



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA APARECIDA DA CONCEIÇÃO DE LIRA

**ESTUDO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DE PARMELIACEAE, DO ÁCIDO
SALAZÍNICO E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTITUMORAL**

RECIFE
2021

MARIA APARECIDA DA CONCEIÇÃO DE LIRA

**ESTUDO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DE PARMELIACEAE, DO ÁCIDO
SALAZÍNICO E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTITUMORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Química para Saúde

Orientador: Prof. Dr. Sebastião José de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

RECIFE
2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Lira, Maria Aparecida da Conceição de

Estudo da toxicidade de extratos de Parmeliaceae, do ácido salazínico e avaliação do seu potencial antitumoral / Maria Aparecida da Conceição de Lira - 2021.

171 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Sebastião José de Melo

Coorientador: Emerson Peter da Silva Falcão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Líquen 2. Neoplasia 3. Parmotrema

I. Melo, Sebastião José de (Orientador) II. Falcão, Emerson Peter da Silva (Coorientador) III. Título

579.7 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-179

MARIA APARECIDA DA CONCEIÇÃO DE LIRA

**ESTUDO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DE PARMELIACEAE, DO ÁCIDO
SALAZÍNICO E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTITUMORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 18/01/2021.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Sebastião José de Melo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão (Coorientador)
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira (Examinador Externo)
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior (Examinador Externo)
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho a toda minha família, em especial a minha mãe Tereza e ao meu pai Francisco (*in memoriam*) por todo amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e por estar sempre comigo frente as minhas dificuldades diárias e também pelas grandes bênçãos concedidas.

A minha família pelo incentivo diário, em especial a minha mãe Tereza Severina de Lira, pelo todo seu esforço, por ter me dado possibilidades de estudar e nunca deixar que eu desestisse dos meus objetivos e ao meu pai Francisco Antônio de Lira (*in memoriam*) por ter me mostrado os princípios básicos da vida e por ter acreditado no meu potencial. Agradeço também aos meus irmãos Raquel Lira e Ricardo Lira e aos meus sobrinhos queridos, por me mostrarem o verdadeiro sentido da vida. Sou muito grata pelo incentivo do meu esposo Jarderson Ferreira e por estar sempre ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Sebastião José de Melo, por ter aceitado me orientar durante toda essa jornada, agradeço pelos conselhos e por todo seu incentivo. Sou grata também ao coorientador Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão por ter extrema dedicação com este trabalho, por ter contribuído de maneira expressiva para os meus conhecimentos científicos.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior (colaborador) por ter me recebido em seu laboratório, ter contribuído de forma direta nos ensaios histológicos, ter investido e acreditado no meu trabalho durante todo trajeto percorrido e por todos os seus conselhos e incentivo.

A Profa. Dra. Lourdes Lacerda Buril (colaboradora) pela identificação das espécies liquênicas e por suas colaborações.

A Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira (colaboradora) por ter me aceitado em seu laboratório e também como aluna de estágio acadêmico, sou muito grata pela sua dedicação comigo e por seu companheirismo.

A Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos (colaboradora) por ter aceitado colaborar com esse trabalho e contribuído de forma direta nos experimentos com os animais.

Ao Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti e ao MSc. Erick Caique Santos Costa (colaboradores) por contribuírem com as análises *in situ* deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira das Neves por todos seus conselhos e incentivos que foram de grande importância no início desta trajetória.

A toda equipe da secretaria da Pós-Graduação de Ciências Biológicas pelo acompanhamento prestado, em especial Adenilda.

As Doutoradas Tamiris Alves Rocha, Marllyn Marques da Silva e Danielle Moura Feijó (colaboradoras) por todo companheirismo e dedicação durante os processos experimentais deste trabalho e pela sincera amizade.

A todos que fazem parte do grupo de pesquisa de Síntese e Isolamento Molecular, Dr. André Severino da Silva, MSc. Gerliny Bezerra de Oliveira, MSc. Cristiane Maria da Conceição e MSc Gleybson Correia de Almeida pelos incentivos, conselhos e por todo companheirismo.

Aos alunos de graduação que forneceram contribuições durante as fases experimentais desta pesquisa, Luana Cristina, Luana Carla, Hugo Amaral, Wanessa Silva, Carla Jamylle, Matheus e Bruna Barbosa.

A colega de turma Marcela Sobral, por toda atenção, conselhos e incentivos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação - Propesq / UFPE, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desta conquista.

Muito obrigada!

“Para mim, o papel mais importante da arte e da ciência consiste em despertar e manter desperto o sentimento dela naqueles que lhe estão abertos” (EINSTEIN, 1981, p.13).

RESUMO

Líquens são organismos que surgiram através de uma associação entre um fungo e uma alga, cujos metabólitos secundários são amplamente descritos pelo seu potencial biológico. Este trabalho descreve a avaliação da composição fenólica, através de técnicas cromatográficas em camada delgada e líquida de alta eficiência, dos extratos orgânicos das espécies de *Parmotrema concurrens* e *P. flavescens*, e do ácido salazínico, isolado do extrato acetônico de *P. concurrens*, bem como a avaliação da atividade citotóxica, com linhagens celulares de Sarcoma-180, macrófago J774 e MDA-MB-231, também a avaliação das atividades de toxicidade aguda e antitumoral em camundongos Albinos Swiss e, por fim, o estudo *in silico* da relação ao acoplamento do ácido salazínico e a timidilato sintase. Os resultados demonstraram a presença de atranorina e dos ácidos úsnico e salazínico nos extratos das espécies de Parmeliaceae estudadas. Os extratos clorofórmico e acetônico de *P. concurrens* e, etéreo e clorofórmico de *P. flavescens* apresentaram níveis elevados de viabilidade celular para linhagens de macrófago J774. As substâncias estudadas não apresentaram toxicidade sistêmica severa aos camundongos em estudo. O composto isolado, ácido salazínico, apresentou um elevado nível de pureza (94%). Sua estrutura química foi confirmada através de Ressonância Magnética de Hidrogênio e Carbono 13. O composto não foi citotóxico para as linhagens de Sarcoma-180 e MDA-MB-231. A avaliação sistêmica do ácido salazínico apresentou leves danos ao nível tecidual e o composto não foi considerado um agente hepatoprotetor, observação feita através de análises qualitativas. O extrato etéreo da *P. flavescens* foi considerado citotóxico para Sarcoma-180, apresentando percentuais de viabilidade celular de $36,51\% \pm 4,85$ e $20,55\% \pm 3,02$ nos períodos de 24 e 48 h, respectivamente, na dose de 200 µg/mL. Os ensaios de atividade antitumoral do extrato etéreo de *P. flavescens* e do ácido salazínico, apresentaram percentuais de inibição tumoral entre 70% e 86%, respectivamente, contra 65% de inibição do controle positivo, 5-Fluorouracil. Através das análises *in silico*, foi possível comprovar que o ácido salazínico atua formando ligações com importantes resíduos do sítio ativo da timidilato sintase. Em conclusão, os compostos liquênicos derivados das espécies de Parmeliaceae, comprovaram não ser tóxico para macrófagos; o ácido salazínico não foi considerado citotóxico para células neoplásicas, porém no teste *in vivo*, tanto o ácido salazínico, como o extrato etéreo apresentaram-se como agentes tóxicos, para Sarcoma-180, mostrando serem

eficazes no tratamento tumoral. E possivelmente a ação do ácido salazínico está relacionada ao mesmo mecanismo de ação do 5-Fluorouracil, através da inibição da timidilato sintase.

Palavras-chave: líquen; neoplasia; *Parmotrema*.

ABSTRACT

Lichens are organisms that arose through an association between a fungus and algae, whose secondary metabolites are widely described by their biological potential. This work describes the evaluation of the phenolic composition, using high efficiency thin and liquid chromatographic techniques, of the organic extracts of the species of *Parmotrema concurrens* and *P. flavescens*, and of salazinic acid, isolated from the acetonic extract of *P. concurrens*, as well as the evaluation of the cytotoxic activity, with cell lines of Sarcoma-180, macrophage J774 and MDA-MB-231, also the evaluation of the activities of acute toxicity and antitumor in Albino Swiss mice and, finally, the *in silico* study of the relation to the coupling of salazinic acid and thymidylate synthase. The results demonstrated the presence of atranorin and the only and salazinic acids in the extracts of the studied Parmeliaceae species. The chloroformic and acetonic extracts of *P. concurrens* and ethereal and chloroformic of *P. flavescens* presented high levels of cell viability for macrophage strains J774. The studied substances did not present severe systemic toxicity to the studied mice. The isolated compound, salazinic acid, showed a high level of purity (94%). Its chemical structure was confirmed by Magnetic Resonance of Hydrogen and Carbon 13. The compound was not cytotoxic for the strains of Sarcoma-180 and MDA-MB-231. The systemic evaluation of salazinic acid showed slight damage at the tissue level and the compound was not considered a hepatoprotective agent, an observation made through qualitative analyzes. The ether extract of *P. flavescens* was considered cytotoxic for Sarcoma-180, with cell viability percentages of $36.51\% \pm 4.85$ and $20.55\% \pm 3.02$ in the 24 and 48 h periods, respectively, in the dose 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The tests for antitumor activity of the ethereal extract of *P. flavescens* and salazinic acid, showed tumor inhibition rates between 70% and 86%, respectively, against 65% inhibition of the positive control, 5-Fluorouracil. Through *in silico* analyzes, it was possible to prove that salazinic acid acts forming bonds with important residues of the active site of thymidylate synthase. In conclusion, the lichenic compounds derived from the species of Parmeliaceae, proved not to be toxic to macrophages; salazinic acid was not considered cytotoxic to neoplastic cells, however in the *in vivo* test, both salazinic acid and ether extract were shown to be toxic agents for Sarcoma-180, showing to be effective in tumor treatment. And possibly the action of salazinic acid is related to the same mechanism of action as 5-Fluorouracil, through the inhibition of thymidylate synthase.

Key-words: lichen; neoplasia; *Parmotrema*.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1	—	Formação tumoral	23
Figura 2	—	Diferenciação celular a partir da célula-tronco	24
Figura 3	—	Estágios da formação tumoral	25
Figura 4	—	Fotomicrografia do Sarcoma-180	27
Figura 5	—	Estrutura química do 5-Fluorouracil	30
Figura 6	—	Grupos morfológicos dos diferentes talos liquênicos	33
Figura 7	—	Espécies de Parmeliaceae aderidas sobre rocha	34
Figura 8	—	<i>Parmotrema concurrens</i> (Hale)	35
Figura 9	—	<i>Parmotrema flavescens</i> (Kremp.) Hale	36
Figura 10	—	Estrutura química do ácido salazínico	37

ARTIGO I

Figura 1	—	Figura esquematizando as cromatografias em CCD dos extratos liquênico estudados	52
Figura 2	—	Cromatogramas em CLAE dos extratos liquênico	53
Figura 3	—	Viabilidade celular de macrófagos J774 frente aos extratos liquênico	54
Figura 4	—	Fotomicrografias representativas do baço, fígado e rim de camundongos expostos ao extrato etéreo de <i>Parmotrema concurrens</i> (EC1) e do grupo controle negativo	61

ARTIGO II

Figura 1	—	Cromatogramas em CLAE do SAL isolado da <i>Parmotrema concurrens</i> (A); padrão do SAL (B)	79
Figura 2	—	Estrutura química do ácido salazínico	79
Figura 3	—	Viabilidade celular de linhagens de MDA-MB-231 e S-180 frente ao SAL	80
Figura 4	—	Peso corporal	82
Figura 5	—	Crescimento tumoral (mg/kg)	85
Figura 6	—	Inibição tumoral (%)	86

Figura 7	—	Fotomicrografia representativas do tumor S-180 de camundongos tratados com SAL e 5-FU	89
Figura 8	—	Metabólitos do SAL (D1-5) e suas respectivas reações	93
Figura 9	—	Cluster dos ligantes e a hTS destacando as subunidades A e B	94
Figura 10	—	Interações entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da hTS e os derivados metabólitos do SAL	96
Figura 11	—	RMSD dos átomos de C α da TS e complexado aos compostos; dos átomos de C α dos compostos e RMSF dos átomos de C α da TS e complexado aos compostos	98
Figura 12	—	Metabólitos do SAL (D1-5) e suas respectivas reações	99

ARTIGO III

Figura 1	—	Photomicrograph of the histological section of the liver of mice exposed to S-180	123
Figura 2	—	Photomicrograph of histological section of the liver of mice exposed to S-180	124

ARTIGO IV

Figura 1	—	Viabilidade celular de linhagens de S-180 ao extrato etéreo de <i>P. flavescens</i>	132
Figura 2	—	Peso corporal	133
Figura 3	—	Crescimento tumoral (mg/kg)	136
Figura 4	—	Inibição tumoral (%)	137

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1	—	Parâmetros bioquímicos analisados do sangue de camundongos expostos aos extratos liquênicos	57
Tabela 2	—	Peso relativo dos órgãos de camundongos expostos aos extratos liquênico	58
Tabela 3	—	Análise histomorfométrica do rim, baço e fígado de camundongos expostos aos extratos liquênico	60

ARTIGO II

Tabela 1	—	Índice de ganho de peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos com tumor S-180 e tratados com SAL e com 5-FU	82
Tabela 2	—	Parâmetros bioquímicos analisados de camundongos expostos ao tumor S-180 e tratados com SAL e com 5-FU	84
Tabela 3	—	Análise histomorfométrica do fígado, rim e baço de camundongos expostos ao tumor S-180 e tratados com SAL e com 5-FU	91
Tabela 4	—	Ranking dos compostos baseando-se nas médias do docking consenso	95

ARTIGO III

Tabela 1	—	Analysis of the weight of livers and animals exposed to treatment with salazinic acid and enzymatic activity of transaminases	122
Tabela 2	—	Qualitative histopathological analysis of the liver of mice exposed to S-180	123

ARTIGO IV

Tabela 1	—	Índice de ganho de peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos com tumor S-180 e tratados com extrato etéreo de <i>Parmotrema flavescens</i> e com 5-FU	134
Tabela 2	—	Análise dos parâmetros bioquímicos dos camundongos com o tumor S-180 e tratados com extrato etéreo de <i>Parmotrema flavescens</i> e com 5-FU	135

Tabela 3 —	Análise histomorfométrica do fígado, rim e baço de camundongos com o tumor S-180 e tratados com extrato etéreo de <i>Parmotrema flavescens</i> e com 5-FU	140
------------	---	-----

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATR	Atratorina
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
DP	Desvio Padrão
EC1	Extrato etéreo de <i>P. concurrens</i>
EC2	Extrato clorofórmico de <i>P. concurrens</i>
EC3	Extrato acetônico de <i>P. concurrens</i>
EF1	Extrato etéreo de <i>P. flavescens</i>
EF2	Extrato clorofórmico de <i>P. flavescens</i>
EF3	Extrato acetônico de <i>P. flavescens</i>
FdUMP	5-Fluoro-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato
hTS	Timidilato sintase humana
H&E	Hematoxilina e eosina
IC ₅₀	Concentração inibitória máxima
MTT	Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NF-KB	Nuclear factor-kB
Nrf2	Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
Ns	Nanosegundo
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PPAR-α	Peroxisome proliferator-activated-α
Rf	Fator de retenção
RMN-C ¹³ e H ¹	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio
RMSD	Deslocamento médio da raiz quadrada
RMSF	Flutuações médias da raiz quadrada
S-180	Sarcoma-180
SAL	Ácido salazínico
SALP	Ácido salazínico purificado
Tr	Tempo de retenção
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UI	Unidade Internacional
U/L	Unidade por litro
USN	Ácido úsnico
5-FU	5-Fluorouracil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	OBJETIVOS.....	21
1.1.1	Objetivo Geral	21
1.1.2	Objetivos Específicos.....	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER.....	22
2.1.1	Formação das células cancerígenas	23
2.1.2	Sarcoma-180 (S-180)	26
2.2	TERAPIAS TRADICIONAIS NO COMBATE AO CÂNCER	27
2.2.1	5-Fluorouracil	29
2.3	PRODUTOS NATURAIS	30
2.4	FUNGOS LIQUENIZADOS	31
2.4.1	Família Parmeliaceae	33
2.4.1.1	<i>Parmotrema concurrens</i> (Hale)	34
2.4.1.2	<i>Parmotrema flavescens</i> (Kremp.) Hale.....	35
2.4.2	Ácido Salazínico	36
2.5	POTENCIAL BIOLÓGICO DOS LIQUENS.....	37
2.5.1	Metabólitos liquênicos utilizados no tratamento de neoplásias	39
2.6	MÉTODOS COMPUTACIONAIS.....	42
2.6.1	Docking molecular	42
2.6.2	Dinâmica molecular	43
3	ARTIGO I — Estudo da toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos extratos de <i>Parmotrema concurrens</i> e <i>P. flavescens</i> (líquen).....	45
4	ARTIGO II — Avaliação do potencial citotóxico, antitumoral e estudo <i>in silico</i> do ácido salazínico isolado da <i>Parmotrema concurrens</i> (líquen)	68
5	ARTIGO III — Histological evaluation of the liver of mice with sarcoma-180 treated with salazinic acid	109
6	ARTIGO IV — Avaliação do potencial antitumoral do extrato etéreo do líquen <i>Parmotrema flavescens</i>	125
7	CONCLUSÃO	147
	REFERÊNCIAS	148

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	157
ANEXO B - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA - <i>P. flavescens</i>	158
ANEXO C - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA - <i>P. concurrens</i>	159
ANEXO D - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO .	160
ANEXO E - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 .	163
ANEXO F - COORIENTAÇÃO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO.....	164
ANEXO G - COLABORAÇÃO DE PROJETO - PIBIC	165
ANEXO H - COLABORAÇÃO DE PROJETO - PIBIC	166
ANEXO I - COLABORAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA	167
ANEXO J - COLABORAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA	168
ANEXO K - CARTA DE DECISÃO DA REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS	169

1 INTRODUÇÃO

Ainda que muitos avanços científicos estão a surgir, inúmeras doenças continuam a causar grandes danos na qualidade de vida das pessoas. Além do mais, os efeitos adversos de muitas terapias representam um grande obstáculo à tolerabilidade e aderência a qualquer tratamento (MUN et al., 2018). Contudo, montar um plano terapêutico completo, com alta eficácia e mínimos efeitos colaterais é importante para obtenção da cura (WANG, LEI e HAN, 2018).

A natureza sempre forneceu muitos modelos moleculares que fundamentam estudos biológicos e inspiraram o desenvolvimento de novos compostos bioativos (VIEGAS JR; BOLZANI e BARREIRO, 2006) na pesquisa científica. A enorme biodiversidade e o grande potencial biotecnológico do Brasil, justificam o desenvolvimento por pesquisas que visem a descoberta de novas biomoléculas ativas, baseadas em produtos naturais, uma vez que as fontes, ainda disponíveis, oferecem as melhores possibilidades para a busca de substâncias de interesse terapêutico (COSTA- LOTUFO et al., 2010).

O estudo dos líquens ou fungos liquenizados, teve início no Brasil em meados do século XIX, com a chegada de estrangeiros, os quais realizaram as primeiras coletas de espécimes da fauna e flora encontrados em território brasileiro (BENATTI, 2013). Entretanto, os componentes liquênicos ainda são poucos estudados no país, principalmente na região Nordeste, devido à falta de especialistas brasileiros na taxonomia desses organismos (CÁCERES et al., 2014).

Os fungos liquenizados são definidos como organismos simbióticos, compostos pela associação entre um micobionte e um fotobionte (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996). Produzem diversas substâncias necessárias à sua sobrevivência. Estas moléculas são divididas em metabólitos primários (produtos intracelulares) e compostos ideais para a sua defesa contra predadores, os metabólitos secundários (produtos extracelulares) (HALE-JR, 1983; COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002).

Os metabólitos de origem primária compreendem carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas, enquanto que os de origem secundária são divididos em quatro grupos bioenergeticamente relacionados: depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos e ácidos úsnicos (CULBERSON, 1972; HALE-JR, 1983; NASH III, 1996).

