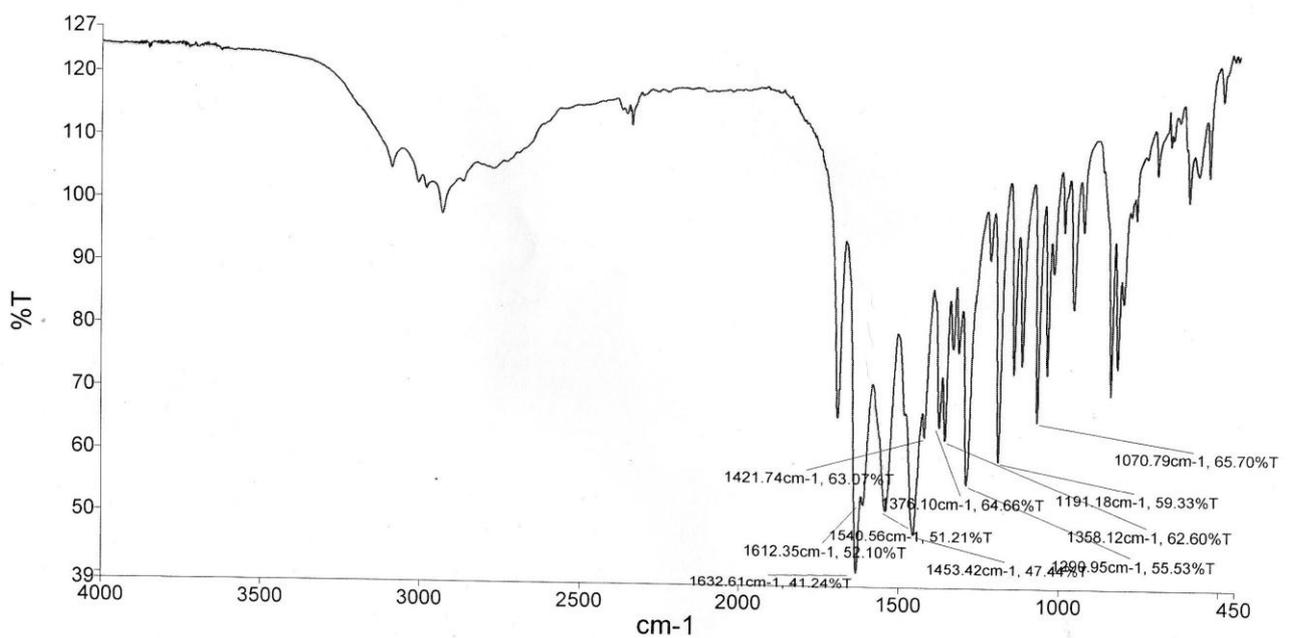


Figura 20- Espectro de Infravermelho do ácido úsnico purificado.

