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

ÉRIMA MARIA DE AMORIM

ESTUDO DA MUTAGENICIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS LIQUÊNICOS, UTILIZANDO O TESTE SMART E ENSAIO COMETA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

Vitória de Santo Antão
2016

ÉRIMA MARIA DE AMORIM

ESTUDO DA MUTAGENICIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS LIQUÊNICOS, UTILIZANDO O TESTE SMART E ENSAIO COMETA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Rohde

Vitória de Santo Antão

2016

Catalogação na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia Feliciano dos Santos, CRB4: 2005

A534e Amorim, Érima Maria de .
Estudo da mutagenicidade de metabólitos secundários liquênicos, utilizando o teste smart e ensaio cometa em células somáticas de Drosophila melanogaster./ Érima Maria de Amorim. - 2016.
Xiii, 53 folhas: il., graf., tab.

Orientador: Emerson Peter da Silva Falcão.
Co-orientador: Claudia Rohde.
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Nome do Curso ou do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Líquens. 2. Genotoxicidade. 3. Testes de Mutagenicidade. I. Falcão, Emerson Peter da Silva (Orientador). II. Rohde, Claudia (Co-orientador). III. Título.

579.7 CDD (23.ed.) **BIBCAV/UFPE- 56/2016**

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

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

Dissertação de Mestrado apresentada por **Érima Maria de Amorim** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "**ESTUDO DA MUTAGENICIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS LIQUÊNICOS, UTILIZANDO O TESTE SMART E ENSAIO COMETA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER***", orientada pelo Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão e coorientada pela Prof.ª Dr.ª Claudia Rohde, aprovada no dia 23 de fevereiro de 2016 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

_____
Dr.ª Noemia Pereira da Silva Santos
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

_____
Dr.ª Maria de Lourdes Lacerda Buril
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

_____
Dr.ª Mônica Cristina Barroso Martins
Departamento de Bioquímica – UFPE

Autora:

Érima Maria de Amorim

Dedico este trabalho a minha
família, especialmente aos meus pais Severino Joaquim de Amorim e Cícera Jesuína da Conceição, a minha irmã Erisbania Maria de Amorim pelo apoio e incentivo durante toda a minha caminhada, ao meu amor Jaziel Valério Florênço que com toda a paciência e amor esteve ao meu lado,
e ao meu cunhado Edilson Pessoa dos Santos (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos ao longo desta jornada, inspirar meus pensamentos, conter meus sentimentos, por estar sempre comigo, em todas as minhas decisões, angústias e alegrias. Por ter me mostrado o caminho e me dado forças para continuar quando tudo parecia perdido.

Aos meus pais Severino Joaquim de Amorim e Cícera Jesuína da Conceição que são a essência do que sou, obrigado por estarem sempre ao meu lado, apoiando as minhas decisões e torcendo por mim, mesmo que isso tenha sido ao custo da ausência do convívio familiar. Todas as palavras não seriam o suficiente para expressar todo o amor e gratidão que sinto.

As minhas amadas irmãs, meu cunhado Roberlan da Costa Borba e sobrinhos, que sempre me apoiaram e incentivaram meu crescimento profissional.

A minha irmã Erisbania Maria de Amorim meus agradecimentos especiais, não tenho palavras para descrever todo amor e gratidão que tenho, obrigado por estar comigo em todos os momentos, por partilhar comigo as tristezas, angustias e alegrias. Por acreditar em mim até mais do que eu, por me dar forças quando eu já não tinha.

Ao meu namorado, Jaziel Valério Florenço, todo o meu amor e gratidão por escutar as minhas angústias, por toda paciência, carinho e incentivo. Pelo o apoio e conselhos para minha vida profissional e pessoal.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, que me abriu as portas do laboratório mesmo sem conhecer de perto meu trabalho, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e compreensão das minhas limitações. Pela oportunidade e confiança na orientação e valorosas contribuições ao longo de todas as etapas do meu mestrado, pelo bom convívio ao longo desse tempo de pesquisa, pelo apoio e conselhos para minha vida profissional e pessoal, serei eternamente grata.

A minha coorientadora, Prof. Dra. Claudia Rohde, a quem tenho grande apreço, por abrir as portas do laboratório para mim desde a iniciação cientifica, pelo carinho que vai além das atividades acadêmicas, pelos valiosos ensinamentos, paciência e compreensão ao longo de todos esses anos. Pela oportunidade, confiança e o bom convívio, pelo companheirismo e dedicação na resolução dos problemas ao longo dos experimentos.

Aos companheiros do Laboratório de Genética CAV/UFPE Rita Coutinho, Geórgia Oliveira, Zilpa Melo, Paloma da Silva, Géssica Galdino e os demais

integrantes do grupo por todo carinho e companheirismo. Por todos tenho um imenso apreço e gratidão por toda ajuda despendida. Em especial ao grupo da Mutagênese aqui representados por: Cícero Verçosa, André Silva, Ícaro Castro, Jéssica Celerino, Robson Gomes e Samuel Lima, que estiveram sempre comigo me incentivando e apoiando. A vocês um agradecimento todo especial, pelo aprendizado em conjunto e partilha de momentos de grande desenvolvimento profissional e humanístico.

Ao meu colega de turma, de pesquisa e amigo André Severino da Silva todas as palavras do mundo não seriam suficientes para descrever toda admiração e gratidão que sinto, por todo apoio, incentivo, companheirismo, por partilhar comigo as tristezas, angustias e alegrias, por toda ajuda dispendida, por não medir esforços para me ajudar na minha vida profissional e pessoal, por abrir as portas de sua casa quando precisei. Você foi essencial para realização desse trabalho.

Ao colega e amigo José Wellinton da Silva por todo apoio, incentivo, força e companheirismo.

Aos colegas do grupo de pesquisa de Síntese e Isolamento Molecular, em especial as colegas, Aparecida Lira, Tamires Rocha e Cristiane Conceição pelo auxílio em diversas etapas do projeto.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana, agradeço pela contribuição na minha formação científica e profissional.

Aos colegas de turma, em especial à Alberico Queiroz Salgueiro de Souza, Thyara Noely Simões, Nivaldo Bernardo de Lima Junior e Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho agradeço a todos pelo magnífico convívio e pela constante construção do conhecimento em conjunto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS viii
LISTA DE TABELAS xv
LISTA DE SÍMBOLOS x
LISTA DE ABREVIATURAS xi
RESUMO xii
ABSTRACT xiii
CAPÍTULO 1 1
1.1 Introdução 1
1.2 Objetivos 3
1.2.1 Objetivo Geral 3
1.2.2. Objetivos Específicos 3
1.3 Revisão da Literatura 4
1.3.1 Os liquens 4
1.3.2 O fenômeno mutação e seus efeitos 8
1.3.3 Gênero *Drosophila* 10
1.3.4 Testes de mutagenicidade e genotoxicidade SMART e Ensaio Cometa 12
CAPÍTULO 2 15
Avaliação tóxico-genética e antigenotóxica da ação isolada e combinada do composto liquênico ácido úsnico em células somáticas de *Drosophila melanogaster* 15
2.1. Resumo 15
2.2. Introdução 16
2.3. Material e Métodos 17
2.4. Resultados e Discussão 20
2.5. Conclusões 26
2.6. Referências 26
2.7. Material Suplementar 29
CAPÍTULO 3 30
Estudo da genotoxicidade do metabólito secundário ácido divaricático isolado do líquen *Ramalina complanata* (Sw.) Ach em células somáticas de *Drosophila melanogaster* 30
3.1. Resumo 30
3.2. Introdução 31
3.3. Material e Métodos 32
3.4. Resultados e Discussão 36
3.5. Conclusões 41
3.6. Referências 41
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES 44
REFERÊNCIAS 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Diferentes tipos de liquens.....	5
Figura 1.2	Estrutura química do ácido úsnico.....	7
Figura 1.3	Estrutura química do ácido divaricático.....	8
Figura 1.4	Imagem da espécie *Ramalina aspera*.....	8
Figura 1.5	Fêmea de *Drosophila melanogaster*	11
Figura 1.6	Imagem dos tipo pelos *mwh* e *flr*^{3}	13
Figura 1.7	Nucleóides classificação visual baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. Imagens de nucleóides gerados a partir de leucócitos, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente.....	14
Figura 2.1	Número de adultos de *D. melanogaster* sobreviventes, submetidos ao teste SMART, após exposição ao composto ácido úsnico.....	21
Figura 2.2	Número de adultos de *D. melanogaster* sobreviventes, submetidos ao teste SMART, após exposição ao composto ácido úsnico associado a mitomicina.....	24
Figura 3.1	Cromatograma dos extratos da espécie *Ramalina complanata* e os seus Rf. **E**, **C e A** os extratos étereo, clorofórmico e acetônico respectivamente, **DP** o ácido divaricático purificado.....	36
Figura 3.2	Número médio de adultos sobreviventes de *D. melanogaster* submetidos ao teste SMART, após exposição ao composto ácido divaricático.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Resultados do potencial mutagênico do ácido úsnico, com diagnóstico estatístico pelo teste binomial e condicional (Kastembaum e Bowman,1970)..... 22

Tabela 2.2 Resultados do potencial antimutagênico do ácido úsnico associado a mitomicina, com diagnóstico estatístico pelo teste binomial e condicional (Kastembaum e Bowman, 1970)..... 24

Tabela 3.1 Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste binomial e condicional (Kastembaum e Bowman, 1970)..... 38

Tabela 3.2 Avaliação de dano genético em larvas da linhagem Oregon-de *Drosophila melanogaster* submetidas ao controle negativo, positivo e as diferentes concentrações do ácido divaricático..... 39

Tabela 3.3 Comparação do índice de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster* entre o controle negativo e as diferentes concentrações do ácido divaricático. Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste Bonferroni 40

Tabela 3.4 Comparação da frequência de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster* entre o controle negativo e a diferentes concentrações do ácido divaricático. Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste Bonferroni……..... 40

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
+	Mais
-	Menos
±	Mais ou menos
X	Vezes
(i)	Inconclusivo
(f^+)	Fraco positivo
(+)	Positivo
(-)	Negativo
°C	Grau Celsius

LISTA DE ABREVIATURAS

U.V	Ultravioleta
D.	*Drosophila*
SMART	Teste de Mutação e Recombinação Somática
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
mwh	*Multiple wing hairs*
flr^3	*Flare*
TR	Trans-heterozigoto
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético- do inglês - *Ethylenediamine Tetra-Acetic Acid*
DMSO	Dimetil Sulfóxido
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
DF%	Frequência de Dano- Do inglês - Damage frequency
DI	Índice de Dano- do inglês - Damage index
h	Hora
Rf	Fator de retenção
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
min	Minutos
mA	Miliampere
cm	Centímetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
NAOH	Hidróxido de Sódio
NACL	Cloreto de Sódio
ph	Potencial hidrogênio iônico
V	Volt
g	Grama
LM	Baixo Ponto de Fusão- do inglês- *Low Melting Point*

RESUMO

Liquens, organismos simbiontes notáveis, produzem metabólitos secundários amplamente citados por suas atividades biológicas. Entretanto, pouco se sabe a respeito do potencial tóxico ao DNA destes fenóis. Este trabalho avaliou o perfil mutagênico e genotóxico dos ácidos úsnico e divaricático, através do teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) e ensaio Cometa, utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo experimental. Organismos descendentes dos cruzamentos entre as linhagens de *D. melanogaster mwh* e *flr*^{3}, foram submetidos a diferentes concentrações do ácido úsnico (0,63, 1,26, 2,53, 5,05 e 10,11 mg/mL) e do ácido divaricático (0,32, 0,63, 1,26, 2,53, 5,05 e 10,11 mg/mL). Os resultados foram comparados com o controle positivo, mitomicina a 1,0 mg/mL e negativo, solventes de diluição. Os ensaios cometa foram realizados em hemócitos de *D. melanogaster,* linhagem Oregon-R. As células foram expostas às doses 0,63, 1,26, 2,53, 5,05 e 10,11 mg/mL do ácido úsnico e 0,32, 0,63, 1,26, 2,53 mg/mL do ácido divaricático. Os resultados foram comparados aos controles positivo de ciclofosfamida à 1mg/mL e negativo, mistura dos solventes. No ensaio de antigenotóxicidade foram utilizadas as mesmas concentrações de ácido úsnico acrescidas de mitomicina a 1mg/mL. Os resultados mostraram que as larvadas submetidas o ácido úsnico no teste SMART apresentaram uma sobrevivência superior a 70% dos indivíduos demonstrando, com níveis não significativos de genotoxicidade. Resultado semelhante ao ensaio Cometa. O ácido úsnico apresentou redução da mutagenicidade, em todas as concentrações quando associado à mitomicina, caracterizando efeito antigenotóxico. O ácido divaricático, no teste SMART, apresentou efeito tóxico nas concentrações 5,05 e 10,11 mg/mL e efeito genotóxico no ensaio cometa nas doses 0,32, 0,63, 1,26, 2,53.

Palavras- chave: fenóis liquênicos, genotoxicidade, antigenotoxicidade.

ABSTRACT

Lichens are notable symbiontic organisms. They can produce phenolic compounds widely described because its biological properties. However a little bit is known about the mutagenic and genotoxic potential of these molecules. This study evaluated the mutagenic and genotoxic profile of the usnic and divaricatic acids through the Somatic Mutation and Recombination test (SMART) and the comet assay using the *Drosophila melanogaster* as experimental model. Organisms descendants of the crossing between strains of D. melanogaster mwh and flr3 were submitted to different concentrations of usnic (0,63, 1,26, 2,53, 5,05 and 10,11 mg/mL) and divaricatic acid (0,32, 0,63, 1,26, 2,53, 5,05 and 10,11 mg/mL). The results were obtained by comparation with the positive and negative standards, mitomicine (1,0 mg/mL) and the dilution solvent respectively. The comet assay were realized using hemocites of *D. melanogaster* from the Oregon – R strain. The cells were exposed to the different concentrations of the usnic and divaricatic acids. The results were obtained byu comparation with the positive and negative standards, cyclophosphamide (1,0 mg/mL) and the dilution solvent. The antigenotoxicity assay used the same concentrations of the usnic acid with the addition of the mitomicyn (1,0 mg/mL). The results demonstrated that the larvae submitted to usnic acid exhibit a higher survival rate of 70%, with no significant levels of genotoxicity. The same result was observed to the comet assay. The usnic acid showed a significant reduction of the mutagenicity in all the tested concentrations with the addition of mitomicyn characterizing an antigenotoxic effect. The divaricatic acid in the SMART test showed a toxic effect at the concentrations of 5,05 and 10,11 mg/mL and a genotoxic effect ant the concentrations of 0,32, 0,63, 1,26, 2,53 mg/mL.

Key words: Lichenic phenolics, genotoxicity, antigenotoxicity.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A simbiose,é uma interação ecológica interespecífica, ou seja, acontece entre organismos de diferentes espécies, ocorrendo de forma obrigatória e harmoniosa, permitindo vantagens recíprocas para as espécies envolvidas (BOUCHER et al.,1982). Entre os exemplos mais notáveis envolvendo esta relação estão os liquens, que são originados a partir da associação entre fungos e algas ou cianobactérias. Os liquens produzem, através de suas rotas secundárias, compostos denominados substâncias liquênicas ou fenóis liquênicos. Estes compostos são agrupados em diversas famílias químicas, ácidos úsnicos, dibenzofuranos, depsídeos, depsidonas, lactonas, quinonas e derivados do ácido pulvínico (SHUKLA et al., 2011). Diversos destes são reconhecidos pelo seu potencial biológico, como o ácido úsnico, descrito como antimicrobiano (FALCÃO et al., 2004; COCCHIETTO et al., 2002; SEGATORE et al., 2012), anti-inflamatório (VIJAYAKUMAR et al., 2000), antineoplásico (MAYER et al., 2005; BRANDÃO et al., 2013), antioxidante (KOHLHARDT-FLOEHR et al., 2010; BEHERA et al., 2012), antiviral (SOKOLOV et al., 2012), moluscicida (MARTINS, 2013) e cicatrizante (BRUNO et al., 2013). Há, porém compostos que apesar de serem quimicamente bem conhecidos, não têm suas potencialidades biológicas devidamente descritas. Este é o caso do ácido divaricático, que pode atuar como agente protetor contra a radiação U.V. (GALLOWAY, 1993; FERNANDEZ et al.,1996) um dos agentes causadores do câncer de pele. Apesar do grande número de publicações, mesmo para o ácido úsnico, pouco se sabe a respeito da ação tóxica e ou mutagênica desses ácidos.