Esses compostos vêm sendo estudados quanto ao seu potencial biológico (RANKOVIC´ e KOSANIĆ, 2015) por pesquisadores de todo o mundo. Muitas destas biomoléculas foram comprovadas quanto ao seu potencial contra células do câncer (ZUGIC et al., 2016), atuando na resposta inflamatória do organismo (OETTL et al., 2013), na ação antifúngica (BASILE et al., 2015), expectorante (ALVES et al., 2014), antioxidante (SAHIN et al., 2015), antiviral (VU et al., 2015), larvicida contra *Leishmania infantum chagasi* (LUZ et al., 2015) e *Aedes aegypti* (MOREIRA et al., 2016) e muitas outras.

Portanto, diante da necessidade de se encontrar novas substâncias bioativas para fins terapêuticos, associada à escassez de dados sobre o potencial biológico de espécies liquênicas existentes na região Nordeste do Brasil, mais especificamente o agreste de Pernambuco, este trabalho se propôs a realizar uma investigação sobre a possível ação tóxica *in vitro* e *in vivo*, e atividade antitumoral de duas espécies de Parmeliaceae coletadas em Pernambuco – Brasil.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a eventual toxicidade *in vitro* e *in vivo* dos extratos de *P. flavescens*, *P. concurrens* e do ácido salazínico, isolado da *P. concurrens*, bem como seu potencial antitumoral e avaliação da relação de acoplamento do ácido salazínico na timidilato sintase.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Obter os extratos orgânicos etéreo, clorofórmico e acetônico do talo *in natura* das espécies de Parmeliaceae;
- b) Isolar e identificar o ácido salazínico, produzido pelo líquen *P. concurrens*;
- c) Analisar a composição dos extratos orgânicos das espécies estudadas e a pureza do ácido salazínico isolado, através das técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- d) Confirmar a estrutura química do ácido salazínico através de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13;
- e) Avaliar a citotoxicidade dos compostos liquênicos frente as linhagens sadias (macrófagos) e tumorais (MDA-MB-231 e Sarcoma-180);
- f) Avaliar a eventual toxicidade aguda das substâncias liquênicas em camundongos Albinos *Swiss*;
- g) Avaliar a ação das substâncias liquênicas no tumor Sarcoma-180 em camundongos Albinos *Swiss*;
- h) Analisar a relação de acoplamento do ácido salazínico na timidilato sintase.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

A nomenclatura câncer designa um conjunto de mais de 100 patologias que tem em comum o crescimento celular descontrolado. Estas células são capazes de instalar-se em tecidos e órgãos, podendo causar tumorações malignas e até mesmo metástase (INCA, 2020). Várias causas podem ter relação com o surgimento da doença, como a ativação da oncogênese, inativação de genes supressores de tumores, mutagênese provocada por fatores externos e alterações epigenéticas (SANT'ANNA et al., 2018).

A formação do tecido neoplásico é um processo altamente complexo, que envolve alterações no DNA, inflamação crônica, extensa interação entre vias moleculares relevantes, e comunicação com células de tecidos próximos (KAPINOVA et al., 2018). A neoplasia configura um mosaico de células que sofreram mutações e são extremamente competitivas por espaço e recursos, sendo capazes de enganar o sistema imunológico para permanecer colonizando diversos tecidos do organismo (MERLO, 2006).

As células cancerígenas possuem crescimento e divisão bem mais acelerados do que as células normais, exibem ainda alterações em seu metabolismo que as diferenciam das saudáveis. Essas células ainda promovem processos químicos que são capazes de utilizar os nutrientes disponíveis, para garantir sua sobrevivência e desenvolvimento. Essa evolução permite a explicação da agressividade do câncer, e de como é difícil conseguir a cura (MERLO, 2006; ANASTASIOU, 2016; WANG, LEI e HAN, 2018).

Outro aspecto importante de ser analisado é o microambiente onde estas células estão inseridas, pois este fornece dados essenciais sobre sua fisiologia, estrutura e funcionamento. Assim, o ambiente em que as células tumorais surgem é capaz de influenciar seu metabolismo, fazendo com que possa ocorrer uma progressão dos aspectos malignos, interferindo no crescimento desordenado, invasão e metástase (ANASTASIOU, 2016; WANG, LEI e HAN, 2018).

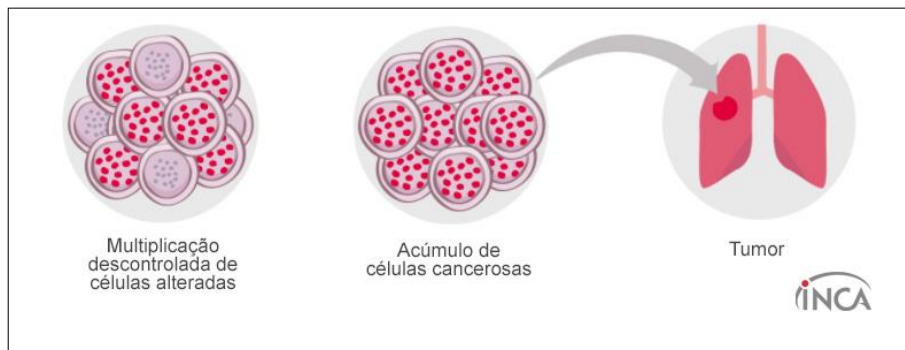
Embora essas informações sejam reconhecidas, dados sugerem que fatores extrínsecos também podem influenciar as propriedades metabólicas tumorais. Além disso, algumas dessas características são determinadas pelo fator genético, o que

torna difícil a compreensão de apenas um perfil metabólico, visto que existe uma constante evolução dentro do microambiente onde a neoplasia está inserida. Contudo, a necessidade de compreender o desenvolvimento das células neoplásicas torna-se essencial para direcionamento de procedimentos terapêuticos, e até mesmo de prevenção (ANASTASIOU, 2016).

2.1.1 Formação das células cancerígenas

O surgimento da neoplasia se dá a partir de alterações na estrutura do DNA, gerando mutações que são capazes de causar instruções erradas na atividade celular, fazendo com que ocorra danos em suas funções. A proliferação dessa nova linhagem pode causar a formação de tumores que podem ser agressivos ao tecido (Figura 1). Em alguns casos, essas células tendem a invadir vasos sanguíneos e/ou linfáticos e se espalhar rapidamente para outros tecidos do organismo, onde elas começam a crescer e formar novos tumores (INCA, 2020; BRASIL, 2020).

Figura 1- Formação tumoral



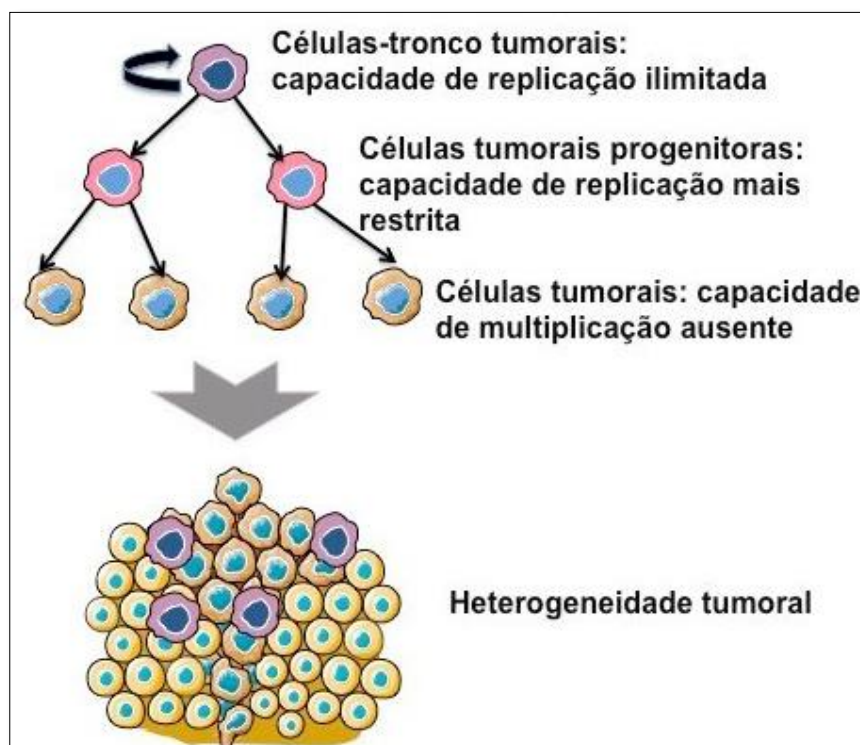
Fonte: INCA, 2020

Pesquisas mostram que o desenvolvimento dessas mutações em células não diferenciadas, combinadas com sua alta capacidade proliferativa, as transformam em células com a capacidade de se auto replicar, chamadas de células-tronco tumorais (MODOLO, 2017).

As células-tronco tumorais são caracterizadas por apresentarem auto renovação ilimitada, que é a capacidade de produzir células iguais a célula-original e, também por serem pluripotentes, geram diferentes tipos celulares. Porém, ao sofrer divisão, criam progenitores comprometidos, com um potencial de proliferação limitado

e com uma capacidade restrita de diferenciação. Nesse momento, sua morfologia já está definida e sua capacidade de proliferação é muito limitada ou até mesmo nula (Figura 2) (PARAGUASSÚ-BRAGA e BONOMO, 2004; THIAGO, 2006).

Figura 2- Diferenciação celular a partir da célula-tronco tumoral



Fonte: MODOLO, 2017

As células-tronco tumorais podem desempenhar um papel crucial no metabolismo tecidual necessário para a evolução do câncer. Além disso, sua proliferação depende de um microambiente específico que possibilita seu potencial de auto renovação e diferenciação celular. Deste modo, tumores podem apresentar células em estágios diferentes de proliferação e diferenciação, assim colaborando para sua heterogeneidade (MODOLO, 2017; THIAGO, 2006).

A ação dessas células exerce um aspecto essencial na resistência à quimioterapia, no ressurgimento do câncer após o tratamento e na manifestação de metástases (MODOLO, 2017). Assim, o entendimento sobre as diferentes vias moleculares ativadas nessas células, bem como o conhecimento do seu microambiente tecidual, é importante para o desenvolvimento de novas terapias específicas capazes de ser direcionadas ao alvo de interesse, com isso, causando

menos efeitos danosos e mais hábeis na indução a morte celular, diminuindo a possível incidência de ressurgimento celular (THIAGO, 2006).

Em relação à formação tumoral, em muitos casos, esse mecanismo de proliferação celular, ocorre de forma lenta, podendo levar até anos para que uma célula cancerígena origine um tumor. Durante esse processo ocorrem algumas etapas (INCA, 2020):

Estágio de Iniciação: Nessa fase as células sadias recebem ação de um agente carcinogênico (sulfato de dimetila, metilnitrossuréia, cloreto de vinila, aflatoxinas, dimetilnitrosoamina e benzopireno) que provoca modificações estruturais em alguns genes alterando funções celulares;

Estágio de promoção: As células passam a sofrer os efeitos dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. É nesse estágio onde ocorre a transformação em célula maligna, sendo de forma lenta e gradual;

Estágio de progressão: Nesse momento ocorre a multiplicação desordenada e evolução da doença (Figura 3).



Fonte: INCA, 2020

No que se refere ao câncer, a classificação se dá de acordo com as características das células sadias que os originaram (ALMEIDA et al., 2005):

Carcinoma: É considerado o mais comum, originado dos epitélios de revestimento externo e interno. Quando a origem do epitélio é glandular, passa a ser chamado de adenocarcinoma;

Sarcoma: É originado de tecidos conjuntivos (mesenquimais);

Linfomas: Origina-se nos linfócitos, células que agem no funcionamento do sistema imunológico e

Leucemia: Este tipo de câncer origina-se de células que formam a medula óssea.

2.1.2 Sarcoma-180 (S-180)

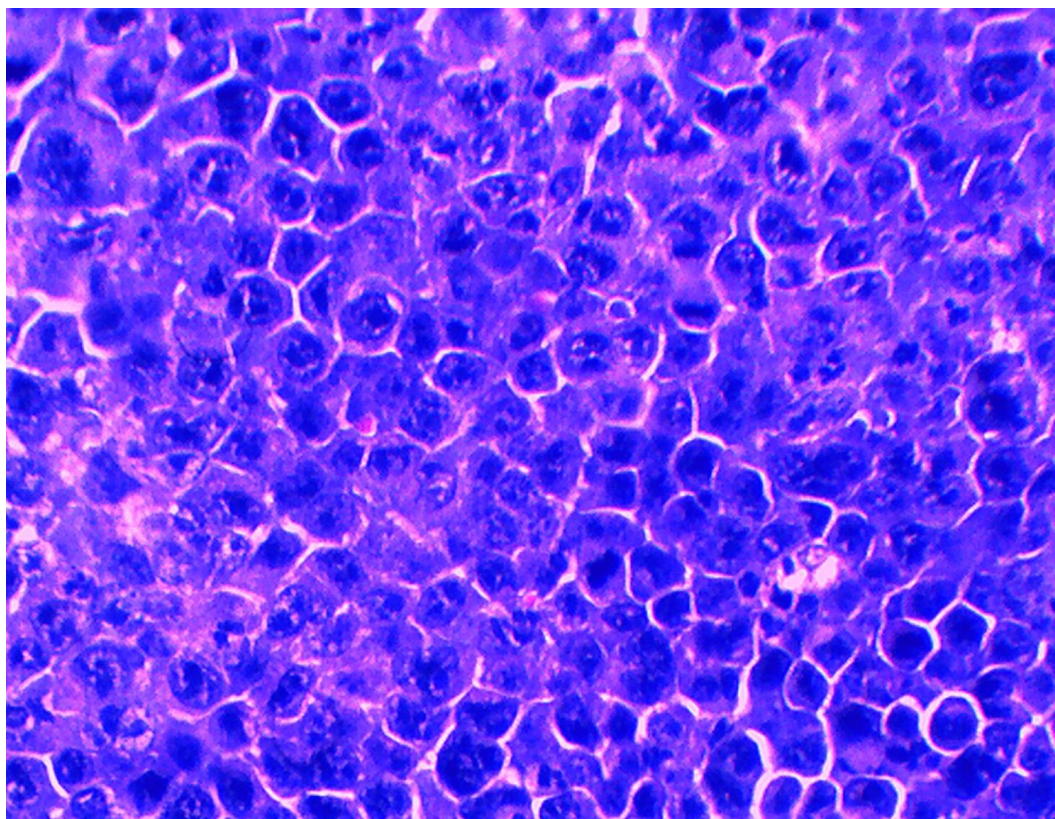
Dos muitos modelos de experimentação tumoral com camundongos, o S-180 é amplamente utilizado, sendo considerado um modelo válido para determinação do potencial tóxico e antitumoral de moléculas e extratos (SILVA, NASCIMENTO e PORTO, 2019).

O S-180, também conhecido como tumor de Crocker foi descoberto em 26 de outubro de 1914, por W. H. Woglom no Laboratório Crocker, nos Estados Unidos. O tumor espontâneo foi visto na axila direita de um camundongo macho de cor branca. Foi classificado, inicialmente, como um carcinoma, através de análises feitas com microscopia. Foram vistos contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, porém depois de inúmeros transplantes subcutâneos, verificou-se que sua origem se deu a partir de tecido conjuntivo, sendo então classificado como sarcoma (SUGIURA e STOC, 1952).

São células que têm uma alta taxa de proliferação; sete dias após o transplante, os tumores chegam a atingir um tamanho de aproximadamente 15x11x8 mm, possuem uma ampla gama de metástases conseguindo infiltrar outros tecidos adjacentes. É uma linhagem de fácil manutenção em laboratório por meio de repicagens intraperitoneais (SUGIURA e STOC, 1952; DEBNATH et al., 2017).

As células do S-180 possuem características de células pleomórficas e anaplásicas, núcleos hipercromáticos e com vários graus de pleomorfismo e alta taxa de proliferação (Figura 4).

Figura 4- Fotomicrografia do Sarcoma-180



Tecido tumoral retirado de camundongo Albino Swiss; coloração H&E com ampliação de 400x
Fonte: Autora

O S-180 é atualmente considerado um tumor válido para avaliar a atividade antitumoral, pois possui versatilidade morfológica de forma ascítica ou sólida, dependendo do local de inserção, além de sua alta agressividade ao organismo. Possui um uso efetivo para aplicabilidade em estudos pré-clínicos de substâncias naturais ou sintéticas. A utilização dessa linhagem celular *in vitro* e *in vivo* é suficiente para comprovar o potencial antitumoral da molécula testada (SILVA, NASCIMENTO e PORTO, 2019).

2.2 TERAPIAS TRADICIONAIS NO COMBATE AO CÂNCER

O câncer ainda é um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Pesquisas mostram que as desigualdades socioeconômicas têm total relação com o grande número de casos da doença. Cidades mais pobres ainda enfrentam casos da doença que poderiam ser evitados. A falta de informações sobre a prevenção e os

cuidados para se ter uma vida saudável, leva as pessoas a terem uma maior exposição aos fatores de risco que causam a doença (SIEGEL, 2019).

Investimentos em saúde pública e estratégias de tratamentos podem salvar vidas. Contudo, uma estratégia muito importante para o tratamento de neoplasias, é a escolha da terapia adequada, sendo fundamental para o processo de cura. Esses métodos terapêuticos são aperfeiçoados com o passar dos tempos, garantindo em muitos casos, resposta satisfatória contra o câncer, seus diversos tipos e graus de estágio (WANG, LEI e HAN, 2018).

Ainda que grandes avanços científicos estão a surgir, o câncer continua a ser uma das principais causas de mortalidade. Além do mais, os efeitos adversos das terapias representam uma grande adversidade à tolerabilidade e aderência ao tratamento (MUN et al., 2018). Portanto, montar um plano terapêutico completo com o propósito de ter um resultado satisfatório é importante para se obter a cura. Porém, quando isso não se torna possível, o plano deve se voltar para suprimir a doença em um estado subclínico, oferecendo uma melhor qualidade de vida ao paciente (WANG, LEI e HAN, 2018).

Sendo assim, a terapia no combate as neoplasias malignas se dá por meio de uma ou mais modalidades/técnicas de tratamento combinadas, dependendo da sua localização, tipo, condição clínica do paciente e a extensão da doença. Não é fácil tratar o câncer, pode exigir meios agressivos tanto para as células cancerígenas, quanto às normais. Cada intervenção tem seus próprios efeitos adversos. Porém, esses danos podem desaparecer com o final do tratamento e, as células saudáveis tendem a recuperar-se (BRASIL, 2020).

Em adição, a principal intervenção para eliminar tumores, benignos ou malignos, é feita através da retirada total do tumor, através de procedimentos cirúrgicos. Outras técnicas também são necessárias, como a quimioterapia, que pode ser realizada antes ou depois da retirada do tecido afetado, e a radioterapia. Muitas vezes esses tratamentos são em conjunto, dependendo do estágio do câncer e estado clínico do paciente (WANG, LEI e HAN, 2018).

Fazer a remoção completa do tecido danificado pelas células cancerígenas, sem causar danos aos tecidos adjacentes, é o propósito para qualquer plano de tratamento. Porém, existe uma limitação por especificidades teciduais do câncer, que pode levá-lo a espalhar-se para os tecidos mais próximos ou até mesmo aos mais

distantes, por meio de metástases. Deste modo, a complementação com outras técnicas, como a quimioterapia e a radioterapia, podem favorecer ou não o aparecimento de efeitos colaterais aos tecidos saudáveis (WANG, LEI e HAN, 2018).

Outro meio eficaz de tratamento é a imunoterapia, que atua ajudando o sistema imunológico no combate às células cancerígenas. A imunidade antitumoral latente provoca intervenções baseadas em anticorpos, visando o antígeno e a proteína de morte celular programada nos linfócitos T e seu principal ligante nas células tumorais. Agem diretamente nessas células, bloqueando diferentes fatores de crescimento e fatores pró-angiogênicos (PHILIPS e ATKINS, 2014; GRANIER et al., 2016).