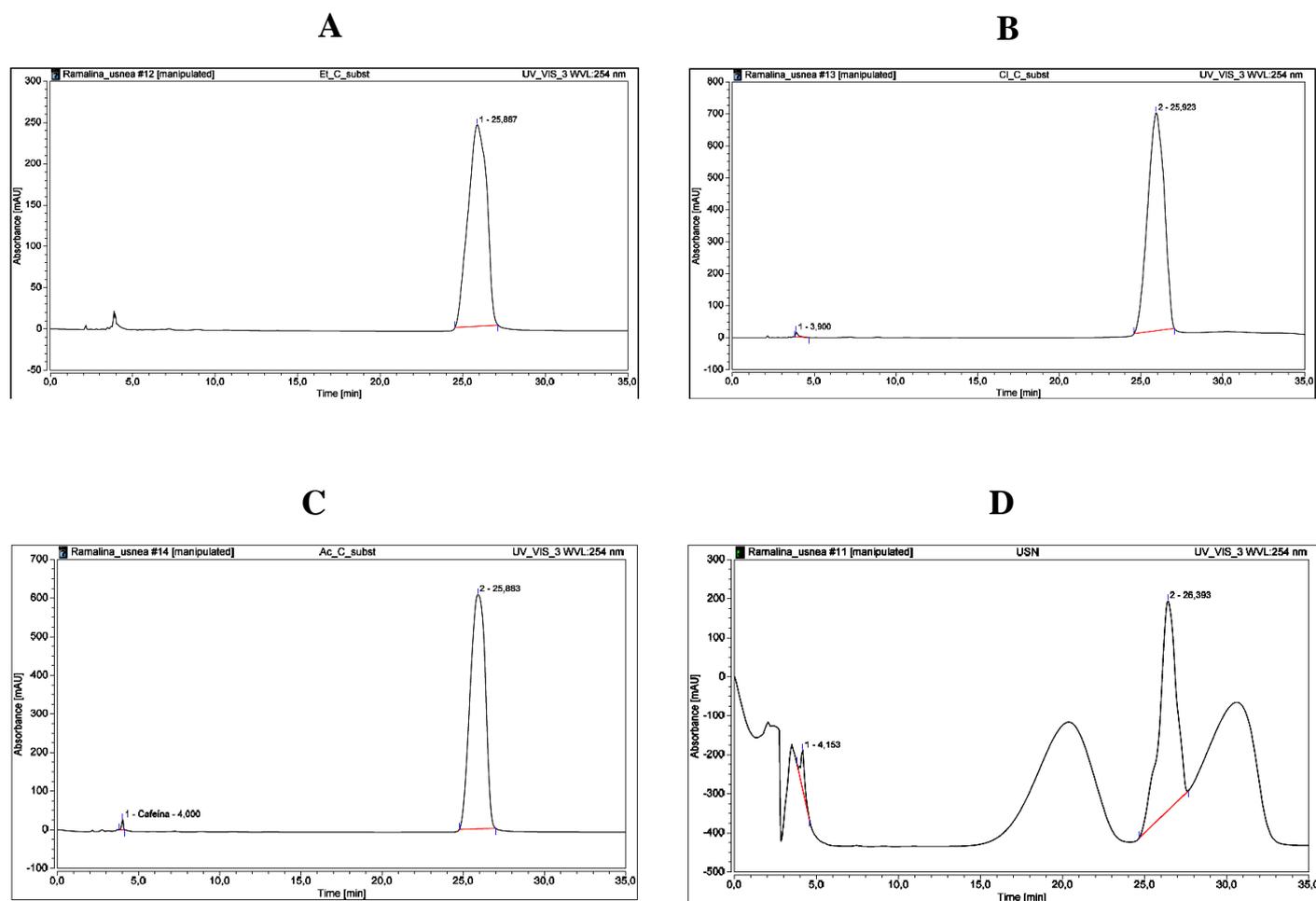


Figura 21- Cromatograma líquido de alta eficiência (CLAE): A- Extrato etéreo TR 25,88 min; B- Extrato clorofórmico TR 25,92; C- Extrato acetônico TR 25,88; D- Ácido úsnico purificado TR 26,39.