Outros metabólitos liquênicos também são conhecidos por suas propriedades farmacológicas e biológicas, citando-se desde a atividade anti-hipertensiva, antitumoral, antiviral, anti-inflamatória e antiparasitária (MAIA et al., 2002; RANKOVIC et al., 2011), dentre outras. Entretanto, poucos trabalhos trazem dados sólidos a respeito do mecanismo de ação dos diversos compostos, deixando uma grande lacuna no conhecimento sobre outros possíveis efeitos colaterais. Adiciona-se a isto a necessidade de se conhecer a

segurança relativa à cronicidade do uso, especialmente se existir alguma intenção de aplicação em farmacologia animal ou mesmo em humanos por um longo prazo.

Neste cenário, se faz relevante, entre outros, o estudo dos efeitos dos compostos liquênicos sobre o DNA e os cromossomos dos organismos, destacando o fenômeno de mutagênese que é caracterizado por qualquer alteração no DNA. Segundo Snustad e Simmons (2001), diversas patologias podem ser explicadas por mutações, pois grande parte destas alterações exerce efeito nos fenótipos, através de modificações nas cadeias polipeptídicas que resultam em alterações e/ou bloqueios das vias metabólicas, com consequências que podem até mesmo ser letais.

Devido ao fato dos organismos estarem constantemente expostos a agentes mutagênicos, diversos métodos são aplicados na identificação dos danos no material genético da célula, com destaque para o Teste de Mutação e Recombinação Somática (*SMART - Somatic Mutation and Recombination Test*), descrito por Graf et al. (1984); e o Ensaio Cometa, descrito por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Singh et al. (1988).

Em testes genotóxicos o modelo *Drosophila melanogaster* têm sido amplamente utilizado em decorrência da facilidade de manipulação laboratorial deste organismo (que tem um ciclo de vida rápido, com cerca de nove dias), a facilidade na detecção dos fenótipos e o grande conhecimento acumulado acerca de seu DNA, sequenciado há mais de uma década (POWELL, 1997; ADAMS et al., 2000; RAND, 2010).

Portanto, estudos que tragam informações a respeito dos efeitos que os fenóis liquênicos têm sobre o DNA e os cromossomos, podem certamente auxiliar no preenchimento das lacunas cientificas destes importantes compostos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de mutagenicidade *in vivo* dos metabólitos secundários liquênicos, ácido úsnico comercial e ácido divaricático purificado de *Ramalina complanata* no organismo modelo *Drosophila melanogaster.*

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Isolar e purificar o ácido divaricático, da espécie *Ramalina complanata*

2.Caracterizar, qualitativa e quantitativamente, o potencial mutagênico, e/ou recombinogênico de diferentes concentrações do ácido úsnico e do ácido divaricático, em células somáticas de larvas descendentes de adultos de cruzamentos específicos de *Drosophila melanogaster*, através da aplicação do teste SMART;

3. Avaliar o potencial genotóxico de diferentes concentrações do ácido úsnico e do ácido divaricático em células da hemolinfa de larvas de *Drosophila melanogaster*, utilizando a metodologia do Ensaio Cometa;

4. Avaliar o potencial efeito antimutagênico do ácido úsnico, em células somáticas de larvas de *Drosophila melanogaster*, através da aplicação do teste SMART, e estabelecer esta como uma nova metodologia para este tipo de investigação.

1.3 Revisão Bibliográfica

1.3.1 Os liquens

Os liquens constituem uma complexa estrutura simbiótica entre algas ou cianobactérias e fungos. O componente fúngico é chamado micobionte e na sua maioria pertencem ao filo Ascomycota, e em menor proporção, aos filos Basidiomycota e Deuteromycota. Já o componente fotossintetizante é denominado fotobionte, sendo constituído por algas unicelulares pertencentes às divisões Chlorophyta e Cyanophyta (CARRAZONI, 1983).

No entanto, alguns autores consideram essa associação como um parasitismo controlado (Purvis 2000; Will-Wolf et al. 2004) e, outros, como uma relação de parasitismo obrigatório devido, fotobionte ter seu tempo de reprodução e crescimento reduzidos pela presença do fungo, e pela dependência do fungo dos produtos resultantes da fotossíntese realizada pelo fotobionte.(FILHO; RIZZINI,1976)

Caracterizam-se como um grupo bastante diverso, apresentando uma quantidade de espécies que varia de 13.500 a 17.000 (VALENCIA; CEBALLOS, 2002). São de difícil posicionamento dentro dos sistemas de classificação de seres vivos devido a sua singular constituição. Mas mesmo assim, sua definição taxonômica leva em consideração o fungo liquênico, obedecendo ao Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Os liquens são classificados em crostosos que se apresentam intimamente ligados ao substrato pela medula e podem estar ou não bem delimitados no substrato, não há córtex inferior (Figura 1.1 A) (CARLILE et al., 2001). Foliosos (Figura 1.1B), apresentam camadas bem definidas, suas estruturas são formadas pelo córtex superior, que funciona como uma base de proteção, por uma camada de fotobionte, e pela medula, com hifas frouxamente organizadas e poucas algas encontradas dispersas entre as hifas, e por um estrato inferior denominada córtex inferior, que pode apresentar estruturas chamadas rizinas, que proporcionam a aderência do talo ao substrato (HALE 1979). Fruticosos (Figura 1.1C), assemelham-se a pequenos arbustos, podendo ser prostrado, ereto, pendente, com simetria radial; em corte transversal são cilíndricos e achatados (WEBSTER; WEBER, 2007). Esquamuloso (Figura 1.1D) é formado a partir de pequenos lóbulos ou escamas, possui a mesma estrutura do tipo folioso, no entanto, com ausência de rizinas no córtex inferior. E está fixado no substrato através de uma porção central do córtex inferior e como dimórficos

(Figura 1.1E) apresenta dois tipos de talos até chegar à forma madura, combinando-se entre os tipos crostoso-fruticoso ou esquamuloso-fruticoso (BRODO,2001).

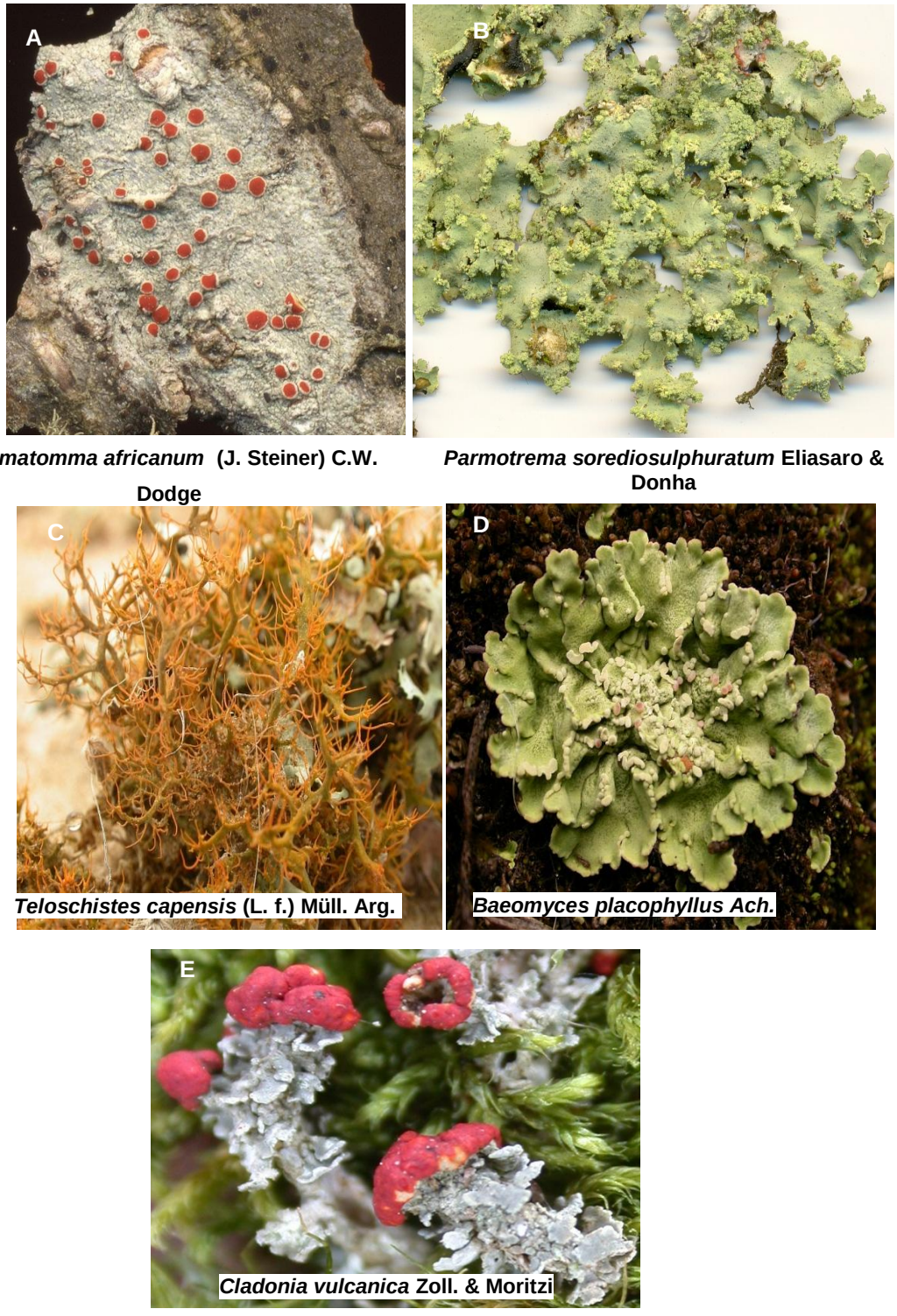


Figura 1.1 Diferentes tipos de liquens. A. crostoso, B. folioso, C. fruticoso, D. escamuloso e E. dimórfico. Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em 16.12.2015.

Estão amplamente distribuídos desde as regiões polares às tropicais e das planícies às montanhas mais altas. Crescem em ambientes de muita luminosidade, áridos ou em temperaturas extremas, desfavoráveis para plantas superiores (NASH, 2008).

Os liquens produzem várias substâncias que são divididas em dois grupos: substâncias do metabolismo primário e substâncias do metabolismo secundário, que são os principais responsáveis por suas propriedades e ações farmacológicas (NASH, 2008). As primeiras têm funções estruturais e atuam no metabolismo celular, sendo encontradas também em outros organismos vegetais como produtos resultantes da atividade fotossintética. São aminoácidos, enzimas, pigmentos, poliálcoois, vitaminas e polissacarídeos. Já os produtos extracelulares, denominados substâncias especiais do metabolismo secundário, também designadas como ácidos ou fenóis liquênicos, são encontrados na medula ou no córtex dos liquens, e raramente em ambas as camadas (PODTEROB, 2008). A origem biossintética dessas substâncias pode ocorrer através das vias metabólicas do acetato-polimalonato, onde é sintetizada a maioria das substâncias típicas, como quinonas, depsídeos, depsidonas, ácidos úsnicos e ácidos graxos; a via do ácido mevalônico, onde ocorre a formação dos terpenoides e esteróis; a via do ácido chiquímico, que origina muitos dos pigmentos amarelos (HALE,1983) e a via dos carboidratos, que produz os sacarídeos e polióis, produtos da redução de açúcares (Xavier-Fillho,1989) .Ao todo são conhecidos aproximadamente 1.050 compostos provenientes do metabolismo secundário de liquens (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008).

Os liquens constituem, assim, importantes fontes de novas moléculas bioativas, através do uso direto de seus metabólitos secundários, ou empregando-se compostos derivados, produzidos no intuito de aumentar a efetividade e a absorção, ou diminuir a toxicidade (CRAGG; NEWMAN, 2005).

As substâncias isoladas dos liquens têm apresentado diversas atividades biológicas como de fotoproteção, antiviral, antibacteriana, antiherbivoria, antioxidante, antipirética, de ação analgésica (MOLNÁR; FARKAS, 2010), e como fontes promissoras de drogas antitumorais (BOUSTIE et al., 2011). Das numerosas substâncias liquênicas isoladas podem ser mencionadas o ácido fumarprotocetrárico, que apresenta atividade expectorante e antioxidante (ALVES et al., 2014); o ácido lecanórico, que se comporta como antioxidante e também tem ação contra bactérias Gram-positivas (GAIKWAD et al., 2014); o ácido salazínico, que possui atividades citotóxicas (MICHELETTI et al., 2009) e antimicrobianas (FALCÃO et al., 2004); e os ácidos úsnico e divaricático, que são amplamente estudados quanto as suas propriedades farmacológicas (BOGO, 2012). Estes dois últimos compostos

são classificados como dibenzofuranos e depsídeos, embora alguns autores considerem o ácido úsnico como protótipo de uma classe distinta dos derivados do próprio ácido úsnico, por apresentar um carbono assimétrico em seu anel furano (HONDA; VILEGAS, 1998).

O ácido úsnico

Através da ciclização do tipo floroglucinol forma-se o ácido úsnico, um dos mais importantes metabólitos liquênicos, produzido por diversos gêneros dentre eles *Cladonia* (*Cladoniacea), Lecanora* (Lecanoraceae), *Usnea* (Usneaceae), *Parmelia* (Parmeliaceae) e *Ramalina* (Ramalinaceae) (INGLÓLFSDÓTTIR, 2002).

O ácido úsnico (Figura 1.2), caracteriza-se por ser é uma substância de origem natural produzida a partir do metabolismo secundário de liquens de pigmentação amarelada (MÜLLER, 2001; COCCHIETTO et al., 2002). O composto tem baixa solubilidade em água e existe em duas formas enantioméricas na natureza: ácido úsnico (-) e (+) (INGÓLFSDÓTTIR, 2002, COCCHIETTO et al., 2002).

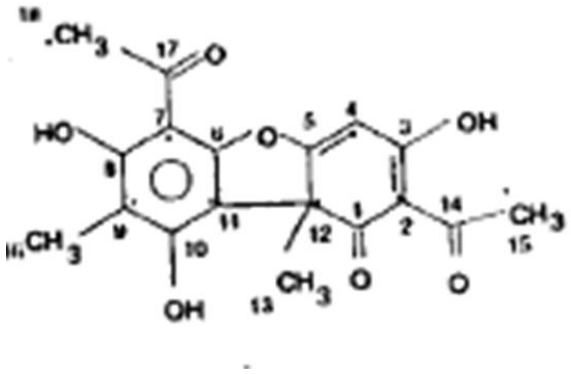


Figura 1.2 Estrutura química do ácido úsnico.(HONDA,1998)

A literatura descreve atividades biológicas do ácido úsnico desde o seu isolamento, como agente tuberculostático quando associado à estreptomicina, eficaz sobre cepas de micobactérias resistentes à penicilina (BENZINGER et al., 1960). Sua associação medicamentosa com a estreptomicina foi favorável no combate à tuberculose *in vivo* (VARTIA; TERVILÄ, 1952). Pätiälä e Pätiälä (1954) demostraram em numerosos testes *in vitro* e *in vivo* que o ácido úsnico possui um efeito bacteriostático contra o bacilo da tuberculose, além de ser o provável responsável pela diminuição e, em certos casos, até o desaparecimento de determinados sintomas de pacientes humanos com tuberculose anal,

tratados com esta substância (BENZINGER et al., 1960). Desde então os estudos sobre as atividades biológicas foram tomando espaço, demonstrando relevantes resultados sobre as ações farmacológicas do ácido úsnico, tais como: atividade anti-inflamatória (VIJAYAKUMAR et al., 2000), antibiótica (COCCHIETTO et al., 2002; SEGATORE et al., 2012), antineoplásica (RIBEIRO-COSTA et al., 2004; MAYER et al., 2005; SANTOS et al., 2006; BRANDÃO et al., 2013), antioxidante (KOHLHARDT-FLOEHR et al., 2010; BEHERA; MAHADIK; MOREY, 2012), antiviral (SOKOLOV et al., 2012), moluscicida (MARTINS, 2013) e cicatrizante (BRUNO et al., 2013).

O acido divaricático

O ácido divaricático é um metabólito secundário de composição fenólica (Figura 1.3), isolado a partir de extratos orgânicos de *Ramalina complanata* (Figura 1.4) com atividades antimicrobianas. Este pode atuar como agente protetor contra a radiação U.V., um dos agentes causadores do câncer de pele (GALLOWAY, 1993; FERNANDEZ et al.,1996).