Pesquisas já foram relatadas sobre o uso da imunoterapia, principalmente com anticorpos monoclonais que atuam bloqueando proteínas específicas que se ligam às células tumorais. Então estimular o sistema imunológico com mecanismo de reconhecimento e ataque as células neoplásicas malignas, parece ser um método seguro e sem danos importantes ao organismo (WANG, LEI e HAN, 2018).

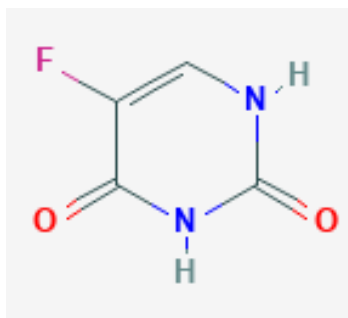
Além do mais, as técnicas tradicionais e as mais recentes usadas no tratamento do câncer têm agregado efeitos colaterais que agem causando efeitos negativos na qualidade de vida do paciente. Portanto, há uma busca incessante por novos métodos terapêuticos antineoplásicos que possuam uma maior eficácia, baixo custo e com menos efeitos danosos as células saudáveis (MUN et al., 2018).

2.2.1 5-Fluorouracil

Um dos métodos mais eficazes e difundidos no combate ao câncer é a quimioterapia (ZHAO et al., 2014). Essa terapia pode, inclusive, ser usada em conjunto com outras técnicas de tratamento, antes ou depois do processo cirúrgico, e/ou juntamente com a radioterapia, a depender do estágio da doença e estado clínico do paciente (WANG, LEI e HAN, 2018).

O 5-fluorouracil é considerado um dos principais representantes entre fármacos quimioterápicos (CAO et al., 2013). Pertence ao grupo dos agentes antimetabólitos, age como bloqueador da síntese do DNA inibindo o metabolismo de coenzimas do ácido fólico. É um análogo das pirimidinas fluoradas (Figura 5) e, possui uma taxa de resposta de agente único de 10 a 30% (LONGLEY et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; ZHANG et al., 2017).

Figura 5- Estrutura química do 5-Fluorouracil



Fonte: Pub Chem

Seu mecanismo de toxicidade celular está atribuído a uma má incorporação dos fluoronucleotídeos no DNA e no RNA e também na inibição da timidilato sintase (enzima sintética de nucleotídeo). A atividade enzimática desta enzima é aumentada em células neoplásicas, sendo que sua atividade está diretamente ligada à velocidade da proliferação tumoral (LONGLEY et al., 2003).

O 5-fluorouracil vem sendo utilizado clinicamente, mostrando ser eficaz no tratamento contra câncer de cólon, mama, estômago, cabeça, pescoço e de fígado (CHENG et al., 2012). No entanto, seu uso prolongado pode causar danos colaterais graves, incluindo mielossupressão e imunossupressão, devido ao fato de possuir baixa seletividade para células tumorais em relação às células saudáveis (LONGLEY et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; ZHANG et al., 2017).

Esse quimioterápico age na inibição efetiva das células cancerígenas, no entanto, atua também nas células normais, sendo tóxico para elas. Além do mais, pode causar disfunção de órgãos que incluem coração, fígado e rim, além de sinais clínicos como diarreia, náusea, vômito e falta de apetite (ZHANG et al., 2017).

2.3 PRODUTOS NATURAIS

A necessidade de buscar novos métodos terapêuticos eficazes tem agregado diversos estudos em relação aos produtos de origem natural, com a finalidade de obter novas moléculas bioativas. Assim, desempenhando um papel vital na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (GUO, 2017), com suas próprias vantagens, contra as enfermidades e com um baixo custo-benefício em relação aos compostos sintéticos (CHEN et al., 2018).

Os produtos de origem natural são fontes de uma grande diversidade de substâncias, com enorme importância como ferramentas científicas em diversas áreas do conhecimento, especialmente a fitofarmacêutica (KHAN, 2018). Muitas moléculas originadas da natureza vêm servindo de inspiração para a produção de novas substâncias de uso terapêutico, de modo a selecionar tais estruturas químicas elaboradas ao longo da evolução para produzir novos compostos com maiores chances de sucesso (PUPO; GALLO e VIEIRA, 2007).

Os metabólitos secundários desempenham um papel na resistência à dessecação em plantas de ressurreição (sobrevivem a longos períodos de estiagem) e na proteção contra predadores naturais. Dessa forma, não é surpreendente que essa classe de compostos já foi descrita com um alto nível de ações antioxidante, citotóxico, antibacteriano, antifúngico e propriedades antivirais (GECHEV et al., 2014). A aplicação de metabólitos provindos de micro-organismos forneceu e, ainda fornece, quimioterápicos utilizáveis como antibióticos e fármacos antineoplásicos (GUO, 2017).

Há uma tendência de crescimento do número de novos fármacos que chegam ao mercado, levando assim a um maior interesse científico na conquista por novos compostos de origem natural. Essa descoberta representa um grande desenvolvimento no meio científico, apresentando diversos avanços nas pesquisas, e indicando claramente que essas substâncias estarão entre as fontes mais importantes de novas drogas no futuro (ATANASOV et al., 2015).

Inúmeros medicamentos de origem natural ou semi-sintético salvam a vida de milhares de pessoas. Devido à sua importância, muitos pesquisadores estão na busca para obtenção de biomoléculas com capacidade quimioterápica inédita, maior potencial seletivo e com menores efeitos adversos (SOUZA et al., 2007).

Portanto, conforme visto, os produtos naturais se consolidam no meio científico como fontes importantes de novas moléculas bioativas e com um forte potencial terapêutico.

2.4 FUNGOS LIQUENIZADOS

Os fungos liquenizados ou líquens são definidos como organismos simbióticos, compostos pela associação entre um fungo (micobionte) e uma alga ou cianobactéria (fotobionte) (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; XAVIER-FILHO et al., 2006). O fungo normalmente forma a maior porção do organismo liquênico, uma característica única

desta simbiose. Seu talo é tão bem desenvolvido que se comporta como um organismo único, uma nova entidade morfológica com nenhuma semelhança óbvia para qualquer um dos indivíduos (HALE-JR, 1983).

Biologicamente, são interpretados como um organismo, mas taxonomicamente são vistos como uma forma de vida de fungos ascomicetos; formadores de líquen ou "micobionte", sendo classificado como o parceiro simbiótico dominante. Em média, 46% dos ascomicota formam líquens (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008).

A maior porção do talo líquênico é constituído por estruturas do micobionte. Na região mais externa, encontra-se a camada cortical, formada apenas por hifas; no interior do organismo são observadas as algas entremeadas por essas hifas e, na região basal, que está diretamente em contato com o substrato, não se encontram algas, apenas as hifas, e em líquen folioso, as rizinas (JOLY, 2002).

Os líquens são cosmopolitas, encontrados em ambientes sujeitos a extremos de temperatura, dessecação e escassez de nutrientes. Esses organismos têm uma notável capacidade de sobreviver em ambientes inóspito, são vistos como um exemplo de sucesso de vida (SEYMOUR; CRITTENDEN e DYER, 2005).

Esses organismos são capazes de habitar uma enorme variedade de substratos diferentes, como rochas, cascas de árvores, e solo desprotegido. São capazes de resistir a condições ambientais extremas e sua resistência deve-se, principalmente, à sua capacidade de sobreviver em um estado metabólico basal por meses e à produção de muitos metabólitos secundários que oferecem proteção química (COCCHIETTO; SKERT e NIMIS, 2002).

As duas espécies que compõem a simbiose se beneficiam com essa associação; as algas, por exemplo, ganham proteção mecânica por serem firmemente envoltas por hifas do fungo e também favorecidas com um equilíbrio hídrico, melhorando sua resistência à dessecação. As hifas ainda as protegem contra intensas radiações solares, uma vez que existe uma redução considerável de luz dentro do talo. Enquanto o fotobionte, por sua vez, oferece recursos energéticos provindos de sua fotossíntese para nutrição do fungo (HALE-JR, 1983).

Os fungos liquenizados exibem uma morfologia diversificada de seus talos, tradicionalmente classificados em crostosos, foliosos ou fruticosos (NASH III, 1996). Cada forma é caracterizada por um arranjo particular dos tecidos cortical e medular e, por diferentes meios de ligação ao substrato (HALE-JR, 1983).

O tipo crostoso é fortemente ligado ao substrato sobre o qual estão se desenvolvendo, e são muito difíceis de serem removidos. Esse grupo não apresenta córtex inferior, são as hifas da medula que os prende ao substrato (NASH III, 1996; XAVIER-FILHO et al., 2006) (Figura 6a).

O talo folioso (Figura 6b) possui uma estrutura laminar e dorsiventral com superfícies superior e inferior distintas, diferentemente do crostoso. Sua aderência ao substrato se dá por projeções ou partes especializadas do córtex inferior, como rizinas e/ou tomento. (HALE-JR, 1983; XAVIER-FILHO et al., 2006). Muitas vezes, o talo é dividido em lobos, que mostram vários graus de ramificação. Esse grupo desenvolve uma grande variedade de formas do talo, sendo descritos numerosos tipos morfológicos (NASH III, 1996).

Líquens fruticosos ou arbustivos crescem em forma de filamentos ou alças muito finas com uma vasta diferenciação de comprimento. O talo pode ser cilíndrico ou achatado e muitas vezes ricamente ramificado (Figura 6c). Não possui diferenciação entre o córtex inferior e superior. Seus ramos podem ser ancorados por apressórios ou apenas enrola-se ao substrato (HALE-JR, 1983).

Figura 6- Grupos morfológicos dos diferentes talos liquênicos



(a) – crostoso, *Lepraria incana*; (b) – folioso, *Parmotrema pseudoreticulatum*; (c) - fruticoso, *Ramalina rosacea*.

Fonte: <http://liquenesdealmeria.blogspot.com/search/label/Ramalina%20rosacea>

2.4.1 Família Parmeliaceae

A família Parmeliaceae, pertencente ao filo Ascomycota e a classe dos Lecanoromycetes. Compreende a maior família de líquens já registrados, com cerca de 2700 espécies distribuídas em mais de 80 gêneros. Com distribuição cosmopolita,

seu habitat são as árvores e as rochas (Figura 7). Possuem uma grande variedade de metabolitos secundários, como os depsídeos, depsidonas, ácidos úsnicos, ácidos alifáticos, triterpenos, antraquinonas, derivados do ácido pulvínico e xantonas, todos descritos e identificados pertencentes a esta família. Muitos destes metabólitos, como ácido úsnico e atranorina, são exclusivamente produzidos nas Parmeliaceae, sendo de grande importância para a identificação de novas espécies (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; GOMEZ-SERRANILLOS et al., 2014).

Seu talo é do tipo folioso e dorsiventral, com rizinas presentes (exceto no gênero *Asahinea*); sua estrutura cortical é chamada de epicortex, que é uma camada não celular, secretada pelas hifas corticais e, possui apotécio lecanórico e esporos unicelulares e incolor (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996).

Figura 7- Espécies de Parmeliaceae aderidas sobre rocha



Local: Taquaritinga do Norte – Pernambuco, Brasil

Fonte: Autora

2.4.1.1 *Parmotrema concurrens* (Hale)

O gênero *Parmotrema* possui lobos com margem inferior larga e descobertos, com ausência de máculas ou, se presentes, geralmente não originando quebras (GOMEZ-SERRANILLOS et al., 2014).

Parmotrema concurrens (Figura 8) é caracterizada pelo talo isidiado sem máculas e, pela combinação de ácido salazínico, ácido girofórico e ácido hipoconstítico. Esses metabólitos são produzidos na região medular do líquen (SPIELMANN, 2008).

Figura 8- *Parmotrema concurrens* (Hale)



Fonte: Autora

2.4.1.2 *Parmotrema flavescens* (Kremp.) Hale

P. flavescens (Figura 9) é uma espécie saxícola (cresce sobre rochas), caracterizada pelo talo sublobado, lobos de ramificação irregular, sobrepostos lateralmente. Seus ápices são subarredondados, subplanos a subcôncavos, margens subcrenadas a crenadas, pouco onduladas e pouco ascendentes, às vezes irregulares e incisos. Máculas ausentes. Cílios escassos, simples e espalhados pela margem. Sorais e pústulas ausentes. Isídios cilíndricos lisos, na maioria simples a pouco ramificados, às vezes tornando-se bastante ramificados ou até coralóides, eretos e firmes. Medula branca, sem pigmentações, às vezes manchada pela oxidação e hidrólise do ácido salazínico. Parte inferior de cor negra, lustroso, liso a pouco rugoso, papilado a pouco venado (BENATTI, 2013).

Sua coloração é verde amarelada, córtex superior com a presença de ácido úsnico, com margens parcialmente ciliadas, isídios marginais ou sobre dobras do talo;

sua medula de coloração amarelo-vermelho, produz os ácidos girofórico e salazínico (BENATTI, 2013).

Figura 9- *Parmotrema flavescens* (Kremp.) Hale



Fonte: Autora

2.4.2 Ácido Salazínico

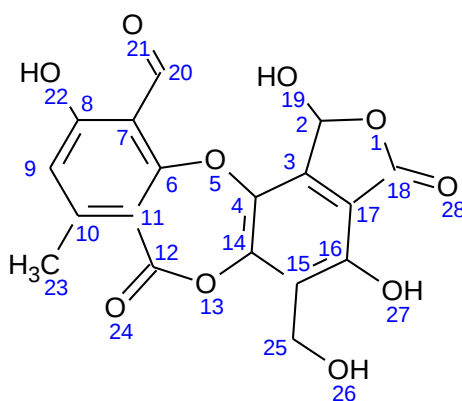
Os líquens produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários, biossinteticamente derivados das vias de acetil polimalonil, mevalônico e chiquimato. Esses compostos chegam a compreender uma proporção significativa do peso seco do talo do líquen, com cerca de 0,1-5% ou até mais (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008).

Os metabólitos secundários podem ser produzidos pelo fotobionte e/ou pelo micobionte, porém nem sempre pode-se distinguir a contribuição de cada organismo (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996). Os metabólitos de origem secundária são produzidos tanto no córtex, como na medula. O ácido salazínico é produzido na região medular liquênica (BENATTI, 2013).

O ácido salazínico (Figura 10) é derivado do grupo relacionados às depsidonas, originadas dos depsídeos. Além de ligação éster presente nos depsídeos, as depsidonas apresentam também um heterocíclo adicional resultante de uma ligação éter, geralmente entre as posições 2 e 5', exceto no ácido variolárico, sua ligação éter está entre as posições 2 e 3' (HONDA e VILEGAS, 1998).

Os compostos do grupo das depsidonas são originados do β -orcinol, possuem sua estrutura mais complexa do que aqueles derivados do grupo do orcinol, como por exemplo, o ácido salazínico; seu anel heterocíclico com oxigênio entre os substituintes das posições 1' e 6', formam grupamentos carboxila e aldeído, respectivamente (ASAHINA; SHIBATA, 1954).

Figura 10- Estrutura química do Ácido Salazínico.



Fonte: Autora

2.5 POTENCIAL BIOLÓGICO DOS LIQUENS E SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os autores Ranković e Kosanić (2015) citam vários estudos sobre o potencial biológico dos metabólitos liquênico nas últimas décadas. No século passado o sal de sódio do ácido úsnico foi comercializado como antibiótico na Europa e na ex-União Soviética. Porém, foi retirado do mercado devido ao surgimento de novos compostos ativos e à lenta renovação do líquen, utilizado como matéria-prima (GONZALEZ-TEJER et al., 1994).

Apesar disso, as substâncias liquênicas continuam sendo utilizadas na medicina popular, mesmo que não tão comum quanto ao uso das plantas. Os líquens são usados, pela população, principalmente na região asiática (HALE-JR, 1983).

Em estudos científicos as substâncias liquênicas são muito visadas, por possuir um grande potencial biológico. Por exemplo, o ácido salazínico, isolado da *Parmelia sulcata* mostrou-se um antibacteriano promissor contra uma variedade de cepas bacterianas (CANDAN et al., 2007), e potencialmente ativo contra *Mycobacterium tuberculosis*, em experimentos feitos por Honda et al. (2010).

Em 2009, Micheletti et al., promoveram modificações estruturais no ácido salazínico e comprovaram o forte potencial tanto do composto precursor, quanto de seus derivados, frente as células cancerígenas, MDA/MB-435 (mama humano), HCT-8 (cólon humano) e SF-295 (glioblastoma humano). Paluszczak et al. (2018) verificaram o potencial do ácido fisódico, também pertencente ao grupo das depsidonas, e comprovaram seu potencial na atividade antiproliferativa de células de câncer colorretal.

Solár et al. (2016), em seus estudos com células neoplásicas, evidenciaram a ação da atranorina (depsídeo) no decréscimo da viabilidade celular na célula 4T1 (carcinoma de mama murinho) e, também sua atuação *in vivo*, propondo o composto como um agente promissor no combate ao câncer. Bankorova et al. (2011) também comprovaram a ação da atranorina e ácido úsnico na indução da apoptose e a inibição da proliferação de células cancerígenas.

Estudos feitos com extratos de Parmeliaceae mostram o potencial dos metabólitos secundários desta família, como fontes promissoras de moléculas bioativas contra diversas patologias, como agente antioxidante (RAJ et al., 2014), antibacteriano (JAIN e JAIN, 2016), citotóxico (BOGO et al., 2010; IVANOVA et al., 2010; FERNÁNDEZ-MORIANO et al., 2016; HONG et al., 2018), larvicida contra as larvas *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles stephensi* (KHADER et al., 2018), anti-inflamatória (JAIN et al., 2016).

Outras espécies liquênicas também têm demonstrado uma importante gama de atividades biológicas, tais como *Cladonia clathrata* com ações anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante (SILVA, 2009); *Usnea barbata* com potencial anticâncer e antioxidante (ZUGIC et al., 2016); *Umbilicaria cylindrica* com atividades antimicrobiana e antioxidante (MANOJLOVIĆ et al., 2012); *Xanthoria parietina* com atividades antiproliferativa, antibacteriana e antifúngica (BASILE et al., 2015); *Parmelia arseneana* e *Acarospora fuscata* com ação antioxidante (KOSANIĆ et al., 2014); *Cladonia verticillaris* com ações antioxidante e expectorante (ALVES et al., 2014).

Braga et al. (2015) avaliaram a ação carrapaticida do líquen *Parmotrema sp.* e obtiveram resultados promissores para o controle da praga. Falcão et al. (2002) concluíram que a espécie *Heterodermia leucomela* apresentou ação antibacteriana contra micro-organismos Gram positivos. Honda et al. (2010) avaliaram as espécies

Parmotrema dilatatum, *P. tinctorum*, *P. lichexanthonicum*, *Pseudoparmelia sphaerospora*, *Usnea subcavata*, *Ramalina* sp, seus isolados e derivados, frente a *Mycobacterium tuberculosis* e verificaram que o ácido difractáico, isolado da *U. subcavata*, apresentou um forte potencial inibidor desta bactéria.

Bézivin et al. (2003) avaliaram 24 espécies líquênicas quanto a toxicidade para células tumorais e constatou que as espécies *Cladonia convoluta*, *C. rangiformis*, *Parmelia caperata*, *Platismatia glauca* e *Ramalina cuspiadata* mostraram-se com um forte potencial antitumoral.

Fernández-Moriano et al. (2016) avaliaram o extrato metanólico de *Cetraria islandica* e *Vulpicida canadensis* para as atividades anticâncer *in vitro*, neuroprotetora e antioxidante, confirmando um potencial citotóxico promissor para as células humanas HepG2 e MCF-7 e, pela primeira vez, comprovaram a ação neuroprotetora desta espécie. Os extratos foram capazes de reverter o dano oxidativo do peróxido de hidrogênio, promovendo a sobrevivência dos astrócitos.