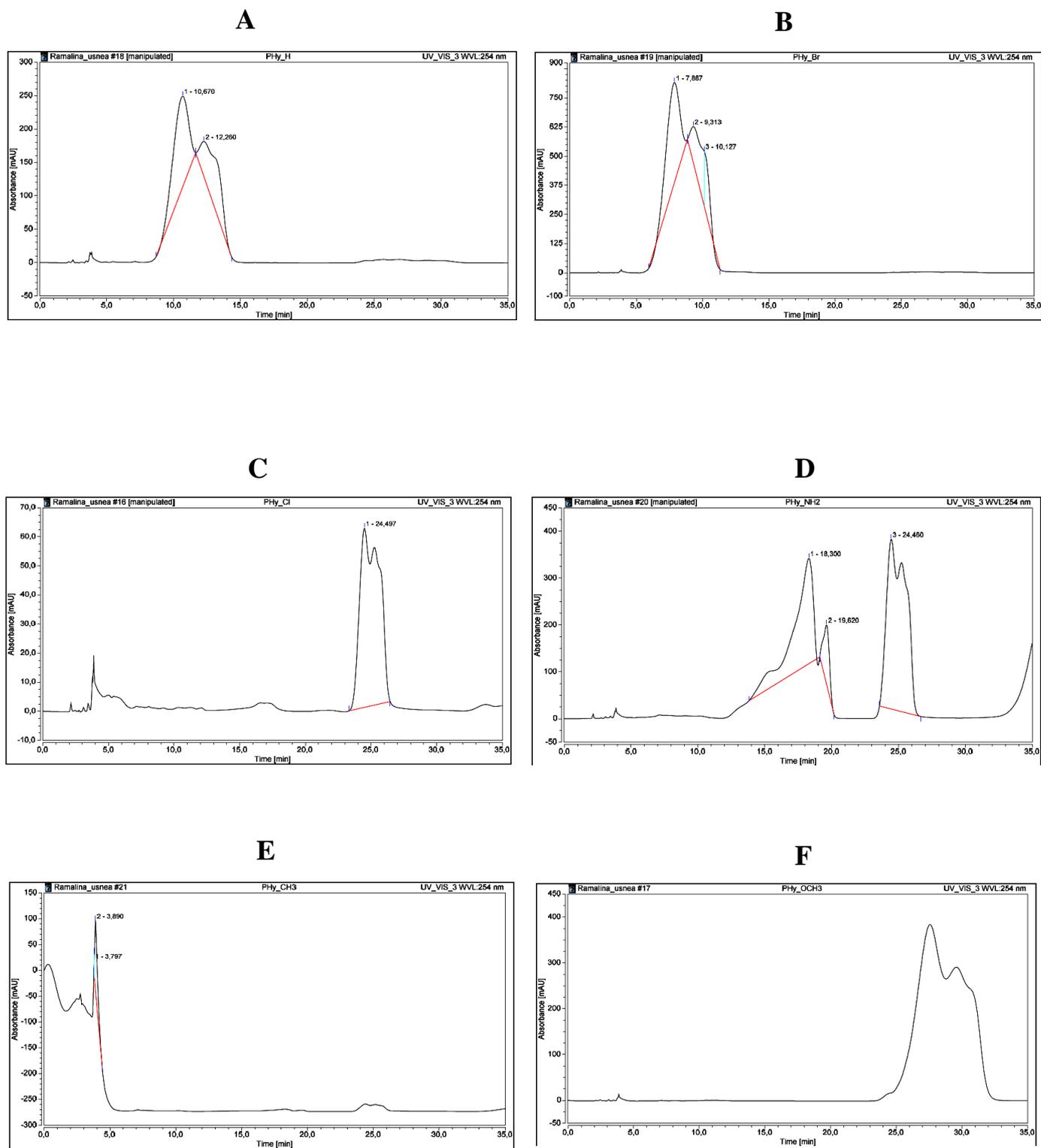


Figura 22- Cromatograma líquido de alta eficiência (CLAE): A- Composto 3a TR 10,67; B- Composto 3b TR 7,88; C- Composto 3c TR 24,49; D- Composto 3d TR 18,30; E- Composto 3e TR 3,89; F- Composto 3f TR 27,50.

Anexo 2

Ficha de Identificação Botânica



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Herbário UFP – Geraldo Mariz

Nº: UFP 77.682

Fam.: Cladoniaceae

Sp.: *Cladonia substellata* Vainio

Nome vulgar:

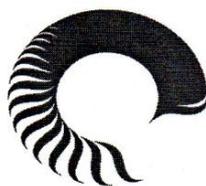
Col.: Bruno Rodrigues, Lourdes Buriel (nº 01-04/III/2013).

Det.: Lourdes Buriel 14/III/2013.

Proc.: PB. Mamanguape, Altitude de 51 m,
Coordenadas: latitude 06° 50' 19" S e Longitude
35° 07' 34" W, área de solo arenoso

Obs.: líquen fruticuloso

Anexo 3
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, 09 de fevereiro de 2015.

Ofício nº 07/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof. Nicacio Henrique da Silva
Departamento: Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.052055/2014-21

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, "**Avaliação da Citotoxicidade e Ação Genotóxica de Extratos Orgânicos de Cladonia Substellata (Líquen), Ácido Úsnico e Derivados Pirazóicos Sintéticos**".

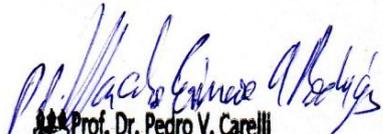
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals 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: Camundongo heterogênico; Linhagem: Musculus Idade: 08 semanas; Peso: 40g; Sexo: machos ; Nº total de animais: 49

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584

Anexo 04
Guide for Authors
(Bioorganic & Medicinal Chemistry)

BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Bioorganic & Medicinal Chemistry seeks to publish research results of outstanding significance and timeliness and review articles in the fields of medicinal chemistry, chemical biology, bioorganic chemistry, bioinorganic chemistry, and related disciplines.