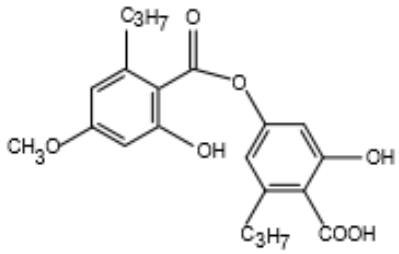


Figura 1.3 Estrutura química do ácido divaricático.(HONDA,1998)

Figura 1.4 Imagem da espécie *Ramalina complanata* (CNALH, 2015. Acesso em 03.12.2015).

1.3.2 O fenômeno mutação e seus efeitos

O fenômeno mutação refere-se a qualquer alteração na sequência do DNA, sendo considerada fonte primária de variabilidade nos processos evolutivos, que proporciona novas combinações genéticas e assim, permite uma adaptação dos organismos às mudanças do meio ambiente. A transmissão desse evento genético para os descendentes poderá ocorrer apenas se a linhagem celular envolvida for uma célula germinativa (SNUSTAD; SIMONS, 2001)

Entre os tipos de mutação estão as mutação pontuais, que afetam um único par de bases do DNA ou um pequeno número de pares de bases adjacentes. As modificações causadas pelas mutações pontuais podem ser provocadas por substituição, inserção ou deleção de bases (GRIFFITHS et al., 2009). Há ainda as mutações classificadas como espontâneas, que têm origem em erros na replicação do DNA e podem acontecer naturalmente, provocadas por lesões, por inserção de elementos transponíveis ou por alterações tautoméricas (BROWN, 1999) e outras. A ocorrência de eventos mutacionais pode ser aumentada pela exposição do organismo a agentes mutagênicos, a chamada mutação induzida. O potencial ou eficiência desses agentes é avaliado pelo incremento da frequência de mutações em relação ao nível basal, quando se analisa um organismo a ele exposto (SIVIERO; MACHADO-SANTELLI, 2008).

Na maioria das vezes, as mutações, exercem um efeito negativo no fenótipo, podendo determinar a perda do controle do ciclo celular e o aparecimento de tumores e aberrações (SNUSTAD; SIMMONS, 2001). O câncer é definido por processos patológicos que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, e que pode espalhar-se para outras regiões do corpo. Neste caso, as células dividem-se rapidamente e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INCA, 2011). O câncer está intimamente ligado à mutagênese, que é uma consequência do dano genético, e pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (RIBEIRO et al., 2003). O DNA é a unidade de herança e qualquer alteração em sua estrutura (mutação e translocação) em células germinais pode ser transmitido à geração seguinte, causando baixa viabilidade, baixa fertilidade, baixo sucesso reprodutivo e teratogenicidade (BICKHAM et al. 2000; YAUK et al., 2000; MAES et al., 2005; MEDINA et al., 2007; GARDESTRÖM et al., 2008).

Segundo Sanseverino et al. (2005), o desenvolvimento de malformações e suas manifestações no desenvolvimento anormal do feto aumentam à medida que se incrementa

a dose do agente tóxico, variando desde nenhum efeito, passando pelos danos funcionais e malformações, até a morte do embrião. A interferência no desenvolvimento embrionário pela ação do teratógeno depende de diversos fatores, dentre eles destacam-se, a concentração e o mecanismo específico do teratógeno e o período de exposição do embrião (SANSEVERINO et al., 2005).

A maioria das mutações é induzida por agentes mutagênicos e todos os seres vivos estão expostos permanentemente a substâncias mutagênicas (MOUSTACCHI, 2000). Dentre estes estão os metabólitos secundários de organismos vegetais, pois eles podem apresentar tanto efeitos benéficos, como maléficos, como no caso dos efeitos tóxicos (SIMÕES et al., 2004; TUROLLA et al., 2006). Vários organismos vegetais possuem constituintes que podem ser tóxicos, como os alcalóides, ácido nítrico, ácido oxálico, flavonóides, furocumarinas, hidrazinas e as quinonas (CHITTURI; FARREL, 2000).

Desta forma compostos que apresentem potencialidades biológicas precisam ser sempre avaliados com relação às suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas. Cada composto descoberto necessita de testes de genotoxicidade e estudos detalhados sobre a sua composição química e perfil toxicológico, pois tais fatores interferem no processo de multiplicação celular e algumas substâncias modificam a estrutura de genes específicos ou contribuem para o surgimento de mutações. Assim, é muito importante aplicar variados testes de genotoxicidade para o rastreamento de possíveis agentes genotóxicos (CUNHA; NEPUCENO, 2011) e também desenvolver e aprimorar novas metodologias e/ou novos organismos de estudo.

Estes estudos podem ser realizados mediante testes *in vivo* e *in vitro* bem padronizados que usam diferentes sistemas biológicos, que têm como objetivo caracterizar o perigo de ocorrência de mutação no material genético e, consequentemente, a transmissão destas mutações. A finalidade dos testes, na maioria das vezes, é prever o desenvolvimento de neoplasias (SIVIERO; MACHADO-SANTELLI, 2008).

1.3.3 Gênero *Drosophila*

O gênero *Drosophila* é o de maior número de espécies dentro da família Drosophilidae (Insecta, Diptera), que é composta por 75 gêneros e mais de 4.177 espécies descritas, com ocorrência em diversos ecossistemas do mundo (BÄCHLI, 2014). Moscas da família Drosophilidae são consideradas excelentes organismos para estudos biológicos pelo fato de ser um modelo experimental com características genéticas conhecidas que possibilita o estudo de mutações pontuais, deleções, translocações, perda cromossômica e

não disjunção. Este grupo tem sido muito estudado especialmente na área da genética (POWELL, 1997), sendo a espécie *Drosophila melanogaster* a mais conhecida e estudada.

Drosophila melanogaster (Figura 1.5) conhecida popularmente como mosca-da-banana ou mosca-do-vinagre, é utilizada há mais de 100 anos em pesquisas genéticas, em diversas áreas. Os primeiros estudos usando este modelo foram realizados pelo geneticista norte-americano Thomas Hunt Morgan no ano de 1910 sobre a teoria cromossômica e hereditariedade. No Brasil as primeiras publicações sobre genética com *Drosophila* datam por volta de 1943 (ROCHA et al., 2013) e desde então, estes organismos se tornaram elementos essenciais das pesquisas em genética, sendo utilizados em vários testes, até mesmo em estudo de patologias humanas, sendo considerados exemplos de organismos alternativos ao uso de mamíferos em pesquisas científicas (SIDDIQUE et al., 2010, DOKE; DHAWALE, 2015). São usados em diversos estudos tais como: estudos da toxicidade de praguicidas (NARCISO; NAKAGAWA, 2009), bioindicador na avaliação da letalidade de extrato de *Nicotiana tabacum* (MORATORE et al., 2009), como avaliador do efeito tóxico-genético do própolis em suas células somáticas (OLIVEIRA et al., 2007), para avaliação tóxico-genética de organismos de origem vegetal como o suco da fruta noni (*Morinda citrifolia*) (FRANCHI et al., 2008), entre tantos outros trabalhos.

Figura 1.5 Fêmea de *Drosophila melanogaster*. **Fonte:** Rocha, L.D.L.S., Laboratório de Mutagênese – ICB/UFG, 2012.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa tem também contribuído com esta linha de pesquisa com a avaliação do efeito tóxico-genético dos larvicidas dilapiol e espinosade com o teste SMART de asa de Drosophila (ACIOLE et al., 2014); e na avaliação da genotoxicidade ambiental associada à radiação natural em Lajes Pintadas/RN (VERÇOSA, 2015) e poluição urbana na cidade de Vitória de Santo Antão/PE (SANTANA, 2015), pela técnica de detecção de dano genético por meio do Ensaio Cometa.

Devido às diversas vantagens que esse organismo oferece, como o pequeno tamanho, fácil cultivo, tempo de geração curto, em aproximadamente nove dias, elevado número de progênie, pequena quantidade de cromossomos e sua capacidade de

metabolizar compostos (GRAF; SINGER, 1992; GRAF et al., 1996), drosofilídeos têm se tornado excelentes organismos modelo nos estudos na área da mutagênese (revisão em GAIVÃO et al., 2014).

1.3.4 Testes de mutagenicidade e genotoxicidade SMART e ENSAIO COMETA

Entre as metodologias utilizadas para o estudo do potencial mutagênico e recombinogênico de compostos químicos de origem sintética ou natural estão o Teste de Mutação e Recombinação Somática – SMART, descrito por Graf et al. (1984), e o Ensaio Cometa descrito por Ostling e Johanson(1984) e modificada por Singh et al. (1988), também conhecido como eletroforese de célula única.

O teste SMART é capaz de detectar mecanismos que levam à perda da heterozigose. Estudos sobre os eventos genéticos relacionados com o desenvolvimento de tumores, por exemplo, demonstram a importância da perda da heterozigose. Essa perda se dá por eventos genéticos que levam à homozigose ou hemizigose das células filhas (ANDRADE e LEHMANN, 2003). O teste SMART se revela através de fenótipos de genes marcadores, identificados nas asas de adultos de *D. melanogaster*, que representam a expressão fenotípica da ocorrência de mutação (gênica ou cromossômica) e/ou recombinação. É, portanto, um método que utiliza células somáticas e pode ser feito em uma só geração. Pode ser utilizado em um amplo espectro de agentes genotóxicos de diferentes classes químicas, misturas complexas e também partículas gasosas.

O teste SMART fundamenta-se na premissa de que, durante o desenvolvimento embrionário da larva de *Drosophila*, grupos de células (os discos imaginais das asas) proliferam mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose entre a fase larval e adulta, em estruturas que originam as asas da mosca. Uma vez que estas células sofram danos no DNA, estes irão se traduzir em uma mutação fenotípica visível nas células das asas do indivíduo adulto (GRAF et al., 1984; ANDRADE e LEHMANN, 2003). Considera-se para tal, dois genes marcadores para a forma dos pelos das asas: pelos múltiplos (*mwh*) e pelos cujo formato lembra uma "chama de vela", chamado *flare* (*flr*^{3}) (Figura 1.6), baseando-se na indução de alterações genéticas que originam a perda de heterozigose em células larvais, que são heterozigotas para estes dois genes recessivos (GRAF et al., 1984; ANDRADE e LEHMANN, 2003). Ocorrendo uma alteração genética em uma das células que estão se dividindo por mitose, é formado um clone de células mutantes que pode ser detectado fenotipicamente como uma mancha mutante na superfície das asas dos adultos. A análise das mutações induzidas pelo tratamento é feita pela observação de

grupos de células que expressam os genes marcadores *flr*^{3} e *mwh*, responsáveis por mudanças na forma dos pelos ou tricomas das asas (GRAF et al., 1984).

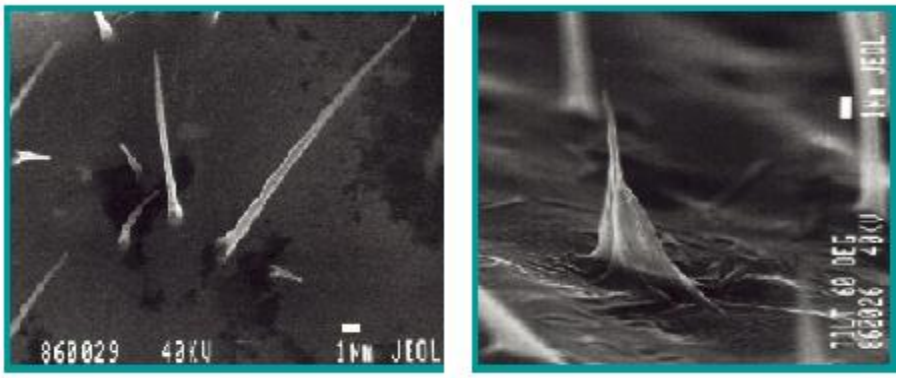


Figura 1.6 Pelo *mwh* (à esquerda) e pelo *flr*^{3} (à direita). Fonte: Andrade e Lehmann (2003).

O Ensaio Cometa, por outro lado, consiste na detecção de lesões genômicas (como quebras simples, duplas, sítios lábeis alcalinos) que podem resultar em mutações se o sistema de reparo não solucionar o problema (SILVA, 2007; SILVA, 2012). Essa metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão (SILVA, 2007). Este teste permite a ruptura das membranas celulares e que o DNA ligue-se à matriz celular, formando um nucleóide. As células lesadas são identificadas visualmente, após um processo de eletroforese e coloração fluorescente, pela formação de uma cauda, similar a de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA migrados. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos (Figura 1.7), e podem estar associados ao núcleo por uma cadeia simples. O tamanho da cauda é considerado proporcional à dimensão do dano que foi causado no DNA, podendo ser do tipo quebras de fita simples, quebras duplas, e lesões álcali-lábeis (SILVA, 2007). O Ensaio Cometa tem se mostrado como um método sensível para a detecção de danos genéticos induzidos por diferentes agentes genotóxicos (GUILLAMET et al., 2004), que é capaz de revelar genotoxicidade, sendo uma das ferramentas mais comuns na investigação de danos ao DNA e reparo, em diferentes tipos celulares.

O teste SMART é amplamente realizado com o organismo *Drosophila melanogaster* e numerosos trabalhos já foram publicados, entre eles estudo do larvicida natural dilapiol e do metabólito secundário bacteriano, o espinosade (ACIOLE et al., 2014). Já o Ensaio Cometa tem sido muito utilizado para estudo de mamíferos (MÜLLER et al., 2004; RIBEIRO et al., 2009), peixes (AHMED et al., 2011; VICARI et al., 2012), répteis (CARBACAS-

MONTALVO et al., 2012), moluscos (RIGONATO et al., 2010) e alguns artrópodes (GOUVEIA et al., 2005).

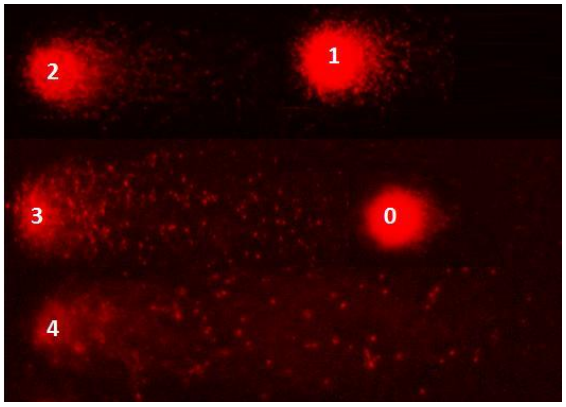


Figura 1.7 Nucleóides classificação visual baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. Imagens de nucleóides gerados a partir de leucócitos, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente. Fonte: SILVA (2012).

O organismo modelo *D. melanogaster* têm sido amplamente utilizada no ensaio cometa para se conhecer o efeito genotóxico de inseticidas (MUKHOPADHYAY et al., 2004), para avaliar o potencial tóxico-genético de compostos do chumbo (CARMONA et al., 2011), compostos indutores do estresse oxidativo (SHUKLA et al., 2011), compostos químicos reconhecidos como mutagênicos em outros animais (SHARMA et al., 2011; MISHRA et al., 2014), estudo de nanopartículas (CARMONA et al., 2015) e até mesmo na avaliação da genotoxicidade ambiental associada a radiação natural (VERÇOSA, 2015) e efeitos da poluição urbana (VERÇOSA, 2015; SANTANA, 2015).

Recentemente os estudos têm utilizado cada vez mais a espécie *D. melanogaster* como organismo experimental na mutagênese (RAND, 2010, GAIVÃO et al., 2014). A espécie tem sido estudada por décadas como organismo modelo nos estudos sobre a genética da transmissão dos caracteres hereditários, ligação cromossômica, efeitos da radiação, interação gênica, aberrações cromossômicas e mudanças evolutivas em populações (FREIRE-MAIA; PAVAN, 1949; POWELL, 1997). Como grande vantagem de seu uso na mutagênese está o fato dela ser um modelo alternativo e recomendado para minimizar o número de mamíferos, como ratos e camundongos, em testes toxicológicos. O uso de *Drosophila* seria uma solução esperada aos impasses envolvendo questões da bioética com pequenos mamíferos (SIDDIQUE et al., 2005).