Odabasoghu et al. (2006) isolaram o ácido úsnico da espécie *Usnea longissima* e avaliaram a atividade gastroprotetora. Os autores evidenciaram a ação do ácido úsnico reduzindo significativamente a lesão gástrica nos tecidos dos estômagos dos animais tratados.

Luz et al. (2015) confirmaram o potencial leishmanicida do ácido úsnico, provocando alterações morfológicas contra a forma promastigota de *Leishmania infantum chagasi*. Moreira et al. (2016) afirmaram que o extrato metanólico de *Ramalina usnea* apresentou 100% de atividade contra a larva *Aedes aegypti*.

Vu et al. (2015) avaliaram compostos sintetizados a partir de metabólitos líquênicos e, comprovaram um forte potencial contra o vírus da Hepatite C. Sokolov et al. (2012) avaliaram, pela primeira vez, a atividade antiviral do ácido úsnico e de seus derivados, sendo que o primeiro apresentou um maior valor de inibição ao vírus influenza H1N1 em relação aos seus derivados. Lai et al. (2013) isolaram compostos de *Ramalina farinacea* e comprovaram a ação antiviral do ácido sequicaico para o vírus sincicial respiratório.

2.5.1 Metabólitos líquênicos utilizados no tratamento de neoplasias

Por produzir diferentes classes de metabólitos, os líquens são considerados organismos promissores na busca de agentes terapêuticos no combate a diversas

doenças. Na literatura é possível verificar uma grande variedade de estudos *in vitro* e *in vivo* que comprovam efeitos antitumoral das substâncias liquênicas (SOLÁROVÁ et al., 2020).

Ao analisar o potencial antineoplásico da atranorina, verificou-se sua ação no combate à proliferação de células 4T1 (carcinoma de mama) em ratas e, obtiveram-se resultados satisfatórios *in vitro* e *in vivo* (SOLÁR et al., 2016). O mesmo foi visto por Zhou et al. (2017), que verificaram o potencial antitumoral da atranorina em ensaios com camundongos com LLC (carcinoma de pulmão). O composto liquênico reduziu o nível nuclear de Ki-67, proteína nuclear relacionada ao ciclo celular ativo, obtendo um bom resultado antineoplásico *in vitro* e *in vivo*.

Em 2016, Ebrahim et al. estudaram a ação do ácido norstíctico em linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, *in vitro* e *in vivo*, enxertados em ratas. Comprovaram o potencial inibidor desta molécula da proliferação, migração e invasão celular, e também no crescimento tumoral. No mesmo ano, Martins et al. avaliaram o potencial do ácido barbático em ratos expostos ao S-180 e concluíram a eficácia do composto em inibir o crescimento do tumor.

Um composto muito estudado é o ácido úsnico, que possui considerável atividade tóxica para linhagens de células cancerígenas. Zuo et al. (2015), em seus experimentos, verificaram que o ácido úsnico exibiu inibição seletiva na viabilidade celular de MCF-7 (câncer de mama humano) e, estimulou a apoptose através de uma via mitocondrial nas células, além de causar inibição do crescimento tumoral em camundongos portadores de tumor MCF-7. Em adição, o ácido úsnico também suprimiu o crescimento e a angiogênese do tumor de mama Bcap-37 (câncer de mama humano) enxertado em camundongos (SONG et al., 2012).

Yang et al. (2018) produziram o usnato de potássio e testaram seu potencial antitumoral. Verificaram uma biodisponibilidade aumentada, em comparação com a do ácido úsnico no tumor, observando ainda seu potencial na inibição de metástase hepática em um modelo ortotópico de câncer colorretal murino.

Geng et al. (2018) analisaram o efeito do ácido úsnico em linhagens celulares de carcinoma gástrico humano (BGC823 e SGC7901) e confirmaram resultados significativos *in vitro*, demonstrando sua eficácia na indução de alterações morfológicas, inibição da proliferação celular, interrompimento da fase do ciclo celular, promovendo a apoptose da célula cancerígena e indução a atividade de autofagia. No

tratamento *in vivo* observaram a eficácia do ácido, suprimindo o crescimento tumoral gástrico em camundongos.

Estudos feitos com outros compostos liquênicos corroboram com as demais pesquisas, a exemplo do ácido difractáico. Seu potencial antineoplásico foi comprovado com linhagens de carcinoma de Ehrlich em camundongos (KARAGOZ et al., 2014).

Alexandrino et al. (2019) estudaram a ação dos ácidos hipostítico e salazínico sobre as células B16-F10 (melanoma de murino) e, observaram os efeitos citotóxico e antitumoral das substâncias analisadas.

Simonetti (2004) encapsulou o ácido fumarprotocetrárico e testou sua ação contra o S-180 em camundongos, verificando uma significativa porcentagem de inibição tumoral do composto testado.

Em 2010, Bogo et al. isolaram o ácido lecanórico e avaliaram sua possível ação antiproliferativa frente as células HEP-2 (carcinoma de laringe), B16-F10 (melanoma de murinho), MCF-7 (câncer de mama humano) e 768-0 (carcinoma renal) e, comprovaram sua ação tóxica nas linhagens celulares testados.

Manojlović et al. (2012) avaliaram o ácido salazínico frente às células FemX (melanoma humano) e LS174 (carcinoma do cólon humano) e evidenciaram uma inibição significativa do crescimento celular.

Outro composto analisado foi a atranorina, estudada por Solár et al. (2016), que avaliaram atividade citotóxica frente a células 4T1 (carcinoma de mama murino) e, comprovaram sua ação tóxica sobre as células testadas.

Contudo, a necessidade na busca de novos agentes terapêuticos, provindos de meios naturais, é de extrema importância para a cura das neoplasias. Como visto, moléculas bioativas derivadas de líquens apresentam-se com um forte potencial biológico e inovador para a produção de novos análogos potencialmente ativos. Portanto, esse estudo consiste em uma adição valiosa para o conhecimento de espécies de Parmeliaceae e seu potencial antitumoral.

2.6 MÉTODOS COMPUTACIONAIS

2.6.1 *Docking* molecular

O arranjo estratégico de técnicas computacionais e experimentais tem possibilitado uma grande capacidade de identificação e desenvolvimento de novas biomoléculas promissoras (FERREIRA et al., 2015).

Com uma abordagem computacional capaz de descobrir e classificar a complementaridade estérica e química entre duas moléculas, o principal objetivo do método de *docking* molecular é prever como ocorre a ligação e, a afinidade de pequenas moléculas dentro do sítio ativo de um receptor de interesse. Ao ser aplicado a grandes bibliotecas de compostos, o método deve ser capaz de diferenciar moléculas com menor probabilidade de se ligar ao receptor e, classificar os compostos com maior afinidade (SILVA, 2015).

O sistema de *docking* envolve duas etapas, uma com algoritmo de busca conformacional, que promove a exploração de energia livre para encontrar o melhor posicionamento do ligante dentro do sítio ativo do receptor; a outra com função de pontuação, que ranqueia as possíveis posições espaciais de determinado composto, ou de vários, provenientes de uma biblioteca digital, avaliando a qualidade do modo de ligação e, selecionando as conformações mais relevantes (GUEDES; MAGALHÃES e DARDENNE, 2014; SILVA, 2015).

Essa computacional metodologia é muito utilizada como uma ferramenta padrão que visa o planejamento e *design* de novos fármacos, a otimização de compostos e estudos de *screening* virtual para encontrar novas moléculas biologicamente ativas (GUEDES; MAGALHÃES e DARDENNE, 2014).

Os algoritmos de busca investigam uma grande quantidade de conformações de ligantes. Nesse momento, a pontuação utilizada tem a função de avaliar a qualidade das poses (soluções) de *docking*, orientando sobre o método de pesquisa para conformações de ligante importantes (FERREIRA et al., 2015).

A pontuação tem como função determinar a força que a proteína interage com o ligante, em cada uma das poses do ligante geradas pelo algoritmo de busca. Ainda tem a capacidade de distinguir os modos de ligação observados, associando-os aos valores de energia mais baixos, de todas as outras poses investigadas pelo algoritmo. Uma outra função é a de classificar corretamente os ligantes ativos e inativos. A

utilização de funções de pontuação ainda continua sendo a alternativa principal de baixo custo computacional para investigar a afinidade de ligação em experimentos de *screening* virtual (GUEDES; MAGALHÃES e DARDENNE, 2014).

O uso do *screening* virtual, por busca de ligantes, pode ser realizada através da utilização de diversas bibliotecas de compostos disponíveis *online*, como por exemplo, o banco de dados PubChem (BOLTON et al., 2008); ZINC (IRWIN et al.; 2012); BindingDB (LIU et al. 2007); SuperNatural (DUNKEL, 2006) e ChEMBL (GAULTON et al., 2011).

Durante as buscas nesses sites é possível filtrar características específicas, visando reduzir a quantidade de compostos a serem analisados computacionalmente. Após a seleção da lista de moléculas a serem analisadas, esses servidores costumam fornecer uma tabela-resumo com as principais propriedades químicas dos ligantes (LAGORCE et al., 2008).

As indústrias farmacêuticas e pesquisadores envolvidos na descoberta de novos agentes biologicamente ativos estão cada vez mais em busca de metodologias de *docking* que sejam eficazes, confiáveis e, com uma maior rapidez na busca de dados.

2.6.2 Dinâmica molecular

Outra ferramenta computacional usada para o planejamento racional de fármacos é a dinâmica molecular. É uma técnica de modelagem molecular que possibilita o fornecimento de dados relativos à movimentação de partículas em função do tempo (KARPLUS, McCAMMON, 2002). É uma metodologia muito utilizada para o auxílio de planejamento para novos ligantes de um alvo terapêutico (NAMBA; SILVA e SILVA, 2008; SILVA, 2015).

A aplicação da dinâmica molecular utiliza equações de Newton, relacionadas ao movimento, especificando a posição e a velocidade de cada átomo no sistema analisado. Assim, a evolução temporal e a trajetória de um complexo ligante-receptor podem ser observadas (NICHOLS et al., 2011).

De início é feita uma configuração específica, que é atribuída aos átomos, para promover uma reprodução da temperatura e da pressão do sistema real da partícula analisada. Para determinar a posição e a velocidade de cada átomo é feito um cálculo das forças que atuam sobre cada partícula. São realizados cálculos repetidamente,

até que as trajetórias moleculares estejam integradas por um determinado intervalo de tempo (SALSBURY Jr., 2010).

As simulações de dinâmica molecular tornaram-se um instrumento versátil na investigação de macromoléculas biológicas (HANSSON; OOSTENBRINK E GUNSTEREN, 2002), sendo capaz de apontar o efeito que leva a pequenas mudanças conformacionais sobre o ligante ou sítio de ligação, possibilitando a otimização de prováveis candidatos a fármacos, ou racionalizando o efeito de uma certa mutação (NAMBA; SILVA e SILVA, 2008).

A interação dessa técnica com outras metodologias, como cálculos de energia livre de ligação e *docking* molecular, são fundamentais para a compreensão das interações ligante-receptor, fazendo com que ocorra um direcionamento do planejamento de novos potenciais inibidores e/ou ligantes de dado alvo terapêutico (FERREIRA et al., 2015; SILVA, 2015).

3 ARTIGO I

Artigo a ser submetido na *Regulatory Toxicology and Pharmacology*

Fator de impacto: 2.652

Estudo da toxicidade *in vitro* e *in vivo* dos extratos de *Parmotrema concurrens* e *P. flavescens* (líquen)

Maria Aparecida da Conceição de Lira^a, Tamiris Alves Rocha^b, Marllyn Marques da Silva^c, Danielle Feijó de Moura^b, Maria de Lourdes Lacerda Buril^d, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior^e, Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira^c, Emerson Peter da Silva Falcão^f, Eugênia Cristina Gonçalves Pereira^d, Nicácio Henrique da Silva^g, Sebastião José de Melo^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Centro de Biociências - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

^b Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

^c Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células, Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil;

^d Laboratório de Geografia Ambiental, Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil;

^e Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil;

^f Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular. Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil;

^g Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

Resumo

Neste estudo, a partir do conhecimento das propriedades dos metabólitos secundários produzidos pelos líquens, se descreve a composição fenólica e atividade citotóxica *in vitro* e toxidez aguda *in vivo* de extratos de *Parmotrema concurrens* e *P. flavescens*. Os fenóis foram identificados por ensaios em cromatografias em camada delgada e líquida de alta eficiência. A atividade citotóxica foi determinada pelo método MTT em linhagem celular de macrófago J774. A toxicidade aguda foi determinada em camundongos Albinos Swiss, através do método descrito pela OECD-425. Foram feitas análises histopatológica no fígado, rim e baço dos animais. Nos extratos de *P. concurrens* foi detectada a presença de atranorina e do ácido salazínico; este também verificado nos extratos de *P. flavescens*, juntamente com o ácido úsnico. Os extratos testados não foram citotóxicos para as linhagens de macrófagos, apresentando percentuais de viabilidade celular acima de 50% no período de 24 h de incubação. Durante os 14 dias de observação, do teste de toxicidade aguda, não foram vistos comportamentos anormais nos camundongos que receberam os extratos. Todos sobreviveram até o final do experimento. Nas análises histopatológicas foram observados alguns danos nos tecidos esplênicos, hepáticos e renal, porém não foram considerados severos.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Histopatologia; Parmeliaceae.

Introdução

Líquens produzem metabólitos secundários com propriedades biológicas relevantes. Tais organismos são mencionados como “uma das mais importantes fontes de compostos biologicamente ativos” (Barnes et al., 2000). São descritas as atividades antioxidante (Raj et al., 2014), antibacteriana (Jain e Jain, 2016), citotóxica (Bogo et al., 2010; Ivanova et al., 2010; Fernández-Moriano et al, 2016; Hong et al., 2018), larvicida frente ao *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, e *Anopheles stephensi* (Khader et al., 2018), dentre outras. Devido a esta grande variedade e, imenso potencial biotecnológico e farmacêutico, é extremamente importante o estudo do perfil toxicológico de tais moléculas.

Alguns taxons são especialmente peculiares por agruparem um número significativo de espécies com metabólitos secundários muito relevantes, a exemplo das famílias *Cladoniaceae* e *Usneaceae*. Por outro lado, a família *Parmeliaceae* torna-se particularmente distinta, visto ser uma das mais numerosas, que abriga cerca de 2700 espécies distribuídas em mais de 80 gêneros. Além do mais, possui uma grande variedade de metabólitos secundários (Hale-Jr, 1983; Nash III, 2008; Gomez-Serranillos et al., 2014). Dessa forma, esta grande família representa uma fonte promissora de moléculas bioativas com importante potencial biotecnológico e farmacológico.

A despeito das potencialidades dos metabólitos liquênicos, estudos a respeito de sua toxidez são muito relevantes e necessários para o desenvolvimento de compostos-protótipo potencialmente aplicáveis em humanos. Assim, se faz necessária uma avaliação criteriosa de margem de segurança e, dos efeitos sobre órgãos sensíveis a agentes estranhos ao organismo.

Compostos de origem natural desempenham um papel altamente significativo nas descobertas de drogas com um alto potencial biológico (Newman e Cragg, 2007). Atualmente há um grande interesse na descoberta de novas moléculas bioativas a partir de recursos naturais. Este interesse está associado à procura de drogas que apresentem com uma elevada atividade farmacológica, associada a um baixo ou inexistente efeito adverso ao organismo (Balunas e Kinghorn, 2005). Assim, a descoberta de novos fármacos eficazes e seguros representa um grande desafio para os pesquisadores que trabalham com este grupo de compostos (Van Ryn et al., 2000).

Diante da necessidade de encontrar novas substâncias capazes de diminuir ou eliminar efeitos colaterais no organismo, e tendo em vista que os compostos liquênicos têm se mostrado agentes promissores para este fim, este trabalho descreve a composição fenólica de *P. concurrens* e *P. flavescens*, e avaliação de possíveis efeitos tóxicos, *in vitro* e *in vivo*, dos extratos orgânicos destas espécies.

Materiais e método

Coleta e identificação das espécies

As espécies liquênicas *P. concurrens* e *P. flavescens* foram coletadas no município de Taquaritinga do Norte, situado no agreste Pernambucano, Nordeste do Brasil, altitude de 785 m e coordenadas de latitude 07° 54' 11" S e longitude de 36° 02' 39" O. As amostras foram identificadas pela Dr^a Maria de Lourdes Lacerda Buril, do Laboratório de Geografia Ambiental do Departamento de Ciências Geográficas – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); uma exsicata de cada amostra foi depositada no Herbário UFP - Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica, da UFPE sob registros UFP84253 para *P. flavescens* e UFP84254 para *P. concurrens*.

Preparação dos extratos orgânicos

Foram pesados 60g do material *in natura* limpo e triturado em Moinho MA 630/1. A extração foi realizada por esgotamento, em aparelho de soxhlet, seguindo a série eluotrópica dos solventes, éter etílico, clorofórmio e acetona. Foram utilizados 200 mL de cada solvente à temperatura de ebulição. Em seguida os solventes foram evaporados em rotaevaporador à temperatura de 40 °C. Os extratos foram acondicionados em dissecador.

Análise da composição fenólica dos extratos orgânicos

Cromatografia em Camada Delgada – CCD

Os ensaios em CCD foram realizados através da metodologia descrita por Culbertson (1972). Os extratos foram diluídos em seus respectivos solventes de extração a 0,01 mg.mL⁻¹, e aplicados 10 µL da solução em cromatoplaças de sílica Gel Merck F_{254nm+366}. Foi utilizado como sistema de eluição a mistura

tolueno:dioxano:ácido acético (180:45:5, v/v). As bandas foram observadas sob luz UV (254 e 366 nm), reveladas com ácido sulfúrico a 10 % (etanol) e, posterior aquecimento a 100 °C por 5 min. Os constituintes dos extratos foram identificados por meio da comparação dos valores de R_f e, reação de coloração das manchas, com os padrões utilizados ácidos úsnico, salazínico e atranorina, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da UFPE.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência -CLAE

As análises em CLAE foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Legaz e Vicente (1983), em cromatógrafo Hitachi (655 A-11, Tóquio, Japão) acoplado a um detector UV CG437-B ajustado a 254 nm. Os extratos diluídos em clorofórmio (Merk®) a 1,0 mg mL⁻¹ foram injetados em coluna de fase reversa NST-C18 MicroPack MCH-18 de 250 x 4,6 mm e 5 mm, com volume de injeção de 10 µL. A fase móvel foi constituída por metanol:água:ácido acético (80:19,5:0,5, v/v), em sistema isocrático, pressão de 88 atm a 30 °C. Os compostos foram identificados por comparação entre os tempos de retenção (T_r) na coluna de cada substância contidas nos extratos com os obtidos com os padrões dos ácidos úsnico, e salazínico, além da atranorina.

Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica foi determinada utilizando-se o método do MTT (Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Mosmann, 1983) em linhagem de macrófagos (J774) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução dos antibióticos Penicilina (10.000 UI) e Estreptomicina (10 mg/mL) em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. As células (10⁵ células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida, os extratos dissolvidos em DMSO (1%) foram adicionados aos poços nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL. Foram preparadas duas placas simultaneamente, e incubadas por períodos diferentes (24 e 48 h). Após o final de cada incubação foram adicionados 25 µL de MTT (5 mg.mL⁻¹) em cada poço e as células reincubadas por 3 h. O meio de cultura juntamente com o MTT foram aspirados, e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram lidas a 630 nm. Os experimentos

foram realizados em triplicata. Os valores de citotoxicidade foram expressos como viabilidade celular: (A_{bs} de célula tratada população X 100 / A_{bs} da população de células não tratadas) (Silva et al., 2019).