Articles should describe original research of high quality and timeliness.

Reviews of topical importance and current relevance are specially commissioned in appropriate fields. Authors wishing to submit a non-solicited review article are requested to first contact the Editor-in-Chief, Professor C.-H. Wong.

Perspectives briefly review (in 1-4 printed pages) specific subjects that already have or are likely to have major impact in areas related to chemical biology and drug discovery. Authors of perspectives are those who have made the original contribution or have extended the original research to new breakthroughs. Perspectives are generally specially commissioned by the editors; however, suggestions for topics and authors are welcomed. Individuals interested in contributing should contact the Editor-in-Chief, Professor C.-H. Wong.

Symposia-in-Print comprise collections of original research papers (including experimental sections) covering specific topics. Topics for forthcoming symposia are announced in the journal from time to time. A guest editor will invite authors active in the field to submit papers, which are then reviewed and processed for publication by the guest editor under the usual refereeing system. Opportunity is also provided for other active investigators to submit contributions.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Conflict of interest

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

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.

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 **\$1800**, 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

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

Manuscripts should be addressed to the appropriate regional editor:

Submissions from Japan and other Asian countries:

Professor Yuichi Hashimoto, Institute of Molecular & Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Japan

Submissions from Europe:

Professor H. Waldmann, Department of Chemical Biology, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund, Germany

Submissions from USA, Canada, and all others:

Professor K. Janda, Department of Chemistry, The Scripps Research Institute, Maildrop: BCC 582, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037, USA

All manuscripts will be centrally handled by the journal editorial office, which will forward manuscripts to the regional editors:

Editorial Office
Bioorganic & Medicinal Chemistry
525 B Street, Suite 1900
San Diego, CA 92101-4495, USA

Fax: (1) 619-699-6801
E-mail: bmc-eo@elsevier.com

Authors who are unable to submit their paper online should contact the editorial office prior to submission at the above address.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/bmc>

Compound characterization checklist

Characterization of new compounds: All new compounds should be fully characterized with relevant spectroscopic data. Microanalyses should be included whenever possible. Under appropriate circumstances, mass spectra may serve in lieu of microanalysis, if accompanied by suitable NMR criteria for sample homogeneity.

CHARACTERIZATION OF ALL NEW COMPOUNDS HAS TO BE SPECIFIED (GIVEN) IN A [COMPOUND CHARACTERIZATION CHECKLIST](#).

PREPARATION

X-ray crystallographic data: Prior to submission of the manuscript, the author should deposit crystallographic data for organic and metalorganic structures with the Cambridge Crystallographic Data Centre. The data, without structure factors, should be sent by e-mail to deposit@ccdc.cam.ac.uk, as an ASCII file, preferably in CIF format. Hard copy data should be sent to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ. A checklist of data items for deposition can be obtained from the CCDC Home Page on the World Wide Web (<http://www.ccdc.cam.ac.uk>) or by e-mail to: fileserv@ccdc.cam.ac.uk, with the one-line message, send me checklist. The data will be acknowledged, within three working days, with one CCDC deposition number per structure deposited. These numbers should be included with the following standard text in the manuscript: Crystallographic data (excluding structure factors) for the structures in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication nos. CCDC. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK, (fax: +44-(0)1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk). Deposited data may be accessed by the journal and checked as part of the refereeing process. If data are revised prior to publication, a replacement file should be sent to CCDC.

Characterization of new compounds: All new compounds should be fully characterized with relevant spectroscopic data. Microanalyses should be included whenever possible. Under appropriate circumstances, high-resolution mass spectra may serve in lieu of microanalysis, if accompanied by suitable NMR criteria for sample homogeneity.

DNA sequences and GenBank Accession numbers: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: "(GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)". Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Software: Software used as part of computer-aided drug/agent design (e.g., molecular modelling, QSAR, conformational analysis, molecular dynamics) should be readily available from accepted sources and the authors may specify where the software can be obtained. Assurance of the quality of the parameters employed for the relevant potential functions should be detailed in the manuscript.

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.