CAPÍTULO 2

Artigo 1

A ser submetido à revista **Phytochemistry**

A1 em Ciências Biológicas I, Fator de Impacto: 2,547

Avaliação tóxico-genética e antigenotóxica da ação isolada e combinada do ácido úsnico em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Érima Maria de Amorim[1,2,3], André Severino da Silva[2,3], Ícaro Fillipe de Araújo Castro[2], Cícero Jorge Verçosa[2], Kenya Silva Cunha, Emerson Peter da Silva Falcão[3], Claudia Rohde[2*]

[1]Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil, [2]Laboratório de Genética, CAV-UFPE, [3]Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular - SIM, CAV-UFPE.

*** Autor para correspondência.**
Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bairro Bela Vista, CEP 51608-680, Vitoria de Santo Antão, Pernambuco, Brazil, Telefone: #55.81.35233351. E-mail claudia.rohde@yahoo.com.br

2.1 RESUMO

Os liquens são organismos resultantes da associação simbiótica entre fungos e algas. Eles produzem diversos metabólitos secundários, dentre eles destaca-se o ácido úsnico, que é descrito na literatura por suas propriedades anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, antioxidante. Diante das diversas ações farmacológicas do ácido úsnico, este trabalho avaliou o efeito genotóxico e antigenotóxico do ácido úsnico em células somáticas de *Drosophila melanogaster* através do Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) de asa e o Ensaio Cometa com hemócitos de larvas deste drosofilídeo. Após terem sido realizados cruzamentos entre duas linhagens de *D. melanogaster* geneticamente estabelecidas para o teste SMART (*mwh* e *flr*^{3}) os organismos descendentes

foram submetidos a diferentes concentrações (0,63, 1,26, 2,53, 5,05 e 10,11 mg/mL) do composto no tratamento genotóxico. Doses de 0,32, 0,63, 1,26, 2,53, 5,05 e 10,11 mg/mL do fenol associadas à mitomicina (1mg/mL) foram utilizadas no teste antimutagênico. Para o Ensaio Cometa foram utilizados descendentes de *D. melanogaster* da linhagem Oregon-R. As concentrações testadas foram 0,32, 0,63, 1,26, 2,53, 5,05 e 10,11 mg/mL. Também foram estabelecidos um controle positivo (mitomicina a 1mg/mL para o SMART e ciclofosfamida à 1mg/mL no Ensaio Cometa), e um controle negativo (com a mistura dos solventes, água destilada, tween 80 e etanol, nos dois testes). Nos resultados do teste SMART houve sobrevivência superior a 70% dos indivíduos demonstrando ausência de efeito tóxico com níveis não significativos de genotoxicidade nas células somáticas tratadas. Da mesma forma não houve efeito genotóxico avaliado pelo Ensaio Cometa, nas condições experimentais aplicadas. No entanto o composto ácido úsnico apresentou redução significativa da taxa de mutação em todas as concentrações quando associado à mitomicina, demonstrando sua ação antigenotóxica.

Palavras-chave: Fenol liquênico, genoproteção, Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART), Ensaio Cometa.

2.2 INTRODUÇÃO

Os liquens são formados a partir de uma associação simbiótica entre algas ou cianobactérias e fungos (RAVEN,EVERT, EICHHORN 2007). Eles produzem, através de suas rotas secundárias, diversos compostos denominados substâncias liquênicas (FALCÃO et al.,2004). Dentre eles destaca-se o ácido úsnico considerado um dos mais importantes metabolitos liquênicos biologicamente ativo (MULLER, 2001) que pode ser encontrado em diversos gêneros de liquens tais como: *Usnea* (Usneaceae), *Cladonia* (Cladoniaceae), *Parmelia* (Parmeliaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae) e *Ramalina* (Ramalinaceae) (INGLÓLFSDÓTTIR, 2002).

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3-(2H,9α/βH)-dibenzofurano; [$C_{18}H_{16}O_7$] é uma substância de pigmentação amarelada e de baixa solubilidade em água. Pode ocorrer na natureza em duas formas enantioméricas (-) e (+) (INGÓLFSDÓTTIR, 2002, COCCHIETTO et al., 2002). Sua estrutura química consta de uma unidade aromática dihidroxilada, de caráter fenólico (anel A), na qual se ligada uma função cetônica e um grupo metila.

O composto possui diversas atividades biológicas dentre elas: anti-inflamatória (VIJAYAKUMAR et al., 2000), antibiótica (COCCHIETTO et al., 2002; SEGATORE et al., 2012), antineoplásica (RIBEIRO-COSTA et al., 2004; BRISDELLI et al., 2013), antiviral (SOKOLOV et al., 2012) e antioxidante (KOHLHARDT-FLOEHR et al., 2010, BEHERA; MAHADIK; MOREY, 2012).

Em vista do enorme potencial do ácido úsnico, o objetivo do presente estudo foi avaliar o eventual potencial genotóxico e antigenotóxico deste composto em células somáticas de *Drosophila melanogaster* por meio do teste de mutação e recombinação somática (SMART) e Ensaio Cometa.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado utilizando o ácido úsnico (+)- [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3-(2H,9bH)-dibenzofurano; $C_{18}H_{16}O_7$], com peso molecular 344.32 e 98% de pureza (Sigma- Aldrich).

Teste de Mutação e Recombinação Somática - SMART

O teste SMART foi realizado com larvas oriundas do cruzamento de fêmeas *flr*^{3} (flare) virgens e machos *mwh* (pelos múltiplos) de *D. melanogaster,* obtendo-se larvas descendentes com duas constituições genotípicas: (i) *mwh*+/+*flr3* (trans-heterozigotas-TR) e (ii) *mwh*+/TM3,BdS (heterozigotas-TM3) (FREI et al., 1992). As fêmeas envolvidas no cruzamento permaneceram por 8 h em frascos de vidro a fim de ovopositar sobre uma camada de fermento pastoso (Fleischman e Royal Ltda) suplementado com sacarose, previamente montado sobre uma base sólida de ágar. Cerca de 100 larvas descendentes com 72h ± 4 horas de vida (3° estágio) foram coletadas e transferidas para tubos plásticos descartáveis contendo meio de cultivo composto por 1,5 g de purê de batatas instantâneo (YOKI S.A.) previamente hidratado com 3 mL das diferentes concentrações do ácido úsnico (0,63, 1,26, 2,53, 5,05 e 10,11 mg/mL) dissolvidos em uma solução mãe inicial de 18 mL composta de 5% de Tween 80, 5% de Etanol e 90% de água destilada. O grupo controle negativo se consistiu de larvas crescidas no meio hidratado apenas com a solução solvente, enquanto que o grupo controle positivo cresceu em meio hidratado com mitomicina (1mg/mL) diluída no solvente.

A fim de testar o potencial antimutagênico do composto, foi realizada uma bateria de co-tratamentos do ácido úsnico, nas diferentes concentrações (0,63, 1,26, 2,53, 5,05 e 10,11

mg/mL) com a mitomicina a 1 mg/mL. Foi escolhido o tratamento denominado crônico, que mistura os dois compostos, cada um na sua diluição específica, de forma que as mesmas diluições dos compostos tenham também a mitomicina a 1 mg/mL. Ambos os experimentos o ácido isolado e o ácido úsnico + a mitomicina foram realizados em duplicata. As larvas se alimentaram nas soluções preparadas até a vida adulta. Após a eclosão, os adultos sobreviventes foram coletados e contados para o estabelecimento da curva de sobrevivência, sendo todos estocados em tubos com etanol a 70% para a montagem e análise dos fenótipos das asas. Neste caso, os pares de asas foram destacados do corpo de machos e fêmeas submetidos aos tratamentos e montados sobre lâminas de vidro, seguindo a descrição de (GRAF et al.,1984; ANDRADE et al., 2003).

As lâminas com as preparações das asas foram analisadas no microscópio óptico (Medlux) com objetiva de 40x. Os testes estatísticos se basearam na comparação das frequências de manchas mutantes por individuo em cada concentração testada com a frequência das manchas dos indivíduos do controle negativo para o teste mutagênico, para o teste antimutagênico foi realizada a comparação das frequências de manchas mutantes por individuo em cada concentração testada com a frequência das manchas dos indivíduos do controle positivo através do teste condicional binomial de Kastembaum e Bowman (1970). O nível de significância dos resultados foi avaliada segundo Frei e Würgler (1988), que apresenta quatro diagnósticos diferentes: positivo (+), fraco positivo (f+), negativo (-) e inconclusivo (i). O potencial genotóxico foi definido pela regra de que a identificação da toxicidade genética requer que o total de manchas mutantes duas vezes maior no tratamento do que no controle, sem que ocorra, uma relação clara entre dose-resposta (CUNHA et al.,2001; TIBURI et al.,2002).

Ensaio Cometa

Tratamento das larvas de Drosophila melanogaster

Para o ensaio cometa foram usadas larvas com 72h ± 4 horas de vida (3° estágio) de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R. O experimento foi realizado em triplicata, foram selecionadas 60 larvas para cada uma das replicas de cada concentração e transferidas para o meio de tratamento composto por purê de batata desidratado, acrescido do composto na diluição desejada 0,32,0,63, 1,26 , 2,53,5,05 e 10,11mg/mL. Da mesma forma que no teste SMART, o meio consistiu de 0.9 g de purê de batata seco (marca Yoki) hidratado com 3 mL de cada uma das concentrações testadas. Também foi estabelecido um grupo controle negativo (tratado apenas com os solventes Tween 80, etanol e água

destilada) e um grupo controle positivo tratado com 3 mL da droga Ciclofosfamida a 1 mg/mL, diluída em água destilada, seguindo as recomendações estabelecidas por Sharma et al. (2011). Após as 24 horas de contato das larvas com os compostos iniciou-se o Ensaio Cometa seguindo as orientações de Verçosa (2015).

Extração da hemolinfa

A extração dos hemócitos foi realizada a partir da hemolinfa de 60 indivíduos, que constituíram uma réplica do experimento. No total, foram estabelecidas três réplicas para cada tratamento, ou seja, foram avaliados hemócitos obtidos de 180 larvas. Foi retirada a hemolinfa de cada uma das 60 larvas de cada réplica. As larvas, foram resfriadas a 4º C por 1 min para a diminuição metabólica, seguido do resfriamento, as larvas foram postas, em solução de EDTA e foi realizado um corte lateral na cutícula de cada indivíduo para a saída da hemolinfa.

Montagem das lâminas, tratamento e eletroforese

As lâminas de vidro previamente lixadas e banhadas com solução 1,5 % de agarose padrão foram montadas com uma camada de 60 µL de suspensão celular (hemócitos de larvas), homogeneizado em 100 µL de solução de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM) a 37ºC. Esta etapa foi realizada na ausência da luz. O homogeneizado foi aplicado na lâmina e sobre o material foi colocada uma lamínula. As lâminas foram submetidas a 4ºC por 10 min, após esse tempo as lamínulas foram retiradas e as lâminas com o material biológico foram submersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 10 mM Tris; 1% Triton X-100 e 10% DMSO) ajustada para pH 10, e mantidas a 4ºC por 72 h. Ao término do período de lise celular, as lâminas foram submetidas a uma solução tampão a 4ºC (1M NaOH; 200 mM EDTA, pH > 13) por um período de 20 min. Logo após, foi realizada a corrida eletroforética por 20 min a 40 V/cm e 300 mA. Após a corrida, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min e seguida foram submetidas à fixação, em etanol absoluto por 5 min, secas ao ar e armazenadas a 4ºC até o momento da análise microscópica.

Análises microscópicas

Para a análise microscópica, as lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRedTM, diluído em água deionizada na proporção de 1:500 e visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com objetiva de 40X e filtro Alexa Fluor 546 utilizando o programa de captura de imagens foi o Axiovision versão 4.8.2.0. A análise

consistiu na observação de 100 nucleóides, sendo 50 por lâmina, de cada uma das três réplicas de cada tratamento (total de 300 nucleóides analisados em cada tratamento). Após a corrida eletroforética os nucleóides (na forma de cometas) foram classificados de zero a quatro (0 a 4), dependendo das suas características, seguindo os parâmetros visuais definidos por (COLLINS et al.,2008). A **classe 0** compreendeu os cometas considerados intactos, ou seja, sem danos causados pelo contato com os compostos testados; a **classe 1** correspondeu os cometas com danos mínimos; **classe 2** os cometas com danos médios; a **classe 3** os cometas com danos intensos; e a **classe 4** correspondeu os cometas com danos máximos.

Testes estatísticos

Para avaliar os cometas contabilizados foram utilizados dois parâmetros. O primeiro parâmetro foi o **Índice de Dano** (ID), que classifica os cometas em cinco classes (da classe 0 até a classe 4), que variam de acordo com o comprimento e intensidade da cauda (COLLINS et al., 2008). O índice de dano pode variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x dano 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x dano 4). O ID total foi calculado usando a fórmula:

$$\text{ID total} = 0\ (\text{nº de cometas classe 0}) + 1\ (\text{nº classe 1}) + 2\ (\text{nº classe 2}) + 3(\text{nº classe 3}) + 4\ (\text{nº classe 4})$$

O segundo parâmetro calculado foi a **Frequência de Dano** (FD%) que representa a porcentagem de todos os cometas com danos (classe 1 até a classe 4) em relação ao total de cometas contabilizados, que corresponde desde a classe 0 até a classe 4 (nº total). O FD% total foi calculado usando a fórmula:

$$\text{Frequência de Dano} = \frac{[(\text{nº total} - \text{nº classe 0}).100]}{\text{nº total}}$$

Para as comparações entre as diferenças das amostras foi aplicado o teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA), e o teste Bonferroni no software STATA versão 12. O nível de significância mínimo em todos os testes foi $p \leq 0,05$.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da toxicidade do ácido úsnico pelo teste SMART

O teste de sobrevivência das larvas de terceiro estágio que foram expostas às diferentes concentrações do ácido úsnico está apresentado no gráfico da Figura 2.1. A imagem mostra elevada sobrevivência de adultos (acima de 70%) em todas as concentrações avaliadas, não havendo diferenças significativas entre o número de sobreviventes do controle negativo e o número de sobreviventes das concentrações testadas (0,63, 1,26, 2,63, 5,05 e 10,11 mg/mL) do ácido úsnico. Assim, o ácido úsnico não apresentou efeito tóxico sobre os indivíduos expostos nas condições experimentais testadas, quando comparado ao controle negativo.

O ácido úsnico possui efeito tóxico em células V79 nas concentrações de 140, 160, e 200 µg/mL. No entanto em estudo *in vivo* em camundongos swiss o ácido úsnico só demonstrou sinais de toxicidade em doses superiores a 200 mg/kg de peso corpóreo (LEANDRO et al., 2013). Em seres humanos, o ácido úsnico apresentou efeito tóxico em quantidades de 3 g/dia sendo responsável por diversas complicações hepáticas (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Benzinger et al. (1960) relatam que a dificuldade de utilização do ácido úsnico como antimicrobiano deve-se à sua insolubilidade em água e à sua alta taxa de toxicidade. Embora o ácido úsnico seja amplamente utilizado, seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido (RIBEIRO et al., 2006).

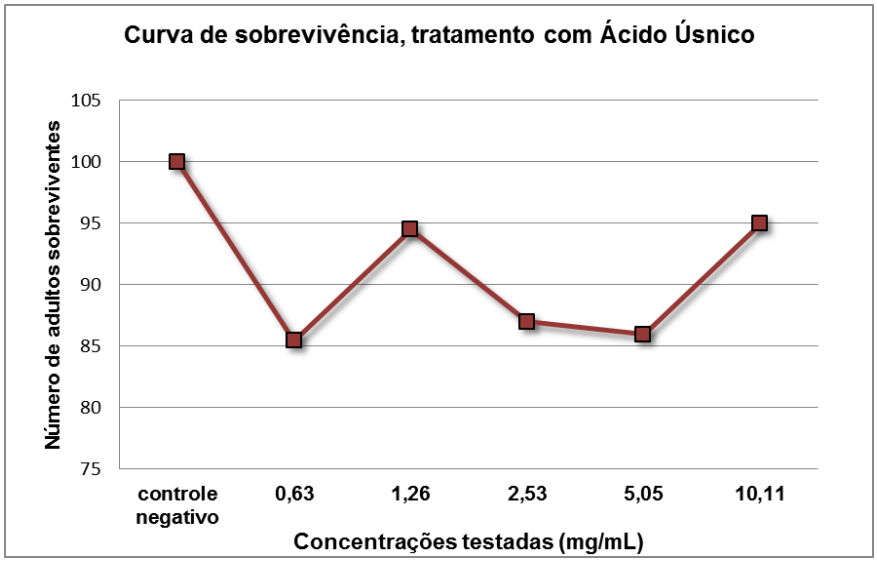


Figura 2.1 Número de adultos de *D. melanogaster* sobreviventes, submetidos ao teste SMART, após exposição ao composto ácido úsnico, em diferentes concentrações.