Animais experimentais

Para o estudo *in vivo* foram utilizados camundongos Albinos Swiss (*Mus musculus*) machos (35-45g), com idade de 60 dias, mantidos em gaiolas de polipropileno com grades inoxidáveis e maravalha como cobertura, à temperatura de 22 ± 3 °C, com ciclo claro-escuro de 12 h, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos ao jejum de 8 horas antes de cada experimento. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (Nº 23076.012019/2018.58), de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de experimentação Animal (CONCEA) e pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Estudo da toxicidade aguda *in vivo*

A Toxicidade Aguda foi avaliada segundo a metodologia recomendada pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD - 425, 2008). O teste constituiu na administração da dose de 2000 mg.kg⁻¹ via oral dos extratos orgânicos em camundongos. Foram utilizados 5 animais por grupo. O grupo controle negativo recebeu apenas solução salina + tween 80 a 5%. Após a administração, os animais foram observados continuamente nas primeiras duas horas e depois a cada 24 horas, durante 14 dias, para a verificação de qualquer alteração comportamental ou nas atividades fisiológicas e mortalidade.

No décimo quarto dia, após a administração dos extratos, os animais foram eutanasiados por overdose de solução de anestésicos cetamina (1,25 g/kg) e xilazina (0,62 g/kg), via intraperitoneal. O sangue foi retirado por punção cardíaca para análise bioquímica, e os órgãos fígado, rins e baço foram retirados para análise histológica.

Os órgãos foram dissecados e acondicionados em solução de formol a 10% tamponada, permanecendo nesta solução por um período de 48 h. Em seguida, as amostras foram desidratadas em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizadas por xilol, impregnadas e incluídas em parafina.

Os cortes teciduais (4 μ m) foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) e as imagens histológicas foram capturadas com câmera digital Moticam 2300, acoplada ao microscópio óptico, sob foco fixo, utilizando as objetivas de 40x para os tecidos do fígado e rim e, de 10x para o tecido esplênico, sendo observados 20 campos por lâmina.

As fotomicrografias foram avaliadas usando o software ImageJ® versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

O tecido esplênico foi avaliado por porcentagem de mensuração das áreas das polpas branca e vermelha e também do estroma. A avaliação do tecido hepático foi feita através de contagens de células hepáticas (hepatócitos e células endoteliais). E as estruturas renais foram avaliadas pela mensuração da área do glomérulo e corpúsculo.

Análise estatística

Os resultados da atividade citotóxica foram expressos como as médias $\pm$ desvio padrão (DP). A análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando-se o teste de Tukey para comparações múltiplas. Um valor de $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância.

Para avaliação histomorfométrica foi realizado um teste de normalidade utilizando o Teste Smirnov Kolmogorov, para a análise da normalidade. Dessa forma, um teste não paramétrico (Mann-Whitney U) calculado pelo SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) foi utilizado para analisar esses dados. Os dados são expressos como média $\pm$ DP, com valores de $p < 0,05$ comparado com o controle considerado significativo.

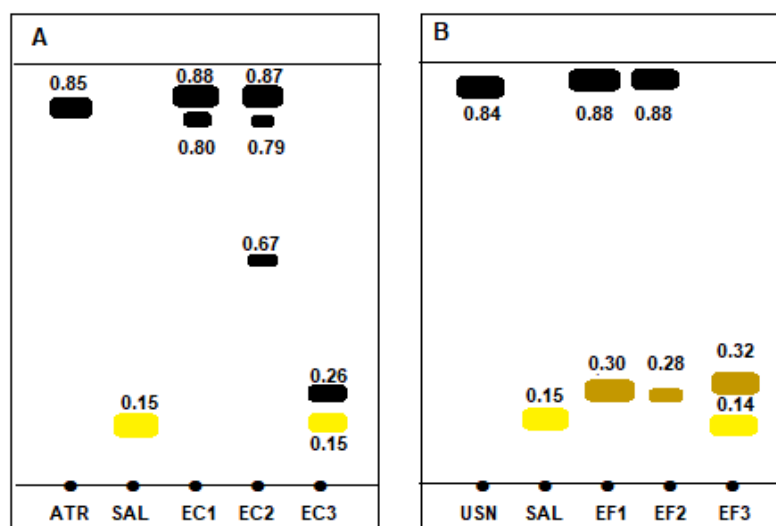
Resultado e discussão

Composição fenólica dos extratos orgânicos

Os extratos obtidos de *P. concurrens*, quando analisados por CCD, evidenciaram a presença da atranorina nos extratos etéreo e clorofórmico (R_f s 0,88 e 0,87) e, do ácido salazínico no extrato acetônico (R_f 0,15). No cromatograma da *P. flavescens* foi detectado o ácido úsnico nos extratos etéreo e clorofórmico (R_f 0,88) e, o ácido salazínico no extrato acetônico (R_f 0,14). Os valores de R_f e coloração das

bandas coincidiram com os exibidos pelos padrões das substâncias purificadas (Figura 1).

Figura 1. Figura esquematizando as Cromatogramas em CCD dos extratos liquênicos estudados



A= *Parmotrema concursens* e seus extratos etéreo (**EC1**), clorofórmico (**EC2**) e acetônico (**EC3**); **B= *Parmotrema flavescens*** e seus extratos etéreo (**EF1**), clorofórmico (**EF2**) e acetônico (**EF3**); **ATR= atranorina**; **SAL= ácido salazínico** e **USN= ácido úsnico**.

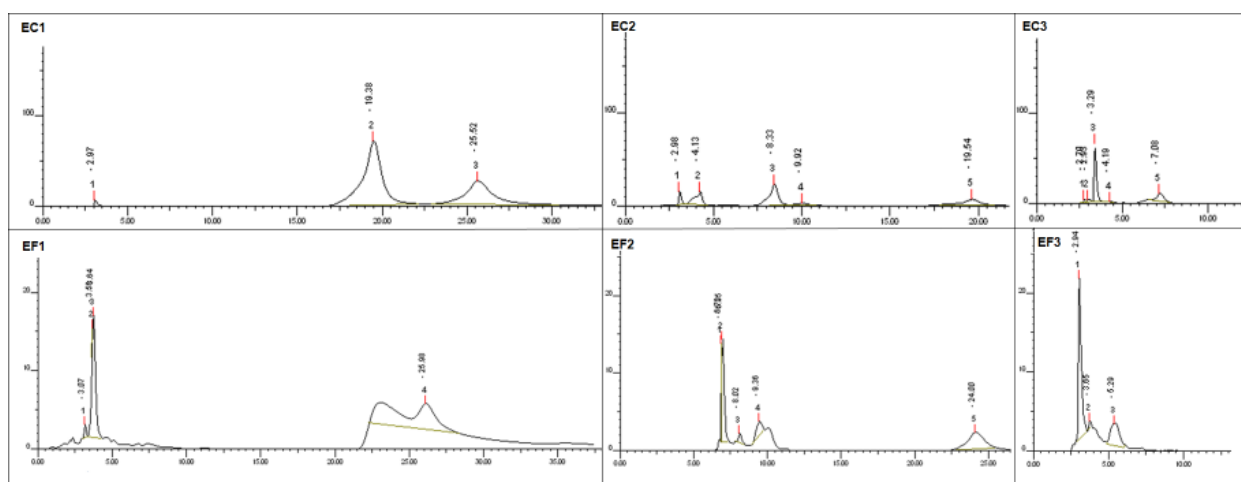
A análise em CLAE do extrato etéreo de *P. concursens* (EC1) evidenciou a presença de 3 picos (Tr 2,97; 19,38 e 25,52 min). Estes compostos foram identificados como ácido salazínico e atranorina. A atranorina representou 65% da composição do extrato e o ácido salazínico foi detectado em menor teor (0,72%), ainda foram evidenciados 34% de uma substância não identificada. O cromatograma do extrato clorofórmico (EC2), apresentou cinco picos distintos (Tr 2,98; 4,13; 8,33; 9,92; 19,54 min), sendo o último identificado como atranorina, apresentando 23% do total de sua composição. Ainda foi vista a presença do ácido salazínico (6,8%) e, as demais substâncias não foram identificadas. A análise feita com o extrato acetônico (EC3) mostra a presença de cinco substâncias (Tr 2,69; 2,92; 4,19; 7,08 min), incluindo o ácido salazínico (Tr 3,29 min) numa concentração de 60% (Figura 2).

O cromatograma correspondente ao extrato etéreo de *P. flavescens* (EF1) mostra um padrão com a presença de quatro compostos principais (Tr 3,07; 3,58; 3,63; e 25,98 min). Foi possível identificar a presença dos ácidos úsnico (69,5%) e salazínico (1,5%); já os demais compostos permanecem sem identificação. Também

foi vista no extrato clorofórmico (EF2), a presença do ácido úsnico (Tr 24,00 min), numa concentração de 42%. Outras substâncias, não identificadas, foram observadas no extrato com Tr 6,79; 6,84; 8,02 e 9,36 min. O extrato acetônico (EF3) apresentou três picos diferentes, um deles possivelmente o ácido salazínico com um Tr 2,94 min (67%), os demais não identificados, com Tr 3,65 e 5,29 min (Figura 2). As análises em CLAE estão de acordo com os resultados em CCD.

Os resultados das análises em CLAE corroboram com os de Falcão et al. (2004), com Tr confirmados com padrões de atranorina (17,70 min), e dos ácidos úsnico (19,24 min) e salazínico (4,47 min). Tais dados também estão de acordo com as descrições de Benatti e Marcelli (2009) e Spielmann e Marcelli (2008), que relatam a presença do ácido salazínico e da atranorina em *P. concurrens* e os ácidos úsnico e salazínico em *P. flavescens*.

Figura 2. Cromatogramas em CLAE dos extratos líquênicos



Extratos etéreo (**EC1**), clorofórmico (**EC2**) e acetônico (**EC3**) de *P. concurrens* e extratos etéreo (**EF1**), clorofórmico (**EF2**) e acetônico (**EF3**) de *P. flavescens*.

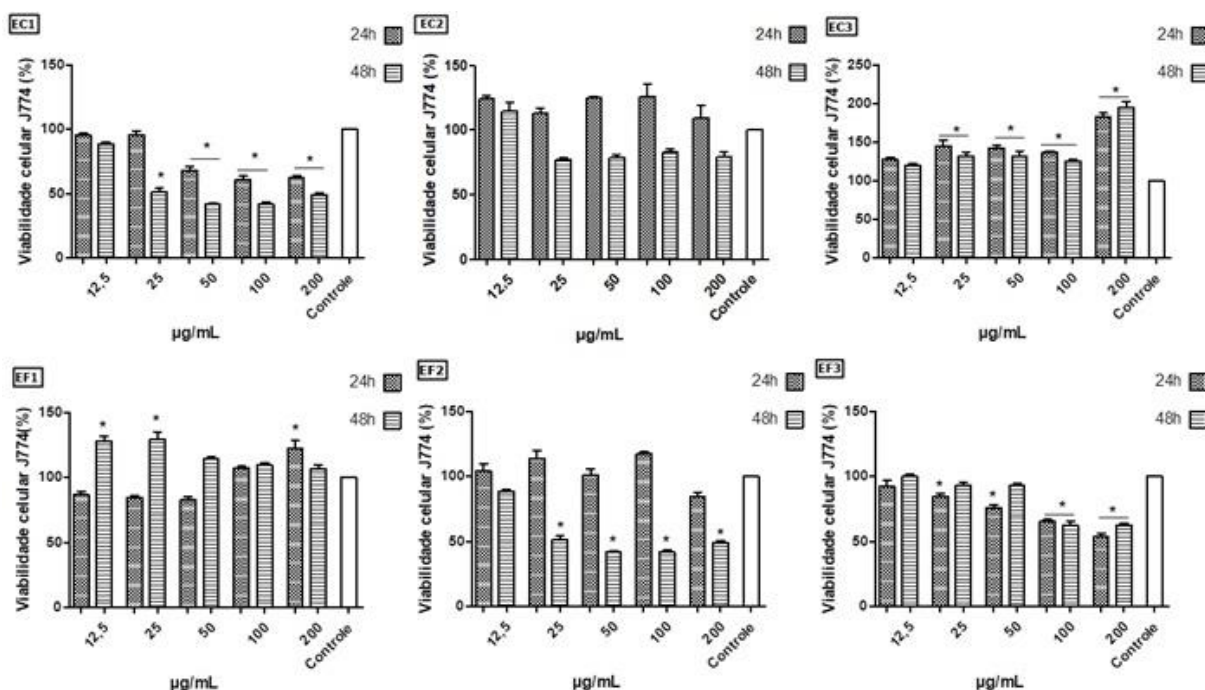
Ensaio citotóxico

A análise de citotoxicidade é compreendida como ações adversas provenientes da interferência dos processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou funções comuns às células (Ekwall, 1999).

Nas análises realizadas com macrófagos J774 verificou-se que o extrato etéreo de *P. concurrens* promove uma diminuição da viabilidade celular, nas maiores doses, nos períodos de 24 e 48 h de incubação. Por outro lado, no extrato clorofórmico observou-se, no período de 24 h, um aumento da viabilidade, chegando a 100%. Após 48 h de incubação houve um declínio dessa viabilidade, em todas as doses testadas, se comparadas ao grupo controle, porém com taxas superiores a 75% de viabilidade celular. O extrato acetônico apresentou percentuais elevados de crescimento celular, em todas as doses testadas e nos dois períodos analisados (Figura 3).

Nos extratos de *P. flavescens* observou-se que o etéreo apresentou valores superiores a 80% de viabilidade celular em todas as doses avaliadas e, nos dois períodos estudados. Já no extrato clorofórmico, verificou-se um decréscimo na taxa de viabilidade, no período de 48 h de incubação, em todas as doses testadas, se comparadas ao período de 24 h e também ao controle. O extrato acetônico apresentou nas maiores doses, uma diminuição da viabilidade, se comparado as menores doses testadas, com um percentual superior a 50%, nos períodos de 24 e 48 h (Figura 3).

Figura 3. Viabilidade celular de Macrófago J774 frente aos extratos liquênicos



Valores expressos em média $\pm$ DP. *p < 0.05 v.s. controle negativo. A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Extratos etéreo (EC1), clorofórmico (EC2) e acetônico (EC3) de *P. concurrens* e extratos etéreo (EF1), clorofórmico (EF2) e acetônico (EF3) de *P. flavescens*.

Em seus estudos com atranorina, composto presente nos extratos de *P. concurrens*, De Melo et al. (2011) demonstraram baixo efeito citotóxico frente à linhagem L929 (fibroblastos). Esses dados são condizentes com nossos resultados, visto que, os extratos que contêm o depsídeo atranorina, apresentaram taxas superiores a 50% de viabilidade celular. Entretanto, não podemos afirmar a ação apenas desse composto, visto que foram encontradas nos extratos outras substâncias, em menor quantidade. É possível que os compostos adicionais detectados por cromatografia tenham agido de forma sinérgica, o que é mencionado por outros autores para fenóis liquênicos em diferentes atividades biológicas (Falcão et al., 2004; De Melo et al., 2011b).

Emsen et al. (2018) isolaram os ácidos olivetórico e fisódico de *Pseudevernia furfuracea* (Parmeliaceae) e, verificaram o possível efeito citotóxico em linhagens de linfócitos humanos, afirmando que em doses mais baixas não foram vistos efeitos tóxicos. Porém, em doses mais elevadas, os ácidos promoveram alguma ação citotóxica. Os mesmos autores publicaram em 2016, estudo com fibroblastos humano, num período de 48 h de incubação, e constataram que o ácido olivetórico apresentou maior citotoxicidade do que o ácido fisódico, este pertencente ao grupo das depsidonas. Esses dados corroboram com os resultados deste estudo, apresentado pelo extrato acetônico de *P. flavescens*, visto que, o mesmo contém um composto pertencente ao grupo das depsidonas.

Ghate et al. (2013), ao exporem linhagens de fibroblastos de pulmão humano (WI-38) ao extrato metanólico de *Parmotrema reticulatum*, obteve resultados satisfatórios a não citotoxicidade do extrato no período de 48 h de incubação. Gonçalves et al. (2018) também evidenciaram que os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico de *Cladonia salzmannii* Nyl não provocaram citotoxicidade em células RAW 264.7 (macrófagos murinos).

Toxicidade aguda

A segurança da dose terapêutica de uma nova molécula é crucial para sua aplicação humana. Desta forma, testes de toxidez aguda fornecem informações importantes relativas ao efeito tóxico celular e sistêmico, extremamente importantes e fundamentais ao desenvolvimento de novos fármacos (Araújo et al., 2019).

Durante os quatorze dias de observação dos animais tratados, não foram observados sinais clínicos de toxicidade, como alterações neurológicas, motora e/ou sensitivas. Esses resultados indicam que os extratos das Parmeliaceae não causaram efeitos sobre o sistema nervoso central (Bonomini et al., 2017).

Considerando os compostos atranorina e ácido úsnico, presentes nas duas espécies estudadas, Yokouchi et al. (2015), ao avaliarem a toxidez do ácido úsnico em ratos, também não evidenciaram sinais clínicos anormais ou diferenças significativas no peso dos animais ao final do experimento. De Melo et al. (2011) também relataram a ausência de sinais clínicos significativos em seu estudo de toxidez subcrônica da atranorina em ratos.

Vale acrescentar que não foram observadas diferenças no consumo da ração e água entre os animais tratados em relação ao controle. De acordo com Moura e Reyes (2002), a avaliação desses parâmetros é essencial na utilização de compostos químicos via oral, uma vez que a ingestão equilibrada de nutrientes e água são de grande importância para a potencialidade da droga ingerida e/ou, até mesmo para evitar danos como irritações gastrointestinais, causadas pela ingestão de tais substâncias durante períodos prolongados. Ressalta-se ainda que não houve mortalidade durante o período de observação.

Análise bioquímica

A avaliação dos parâmetros bioquímicos mostrou que os grupos expostos aos extratos clorofórmico e acetônico de *P. concurrens* apresentaram um aumento nos níveis de alanina aminotransferase (ALT), em relação ao grupo controle. Nos animais tratados com o extrato acetônico foi verificado um aumento na taxa de proteínas totais no sangue. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com os extratos e o controle para os níveis de aspartato aminotransferase (AST), ácido úrico, albumina, triglicerídeos e colesterol (Tabela 1).

De Melo et al. (2011) também verificaram em seu estudo com atranorina (composto presente na espécie estudada), aumento das proteínas totais além de Gama - glutamil transferase, Bilirrubina direta e Fosfatase alcalina. Os autores não observaram aumento nas aminotransferases.

Os resultados observados para *P. flavescens* indicaram aumentos significativos, para pelo menos um grupo dos tratados, nos níveis de ALT, AST,

albumina, proteínas totais e colesterol dos camundongos. Entretanto, não houve diferença nos níveis de triglicerídeos (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos analisados do sangue de camundongos expostos aos extratos liquênicos

Grupos	ALT (U/L)	AST (U/L)	Ácido úrico (mg/dL)	Albumina (g/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Proteínas totais (g/dL)	Colesterol (mg/dL)
CN	40,08±7,02	56,35±3,29	2,89±0,49	2,94±0,11	174,69±21,48	4,58±0,08	100,65±19,93
EC1	50,64±4,20	67,18±7,64	2,89±0,68	3,08±0,10	155,70±38,16	4,76±0,13	117,04±11,65
EC2	61,92±11,90*	76,62±14,63	3,33±0,32	3,06±0,17	148,50±34,37	4,82±0,05	124,14±10,23
EC3	62,75±14,50*	76,90±22,10	3,43±0,20	3,10±0,16	194,92±81,67	5,25±0,63*	124,60±3,11
EF1	64,31±10,62	133,2±29,60***	X	3,32±0,12**	187,21±15,69	5,25±0,17*	141,95±6,95***
EF2	43,71±5,06	66,64±2,01	X	3,28±0,13**	148,38±12,92	5,15±0,12*	138,74±8,38**
EF3	73,67±23,41*	264,9±34,40***	X	3,10±0,14	221,87±48,64	4,65±0,12	135,14±9,13**

Dados expressos em média ± DP dos níveis séricos; N= 5; * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 v.s CN.