Templates

Templates are provided to allow authors to view their paper in a style close to the final printed form. Their use is optional. All manuscripts will be fully typeset from the author's electronic files. It should be noted that due to defined typesetting standards and the complex requirements of electronic publishing, the publisher will not always be able to exactly match the layout the author has submitted. In particular, in the finished journal article, figures and tables are usually placed at the top or bottom of pages. The template is only intended to be used in assisting with the preparation and submission of manuscripts.

It should be noted that use of the journal templates is not a requirement and their adoption will neither speed nor delay publication. Elsevier can handle most major word processing packages and in general most formatting applied by authors for style and layout is replaced when the article is being typeset.

These templates contain a large number of macros. To ensure successful PDF conversion during online submission, it is important that the author save a new document based on the template, rather than saving the template itself. To use the template, the author should save the final document as a Word file with a '.doc' extension (rather than the '.dot' extension).

The templates can be found at http://www.elsevier.com/wps/find/P04_116.cws_home/authors_guide.

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.

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.

Vitae

When submitting a review article, authors should include biographical information for each author as well as a black-and-white photograph. Each biography should be one paragraph (approximately 150-200 words) and should include date and place of birth, universities attended, degrees obtained, principal professional posts held, present title, a line or two about the major research interests, and anything else professionally relevant that is of special interest.

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.

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](#).

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

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.

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.

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.

Citation in text

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

Web references

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

References in a special issue

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

Reference style

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

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

In the text, references should be indicated by superscript Arabic numerals which run consecutively through the paper and appear after any punctuation. Please ensure that all references are cited in the text and vice versa. The reference list should preferably contain only literature references though other information (e.g., experimental details) can be placed in this section. Preferably, each reference should contain only one literature citation. Authors are expected to check the original source reference for accuracy. Journal titles should be abbreviated according to American Chemical Society guidelines (*The ACS Style Guide*; Dodd, J. S., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1997). A list of currently accepted journal abbreviations may be found at <http://elsevier.com/locate/bmcl>. Formatting for common references is shown below.

Scientific articles:

1. Barton, D. H. R.; Yadav-Bhatnagar, N.; Finet, J.-P.; Khamsi, J. *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 3111.

Books with editor:

2. Doe, J. S.; Smith, J. J. In *Medicinal Chemistry*; Roe, P., Small, J. K., Eds.; Pergamon: Oxford, 1990; Vol. 1, pp 301–383.

Books without editor:

3. Doe, J. S.; Smith, J. J. *Bioorganic Chemistry*; Pergamon: Oxford, 1990, Chapter 6.

Theses:

4. Doe, J. S. Ph.D. Thesis, University of California at San Diego, January 2000.

Patent/Chem. Abstract:

5. Lyle, F. R. U.S. Patent 6,973,257, 1995; Chem. Abstr. 1995, 123, 2870.

Abstract of meeting papers:

6. Doe, J. S. Abstract of Papers, 195th National Meeting of the American Chemical Society, Anaheim, CA; American Chemical Society: Washington, DC, 1995; Abstract 3028.

Material presented orally:

7. Doe, J. S. Presented at the 195th National Meeting of the American Chemical Society, Anaheim, CA, March 1995; paper 205.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-Itwa/>.

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>.

Open data

This journal supports Open Data, enabling authors to submit any raw (unprocessed) research data with their article for open access publication on ScienceDirect under the CC BY license. For more information, please visit <http://www.elsevier.com/about/research-data/open-data>.

Mol files

Mol files (optional): Elsevier would like to enrich your online article by visualizing and providing details of chemical structures you define as the main chemical compounds described. For this purpose, corresponding mol files can be uploaded via the online submission system. Each compound needs to be submitted as a separate mol file. Please use your preferred drawing tool to export chemical structures as mol files and ensure that they are unique, complete and do not contain any R-groups or other variables so that a correct InChI key can be generated. For more information see <http://www.elsevier.com/mol>.

Interactive plots

This journal encourages you to include data and quantitative results as interactive plots with your publication. To make use of this feature, please include your data as a CSV (comma-separated values) file when you submit your manuscript. Please refer to <http://www.elsevier.com/interactiveplots> for further details and formatting instructions.

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.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. 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. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. 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](http://www.sciencedirect.com). 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/.
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>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>