Avaliação do potencial mutagênico do ácido úsnico pelo Teste SMART

Os resultados do potencial de mutagenicidade do ácido úsnico estão expostos na Tabela 2.1. Os resultados indicam que não houve indução de mutação nas concentrações testadas.

Tabela 2.1 Resultados do potencial mutagênico do ácido úsnico, com diagnóstico estatístico pelo teste binomial e condicional (Kastembaum e Bowman,1970).

Concentrações (mg/mL) do genótipo *mwh/flr*^{3}	**N**	**Frequência de manchas por individuo (n° de manchas)**								**Total de manchas**
		MSP (1-2céls)[b] *m*=2	**D**	MSG (>2céls)[b] *m*=5	**D**	MG *m*=5	**D**	TM *m*=2	**D**	mwh[c] *(n)*
Cont. Negativo	31	0,48 (15)		0,13 (04)		0,03 (01)		0,65 (20)		20
0,63	20	0,65 (13)	-	0,10 (02)	i	0,05 (01)	i	0,80 (16)	-	15
1,26	32	0,63 (20)	i	0,03 (01)	-	0,00 (00)	i	0,66 (21)	-	21
2,53	33	0,45 (15)	-	0,06 (02)	i	0,00 (00)	i	0,52 (17)	-	17
5,05	30	0,57 (17)	i	0,00 (00)	-	0,00 (00)	i	0,57 (17)	-	17
10,11	39	0,38 (15)	-	0,10 (04)	i	0,03 (01)	i	0,51 (20)	-	20

D=Diagnóstico estatístico de acordo com Frei & Würgler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo. MSP = manchas simples pequenas; MSG = manchas simples grandes; MG = manchas gêmeas; TM = total de manchas; *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância p<0,05. [b]Incluindo manchas simples *flr3*raras. [c]Total de manchas**, c**onsiderando clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para manchas gêmeas. N=total de indivíduos analisados.

Leandro et al. (2013) avaliou o potencial genotóxico do ácido úsnico em Células V79 através do teste de micronúcleo nas concentrações de 15, 30, 60 e 120 µg/mL e verificou que não houve diferença significativa na indução de micronúcleos entre culturas tratadas com as diferentes concentrações de ácido úsnico, demonstrando a ausência de atividade genotóxica nas concentrações testadas. Segundo o mesmo autor em teste de micronúcleo *in vivo* com camundongo swiss foi observado que não houve diferença na frequência de micronúcleo dos animais tratados com diferentes doses do ácido úsnico 25, 50, 100 e 200 mg/kg de peso corpóreo em relação ao controle negativo demonstrando a ausência de atividade genotóxica.

Avaliação da genotoxicidade do ácido úsnico pelo Ensaio Cometa

Os resultados da contagem dos danos (0 a 4) e os valores calculados de ID e FD por cada réplica (e suas respectivas médias) dos controles negativo, positivo e dos tratamentos com os composto ácido úsnico estão apresentados no Material Suplementar (Tabela S1) .De acordo com o teste estatístico de Bonferroni aplicados aos resultados, o ácido úsnico não possui efeito genotóxico sobre as células somáticas de *Drosophila melanogaster* nas condições experimentais testadas, uma vez que não houve diferença

significativa entre o índice de dano e a frequência de dano genético causado pelo composto em relação ao controle negativo Material suplementar (Tabelas S2 e S3).

O ensaio cometa realizado por LEANDRO et al. (2013), com células v79, não houve diferença significativa na indução de dano genético entre os grupos tratados com as concentrações de 15 e 30 µg/mL de ácido úsnico e o controlo negativo. No entanto, nas concentrações de 60 e 120 µg/mL houve um aumento significativo do número de danos genéticos, quando comparados com o controle negativo. Nos resultados do ensaio do cometa de células do fígado de camundongos swiss foi observado que não houve diferença significativa entre os animais tratados com ácido úsnico e o grupo controle negativo, demonstrando a ausência de genotoxicidade do ácido úsnico nas doses 25, 50, 100 e 200 mg/kg de peso corporal (LEANDRO et al., 2013).

Avaliação do potencial antimutagênico do ácido úsnico pelo Teste SMART

O teste de sobrevivência das larvas de terceiro estágio que foram expostas às diferentes concentrações do ácido úsnico associado à mitomicina (1mg/mL) está apresentado na Figura 2.2, que mostra elevada sobrevivência de adultos nas concentrações 0,63, 1,26, 2,63, 5,05 mg/mL avaliadas. No entanto na dose 10,11 mg/mL do ácido úsnico associado a mitomicina a 1mg/mL o número de sobreviventes foi inferior à 40% caracterizando como dose tóxica para os organismos *Drosophila melanogaster*. Os resultados do potencial antimutagênico do ácido úsnico quando associado a mitomicina está apresentado na Tabela 2.2.

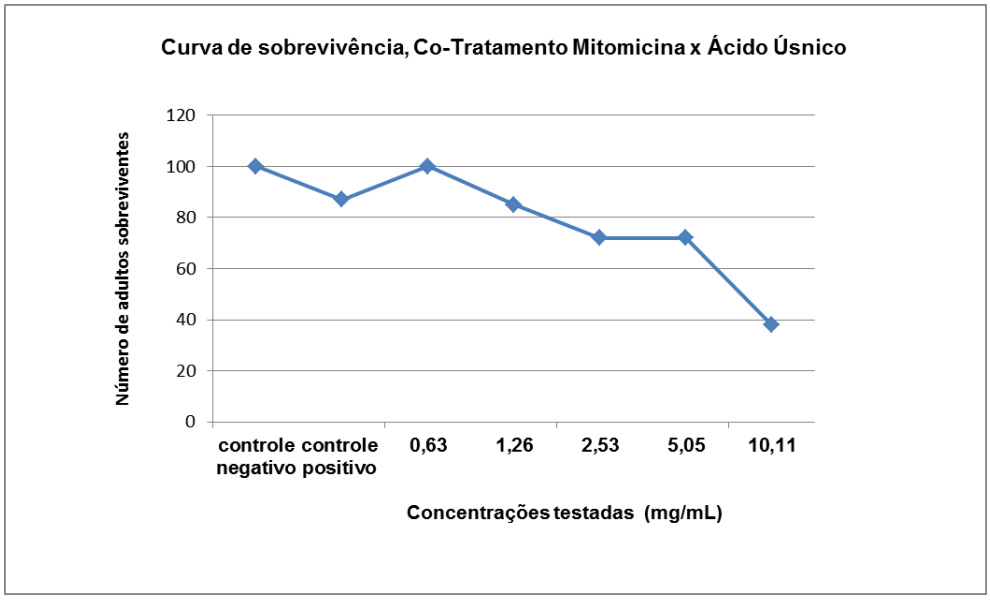


Figura 2.2 - Número de adultos de *D. melanogaster* sobreviventes, submetidos ao teste SMART, após exposição ao composto ácido úsnico associado à mitomicina.

O ácido úsnico apresentou diminuição significativa do efeito genotóxico da mitomicina em todas as concentrações testadas. O que é um indicativo de sua atividade antigenotóxica. Estes resultados estão de acordo com Leandro et al. (2013) que identificou efeito antigenotóxico do ácido úsnico em células v79 utilizando o ensaio cometa e o teste de micronúcleo quando associado a metanossulfonato de metila nas concentrações 15, 30, 60 e 120 µg/mL. Os autores observaram uma redução que variou entre 31,9 a 47,84% no número de danos genéticos no ensaio cometa e uma redução de 53,62 % no número de micronúcleos na concentração 15 µg/mL no teste de micronúcleo.

Tabela 2.2 Resultados do potencial antimutagênico do ácido úsnico associado à mitomicina, com diagnóstico estatístico pelo teste binomial e condicional (Kastembaum e Bowman,1970).

Concentrações (mg/mL) do genótipo *mwh/flr*^{3}	**N**	**Frequência de manchas por individuo (n° de manchas)**								**Total de manchas**
		MSP (1-2céls)[b] *m*=2	**D**	MSG (>2céls)[b] *m*=5	**D**	MG *m*=5	**D**	TM *m*=2	**D**	mwh[c] *(n)*
Cont. Negativo	31	0,48 (15)		0,13 (04)		0,03 (01)		0,65 (20)		20
Cont. Positivo	25	12,36 (309)		16,72 (418)		3,24 (81)		32,32 (808)		727
0,63	29	9,48 (275)	f+	7,38 (214)	+	0,66 (19)	+	17,52 (508)	+	489
1,26	30	4,70 (141)	+	4,37 (131)	+	0,30 (09)	+	9,37 (281)	+	272
2,53	30	5,20 (156)	+	5,10 (153)	+	0,73 (22)	+	11,03 (331)	+	309
5,05	29	3,59 (104)	+	2,69 (78)	+	0,24 (07)	+	6,52 (189)	+	182

D=Diagnóstico estatístico de acordo com Frei & Würgler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo, -, negativo; i, inconclusivo. MSP = manchas simples pequenas; MSG = manchas simples grandes; MG = manchas gêmeas; TM = total de manchas; *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância p<0,05. [b]Incluindo manchas simples *flr3*raras. [c]Total de manchas**, c**onsiderando clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para manchas gêmeas. N=total de indivíduos analisados.

No ensaio antigenotóxico do ácido úsnico mais metanossulfonato de metila no teste micronúcleo com camundongos swiss as doses mais elevadas do ácido úsnico 100 e 200 mg/kg levaram a uma redução significativa na frequência de micronúcleos quando comparado apenas aqueles tratados com metanossulfonato de metila. Em hepatócitos o grau de danos no DNA foi significativamente inferior em animais tratados com as diferentes doses do ácido úsnico combinado com metanossulfonato de metila em relação com aqueles tratados apenas com MMS. No entanto, as diferenças foram estatisticamente significativas

apenas para o tratamentos com 100 e 200 mg/kg peso corpóreo em comparação com metanossulfonato de metila sozinho. Os efeitos protetores do ácido úsnico contra genotoxicidade induzida não estão bem esclarecidos mais podem estar associados a sua atividade antioxidante (LEANDRO et al.,2013).

Estudos realizados por Rabelo et al. (2012) mostraram o potencial antioxidante do ácido comercial, que foi capaz de reduzir a formação do óxido nítrico e aumentando a viabilidade das células neuronais *in vitro*, tratadas na concentração de 20 µg mL. A atividade antioxidante de diferentes espécies de liquens está associada ao seu conteúdo total de fenóis (RANKOVIC et al.,2010). Portanto, existe a possibilidade de o composto exercer sua ação genoprotetora através de seu potencial antioxidante, impedindo lesões ao DNA realizadas através de compostos oxidantes.

2.5 CONCLUSÃO

O ácido úsnico não possui efeito tóxico e ou genotóxico sobre as células somáticas de *Drosophila melanogaster* quando avaliado por meio do teste SMART e ensaio cometa nas condições experimentais aplicadas. Além disso, ele apresentou efeito antigenotóxico frente a mutações induzidas pela mitomicina em todas as concentrações testadas no teste SMART.

2.6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster.* In: RIBEIRO,L,R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental,** 1ª ed, Canoas, editora: ULBRA, p. 281- 307, 2003.

BEHERA B. C.; MAHADIK N.; MOREY M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, p. 968–979,2012.

BENZINGER, F; TOMÁSIC, P.; ZAVERSERK. Usninsäure aus Jugoslawischen Flechten und ihre Antibiotishe Wirksamreit. **Qualitás Plantarum Mater-Veg**, v.7, p. 371-383, 1960.

BRISDELLI F.; PERILLI M.; SELLITRI D.; PIOVANO M.; GARBARINO J. A.; NICOLETTI M.; BOZZI A.; AMICOSANTE G.; CELENZA G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of Ppurified lichen metabolites: *an in* vitro study. **Phytotherapy Research.** v.27, p. 431–437, 2013.

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.,et al. The Comet Assay: topical issues. **Mutagenesis** 23: p.143-151,2008.

CUNHA, K.S., REGULY, M.L., GRAF, U., ANDRADE, H.H.R. Taxanes: The genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis** v. 16, p.79-84, 2001.

FALCÃO, E.P.S. et al. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron1. **Acta Botanica Brasilica,** v.18, n.4, p.911-918, 2004.

FREI, H. *et al.* The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of Drosophila melanogaster. **Mutation Research**., v.279, p.21-33.,1992.

FREI, H., WURGLER, F.E.. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate positive, negative or inconclusive results. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.

GRAF, U. *et al.* Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**., v. 6, p. 153-188, 1984.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecules of interest usnic acid. **Phytochemistry**. v. 61, p. 729-736, 2002.

KASTENBAUM,M.A.; BOWMAN,K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, **Mutation Research**. v 9 p.527–549, 1970.

KOHLHARDT-FLOEHR C.; BOEHM F.; TROPPENS S.; LADEMANN J.; TRUSCOTT T.G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biology.** v**.**101, p. 97–102, 2010.

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

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

RABELO, T. K.; CHULIÁ-ZEIDÁN, F.; VASQUES, L. M.; SANTOS, J. P.; ROCHA, R. F.;PASQUALI, M. A.; RYBARCZYK-FILHO, J. L.; ARAÚJO, A. A.; MOREIRA, J. C.;

GALEIN, D. P. 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.

RANKOVIC, B.; RANKOVIC, D.; KOSANIC, M.; MARIC, D. Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Anaptychya ciliaris*, Nephroma parile, *Ochrolechia tartarea* and *Parmelia centrifuga*. **Central European Journal of Biology**, v. 5, n. 5.p. 649-655, 2010.

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

RIBEIRO, S.M. Produção de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio1. **Acta Botanica Brasilica.** p.265-272, 2006.

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. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of Microencapsulation**. v. 21, n. 4, p. 371-384, 2004.

SEGATORE A. B.; BELLIO P.; SETACCIA D., BRISDELLI F.; PIOVANOB M.; GARBARINOB J. A.; NICOLETTI M.; AMICOSANTEA G.; PERILLI M.; CELENZAA G. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and _E model methods. **Phytomedicine.** v.19, p.341-347, 2012.

SHARMA, A.; SHUKLA, A.K.; MISHRA, M.; CHOWDHURI, D.K. Validation and application of Drosophila melanogaster as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. **Mutation Research**, v. 721, p. 142-146, 2011.

SOKOLOV D. N.; ZARUBAEV V. V.; SHTRO A. A.; POLOVINKA M. P.; LUZINA O. A.;KOMAROVA N. I. , SALAKHUTDINOV N. F., KISELEV O. I. Anti-viral activity of (-)/(+)usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 22, p. 7060–7064, 2012.

TIBURI, M., REGULY, M.L., SCHWARTSMANN, G., CUNHA, K.L., LEHMANN, M., ANDRADE, H.H.R. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research.**, v. 519, p. 141-149,2002.

VERÇOSA, C.J. **Aplicação do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação da genotoxicidade ambiental.** Dissertação (Mestrado) Biologia Celular e Molecular Aplicada) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, 2015.

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; REDDY, M.K.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A B.;SUKUMAR, E. Anti-inflamtory activity of (+) –unisc acid. **Fitoterapia.** v.71 p.564-566, 2000.

2.7 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 -Avaliação de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster* submetidas ao controle negativo, positivo e a diferentes concentrações do ácido úsnico.