A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Controle Negativo (CN), Extratos etéreo (EC1), clorofórmico (EC2) e acetônico (EC3) de *P. concurrens* e extratos etéreo (EF1), clorofórmico (EF2) e acetônico (EF3) de *P. flavescens*; ALT= Alanina aminotransferase e AST= Aspartato aminotransferase. X= teste não realizado

Níveis alterados de ALT e AST podem indicar uma provável lesão nas células hepáticas. O dano aos hepatócitos induzido pelo ácido úsnico é bem conhecido na pesquisa científica (Han et al., 2004; Pramyothin et al., 2004). Além disso, é também descrita necrose hepática extensa por ácido úsnico em ratos (Ribeiro-Costa et al., 2004; Da Silva-Santos et al., 2006). Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos por Araújo et al. (2019). Os autores analisaram a toxicidade aguda (dose de 2000 mg/kg) do ácido úsnico modificado a sal de potássio (usnato de potássio) e, verificaram a hepatotoxicidade através do aumento dos níveis das enzimas nos sangues dos camundongos tratados. O ácido úsnico está presente nos extratos etéreo de *P. flavescens*.

A AST e ALT são enzimas intracelulares hepática, consideradas marcadoras sensíveis de lesão hepática (Liu et al., 2016). Por outro lado, a albumina, uma importante proteína que age na manutenção da distribuição correta dos líquidos

corporais (Larsen et al., 2016), também é sintetizada neste órgão, de modo que em ambos os casos, aumentos séricos destes marcadores indicam dano ao fígado. Lesões nesse órgão também podem estar relacionadas ao aumento de albumina, onde ocorre sua síntese.

Os valores do grupo controle observados para o ácido úrico, AST, ALT e albumina estão de acordo com os valores obtidos por Diniz et al. (2006), que fizeram testes e comparações para padronizar valores bioquímicos em camundongos *Swiss* e ratos *Wistar*, machos e fêmeas.

Peso relativo dos órgãos

Não foram observadas diferenças significativas na morfologia e no peso relativo dos órgãos dos animais tratados em relação ao grupo controle (Tabela 2). Esses dados corroboram os resultados obtidos por Araújo et al. (2019), em relação ao peso do baço. No estudo, os autores comprovaram que os animais tratados com ácido úsnico, composto presente na *P. flavescens*, não causou interferência no ganho ou perda de peso deste órgão, porém observaram aumento no peso dos rins e fígado, em relação ao grupo controle.

Portanto, os pesos relativos dos órgãos dos animais expostos aos extratos líquênicos não mostraram qualquer evidência de toxicidade. Em adição, essa manutenção de peso, indica que os extratos de Pameliaceae estudados não causaram danos no metabolismo dos animais avaliados (Bonomini et al., 2017).

Tabela 2. Peso relativo dos órgãos de camundongos expostos aos extratos líquênicos

Grupos	Rim (g)	Baço (g)	Fígado (g)
CN	1,35±0,09	0,42±0,32	5,98±0,45
EC1	1,35±0,10	0,40±0,06	5,72±0,81
EC2	1,37±0,10	0,39±0,07	5,6±0,20
EC3	1,39±0,06	0,35±0,04	5,68±0,4
EF1	1,14±0,22	0,35±0,07	5,54±0,38
EF2	1,32±0,11	0,43±0,07	5,18±0,21
EF3	1,24±0,02	0,39±0,12	5,2±0,60

Dados expressos como média ± DP do peso relativo dos órgãos (g); N= 5. A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Controle Negativo (CN), Extratos etéreo (EC1), clorofórmico (EC2) e acetônico (EC3) de *P. concurrens* e extratos etéreo (EF1), clorofórmico (EF2) e acetônico (EF3) de *P. flavescens*.

Análise histomorfométrica

A análise microscópica renal demonstrou que não houve diferença entre as áreas glomerular e capsular dos extratos de *P. concurrens* em relação ao grupo controle. Na análise feita com os extratos de *P. flavescens* foi visto que apenas o extrato etéreo demonstrou um aumento significativo nas áreas glomerular e capsular, como descrito na tabela 3.

No baço dos animais tratados com os extratos de *P. concurrens* observou-se uma diminuição significativa do estroma, em comparação ao grupo não tratado. Nos animais expostos aos extratos etéreo e clorofórmico houve um aumento da polpa branca e, os tratados com o extrato acetônico, diminuição da polpa vermelha. Na avaliação feita com os extratos de *P. flavescens* foi verificada apenas uma pequena diminuição da porcentagem da área do estroma para os extratos etéreo e clorofórmico. Não houve nenhuma diferença nas áreas das polpas brancas e vermelhas para as substâncias desta espécie (Tabela 3).

A análise do fígado demonstrou que os extratos de *P. concurrens* não causaram alterações na quantidade de hepatócitos e de células endoteliais em relação ao grupo controle. Os resultados descritos neste trabalho corroboram os achados histomorfológicos de De Melo et al. (2011) em seus estudos com atranorina. Por outro lado, no tratamento com *P. flavescens* verificou-se que houve um aumento significativo no número de hepatócitos em todos os extratos testados, em comparação com o grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3. Análise histomorfométrica do rim, baço e fígado de camundongos expostos aos extratos líquênicos

Grupos	Rim (μm^2)		Baço (% por fotomicrografia)			Fígado (média do n° de cél. por fotomicrografia)	
	Glomérulo	Corpúsculo	Polpa branca	Polpa vermelha	Estroma	Hepatócitos	Células endoteliais
CN	2711,61±567,78	3427,97±702,26	22,74±10,01	73,40±9,63	3,85±2,04	35,98±9,45	17,22±7,22
EC1	2663,28±508,20	3371,46±714,58	27,76±8,30*	70,17±8,40	2,05±0,89***	36,33±7,32	16,72±4,73
EC2	2853,75±596,22	3379,76±680,90	27,74±8,78*	69,79±8,96*	2,47±0,70***	37,32±8,29	16,50±5,01
EC3	2789,96±575,97	3381,09±752,30	24,53±6,80	73,03±6,70	2,43±0,90***	37,53±9,93	16,26±5,19
CN	3508,76±1307,70	4708,39±153,62	22,74±10,01	73,40±9,63	3,85±2,04	35,98±9,45	17,22±7,22
EF1	4104,56±1523,39**	5598,51±1831,83***	23,11±6,28	73,88±6,60	3±2,20*	61,87±9,83***	15,39±5,06
EF2	3223,85±117,04	4324,33±1401,33	20,04±7,10	77,34±7,60	2,61±0,91*	65,81±12,55***	16,15±4,78
EF3	3149,27±1137,96	4374,25±1436,89	26,10±7,82	70,44±7,72	3,50±1,40	61,52±10,55***	13,66±4,03***

Teste Mann-Whitney, Dados expressos em média $\pm$ DP. N= 5; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 v.s CN. CN= controle negativo; Extratos etéreo (EC1), clorofórmico (EC2) e acetônico (EC3) de *P. concurrens* e extratos etéreo (EF1), clorofórmico (EF2) e acetônico (EF3) de *P. flavescens*.

Alterações nas estruturas renais podem desencadear expansão renal, restringindo e distorcendo capilares glomerulares, diminuindo a superfície de filtração do capilar. Com isso, os danos podem obstruir o glomérulo, com consequente redução da função renal (Araújo et al., 2019).

O tecido renal é muito suscetível à toxicidade causada por agentes estranhos presentes na corrente sanguínea. Suas células têm uma alta capacidade de reabsorção e concentração de solutos, além do fato de que o órgão recebe cerca de 25% do débito cardíaco. Dessa forma, fazem com que drogas metabolizadas interajam com suas organelas, podendo modificar o caminho de sinalização celular e, até mesmo, causando danos inflamatórios e morte tecidual (Barnett e Cummings, 2019).

Após tratamento com substâncias estranhas ao organismo, o baço pode sofrer alterações ultraestruturais que surgem não apenas pela ação danosa do composto, mas também pela reação do tecido, elevando o aumento da atividade de macrófagos, plasmócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos (El-Shenawy et al., 2017), indicando uma proteção do órgão a uma possível reação prejudicial da substância (Crăciunaș et al., 1996).

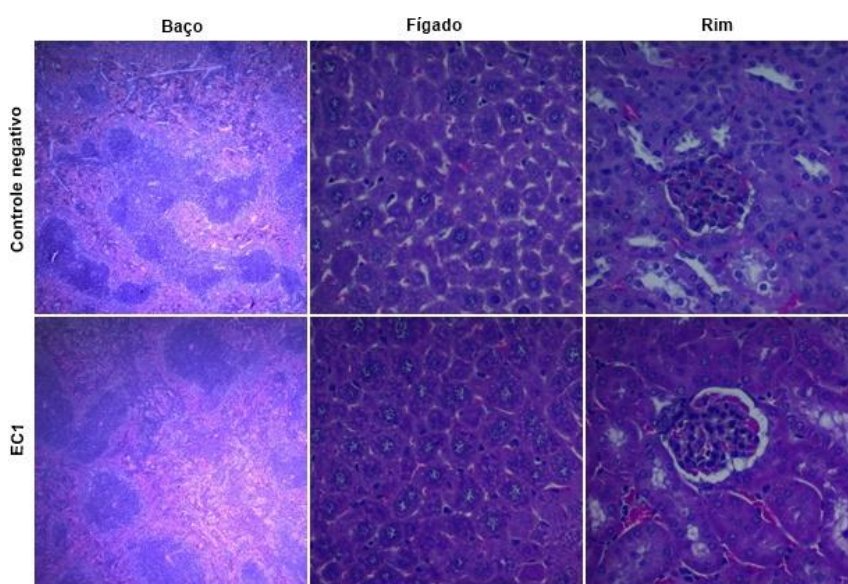
O tecido hepático é sensível às lesões induzidas por xenobióticos, visto que exerce um papel central no metabolismo destas substâncias estranhas ao organismo.

Nutrientes, compostos sintéticos e plantas medicinais são capazes de provocar algum grau de lesão no fígado (Singh et al., 2016). O aumento de hepatócitos pode indicar possível regeneração tecidual para contornar condições adversas influenciadas por vários fatores (Marinho et al., 2017).

Alexandrino et al. (2019) avaliaram a toxicidade aguda do ácido salazínico (100 mg/kg), composto presente nas duas espécies em estudo. Os autores verificaram a baixa toxicidade desta substância e, relataram uma diferença significativa da histopatologia do rim e do fígado. Resultados semelhantes foram observados por Araújo et al. (2019) em seus estudos com o ácido úsnico (2000 mg/kg), composto presente no extrato etéreo de *P. flavescens*. Entretanto, verificaram alterações no espaço glomerular, com distorções morfológicas além de danos no tecido hepático dos grupos tratados. Na literatura ainda há poucos estudos em relação à toxicologia *in vivo* para extratos liquênicos, principalmente em análises histomorfológicas.

Contudo, na histomorfologia renal pode-se observar uma arquitetura glomerular preservada, juntamente com a cápsula de Bowman e os túbulos renais. Na observação do baço, a estrutura esplênica foi mantida com nódulos linfáticos bem definidos. No fígado, não foram vistos sinais de alterações no parênquima hepático, sem lesões degenerativas ou infiltrativas (Figura 4).

Figura 4. Fotomicrografias do baço, fígado e rim de camundongos expostos ao extrato etéreo de *Parmotrema concurrens* (EC1) e do grupo controle negativo



Foi utilizado coloração hematoxilina e eosina. As imagens do baço com 100X e as demais com 400X de ampliação.

A análise de toxicidade aguda em camundongos submetidos aos extratos de Parmeliaceae nos permite a verificação de uma possível toxidez das substâncias testadas. Em meados dos anos 2000, os pesquisadores da OECD revisaram métodos para toxicidade aguda sistêmica, na intenção de diminuição da quantidade de animais nos testes. Concluíram que para agentes químicos, pesticidas e produtos biotecnológicos a OECD 401 seria banida e, as diretrizes 420, 423 e 425, então revisadas, seriam definitivamente adotadas e recomendadas (Valadares, 2006). Assim, os dados obtidos neste estudo estão enquadrados nesta normatização e, portanto, são considerados válidos.

Conclusão

A análise cromatográfica das espécies estudadas, está de acordo com os dados bibliográficos que descrevem atranorina e ácido úsnico presentes em *P. concurrens* e *P. flavescens*, respectivamente, e ácido salazínico para ambas espécies.

Os compostos liquênicos extraídos das espécies de Parmeliaceae comprovaram a não citotoxicidade para células de macrófagos e também baixa toxicidade sistêmica em camundongos Albinos *Swiss*.

Agradecimentos

LIRA, MAC agradece o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Propesq / UFPE. Uma das autoras (ECPereira) agradece ao CNPq (Conselho Nacional de Financiamento à Pesquisa) pela bolsa de produtividade em pesquisa (Pq).

Referências

- Alexandrino, C.A.F., Honda, N.K., Matos, M. de F.C., Portugal, L.C., Souza, P.R.B. de, Perdomo, R.T., Guimarães, R. de C.A., Kadri, M.C.T., Silva, M.C.B.L., Bogo, D., 2019. Antitumor effect of depsidones from lichens on tumor cell lines and experimental murine melanoma. *Brazilian J. Pharmacogn.* 29, 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.005>
- Araújo, H.D.A., Silva, J.G., Oliveira, J.R.S., Ribeiro, M.H.M.L., Martins, M.C.B., Bezerra, M.A.C., Aires, A.L., Albuquerque, M.C.P.A., Melo, M.R., Filho, N.T.P., Pereira, E.C., Silva, D.J.R., Dos Anjos, J. V., Falcão, E.P.S., Silva, N.H., Lima, V.L.M., 2019. Usnic acid potassium salt: Evaluation of the acute toxicity and antinociceptive effect in murine model. *Molecules* 24, 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules24112042>
- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78, 431–441. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012>
- Barnes, J., Halksworth, D., Shaw, C., Hider, B., Kinghorn, D., 2000. Pharmacognosy in the 21st century. *Pharmacology Journal* 264, 701-703.
- Barnett, L.M.A., Cummings, B.S., 2019. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Toxicity. *Semin. Nephrol.* 39, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.12.004>
- Benatti, M.N., Marcelli, M.P., 2009. Espécies de Parmotrema (Parmeliaceae, Ascomycota) do litoral centro-sul do estado de São Paulo, Brasil. I. Grupos químicos girofórico e lecanórico. *Acta Botanica Brasilica* 23, 1013-1026. doi:10.1590/S0102-33062009000400011
- Bogo, D., Matos, M.F.C., Honda, N.K., Pontes, E.C., Oguma, P.M., da Silva Santos, E.C., de Carvalho, J.E., Nomizo, A., 2010. *In vitro* Antitumour activity of orsellinates. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 65, 43–48. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-1-208>
- Bonomini, T.J., Holzmann, I., Thiesen, L.C., Fraton, E., Muller, A.F.F., Lucinda-Silva, R.M., Yunes, R.A., Malheiros, A., Gonçalves, A.E., Dalmagro, A.P., da Silva, K.A.B.S., de Souza, M.M., Santin, J.R., 2017. Neuropharmacological and acute toxicological evaluation of ethanolic extract of *Allamanda cathartica* L. flowers and plumieride. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 91, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.10.005>

Crăciunaș C., Crăciun C., Crăciun V., Dordea M., Toader-Radu M., 1996. Ultrastructural effects of certain cytostatics on rat spleen. *Curr. Probl. and Techn. In Cellular and Molecular Biology* 1, 311-317.

Culberson, C.F., 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thinlayer-chromatographic method. *Journal of Chromatography* 72, 113-125.

De Melo, M.G, Araujo, A.A.S., Serafini, M.R., Carvalho, L.F., Bezerra, M.S., Ramos, C.S., Bonjardin, L.R., Albuquerque-Júnior, C.R.L., Lima, J.T., Siqueira, R.S., Fortes, V.S., Fonseca, M.J.V., Quintans-Júnior, L.J., 2011. Anti- inflammatory and toxicity studies of atranorina etracted from *Cladina kalbii* in rodents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 47, 861-972.

De Melo, M.G, Santos, J.P.A., Serafini, M.R., Caregnato, F.F., Pasquali, M.A.B., Rabelo, T.K., Rocha, R.F., Quintans-Júnior, L.J., Silva, F.A., Araujo, A.A.S., Moreira, J.C.F., Gelain, D.P., 2011b. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metbolite. *Toxicology in vitro* 25, 462-468.

Diniz, M.F.F.M., Medeiros, I.A., Santos, H.B., Oliveira, K.M., Vasconcelos, T.H.C., Aguiar, F.B., Toscano, M.G., Ribeiro, Ê.A.N., 2006. Padronização do parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss e ratos Wistar. *Rev. bras. ciênc. saúde* 10, 171–176.

Ekwall, B., 1999. Overview of the final MEIC results: II. The *in vitro-in vivo* evaluation, including the selection of a practical battery of cell tests for prediction of acute lethal blood concentrations in humans. *Toxicol. Vitro* 13, 665–673. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(99\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(99)00061-2)

El-Shenawy, N.S., Hamza, R.Z., Khaled, H.E., 2017. Protective effect of α -lipoic acid against spleen toxicity of dimethylnitrosamine in male mice: Antioxidant and ultrastructure approaches. *Biomed. Pharmacother.* 96, 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.010>

Emsen, B., Turkez, H., Togar, B., Aslan, A., 2016. Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of olivetoric and physodic acid in cultured human amnion fibroblasts. *Hum. Exp. Toxicol.* 1-10. <https://doi.org/10.1177/0960327116650012>

Falcão, E.P.S., Silva, N.H., Gusmão, N.B., Ribeiro, S.M., Pereira, E.C., 2004. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen. *Acta bot. bras.* 18, 911–918. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000400022>

Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., Divakar, P.K., Crespo, A., Gómez-Serranillos, M.P., 2016. Evaluation of the antioxidant capacities and cytotoxic effects

of ten parmeliaceae lichen species. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2016, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2016/3169751>

Ghate, N.B., Chaudhuri, D., Sarkar, R., Sajem, A.L., Panja, S., Rout, J., Mandal, N., 2013. An antioxidant extract of tropical lichen, *Parmotrema reticulatum*, induces cell cycle arrest and apoptosis in breast carcinoma cell line MCF-7. PLoS One 8, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082293>

Gómez-Serranillos, M.P., Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., Divakar, P.K., Crespo, A., 2014. Parmeliaceae family: Phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. RSC Adv. 4, 59017–59047. <https://doi.org/10.1039/c4ra09104c>

Gonçalves, J.P., Martins, M.C.B., Buril, M. de L.L., Aguiar, J.D.S., Da Silva, T.G., Dos Santos Souza, T.G., Santos, N.P.D.S., Chagas, C.A., Pereira, E.C., Falcão, E.P.D.S., Da Silva, N.H., 2018. Antineoplastic Activity and Genotoxicity of Organic Extracts and Barbatic Acid Isolated from the Lichen *Cladonia salzmannii* Nyl. Int. Arch. Med. 11, 1–12. <https://doi.org/10.3823/2594>

Hale- JR., M.E., 1983. The Biology of Lichens, third ed. London: Edward Arnold Pub., England.

Han, D., Matsumaru, K., Rettori, D., Kaplowitz, N., 2004. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: Inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. Biochem. Pharmacol. 67, 439–451. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.09.032>

Hong, J.M., Suh, S.S., Kim, T.K., Kim, J.E., Han, S.J., Youn, U.J., Yim, J.H., Kim, I.C., 2018. Anti-cancer activity of lobaric acid and lobarstin extracted from the antarctic lichen *stereocaulon* *alpnum*. Molecules 23, 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules23030658>

Ivanova, V., Bačkor, M., Dahse, H.M., Graefe, U., 2010. Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*. Prep. Biochem. Biotechnol. 40, 377–388. <https://doi.org/10.1080/10826068.2010.525432>

Jain, P.K., Jain, A.P., 2016. Effect of *Parmotrema reticulatum* lichens on dermal wound healing with possible antioxidant and antibacterial mechanism. Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology 2, 10–14.