Tratamento	**Nível de dano genético**						
	0	1	2	3	4	ID	FD %
Controle positivo	18	21	29	12	20	195	82
Controle positivo	17	21	16	26	20	211	83
Controle positivo	17	21	29	15	18	196	83
Média	**17,80**	**21,00**	**24,70**	**17,70**	**19,30**	**200,70**	**82,70**
Controle negativo	84	12	4	0	0	20	16
Controle negativo	63	26	10	1	0	49	37
Controle negativo	76	17	6	1	0	32	24
Média	**74,30**	**18,30**	**6,67**	**0,67**	**0,00**	**33,67**	**25,67**
0,32 mg/mL	81	14	5	0	0	24	19
0,32 mg/mL	84	11	4	1	0	22	16
0,32 mg/mL	88	6	4	2	0	20	12
Média	**84,30**	**10,30**	**4,33**	**1,00**	**0,00**	**22,00**	**15,67**
0,63 mg/mL	94	5	1	0	0	7	6
0,63 mg/mL	83	16	1	0	0	18	17
0,63 mg/mL	72	27	1	0	0	29	28
Média	**83,00**	**16,00**	**1,00**	**0,00**	**0,00**	**18,00**	**17,00**
1,26 mg/mL	89	10	1	0	0	12	11
1,26 mg/mL	91	9	0	0	0	9	9
1,26 mg/mL	56	36	8	0	0	52	44
Média	**78,70**	**18,30**	**3,00**	**0,00**	**0,00**	**24,33**	**21,33**
2,52 mg/mL	82	11	7	0	0	25	18
2,52 mg/mL	86	13	1	0	0	15	14
2,52 mg/mL	54	25	17	3	1	72	46
Média	**74,00**	**16,30**	**8,33**	**1,00**	**0,33**	**37,33**	**26,00**
5,05 mg/mL	87	5	8	0	0	21	13
5,05 mg/mL	82	10	7	1	0	27	18
5,05 mg/mL	81	15	4	0	0	23	19

Média	**83,30**	**10,00**	**6,33**	**0,33**	**0,00**	**23,67**	**16,67**
10,11 mg/mL	83	8	8	1	0	27	17
10,11 mg/mL	84	9	7	0	0	23	16
10,11 mg/mL	67	19	9	5	0	52	33
Média	**78,00**	**12,00**	**8,00**	**2,00**	**0,00**	**34,00**	**22,00**

Tabela S2- Avaliação do índice de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster* comparadas ao controle negativo e a diferentes concentrações do ácido úsnico. Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste Bonferroni.

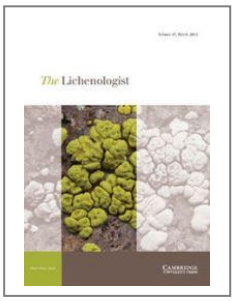
Índice de Dano	Controle Negativo	0,32 mg/mL	0,63 mg/mL	1,26 mg/mL	2,53 mg/mL	5,05 mg/mL
0,32 mg/mL	1.000					
0,63 mg/mL	1.000	1.000				
1,26 mg/mL	1.000	1.000	1.000			
2,53 mg/mL	1.000	1.000	1.000	1.000		
5,05 mg/mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
10,11 mg/mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Nível de significância ($p \leq 0,05$).

Tabela S3 - Avaliação da frequência de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster* comparadas ao controle negativo e a diferentes concentrações do ácido úsnico. Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste Bonferroni.

Frequência de Dano	Controle Negativo	0,32 mg/mL	0,63 mg/mL	1,26 mg/mL	2,53 mg/mL	5,05 mg/mL
0,32 mg/mL	1.000					
0,63 mg/mL	1.000	1.000				
1,26 mg/mL	1.000	1.000	1.000			
2,53 mg/mL	1.000	1.000	1.000	1.000		
5,05 mg/mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
10,11 mg/mL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

CAPÍTULO 3



Artigo 2

A ser submetido à revista **The Lichenologist**
B1 em Biodiversidade, Fator de Impacto: 1,613

Estudo da genotoxicidade do ácido divaricático isolado do líquen *Ramalina complanata* (Sw.) Ach em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Érima Maria de Amorim[1,2,3], André Severino da Silva[2,3], Jéssica Celerino dos Santos[2] , Ícaro Fillipe de Araújo Castro[2], Robson Gomes dos Santos[2], Claudia Rohde[2], Emerson Peter da Silva Falcão[3*]

[1]Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil, [2]Laboratório de Genética, CAV-UFPE, [3]Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular - SIM, CAV-UFPE.

*** Autor para correspondência.**
Laboratório de Produtos Naturais e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bairro Bela Vista, CEP 51608-680, Vitoria de Santo Antão, Pernambuco, Brazil, Telefone: #55.81.35233351. E-mail: emerson_falco@yahoo.com.br

3.1 RESUMO

Os liquens são amplamente mencionados pelo potencial de compostos oriundos de seu metabolismo secundários. São descritas atividasdes anti-hipertensivas, antitumorais, antivirais, anti-inflamatórias e antiparasitárias. Dentre estas moléculas destaca-se o ácido divaricático, que pode atuar como agente protetor contra a radiação U.V. A fim de avaliar a segurança em futuras aplicações farmacêuticas do ácido divaricático este trabalho avaliou o seu eventual efeito mutagênico e genotóxico através do teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e o Ensaio Cometa com hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R. O ácido foi isolado da espécie *Ramalina complanata* pelo do método de esgotamento a quente, em aparelho de Soxhlet, utilizando os solventes: éter, acetona e clorofórmio. O composto foi

purificado a partir de sucessivas recristalizações com *n*-hexano e sua pureza foi avaliada pela técnica de cromatografia em camada delgada. Após terem sido realizados cruzamentos entre duas linhagens de *D. melanogaster* geneticamente estabelecidas para o teste SMART (*mwh* e *flr*^{3}) os organismos descendentes foram submetidos a diferentes concentrações do composto: 0,32, 0,64, 1,26, 2,53, 5,05 e 10,11 mg/mL. No Ensaio Cometa foram testadas as quatro primeiras concentrações, visto que 5,05 e 10,11 mg/mL foram tóxicas no teste SMART realizado, eliminando mais de 70% dos indivíduos tratados. As concentrações testadas foram 0,32, 0,64, 1,26 e 2,53, mg/mL. Também foram estabelecidos grupos controle positivo (mitomicina a 1mg/mL para o teste SMART e ciclofosfamida à 1mg/mL para o Ensaio Cometa), e grupos controle negativo (tratamento com 3 mL de solução com apenas com a mistura do solvente, composto por 90% água destilada, 5% de tween 80 e 5% de etanol, para cada um dos testes). Resultados do teste SMART indicaram toxicidade nas concentrações de 5,05 e 10,11 mg/mL, com morte de mais de 70% dos indivíduos tratados. Nas demais concentrações (0,32, 0,64, 1,26, 2,53 mg/mL) os resultados do teste SMART indicaram ausência de efeito mutagênico. No ensaio cometa os resultados obtidos demonstraram efeito genotóxico do composto em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle negativo. Os dados indicam que este fenol liquênico, nas condições experimentais testadas, possui efeito tóxico em concentrações iguais ou superiores a 5,05 mg/mL e efeito genotóxico nas concentrações 0,32, 0,64, 1,26, 2,53 mg/mL no entanto não apresentam ação mutagênica nas condições experimentais aplicadas.

Palavras-chave: SMART (Somatic Mutation and Recombination Test), Ensaio Cometa,

3.2 INTRODUÇÃO

Os liquens produzem através do seu metabolismo secundário diversas substâncias conhecidas como ácidos liquênicos, que são na sua grande maioria compostos fenólicos, como ácidos alifáticos ,depsídeos, depesidonas, benzil ésteres, antraquinonas, terpenóide (SHUKLA et al.,2010), com diversas propriedades farmacológicas, já descritas, como agentes anti-hipertensivos, antitumorais, antivirais, anti-inflamatórios, antiparasitários, entre outras (MAIA, 2002; RANKOVIC, 2011).

Entre as diversas substâncias liquênicas com propriedades farmacológicas estão os ácidos: úsnico que possui atividade antibiótica (COCCHIETTO et al., 2002), antineoplásica

(BRISDELLI et al., 2013), antioxidante (KOHLHARDT-FLOEHR et al., 2010), antiviral (SOKOLOV et al., 2012), difractáico que possui atividade analgésica e antipirética (OKUYAMA et al., 1995) e o ácido divaricático que pode atuar como agente protetor contra a radiação U.V., um dos agentes causadores do câncer de pele (GALLOWAY, 1993; FERNANDEZ et al., 1996). No entanto poucos são os estudos publicados no que se refere a ação mutagênica e ou genotóxica desde ácido.

Neste cenário caracteriza-se o fenômeno mutação com qualquer alteração súbita no material genético que não seja oriunda de uma recombinação e que pode acometer células germinativas ou somáticas de diversos organismos e que pode causa diversas patologias (ROUSE e JACKSON, 2002; SNUSTAD e SIMONS, 2001).

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação mutagênica e ou genotóxica do ácido divaricático através do teste de mutação e recombinação somática SMART em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e o ensaio cometa com hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon R.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Material liquênico, isolamento e purificação dos extratos orgânicos

O material liquênico foi isolado conforme descrição em Falcão et al. (2004), a partir da espécie *Ramalina complanata* coletada na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Fazenda Brejo, em Saloá, município do Agreste de Pernambuco-Brasil. O material orgânico foi seco à temperatura ambiente, sendo a fração fenólica extraída através da maceração de 10 g do talo seco com 100 mL dos solventes éter, clorofórmio e acetona , por sistema de esgotamento a quente, seguindo sua série eluotrópica. Os extratos orgânicos foram mantidos em dessecador até peso constante. Para obtenção do ácido divaricático puro, o extrato etéreo, previamente seco, pesado e recristalizado em n-hexano.

Análise Cromatográfica

A composição do extrato orgânico e a pureza do composto isolado foi avaliada através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se a

metodologia descrita por Culberson (1972) e utilizada por Falcão et al. (2004). Para visualização das bandas foram usadas placas de sílica gel Merck (F-254 nm), sistema A (tolueno/ dioxano /ácido acético 180:45:5 v/v/v) com uso de lâmpada UV, revelação com solução de ácido sulfúrico a 10%, e posterior aquecimento a 100ºC por 10 min. As bandas foram identificadas através do fator de retenção (Rf), comparado ao padrão do composto ácido divaricático.

Teste de Mutação e Recombinação Somática- SMART

O teste SMART foi realizado através do cruzamento padrão entre fêmeas *flr*^{3} (flare) virgens e machos *mwh* (pelos múltiplos) que originou larvas descendentes com duas constituições genotípicas: (i) *mwh* +/+ *flr3* (trans-heterozigotas - TR) e (ii) *mwh*+/TM3,BdS (heterozigotas - TM3) (FREI et al.,1992). Fêmeas envolvidas no cruzamento permaneceram por 8 h em frascos de vidro a fim de ovopositar sobre uma camada de fermento pastoso (Fleischman e Royal Ltda) suplementado com sacarose, previamente montado sobre uma base sólida de ágar. Cerca de 100 larvas descendentes com 72h ± 4 horas de vida (3° estágio) foram coletadas e transferidas para tubos plásticos descartáveis contendo meio de cultivo composto por 1,5 g de purê de batatas instantâneo (YOKI S.A.), previamente hidratado com 3 mL das diferentes concentrações do ácido divaricático (0,32, 0,64, 1,26, 2,53, 5,05 e 10,11 mg/mL) diluído na solução solvente composta por 5% de Tween 80, 5 % de Etanol e 90% de água destilada. O grupo controle negativo se consistiu de larvas crescidas no meio hidratado apenas com a solução solvente, enquanto que o grupo controle positivo cresceu em meio hidratado com mitomicina (1mg/mL) diluída no solvente. As larvas se alimentaram nas soluções preparadas até a vida adulta. Após a eclosão, os adultos sobreviventes foram coletados e contados para o estabelecimento da curva de sobrevivência, sendo todos estocados em tubos com etanol a 70% para a montagem e análise dos fenótipos das asas. Neste caso, os pares de asas foram destacadas do corpo de machos e fêmeas submetidos aos tratamentos e montados sobre lâminas de vidro, seguindo a descrição de Graf et al(1984) e Andrade et al (2003).

As lâminas com as preparações das asas foram analisadas no microscópio óptico (Medlux) com objetiva de 40x. Os testes estatísticos se basearam na comparação das frequências de manchas mutantes por individuo em cada concentração testada com a frequência das manchas dos indivíduos do controles negativo, através do teste condicional binomial de Kastembaum e Bowman (1970). O nível de significância dos resultados foi avaliado segundo Frei e Würgler (1988), que apresenta quatro diagnósticos diferentes:

positivo (+), fraco positivo (f+), negativo (-) e inconclusivo (i). O potencial genotóxico foi definido pela regra de que a identificação da toxicidade genética requer que o total de manchas mutantes seja duas vezes maior no tratamento do que no controle, sem que ocorra, uma relação clara entre dose-resposta (Cunha et al.,2001; Tiburi et al.,2002).

Ensaio Cometa

Tratamento das larvas de Drosophila melanogaster

Para o ensaio cometa foram usadas larvas com 72h ± 4 horas de vida (3° estágio) de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R. O experimento foi realizado em triplicata, sendo selecionadas 60 larvas para cada uma das replicas de cada concentração e transferidas para o meio de tratamento composto por purê de batata desidratado, acrescido do composto na diluição desejada (0,32,0,64, 1,26 e 2,53mg/mL). Da mesma forma que no teste SMART, o meio consistiu de 0.9 g de purê de batata seco (marca Yoki) hidratado com 3 mL de cada uma das concentrações testadas. Também foi estabelecido um grupo controle negativo (tratado apenas com os solventes Tween 80, etanol e água destilada) e um grupo controle positivo tratado com 3 mL de Ciclofosfamida a 1 mg/mL, diluída em água destilada, seguindo as recomendações estabelecidas por SHARMA et al.(2011). Após as 24 horas de contato das larvas com os compostos iniciou-se o ensaio cometa seguindo as orientações de VERÇOSA (2015).

Extração da hemolinfa

A extração dos hemócitos foi realizada a partir da hemolinfa de 60 indivíduos, que constituíram uma réplica do experimento. No total, foram estabelecidas três réplicas para cada tratamento, ou seja, foram avaliados hemócitos obtidos de 180 larvas. As larvas foram resfriadas a 4º C por 1 min para a diminuição metabólica, seguido do resfriamento, as larvas foram postas em solução de EDTA, sendo realizado um corte lateral na cutícula de cada indivíduo para a saída da hemolinfa.

Montagem das lâminas, tratamento e eletroforese

As lâminas de vidro previamente lixadas e banhadas com solução 1,5 % de agarose padrão foram montadas com uma camada de 60 µL de suspensão celular (hemócitos de larvas), homogeneizado em 100 µL de solução de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM) a 37ºC. Esta etapa foi realizada na ausência da luz. O homogeneizado foi

aplicado na lâmina e sobre o material foi colocada uma lamínula. As lâminas foram submetidas a 4ºC por 10 min, após esse tempo as lamínulas foram retiradas e as lâminas com o material biológico foram submersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 10 mM Tris; 1% Triton X-100 e 10% DMSO) ajustada para pH 10, e mantidas a 4ºC por 72 h. Ao término do período de lise celular, as lâminas foram submetidas a uma solução tampão a 4ºC (1M NaOH; 200 mM EDTA, pH > 13) por um período de 20 min. Logo após, foi realizada a corrida eletroforética por 20 min a 40 V/cm e 300 mA. Após a corrida, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min e seguida foram submetidas à fixação, em etanol absoluto por 5 min, secas ao ar e armazenadas a 4ºC até o momento da análise microscópica.

Análises microscópicas

Para a análise microscópica, as lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRedTM, diluído em água deionizada na proporção de 1:500 e visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com objetiva de 40X e filtro Alexa Fluor 546. O programa de captura de imagens foi o Axiovision versão 4.8.2.0. A análise consistiu na observação de 100 nucleóides, sendo 50 por lâmina, de cada uma das três réplicas de cada tratamento (total de 300 nucleóides analisados em cada tratamento). Após a corrida eletroforética os nucleóides foram classificados de zero a quatro (0 a 4), dependendo das suas características, seguindo os parâmetros visuais definidos por (COLLINS et al., 2008). A **classe 0** compreendeu os cometas considerados intactos, ou seja, sem danos causados pelo contato com os compostos testados; a **classe 1** correspondeu aos cometas com danos mínimos; **classe 2** os cometas com danos médios; a **classe 3** os cometas com danos intensos; e a **classe 4** correspondeu aos cometas com danos máximos.

Testes estatísticos

Para avaliar os cometas contabilizados foram utilizados dois parâmetros. O primeiro parâmetro foi o **Índice de Dano** (ID), que classifica os cometas em cinco classes (da classe 0 até a classe 4), que variam de acordo com o comprimento e intensidade da cauda (COLLINS et al., 2008). O índice de dano pode variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x dano 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x dano 4). O ID total foi calculado usando a fórmula:

$$\text{ID total} = 0\ (\text{nº de cometas classe } 0) + 1\ (\text{nº classe } 1) + 2\ (\text{nº classe } 2) + 3(\text{nº classe } 3) + 4\ (\text{nº classe } 4)$$

O segundo parâmetro calculado foi a **Frequência de Dano** (FD%) que representa a porcentagem de todos os cometas com danos (classe 1 até a classe 4) em relação ao total de cometas contabilizados, que corresponde desde a classe 0 até a classe 4 (nº total). O FD% total foi calculado usando a fórmula:

$$\text{Frequência de Dano} = \frac{[(\text{nº total} - \text{nº classe 0}).100]}{\text{nº total}}$$

Para as comparações entre as diferenças das amostras foi aplicado o teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA), e o teste Bonferroni no software STATA versão 12. O nível de significância mínimo em todos os testes foi $p \leq 0,05$.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e identificação do ácido divaricático extraído da espécie Ramalina complanata

A análise por CCD dos extratos orgânicos de *Ramalina complanata* confirmou a presença do ácido divaricático (Rf= 0,57). Está espécie pode produzir como composto majoritário tanto este fenol quanto o ácido salazínico (Rf= 0,173), entretanto, este composto não foi identificado nas análises.

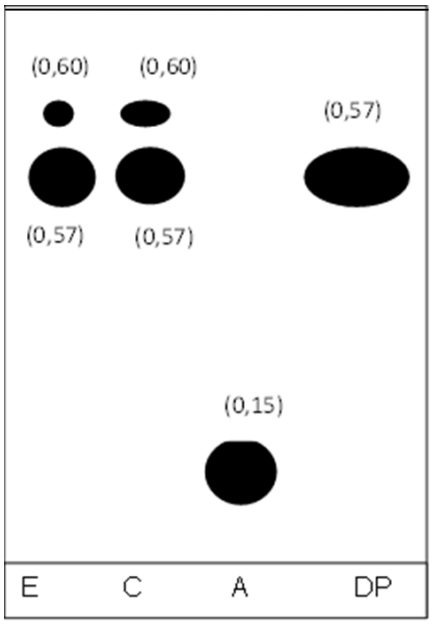


Figura 3.1 Padrão cromatográfico dos extratos da espécie *Ramalina complanata* e os seus Rf. **E**, **C e A** os extratos étereo, clorofórmico e acetônico respectivamente, **DP** o ácido divaricático purificado.

Avaliação da toxicidade e mutagenicidade do ácido divaricático pelo Teste SMART

A curva de sobrevivência para o ácido divaricático (Figura 3.2) indica variações entre os tratamentos quando comparados ao controle negativo, com queda acentuada em 45% na concentração 0,32 mg/mL, e sobrevivência abaixo de 40% nas concentrações de 5,05 mg/mL e 10,11 mg/mL. Nestas duas últimas concentrações houve efeito tóxico sobre os indivíduos expostos. Conforme metodologia de GRAF et al. (1984). Estas concentrações não foram incluídas na análise subsequente do teste SMART, devido ao número de sobreviventes ser inferior a 70%.

Estudo realizado por LEANDRO et al. (2013) com ácido úsnico, outro importante metabólico secundário liquênico, em células V79 demonstrou efeito tóxico dose resposta resposta em culturas tratadas com as concentrações de 140, 160, e 200 µg / mL. Isto indica que o fármaco presenta uma ação específica e dependente de um receptor para se processar. O perfil de resposta visto para o ácido divaricático também demonstra um efeito que aumenta em função da dose. Deste modo pode ser sugerido que exista igualmente um padrão específico no mecanismo de ação deste composto. Segundo LAWREY (1980) substâncias liquênicas apresentam efeitos tóxicos sobre a microbiota intestinal de insetos.

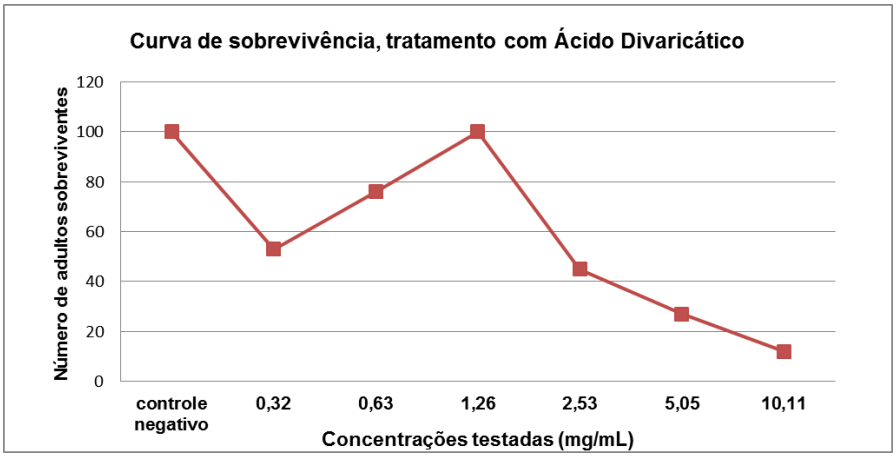


Figura 3.2 Número médio de adultos sobreviventes de *D. melanogaster* submetidos ao teste SMART, após exposição ao composto ácido divaricático.

A maioria dos metabólitos secundários liquênicos conhecidos pertencem às classes químicas de depsídeos, depsidonas e dibenzofuranos. As principais funções biológicas destas substâncias para os liquensparece estar relacionadas àproteção contra infecções virais, bacterianas, por protozoários e parasitas, além de proteger contra herbivoria, tais como insetos e nematoides e na concorrência com as plantas (COCCHIETTO et al., 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Os resultados do teste SMART indicados na Tabela 3.1, demonstram que a alteração fenotípica visualizada no controle negativo ficou dentro do nível de efeitos genéticos esperados para o teste SMART (frequência de 0,65). Os dados do controle positivo não estão expressos na Tabela 3.1, uma vez que a análise estatística do teste SMART compara apenas os tratamentos com o grupo controle negativo. Entretanto, os seus resultados também ficaram dentro dos níveis de mutação esperados, com elevada ocorrência de pelos mutantes em indivíduos tratados com mitomicina.

Em relação ao ácido divaricático, os resultados indicados na Tabela 3.1 demonstram que houve baixa indução de mutação em todas as concentrações testadas, o que significa dizer que o composto não foi capaz de induzir efeito mutagênico, quando comparado ao controle negativo, nas condições experimentais utilizadas.

Tabela 3.1 Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste binomial e condicional (Kastembaum e Bowman,1970).

Concentrações (mg/mL) do genótipo *mwh/flr*^{3}	**N**	**Frequência de manchas por individuo (n° de manchas)**								**Total de manchas**
		MSP (1-2céls)[b] *m*=2	**D**	MSG (>2céls)[b] *m*=5	**D**	MG *m*=5	**D**	TM *m*=2	**D**	mwh[c] *(n)*
Cont. Negativo	31	0,48 (15)		0,13 (04)		0,03 (01)		0,65 (20)		20
0,32	20	0,35 (07)	-	0,10 (02)	¡	0,00 (00)	¡	0,45 (09)	-	09
0,63	20	0,30 (06)	-	0,20 (04)	¡	0,05 (01)	¡	0,55 (11)	-	11
1,26	23	0,30 (07)	-	0,13 (03)	¡	0,00 (00)	¡	0,43 (10)	-	10
2,53	32	0,36 (08)	-	0,09 (02)	¡	0,00 (00)	¡	0,45 (10)	-	10

D=Diagnóstico estatístico de acordo com Frei & Würgler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo, -, negativo; i, inconclusivo. MSP = manchas simples pequenas; MSG = manchas simples grandes; MG = manchas gêmeas; TM = total de manchas; *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância p<0,05. [b]Incluindo manchas simples *flr3*raras. [c]Total de manchas**, c**onsiderando clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para manchas gêmeas. N=total de indivíduos analisados.

Avaliação da genotoxicidade do ácido divaricático pelo Ensaio Cometa

Os resultados da contagem dos danos (0 a 4) e os valores calculados de ID e FD por cada réplica (e suas respectivas médias) dos controles negativo, positivo e dos tratamentos com os composto ácido divaricático estão apresentados na Tabela 3.2. Comparando as médias obtidas das três réplicas de cada tratamento com o ácido divaricático, com a média

obtida no controle negativo, percebe-se que os valores foram superiores em todas as concentrações testadas, tanto para ID quanto FD%.

Tabela 3.2. Avaliação de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster* submetidas ao controle negativo, positivo e as diferentes concentrações do ácido divaricático.

Tratamento	**Nível de dano genético**						
	0	1	2	3	4	ID	FD %
Controle positivo	18	21	29	12	20	195	82
Controle positivo	17	21	16	26	20	211	83
Controle positivo	17	21	29	15	18	196	83
Média	**17,80**	**21,00**	**24,70**	**17,70**	**19,30**	**200,70**	**82,70**
Controle negativo	84	12	4	0	0	20	16
Controle negativo	63	26	10	1	0	49	37
Controle negativo	76	17	6	1	0	32	24
Média	**74,30**	**18,30**	**6,67**	**0,67**	**0,00**	**33,67**	**25,67**
0,32 mg/mL	19	70	10	1	0	93	81
0,32 mg/mL	33	43	22	2	0	93	67
0,32 mg/mL	39	56	5	0	0	66	61
Média	**30,30**	**56,30**	**12,30**	**1,0**	**0,0**	**84,00**	**69,70**
0,63 mg/mL	22	28	36	11	3	145	78
0,63 mg/mL	30	43	26	1	0	98	70
0,63 mg/mL	44	34	18	4	0	82	56
Média	**32,0**	**35,00**	**26,70**	**5,33**	**1**	**108,33**	**68,00**
1,26 mg/mL	8	40	44	8	0	152	92
1,26 mg/mL	10	13	49	25	3	198	90
1,26 mg/mL	23	38	30	8	1	126	77
Média	**13,70**	**30,30**	**41,00**	**1,33**	**1,33**	**158,66**	**86,33**
2,53 mg/mL	18	19	53	8	2	157	82
2,53 mg/mL	8	19	45	20	8	201	92
2,53 mg/mL	7	1	31	40	21	267	93
Média	**11,00**	**13,00**	**22,70**	**10,30**	**10,30**	**208,33**	**89,00**

A Tabela 3.3 mostra que houve diferença significativa entre o índice de dano causado nas concentrações 1,26 e 2,53 mg/mL quando comparado ao controle negativo. Já a Tabela 3.4 mostra que houve aumento na frequência de dano entre todas as doses aplicadas (0,32, 0,63, 1,26 e 2,53 mg/mL) em relação à frequência de dano do controle negativo. As concentrações 1,26 e 2,53 mg/mL foram extremamente significativas ($p \leq$

0,001), mostrando um efeito positivo e também dependente da dose, ou seja, quanto maior a concentração do ácido divaricático aplicado aos indivíduos, maior foi o dano genético obtido nos indivíduos tratados.

Tabela 3.3 Comparação do índice de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster* entre o controle negativo e as diferentes concentrações do ácido divaricático. Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste Bonferroni.

Índice de dano Genético	Controle Negativo	0.32 mg/mL	0.63 mg/mL	1.26 mg/mL
0,32 mg/mL	1,000			
0,63 mg/mL	0,240	1,000		
1,26 mg/mL	0,012*	0,240	1,000	
2,53 mg/mL	0,001*	0,013	0,052	1,000

* = significativo ($p \leq 0,05$).

Tabela 3.4 Comparação da frequência de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster* entre o controle negativo e as diferentes concentrações do ácido divaricático. Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste Bonferroni.

Frequência de Dano	Controle Negativo	0.32 mg/mL	0.63 mg/mL	1.26 mg/mL
0,32 mg/mL	0,002*			
0,63 mg/mL	0,003*	1,000		
1,26 mg/mL	0,0001*	0,558	0,386	
2,53 mg/mL	0,0001*	0,309	0,213	1,000

* = significativo ($p \leq 0,05$).

Fazendo uma extrapolação dos resultados, pode-se inferir que, como o Ensaio Cometa avalia o dano imediato no DNA e o teste SMART as mutações estabelecidas após um tempo de desenvolvimento capaz de ativar o sistema de reparo da célula, o ácido divaricático pode ter causado danos genéticos ou efeito genotóxico também no experimento do teste SMART. Estes danos, porém, podem ter sido reparados, o que explica a ausência de efeito mutagênico evidente neste teste.

3.5 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, o ácido divaricático possui efeito tóxico sobre os descendentes de cruzamentos específicos de indivíduos de *Drosophila melanogaster* em algumas concentrações 5,05 e 10,11 mg/mL, matando mais de 70% dos indivíduos expostos. Os resultados indicam que o ácido divaricático parece ter efeito genotóxico em descendentes de indivíduos de *D. melanogaster* da linhagem Oregon-R expostos às concentrações de 0,32, 0,63, 1,26, 2,53 mg/mL, no experimento do Ensaio Cometa. No entanto não foi observado efeito mutagênico em nenhuma das concentrações avaliadas através do teste SMART em células somáticas de indivíduos descendentes de cruzamentos específicos da linhagem *flr3* e *mwh* de *Drosophila melanogaster.*

3.6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster.* In: RIBEIRO,L,R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental,** 1ª ed, Canoas, editora: ULBRA, p. 281- 307, 2003.

BRISDELLI F.; PERILLI M.; SELLITRI D.; PIOVANO M.; GARBARINO J. A.; NICOLETTI M.; BOZZI A.; AMICOSANTE G.; CELENZA G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. **Phytotherapy Research** v.27, p. 431–437, 2013.

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.,et al. The Comet Assay: topical issues. **Mutagenesis** 23: 143-151,2008.

CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer cromathographic method. **Journal of Chromatography,** v.72, p.113-125, 1972.

CUNHA, K.S., REGULY, M.L., GRAF, U., ANDRADE, H.H.R. Taxanes: The genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis** v. 16, p.79-84, 2001.

FALCÃO, E.P.S. et al. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen Ramalina sorediosa (B. de Lesd.) Laundron1. **Acta Botanica Brasilica**, v.18(4), p.911-918, 2004.

FERNANDEZ, E. et al. Lichen metabolites as UVB filters: Lichen metabolites show photoprotector capacity. **Cosmetics and Toiletries**, v. 111(12), p. 69-76 1996.

FREI, H. *et al.* The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of Drosophila melanogaster. **Mutation Research**., v.279, p.21-33.,1992.

FREI, H., WURGLER, F.E.. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate positive, negative or inconclusive results. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.

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

GRAF, U. *et al.* Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**., v. 6, p. 153-188, 1984.

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

KASTENBAUM,M.A.; BOWMAN,K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, **Mutation Research**. V. 9 p.527–549, 1970.

KOHLHARDT-FLOEHR C.; BOEHM F.; TROPPENS S.; LADEMANN J.; TRUSCOTT T.G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biology.** v**.**101, p. 97–102, 2010.

LAWREY, J.D .Correlations between lichen secondary chemistry and grazing activity by*Pallifera varia*. **Bryologist** 23,p.128-134,1980.

LEANDRO, L.F. Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays. **Mutation Research**, v. 752, n. 2, p. 101-106, 2013.

MAIA, M.B.S.; SILVA, N.H.; SILVA, E.F.; CATANHO, M.T.J.; SCHULER, A.R.P.; PEREIRA, E.C. Antinociceptive Activity of Crude Extracts and Atranorin Obtained from the lichen Cladina dendroides (des Abb) Ahti. **Acta Farmaceutica Bonaerense,** v. 21, n. 4, p. 259-264, 2002.

OKUYAMA,E.; UMEYAMA,K.; YAMAZAKI,M.; KINOSHITA,Y.; YAMAMOTO,Y. Usnic acid and difractaic acid as analgesic and antipyretic componentes of usnea diffracta. **Planta Medica**., v. 61, p. 113-115, 1995.

RANKOVIĆ et al. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens Cladonia furcata, Lecanora atra and Lecanora muralis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 97, p. 1-8, 2011.

ROUSE, J.; JACKSON, S. P. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. **Science**, v. 297, .n. 5581, p. 547-551, 2002.

SHARMA, A.; SHUKLA, A.K.; MISHRA, M.; CHOWDHURI, D.K. Validation and application of Drosophila melanogaster as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. **Mutation Research**, v. 721, p. 142-146, 2011.