Khader, S.Z.A., Ahmed, S.S.Z., Venkatesh, K.P., Chinnaperumal, K., Nayaka, S., 2018. Larvicidal potential of selected indigenous lichens against three mosquito species – *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. Chinese Herb. Med. 10, 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2018.03.002>

Larsen, M.T., Kuhlmann, M., Hvam, M.L., Howard, K.A., 2016. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Mol. Cell. Ther.* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40591-016-0048-8>

Legaz, M.E.E., Vicente, C., 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiology* 71, 300-302.

Liu, X., Zheng, L., Zhang, R., Liu, G., Xiao, S., Qiao, X., Wu, Y., Gong, Z., 2016. Toxicological evaluation of advanced glycation end product N ϵ -(carboxymethyl)lysine: Acute and subacute oral toxicity studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 77, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.02.013>

Marinho, K.S.N., Antonio, E.A., Silva, C.V.N.S., Silva, K.T., Teixeira, V.W., Aguiar Júnior, F.C.A., Santos, K.R.R.P., Silva, N.H., Santos, N.P.S., 2017. Hepatic toxicity caused by PLGA-microspheres containing usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* (AHTI) during pregnancy in Wistar rats. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 1073–1084. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160650>

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Moura, M.R.L., Reyes, F.G.R., 2002. Drug-nutrient interaction: A review. *Rev. Nutr.* 15, 223–238. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732002000200011>

Nash III, T.H., 2008. *Lichen Biology*, second ed. Cambridge, USA: Cambridge University Press.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70, 461–477. <https://doi.org/10.1021/np068054v>

OECD – 425 Organization for Economic Cooperation and Development, 2008. Guideline for the Test of Chemicals, Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP).

Pramyothin, P., Janthasoot, W., Pongnimitprasert, N., Phrukudonm, S., Ruangrungsri, N., 2004. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 381-387.

Raj, P.S, Prathapan, A., Sebastian, J., Antony, A.K., Riya, M.P., Rani, M.R.P., Biju, H., Priya, S., Raghu, K.G., 2014. *Parmotrema tinctorum* exhibits antioxidant, antiglycation and inhibitory activities against aldose reductase and carbohydrate digestive enzymes:

An in vitro study. Nat. Prod. Res. 28, 1480–1484.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.909420>

Silva, M.M., Rocha, T.A., Moura, D.F., Chagas, C.A., Aguiar Júnior, F.C.A., Santos, N.P.S., Sobral, R.V.S., Nascimento, J.M., Leite, A.C.L., Pastrana, L., Costa, R.M.P.B., Nascimento, T.P., Porto, A.L.F., 2019. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 103, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.02.009>

Singh, D., Cho, W.C., Upadhyay, G., 2016. Drug-induced liver toxicity and prevention by herbal antioxidants: An Overview. Front. Physiol. 6, 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00363>

Spielmann, A.A., Marcelli, M.P., 2008. Parmeliaceae (Ascomycota liquenizados) nos barrancos e peraus da encosta da Serra Geral, Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil. II. Gêneros Canoparmelia, Hypotrachyna, Myelochroa, Parmelinopsis e Relicina. Iheringia - Ser. Bot. 63, 193–212.

Van Ryn, J., Trummelitz, G., Pairet, M., 2000. COX-2 Selectivity and Inflammatory Processes. Curr. Med. Chem. 7, 1145–1161.
<https://doi.org/10.2174/0929867003374255>

Yokouchi, Y., Imaoka, M., Niino, N., Kiyosawa, N., Sayama, A., Jindo, T., 2015. (+)-Usnic acid – induced Myocardial Toxicity in Rats. Toxicology Pathology 43, 424-434.
doi: 10.1177/0192623313503308

4 ARTIGO II

Artigo a ser submetido na *European Journal of Pharmaceutical Sciences*

Fator de impacto: 3.616

Avaliação do potencial citotóxico, antitumoral e estudo *in silico* do ácido salazínico isolado da *Parmotrema concurrens* (líquen)

Maria Aparecida da Conceição de Lira^a, Marllyn Marques da Silva^b, Tamiris Alves Rocha^c, Danielle Feijó de Moura^c, Erick Caique Santos Costa^a, Mayara dos Santos Maia^d, Luciana Scotti^d, Marcus Tullius Scotti^d, Maria de Lourdes Lacerda Buril^e, Eugênia Cristina Gonçalves Pereira^e, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior^f, Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira^b, Noemia Pereira da Silva Santos^b, Emerson Peter da Silva Falcão^g, Sebastião José de Melo^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Centro de Biociências - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

^b Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células, Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil;

^c Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

^d Laboratório de Quimioinformática - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil;

^e Laboratório de Geografia Ambiental, Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil;

^f Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil;

^g Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular. Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil;

Resumo

Apesar dos inúmeros avanços científicos, o câncer continua sendo uma das principais causas de morte no mundo, impactando seriamente os serviços de saúde pública. Com isso, há uma constante busca por moléculas promissoras para o tratamento desta doença. Os fenóis liquênicos são compostos de química relativamente simples e, amplamente descritos por seu potencial farmacológico. Este trabalho avaliou o potencial antitumoral de um depsídeo isolado de *Parmotrema concurrens*, o ácido salazínico, com ensaios *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. A molécula foi isolada a partir do extrato acetônico do líquen e recristalizada em acetona. Sua pureza foi confirmada através de CLAE (94%) e sua estrutura confirmada por RMN- ^1H e ^{13}C . Em seguida foi realizado o ensaio de citotoxicidade por MTT utilizando-se as linhagens celulares de Sarcoma-180 e MDA-MB-231. O ácido salazínico não foi considerado tóxico para ambas as células testadas, com valores de percentual de viabilidade celular de $79,49 \pm 4,15$ (%) e $86,88 \pm 1,02$ (%), respectivamente para Sarcoma-180 e MDA-MB-231. O ensaio de atividade antitumoral foi executado através do modelo murino (camundongos Albinos Swiss), utilizando o Sarcoma-180. Os animais foram tratados, durante 7 dias consecutivos, com doses de ácido salazínico (25 e 50 mg/kg) e de 5-Fluorouracil (20 mg/kg). O resultado mostrou uma taxa de inibição tumoral de mais de 80% para os animais tratados com o ácido salazínico e 65% para os que receberam o 5-Fluorouracil. Foram realizadas simulações de dinâmica molecular para estimar a flexibilidade das interações entre a proteína da timidilato sintase humana e, de derivados do ácido salazínico e do 5-Fluorouracil. Foi observado que o ácido salazínico apresentou uma maior capacidade de interação enzimática, com energia altamente favorável, do que o 5-Fluorouracil. Tais resultados comprovam o forte potencial do ácido salazínico como agente de inibição tumoral.

Palavras-chave: câncer; *docking* molecular; fungos liquenizados.

Introdução

As neoplasias malignas ainda configuram um grande problema de saúde pública mundialmente. Além do mais, os efeitos adversos das terapias representam um grande problema à tolerabilidade e aderência ao tratamento (Mun et al., 2018). Portanto, montar um plano terapêutico completo com o propósito de ter um bom resultado é importante para obtenção da cura. Porém, quando isso não se torna possível, o plano deve se voltar para suprimir a doença em um estado subclínico, oferecendo uma melhor qualidade de vida ao paciente (Wang, Lei e Han, 2018).

Contudo, algumas técnicas tradicionais usadas no combate às células cancerígenas têm agregado danos ao organismo, causando efeitos negativos na qualidade de vida do paciente. Portanto, selecionar métodos terapêuticos eficazes e eficientes, com menor custo e com menores efeitos colaterais, tornou-se um grande desafio (Abotaleb et al., 2018; Mun et al., 2018).

Os compostos fitoquímicos estão entre os candidatos mais promissores, demonstrando um forte potencial no combate a doença (Kapinova et al., 2018). Muitas pesquisas relatam a eficácia da utilização dessas moléculas na inibição da angiogênese (Song et al., 2012; Martins et al., 2016; Santos et al., 2018; Alexandrino et al., 2019), processo fundamental ao desenvolvimento neoplásico. Inúmeros medicamentos de origem natural ou semi-sintético são utilizados clinicamente e salvam milhares vida (Souza et al., 2007).

Os fungos liquenizados são formados por uma associação entre um fungo (micobionte) e uma alga ou cianobactéria (fotobionte) (Hale-Jr, 1983), são produtores de uma diversidade de metabólitos secundários, caracterizados por sua ampla diversidade estrutural e alta complexidade. Estes metabólitos são de natureza fenólica e conhecidos como substâncias ou fenóis liquênicos (Ebrahim et al., 2016).

As substâncias liquênicas são relatadas por possuírem atividades anticâncer (Zuo et al., 2015; Ebrahim et al., 2016; Sólar et al., 2016; Zhou et al., 2017; Yang et al., 2018 e Geng et al., 2018), anti-inflamatória (Jain et al., 2016), antiproliferativa, antibacteriana, antifúngica (Basile et al., 2015), leishmanicida (Luz et al., 2015), larvicida (*Aedes aegypti*) (Moreira et al., 2016 e Kharder et al., 2018), antioxidante (Jain e Jain, 2016) e muitas outras.

Contudo, a necessidade da busca de novos agentes terapêuticos, provindos de meios naturais, é de extrema importância para possível cura e tratamento de doenças

neoplásicas. O arsenal terapêutico disponível tem crescido enormemente, mas possivelmente ainda há muito mais a se descobrir, especialmente se levarmos em conta o potencial ainda não conhecido da liquenobiota brasileira.

Portanto, o objetivo deste estudo foi isolar o ácido salazínico do extrato acetônico de *Parmotrema concurrens*, avaliar seu potencial citotóxico em células cancerígenas, antitumoral em camundongos expostos ao Sarcoma-180, além de analisar eventuais alterações comportamentais, parâmetros bioquímicos, possíveis alterações histopatológicas no fígado, baço e rim dos animais em estudo. E também, analisar a possível relação de acoplamento do ácido salazínico na timidilato sintase humana.

Materiais e Métodos

Coleta e identificação da espécie

A espécie *P. concurrens* foi coletada no município de Taquaritinga do Norte, situado no agreste Pernambucano, Nordeste do Brasil, altitude de 785 m e coordenadas de latitude 07° 54' 11" S e longitude de 36° 02' 39" O. O material *in natura* foi identificado pela Dr^a Maria de Lourdes Lacerda Buril, do Laboratório de Geografia Ambiental do Departamento de Ciências Geográficas – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); uma exsicata do mesmo foi depositada no Herbário UFP - Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de depósito UFP84254.

Extração e isolamento do composto liquênico

O extrato foi obtido pelo método de exaustão em aparelho de Soxhlet. Foi utilizada acetona (200 mL) à temperatura de ebulição. Em seguida o solvente foi evaporado em rotaevaporador à temperatura 40 °C.

O extrato acetônico (2 g) foi submetido a recristalização para obtenção do ácido salazínico (SAL). Foi utilizado o método de precipitação por acetona (Micheletti et al., 2009) com algumas modificações. Foram feitas filtrações a vácuo do extrato, em funil de fundo poroso G4, utilizando acetona como solvente de lavagem e, em seguida, o sólido resultante foi centrifugado em 20 mL de acetona, a 1.500 rpm por 10 min. O

sobrenadante foi aspirado e o composto foi colocado em dessecador, para evaporação total do solvente.

Análises cromatográficas

Cromatografia em Camada Delgada - CCD

A análise em CCD do extrato acetônico foi realizada através da metodologia descrita por Culberson (1972). O extrato foi diluído até a concentração de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, sendo aplicados $10 \mu\text{L}$ da solução em cromatoplasas de sílica Gel Merck $F_{254\text{nm}}$. O sistema de eluição utilizado foi a mistura tolueno:dioxano:ácido acético (180:45:5, v/v/v). As bandas foram observadas sob luz UV (254 e 366 nm), e reveladas com ácido sulfúrico a 10% e posterior aquecimento a 100°C por 5 min em placa aquecedora.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

A análise em CLAE foi realizada seguindo a metodologia descrita por Legaz e Vicente (1983) em cromatógrafo Hitachi (655 A-11, Tóquio, Japão) acoplado a um detector UV CG437-B ajustado a 254 nm, acoplado a uma coluna de fase reversa NST-C18 MicroPack MCH-18 de $250 \times 4,6 \text{ mm}$ e 5 mm , Berlim, Alemanha (Merck® KGaA, Darmstadt, Alemanha). A amostra foi injetada na concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ dissolvida em clorofórmio (Merk®). A fase móvel foi constituída por metanol:água deionizada:ácido acético (80:19,5:0,5, v/v/v), em sistema isocrático, numa pressão de 88 atm a temperatura ambiente $27 \pm 3^\circ\text{C}$. Os resultados foram avaliados mediante a determinação do tempo de retenção (T_r) e comparação com o padrão do referido ácido e cálculo da área dos picos, respectivamente.

Análise do perfil químico do ácido salazínico

Ressonância Magnética de Prótons e Carbono - RMN

A confirmação da estrutura química do SAL foi realizada através de espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de H^1 e C^{13} . Os espectros de RMN foram obtidos de um espectrofotômetro VARIAN modelo UNITY PLUS-300MHz, utilizando DMSO - d_6 como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, e as constantes de acoplamento (J) são apresentadas em Hz.

Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica foi determinada através do método do MTT (Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Mosmann, 1983) em linhagem de células de câncer, S-180 (Sarcoma-180) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano) provenientes do Banco de Células do Departamento de Antibióticos – UFPE, Recife e Rio de Janeiro (BCRJ), respectivamente. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico, Penicilina (10.000 UI) e Estreptomicina (10 mg/mL), incubadas a 37 °C. Para o cultivo do S-180 foram incluídos 5% de CO₂. As células (10⁵ células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida, o SAL foi dissolvido em DMSO a 1% (Dimetilsulfóxido) e adicionado aos poços nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL. Após 24 h de incubação foram adicionados 25 µL de MTT (5 mg.mL⁻¹) em cada poço e as células reincubadas por 3 h. O meio de cultura com o MTT foi aspirado e, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância foi obtida a um comprimento de onda de 630 nm em leitor de microplaca (Biotek Elx808). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores de citotoxicidade foram expressos como viabilidade celular: (A_{bs} de célula tratada população X 100 / A_{bs} da população de células não tratadas) (Silva et al., 2019).

Animais experimentais

Para a realização do estudo *in vivo* foram utilizados camundongos Albinos Swiss (*Mus musculus*) machos (35-45g), com idade de 60 dias. Os animais foram submetidos a jejum de 8 horas antes de cada experimento. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE (Nº 23076.012019/2018.58), com as normas proposta pelo Conselho Nacional de experimentação Animal (CONCEA) e, pelas normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Atividade antitumoral

O tumor experimental S-180 foi mantido nos camundongos na forma ascítica, com frequência de manutenção de 7 dias. Células do tumor ascítico ($5,0 \times 10^6$ células mL^{-1}) foram inoculadas via subcutânea na região axilar direita do camundongo, de modo a desenvolver o tumor sólido.

O tratamento teve início 24 h após inoculação das células tumorais e foi realizado por 7 dias consecutivos. Injeções de soluções do SAL foram administradas intraperitonalmente nas doses de 25 ou 50 mg/kg, correspondendo a 1,25 e 2,5%, da dose máxima da toxicidade aguda, respectivamente (dados não apresentados). Os animais do grupo controle negativo foram tratados com solução salina + tween 80 a 5%, enquanto os animais do grupo controle positivo foram tratados com 5-Fluorouracil (20 mg/kg). Foram utilizados 10 animais por grupo para o modelo experimental.

Um dia após término do tratamento, os animais foram anestesiados com solução de cetamina (1,25 g/kg) e xilazina (0,62 g/kg). Foram realizadas coletas de sangue por punção cardíaca para análise bioquímica e, consecutivamente, foram sacrificados por overdose da solução anestésica utilizada.

A inibição tumoral foi determinada a partir do peso médio dos tumores dos grupos que receberam tratamento em relação ao grupo não tratado: $IT\% = (C - T)/C \times 100\%$, onde C é o peso médio dos tumores do grupo controle negativo e T corresponde ao peso médio dos grupos tratados.

Para o cálculo da média dos pesos dos tumores dos grupos controle foi desconsiderado aqueles cujos pesos corresponderam a 0,39g ou menos, denominados “no-takes” (Martins et al., 2016).

Avaliação do peso corporal, tumor e órgãos

Os camundongos foram pesados durante todos os dias de experimento. Os pesos corporais médios de cada grupo foram calculados na razão do ganho de peso corporal: $(\text{peso médio final} - \text{peso médio inicial}) / \text{peso médio inicial} \times 100\%$.

Os órgãos (baço, rim e fígado) e tumor foram coletados e pesados após o sacrifício dos camundongos. O peso relativo dos órgãos foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $(\text{peso médio do órgão} / \text{peso médio corporal}) \times 100$ (Zhang et al., 2017).

Análise histomorfométrica

Tumores e órgãos (fígado, rins e baço) foram dissecados e fixados em solução de formol (10%) tamponada, permanecendo nesta solução por um período de 48 h. Em seguida, as amostras foram desidratadas em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizadas por xilol, impregnadas e incluídas em parafina.

Os blocos foram cortados em micrótomo com ajuste para 4 µm de espessura. Os cortes teciduais já inclusos nas lâminas foram mantidos em estufa com temperatura de 60 °C por 24 h e, submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H&E). As imagens histológicas dessas lâminas foram capturadas por câmera digital Moticam 2300, acoplada ao microscópio óptico, sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se assim 20 campos por lâmina, com uma ampliação de 100x para lâminas de baço e 400x para lâminas de fígado, rim e tumor.

As fotomicrografias foram avaliadas usando o software ImageJ® versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

As análises do tecido hepático foram feitas através de contagens de células hepáticas (hepatócitos e células endoteliais). As estruturas renais foram avaliadas pela mensuração da área do glomérulo e do corpúsculo renal. O tecido esplênico foi avaliado por porcentagem de mensuração das áreas das polpas branca e vermelha. O tecido tumoral foi avaliado através da contagem de células em fases de mitóticas.

Estudo *in silico* do acoplamento do SAL e a timidilato sintase humana - hTS

Preparação dos ligantes

A estrutura química do SAL foi desenhada utilizando o software BIOVIA Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>). As estruturas do 5-FU e seu derivado ativo (FdUMP - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato) foram obtidas por meio do banco de dados de química PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e, todas as energias estruturais foram minimizadas através do software Avogadro (<https://avogadro.cc/>). Os respectivos estados de protonação das estruturas foram considerados no pH= 7 e, posteriormente, salvas no formato sdf*.

Obtenção dos metabólitos

As estruturas metabolizadas do SAL, relacionadas com as reações mediadas pela enzima monooxigenase, foram previstas utilizando o software MetaSite, da Moldiscovery (<https://www.moldiscovery.com/software/metasite/>), através do reconhecimento enzima-substrato. Em seguida, as cinco estruturas melhor ranqueadas foram selecionadas, desenhadas e suas energias minimizadas com o software BIOVIA Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

Preparação da macromolécula

A enzima Timidilato Sintase humana (hTS) (PDB: 1HVV) foi recuperada do PDB (Protein Data Bank) e, em seguida, excluíram-se manualmente todos os ligantes, íons e moléculas de água da estrutura original e, adicionaram-se os átomos de hidrogênio através do software BIOVIA Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

Ancoragem

Para a realização do processo de ancoragem, foram utilizados os softwares AutoDock Vina, AutoDock 4 e Molegro Virtual Docker. O sítio ativo foi designado por meio das interações moleculares existentes entre os resíduos de aminoácidos da enzima-substrato e da enzima e o ligante co-cristalizado. A caixa de grade foi ajustada e fixada em um raio de 25 Å, de modo a englobar todos os resíduos de aminoácidos do sítio ativo e, as interações entre a enzima e o ligante da estrutura cristalina de raios-X. Os resultados dos cálculos foram obtidos em valores de energia de ligação para cada pose dos ligantes acoplados a enzima alvo.