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

SOKOLOV D. N.; ZARUBAEV V. V.; SHTRO A. A.; POLOVINKA M. P.; LUZINA O. A.;KOMAROVA N. I. , SALAKHUTDINOV N. F., KISELEV O. I. Anti-viral activity of (-)/(+)usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 7060–7064, 2012.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M.J. Mutação, Reparo do DNA e Recombinação. In: **Fundamentos de Genética.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 14, p. 312-314, 2001.

TIBURI, M., REGULY, M.L., SCHWARTSMANN, G., CUNHA, K.L., LEHMANN, M., ANDRADE, H.H.R. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**., v. 519, p. 141-149,2002.

VERÇOSA, C.J. **Aplicação do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação da genotoxicidade ambiental.** Dissertação (Mestrado) Biologia Celular e Molecular Aplicada) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, 2015.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O ácido úsnico não possui efeito tóxico sobre as células somáticas de *Drosophila melanogaster* nas condições experimentais testadas. Em relação ao potencial genotóxico e ou mutagênico o composto não demonstrou diferença significativa entre o seu efeito quando comparado ao controle negativo, o que indica que o ácido úsnico não possui efeito tóxico genético nas condições experimentais aplicadas.

No entanto, quando avaliado o potencial antimutagênico do ácido úsnico avaliado por meio do teste de mutação e recombinação somática SMART o composto demonstrou uma redução significativa do número de mutações em todas as doses testadas quando associado à mitomicina em relação ao controle positivo no qual foi administrado apenas a mitomicina.

Em relação ao ácido divaricático isolado da espécie *Ramalina complanata* este demonstrou efeito tóxico nas duas maiores concentrações utilizadas a 5,05 e a 10,11 mg/mL . Nos resultados obtidos no ensaio cometa o composto apresentou efeito genotóxico em significativo em todas as concentrações testadas, no entanto, nas concentrações mais altas o composto demonstrou ser extremamente significativo. O caracteriza um efeito dose resposta, no qual quanto maior a dose maior será o efeito do composto. Entretanto, quando avaliado por meio do teste SMART os resultados foram negativos em todas as doses testadas, comparado ao controle negativo, indicando que o composto não possui efeito mutagênico nas condições aplicadas.

Desta forma, o ensaio cometa demonstrou ser mais sensível do que o teste de mutação e recombinação somática - SMART para detectar o potencial genotóxico do composto natural ácido divaricático.

REFERÊNCIAS

ACIOLE E.H.P., GUIMARAES N.N., SILVA A.S., AMORIM E.M., NUNOMURA S.M., GARCIA A.C.L., CUNHA K.S., ROHDE C. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Pest Management Science.**, v. 70, p.559-565, 2014.

AHMED, K.; HOSSAIN, M.A.; ARIF, M.; PARVIN, E.; SALMA, M.; SHAHNEAWZ,M.; ISLAM, M. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. **Chemosphere**, v. 8, p. 143-149, 2011.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. New York, J. Wiley & Sons, p. 865 -869, 1996.

ADAMS, M.D. *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, p. 2185-2195, 2000.

ALVES, G.M.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

ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster.* In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (eds). **Mutagênese Ambiental,** 1ª ed, Canoas, editora: ULBRA, p. 281- 307, 2003.

BÄCHLI, G. 2014. **TaxoDros: The database on Taxonomy of Drosophilidae.** Disponível em: **<**http://taxodros.unizh.ch>. Acesso em 23 de abril de 2014.

BEHERA B.C.; MAHADIK N.; MOREY M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, p. 968–979, 2012.

BENZINGER, F.; TOMÁSIC, P.; ZAVERSERK. Usninsäure aus Jugoslawischen Flechten und ihre Antibiotishe Wirksamreit. **Qualitás Plantarum Mater-Veg**, v. 7, p.371-383, 1960.

BICKHAM J, SANDHU S, HEBERT P, CHIKHI L, ATHWAL R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research.**, v. 463, p. 33–51, 2000.

BOGO, D. **Aliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de compostos de liquens.** 110 f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul**,** 2012.

BOUCHER, D. H.; JAMES ; S. ; KEELER, K.H. The ecology of mutualism. **Annual Review of Ecologyand Systematics**, v. 13, p. 315-47, 1982.

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

BRANDÃO, L.F.G. et al., Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. Chemical and Pharmaceutical Bulletin**., v. 61, n. 2, p. 176–183, 2013.**

BRODO, I.M., SHARNOFF, S.D., SHARNOFF, S. Lichens of North America. Yale University Press. **New Haven and London**. 795 p,2001

BROWN, T.A. Alteração do Material Genético. In: **Genética: um enfoque molecular.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, p. 135-151, 1999.

BRUNO M. et al., (+)(-)Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1834-1843, 2013.

CABARCAS-MONTALVO, M.; OLIVERO-VERBEL, J.; CORRALES-ALDANA, H. Science of the total environment genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia. **Science of the Total Environment,** v. 416, p. 208-214, 2012.

CARAZZONI, E.P. **Química de líquens**. 1 ed., Recife, FASA, p. 36, 1983.

CARLILE, M.J., WATKINSON, C.S., GOODAY, G.W. **The fungi**. 2nd edition. Academs press,2001.

CARMONA, E. R.;CREUS,A.;MARCOS,R.Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of Drosophila melanogaster. **Mutation Research**, v. 724, p. 35-40, 2011.

CARMONA,E.R; ESCOBAR,B; VALES,G; MARCOS,R. Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using thewing-spot test and the comet assay in *Drosophila.* **Mutation Research**, v. 778, p. 12-21, 2015.

CHITTURI, S., FARRELL, G.C. Herbal hepatotoxicity: an expanding but poorly defined problem. **Journal Gastroenterology and Hepatology**, v.1 5, p. 1093-1099, 2000.

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

CRAGG, M.G.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacology**, v.100, n. ½, p.72-79, 2005.

CUNHA, D. L.; NEPOMUCENO, J. C. Genotoxicidade do anastrozol avaliado por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster.* **Revista Perquirere**, v. 1, n.8, p. 79-99, 2011.

DOKE, S.K.; DHAWALE, S.C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal,** v. 23, p. 223–229, 2015.

FALCÃO, E.P.S. et al. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron1. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 4, p. 911-918, 2004.

FERNANDEZ, E. et al. Lichen metabolites as UVB filters: Lichen metabolites show photoprotector capacity. **Cosmetics and Toiletries**, v. 111, n. 12, p. 69-76, 1996.

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

FRANCHI, L. P.; GUIMARÃES, N. N.; LEHMANN, M.; ANDRADE, H. H. R.; CUNHA, K. S.. Ausência de efeito tóxico-genético de *Morinda citrifolia* (noni) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 3, p. 46-53, 2008.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo da drosófila. **Cultus**, v. 1, p. 1-171, 1949.

GAIKWAD, SUBHASH *et al*. Growth promoting effects of some lichen metabolites on probiotic bacteria. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 10, p. 2624-2631, 2014

GAIVÃO, I; SIERRA, L.M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 304, 2014.

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

GARDESTRÖM J, DAHL U, KOTSALAINEN O, MAXSON A, ELFWING T, GRAHN M, BENGTSSON B, BREITHOLTZ M. Evidence of population genetic effects of long-term exposure to contaminated sediments: a multi-endpoint study with copepods. **Aquat Toxicol** v. 86, p. 426–436, 2008.

GOUVEIA, G.R.; MARQUES, D.S.; CRUZ, B.P.; GERACITANO, L.A.; NERY, L.E.M.; TRINDADE, G.S. Antioxidant defenses and DNA damage induced by UV-A and UV-B radiation in the *Carb chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 398- 403, 2005.

GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental and Molecular Mutagenesis **, v. 6, p. 153-188, 1984.**

GRAF U.; SPANÓ M.A.; GUZMÁN RINCÓN J.; ABRAHAM S.K.; ANDRADE H.H. The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex

mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. **African Newslett on Occupational Healthand Safety**, v. 6, p. 9-13, 1996.

GRAF. U., SINGER D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 8, p. 15-27, 1992.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C. Mutação, Reparo e Recombinação. In: **Introdução à Genética**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 15, p. 439-474, 2009.

GUILLAMET, E. et al. *In vitro* DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 19, p. 129-135, 2004.

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

HALE, M.E.. How to know the lichens. 2nd edition. Smithsonian Institution,1979

HONDA, N.K.; VILEGAS, W. A química dos liquens. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 110-125,1998.

INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acesso em 13 de outubro de 2015]. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/vigilancia/, 2011.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecules of interest usnic acid. **Phytochemistry**. v. 61, p. 729-736,2002.

KOHLHARDT-FLOEHR C.; BOEHM F.; TROPPENS S.; LADEMANN J.; TRUSCOTT T.G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v**.** 101, p. 97–102, 2010.

MAES G, RAEYMAEKERS J, PAMPOULIE C, SEYNAEVE A, GOEMANS G, BELPAIRE C, VOLCKAERT F . The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. **Aquat Toxicol** v. 73, p. 99–114, 2005.

MAIA, M.B.S.; SILVA, N.H.; SILVA, E.F.; CATANHO, M.T.J.; SCHULER, A.R.P.; PEREIRA, E.C. Antinociceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from the lichen *Cladina dendroides (des Abb) Ahti*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 259-264, 2002.

MARTINS, M.C.B. **Aplicações biotecnológicas de compostos obtidos dos liquens**. Doutorado (Bioquímica e Fisiologia), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

MAYER, M., et al., Usnic acid: A non-genotoxic compound with anti-cancer properties. **Anti-Cancer Drugs.** v. 16, n. 8, p. 805-809, 2005.

MEDINA, M, CORREA, J, BARATA, C. Micro-evolution due to pollution: possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. **Chemosphere** v. 67, p. 2105–2114, 2007.

MICHELETTI, A.C. et al., Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler – isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 12-20, 2009.

MISHRA, M. et al. Genotoxicity of dichlorvos in strains of *Drosophila melanogaster* detective in DNA repair. **Mutation Research**, v. 766, p. 35-41, 2014.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 65, p**.** 157-173, 2010.

MORATORE, C.; DEVICARI, M.; CUNHA, S. S.; BARCELOS, D. Utilização de *Drosophila melanogaster* como bioindicador na avaliação da letalidade de extrato de *Nicotiana tabacum*. **Arquivos do Instituto Biologico.** v. 76, n. 3, p. 471-474, 2009.

MOUSTACCHI, E. DNA-damage and repair: consequences on dose-responses. **Mutation Research**, v. 464, p. 35-40, 2000.

MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D. K.; BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay 1. **Mutagenesis**, v. 19, p. 85-90, 2004.

MÜLLER, A. C.; PIGORSCH, S.; BEYER, C.; LAUTENSCHLÄGER, C.; DUNST, J. Radioprotective effects of amifostine *in vitro* and *in vivo* measured with the Comet Assay. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 180, n. 8, p. 517-525, 2004.

NARCISO, E. S.; NAKAGAWA, L.E. Análise de praguicidas por bioensaio com mosca *Drosophila melanogaster* e cromatografia em camada delgada. **Arquivos do Instituto Biologico***.,* v. 76, n. 2, p.313-316, 2009.

NASH III, T. H**. Lichen Biology.** Cambridge, Cambridge University Press 2ª edição, 2008.

OLIVEIRA, I. G. DE.; PEREIRA, K. C.; GUIMARÃES, C. C.; MORAES, T. N.; CHEN, L. C.; CUNHA, K. S. Avaliação comparativa dos efeitos tóxico-genéticos da própolis em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, portadoras de diferentes níveis de enzimas de metabolização. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 4, n. 1, p. 64-69, 2007.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PÄTIÄLÄ, J.; PÄTIÄLÄ, R. 1–Usnic acid and observations on its effect in human tuberculosis. **Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae**, v. 32, p. 3-22, 1954.

PODTEROB, A.P. Medicinal plants chemical composition of lichens and their medicinal applications. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 10, p. 582-588, 2008.

POWELL, J.R. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model. **Oxford Universit. Press. New York**, 1997.

PURVIS, O.W. Lichens. London, The Natural History Museum,2000.

RAND, M. D. Drosophotoxicology: the growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p. 74-83, 2010.

RANKOVIĆ et al. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 97, 2011.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN E. S. **Biologia Vegetal**. Editora Guanabara Koogan LTDA. v. 7, p. 306, 2010.

RIBEIRO, J.C.; ANDRADE, S.F.; BASTOS, J.K.; MAISTRO, E.L. Evaluation of the genotoxic potential of *Austroplenckia populnea* (Reiss) Lundell chloroform fraction from barkwood extract in rodent cells *in vivo*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 1141-1147, 2009.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003.

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. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of Microencapsulation**. v. 21, n. 4, p. 371-384, 2004.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M. S.; JORDÃO, B. Q. Detection of genotoxicity of water from an urbanized stream, in *Corbicula fluminea* (Mollusca) (*in vivo*) and CHO-K1 Cells (*in vitro*) using Comet Assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 59, p. 31-38, 2010.

ROCHA, L. D. L. S.; FARIA, J. C. N. M.; CRUZ, A. H. S.; REIS, A. A. S.; SANTOS, R. S.. *Drosophila*: um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de Genética. **Scire Salutis**, v. 3, n. 1, p. 37-48, 2013.

SANSEVERINO, M.T.V. et al. Manual de teratogênese. **Editora da Universidade** 556 p. 2005.

SANTANA S.L. O ensaio cometa em *Drosophila melanogaster* como bioindicador da poluição atmosférica em uma área urbana e rural. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

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

SEGATORE, A. B. et al., *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytochemistry**, v. 19, p. 341-347, 2012.

SHARMA, A.; SHUKLA, A.K.; MISHRA, M.; CHOWDHURI, D.K. Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. **Mutation Research**, v. 721, p. 142-146, 2011.

SHUKLA, A.K.; PRAGYA, P.; CHOWDHURI, D.K. A modified alkaline Comet assay for *in vivo* detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 726, p. 222-226, 2011.

SIDDIQUE, H.R.; GUPTA, S.C.; DHAWAN, A.; MURTHY, R.C.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 46, p. 189-197, 2005.

SILVA, E.J**. Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar**. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente). Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

SILVA, J. O uso do Ensaio Cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na Escola,** v. 2, p. 30-33, 2007.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade do Rio Grande do Sul, 5ª edição, 404 p. 2004.

SINGH, N.P.; McCOY M.T.; TICE R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research,** v.175, p. 184-191,1988**.**

SIVIERO, F.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Mutagênese Carcinogênese, In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**, 3ª ed, São Paulo, Atheneu, p.83-86, 2008.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M.J. Mutação, Reparo do DNA e Recombinação. In: **Fundamentos de Genética.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 14, p. 312-314, 2001.

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

STOCKER-WÖRGÖTTER E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. **Natural Product Reports** v. 25, p. 188–200, 2008.

TUROLLA, M.S., NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p.289-306, 2006.

VALENCIA, M.C.; CEBALLOS, J.A. **Hongos liquenizados**. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2002.

VARTIA, K.O.; TERVILA, L. D-Lichesteric acid, effect *in vivo* on pigmented mice with inoculation tuberculosis. **Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae.,** v. 1, p. 76-78, 1952.

VERÇOSA, C.J. **Aplicação do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação da genotoxicidade ambiental.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, 2015.

VICARI, T.; FERRARO, M.V.M.; RAMSDORF, W.A.; MELA, M.; RIBEIRO, C. A.O.; CESTARI, M.M.A. Ecotoxicology and environmental safety genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH3 Hgþ) in *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 47–55, 2012.

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; REDDY, M.K.; PARVATHAVARTHINI,S.; KUNDU, A B.;SUKUMAR, E. Anti-inflamtory activity of (+) –unisc acid. **Fitoterapia**, v. 71, p 564-566, 2000.

WEBSTER, J., WEBER, R.W.S. Introduction to Fungi. 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge,2007

WILL-WOLF, S., HAWKSWORTH, D.L., MCCUNE, B., ROSENTRETER, R., SPIMAN, J.M. Lichenized Fungi. In: Mueller. G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. (eds) **Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods***.* Elsevier, Amsterdam, pp. 173-195,2004.

XAVIER-FILHO, L. Inibição Fotooxidativa de b-Caroteno por Cloroatranorina de Parmelia tinctorum Nyl. João Pessoa: UFPB.Tese de Titular - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB,1989.

YAUK C, FOX G, MCCARRY B, QUINN J. Induced minisatellite germline mutations in herring gulls (*Larus argentatus*) living near steel mills. **Mutation Research.,** v. 452, p. 211–218, 2000.