Docking Consenso

A análise de consenso foi realizada através do método Média das pontuações em escala automática (AASS) (Oda et al., 2006). Inicialmente, realizou-se a normalização de cada pontuação obtida nos diferentes programas de docking utilizados, para valores entre 0 e 1. A normalização é realizada entre as pontuações

obtidas em seus respectivos programas de docking, por meio da divisão da pontuação de cada molécula pela menor pontuação obtida. A pontuação final de cada molécula e o ranking foram estabelecidos pela média de todas as pontuações normalizadas.

Validação de ancoragem

Para validar o processo de ancoragem, foi realizado o re-dock da estrutura do ligante co-cristalizado, extraída da enzima pelo arquivo original do PDB e interpretado em termos do RMSD (deslocamento médio da raiz quadrada) (1ª pose), dos átomos do ligante re-encaixado e cristalográfico (Silva-Júnior et al., 2018).

Análises e Ilustrações

As análises das interações entre os resíduos de aminoácidos da hTS e os ligantes, bem como as ilustrações, foram realizadas através do software Molegro Virtual Docker.

Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas para estimar a flexibilidade das interações entre a proteína hTS e ligantes, usando o software GROMACS 5.0 (Abraham et al., 2015; Berendsen et al., 1995). A topologia dos ligantes foi preparada usando o gerador de topologia ATB (Malde et al., 2011) aplicando o campo de força GROMOS96 54a7. A topologia da proteína também foi preparada usando o campo de força GROMOS96 54a7 no GROMACS. A simulação da dinâmica molecular foi realizada usando o modelo de água SPC de carga pontual estendida em uma caixa cúbica (Bondi, 1964). O sistema foi neutralizado pela adição de íons (Cl^- e Na^+) e, minimizado para remover maus contatos entre moléculas complexas e solvente. O sistema também foi balanceado em 300K usando o algoritmo V-rescale em 100ps, representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido por equilíbrio a 1 atm de pressão usando o algoritmo Parrinello-Rahman como NPT (partículas numéricas constantes pressão e temperatura) até 100ps. As simulações de DM foram realizadas em 5.000.000 etapas a 10ns. Para determinar a flexibilidade da estrutura e, se o complexo é estável perto da estrutura experimental, o deslocamento médio da raiz quadrada de todos os átomos de $\text{C}\alpha$ foi calculado em relação às estruturas de partida. Flutuações médias

da raiz quadrada (RMSF) também foram analisadas para entender o papel dos resíduos próximos ao local de ligação do receptor. Os gráficos de RMSD e RMSF foram gerados no software Grace e, a proteína e os ligantes foram visualizados no UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

Análise estatística

Os resultados da atividade citotóxica foram expressos como as médias das repetições $\pm$ desvio padrão. Para análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste de Tukey para comparações múltiplas. Um valor de $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância.

A avaliação histomorfométrica foi realizada através do teste de normalidade utilizando o Teste Smirnov Kolmogorov, para a análise da normalidade. Dessa forma, um teste não paramétrico (Mann-Whitney U) calculado pelo SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) foi utilizado para analisar esses dados. Os dados foram expressos como média $\pm$ DP, com valores de $p < 0,05$ comparado com o controle considerado significativo.

Resultado e discussão

Obtenção do SAL

O ácido salazínico, isolado do extrato acetônico de *P. concurrens*, identificado através dos dados obtidos em CCD ($R_f = 0,15$) e CLAE ($Tr = 2,97$ min) (Figura 1), apresentou dados compatíveis com aqueles descritos por Falcão et al. (2004) e Manojlović et al. (2012), que descreveram o Tr de 3,47 e 3,01 min, respectivamente, para a substância.

A estrutura química do SAL foi confirmada com os resultados de RMN- H^1 e C^{13} , corroborando com os dados descritos por Huneck e Yoshimura (1996), Eifler-Lima et al. (2000) e Micheletti et al. (2009).

Ácido salazínico (Figura 2): RMN- H^1 (DMSO – d_6 , 400MHz / δ ppm): δ 2,379 (3H, s, CH_3); δ 4,618 (2H, s, CH_2); δ 6,779 (2H, s, H2, H9); δ 10,381 (1H, s, H_2O , CHO). ^{13}C (DMSO- d_6 , 400 MHz) DC: 94,89 (C-2), 137,30 (C-3), 138,09 (C-4), 165,89 (C-6), 110,67 (C-7), 163,56 (C-8), 117,42 (C-9), 152,28 (C-10), 111,95 (C-11), 160,29 (C-

12), 148,13 (C-14), 123,45 (C-15), 152,83 (C-16), 109,66 (C-17), 164,01 (C-18), 192,75 (C-20), 21,43 (C-23), 52,69 (C-25). Rendimento 10.36%.

Figura 1. Cromatogramas em CLAE do SAL isolado da *P. concurrens* (A); padrão do SAL (B)

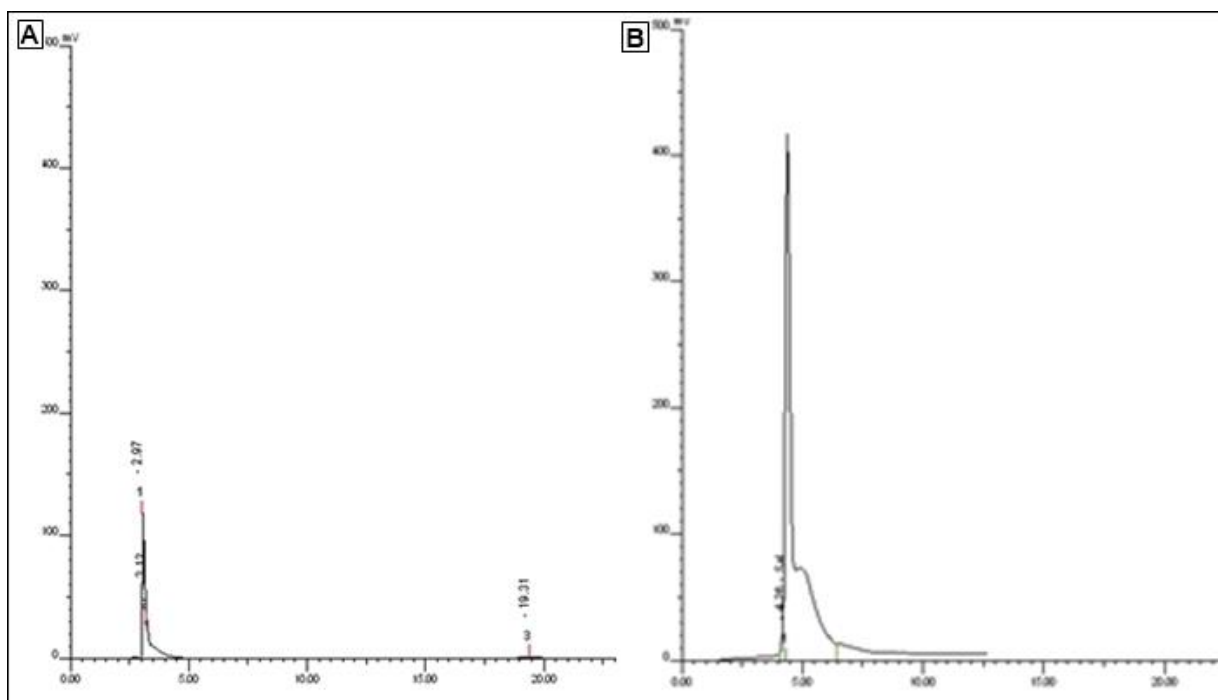
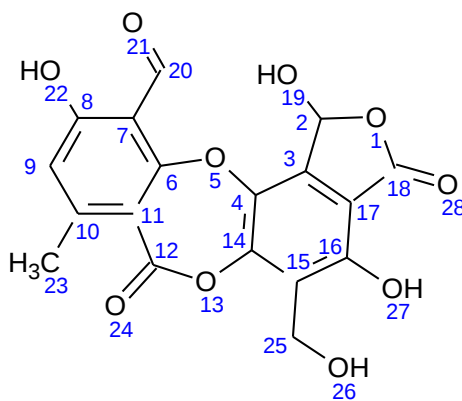


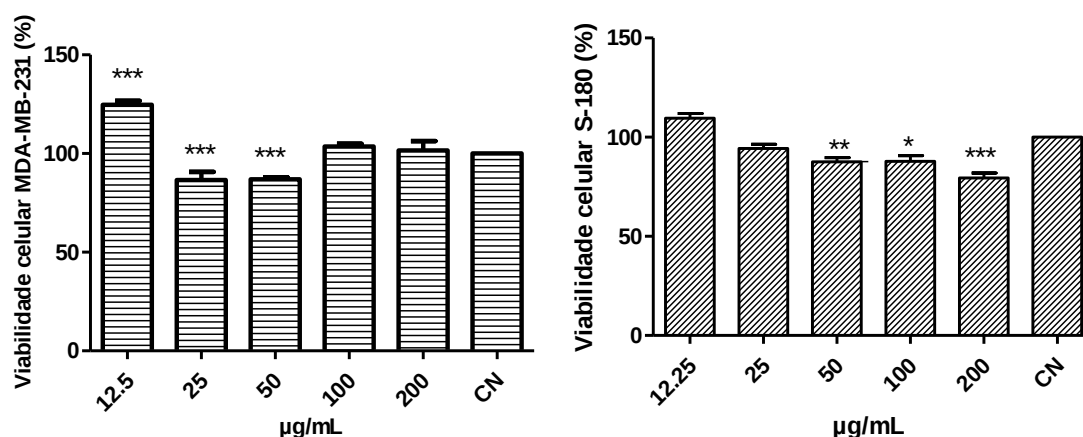
Figura 2. Estrutura química do ácido salazínico



Ensaio citotóxico

O SAL mostrou uma porcentagem de viabilidade celular de $86,54 \pm 3,33$ (%) e $86,88 \pm 1,02$ (%) nas doses de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para a linhagem celular MDA-MB-231 e $79,49 \pm 4,15$ (%) na dose de 200 $\mu\text{g/mL}$ para S-180 em um período de 24 h de incubação, figura 3.

Figura 3. Viabilidade celular de linhagens de MDA-MB-231 e S-180 frente ao SAL



Valores expressos em média $\pm$ DP. *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001 v.s CN. A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Controle negativo (CN) = salina + 5% tween 80.

Paluszczak et al. (2018) também avaliaram o SAL em ensaios de viabilidade celular, utilizando linhagens celulares de carcinoma colorretal (HCT116 e DLD-1). Verificaram que na dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ houve uma porcentagem de aproximadamente 60% de viabilidade celular para as linhagens testadas. Micheletti et al. (2009) também relataram a ação do SAL (25 $\mu\text{g/mL}$) em células de câncer de mama humano, MDA-MB-435, e observaram uma taxa 85,31% de viabilidade celular, tais dados corroboram com o presente estudo.

Alexandrino et al. (2019) comprovaram a ação antiproliferativa do SAL em linhagens celulares K562 (leucemia mielóide crônica), HT-29 (câncer de cólon), PC-03 (câncer de próstata) e B16-F10 (melanoma de murino), cujos resultados mostraram o potencial do SAL na inibição de cerca de 50% do crescimento dessas linhagens celulares.

Os dados citotóxicos deste trabalho estão condizentes também com a avaliação feita por Manojlović et al. (2012), que avaliaram o SAL frente a células cancerígenas, FemX (melanoma humano) e LS174 (carcinoma do cólon humano) e, verificaram uma taxa de aproximadamente 65% de viabilidade celular para as células estudadas. O conjunto de dados disponíveis parece indicar que o SAL não possui altas taxas de toxidez em linhagem celulares cancerígenas.

Avaliação do efeito do SAL em camundongos portadores do tumor S-180

Avaliação do peso corporal e órgãos

Os dados obtidos mostram perda de peso logo após a inserção das células tumorais, em todos os grupos analisados. Ao decorrer do tratamento, ocorreu um aumento do peso corporal, em todos os grupos, porém, no sexto dia, os animais tratados com SAL (25 mg/kg) perderam peso, como visto na figura 4. Contudo, apesar das mudanças nos pesos corporais dos camundongos tratados com o SAL, estes não foram significativamente diferentes do controle, entretanto houve diferença significativa apenas para o grupo que recebeu o 5-FU.

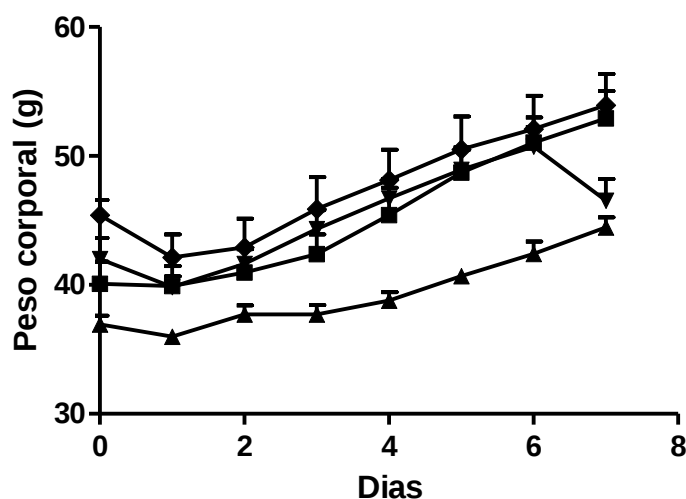
Em relação ao índice de ganho corporal, todos os animais tratados tiveram um percentual menor no ganho de peso do que o grupo controle negativo, sendo que o grupo tratado com SAL (25 mg/kg) apresentou um percentual mais baixo, de 13,18%, como visto na tabela 1.

No que se refere a análise macroscópica dos órgãos, a observação feita não forneceu dados relevantes para a confirmação de possíveis danos. No geral, os órgãos pareciam saudáveis, sem alterações morfológicas ou lesões macroscópicas. Porém, houve diferença significativa no peso do fígado de todos os animais tratados, em relação ao controle negativo. Também foi visto aumento no peso dos rins dos animais expostos ao SAL (25 mg/kg) em comparação ao controle negativo, porém não houve diferença significativa no peso do baço (Tabela 1).

As mudanças de peso corporal são um indicativo de possível efeito tóxico ao organismo, causado pela substância aplicada (Sugiura and Stock, 1952; El Hilaly, Israili and Lyoussi, 2004). Também podem estar relacionadas às instabilidades no apetite dos animais, com relação à dieta e oferta de água *ad libitum* (Aniagu et al., 2005). Entretanto, outra possível causa seria o desequilíbrio metabólico gerado pelo tumor.

Contudo, é de extrema importância a comparação estatística de pesos dos órgãos entre os animais tratados e não tratados, de modo a se prever um possível potencial tóxico da substância testada (Wolfsegger et al., 2009).

Figura 4. Peso corporal



Valores expressos em média $\pm$ DP do ganho de peso corporal. (N= 10). A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. (■) = Controle negativo; (▲) = 5-FU; (▼) = SAL (25 mg/kg) e (◆) = SAL (50 mg/kg).

Tabela 1. Índice de ganho de peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos com tumor S-180 e tratados com SAL e com 5-FU.

Grupos	Índice de peso corporal (%)	Baço (g)	Rins (g)	Fígado (g)
CN	30,19	0,66 $\pm$ 0,22	1,15 $\pm$ 0,24	5,61 $\pm$ 0,54
5-FU	20,36	0,55 $\pm$ 0,12	1,20 $\pm$ 0,11	6,49 $\pm$ 0,32**
SAL25	13,18	0,86 $\pm$ 0,19	1,41 $\pm$ 0,18*	6,59 $\pm$ 0,24***
SAL50	19,76	0,84 $\pm$ 0,18	1,30 $\pm$ 0,12	6,44 $\pm$ 0,32**

Valores expressos em média $\pm$ DP; (N= 10); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, *p <0,05, **p <0,01; ***p <0,001 v.s CN= Controle negativo; 5-FU= 5-Fluorouracil e SAL= ácido salazínico 25 / 50 mg/kg.

Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Verificou-se que não houve diferença significativa entre os grupos tratados em comparação com o grupo controle negativo, em relação aos níveis séricos de albumina, proteínas totais, e alanina aminotransferase (ALT) presentes no plasma sanguíneo. Porém, houve uma diminuição nos níveis de aspartato aminotransferase (AST) no grupo que recebeu o SAL25 e, diminuição nos níveis de triglicerídeos para todos os grupos tratados, comparados ao controle negativo. Foi visto também um aumento na taxa de glicose para os grupos expostos ao SAL25 e 5-FU, e também aumento nos níveis de colesterol para os animais que receberam SAL25, tabela 2.

ALT e AST são biomarcadores bastante específicos da hepatotoxicidade. São utilizados nos primeiros ensaios clínicos para monitorar lesões agudas provocadas pela ingestão de drogas terapêuticas (Ozer et al., 2008; Liu et al., 2016). Porém a ALT é um marcador hepático mais específico que a AST. A enzima AST pode ser encontrada no músculo cardíaco, músculo esquelético, na região cerebral e também no fígado. Por isso, não é possível confirmar prováveis danos hepáticos com o resultado dos níveis de AST na corrente sanguínea (Ozer et al., 2008).

Foi verificada uma diminuição significativa nos níveis séricos de triglicerídeos dos animais tratados. Foi também verificado aumento nos níveis de glicose nos camundongos tratados com o SAL25 e o 5-FU. Estes resultados podem gerar a produção de alguns efeitos danosos ao organismo, devido ao desequilíbrio metabólico (Aniagu et al., 2005).

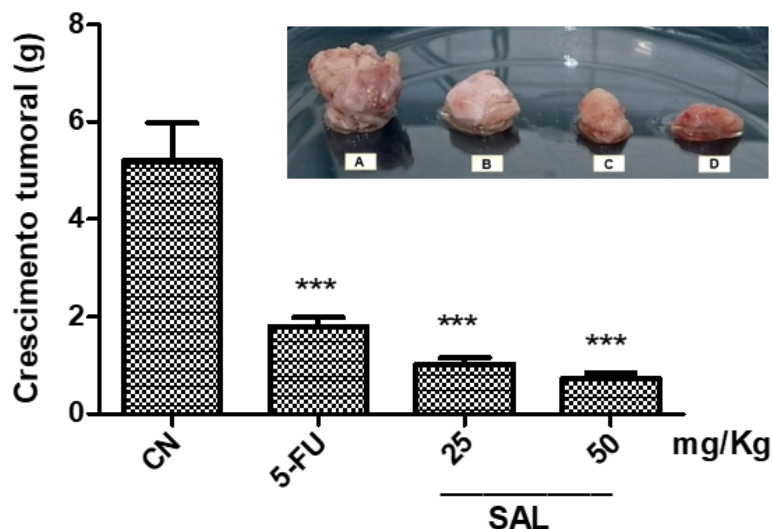
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos analisados de camundongos expostos ao S-180 e tratados com SAL e 5-FU

Grupo	ALT (U/L)	AST (U/L)	Albumina (g/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Proteínas totais (g/dL)	Glicose (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
CN	59,70±9,94	246,30±42,86	2,87±0,10	213,43±30,10	4,74±0,14	68,60±20,40	127,72±6,43
5-FU	45,73±8,56	230,77±43,72	2,99±0,10	149,66±22,68***	4,93±0,27	132,06±9,32***	120,95±8,97
SAL25	60,89±15,55	229,46±32,77	2,91±0,26	189,01±35,69**	4,88±0,27	105,65±13,87***	142,13±9,44*
SAL50	53,39±14,68	178,90±44,71*	2,94±0,18	155,73±19,50***	4,85±0,23	72,48±10,51	121,37±12,95

Valores expressos em média ± DP; (N= 10); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, *p <0.05, **p <0.01; ***p <0.001 v.s CN= Controle negativo; 5-FU= 5-Fluorouracil; SAL= ácido salazínico 25 / 50 mg/kg; ALT= Alanina aminotransferase e AST= Aspartato aminotransferase.

Crescimento e inibição tumoral

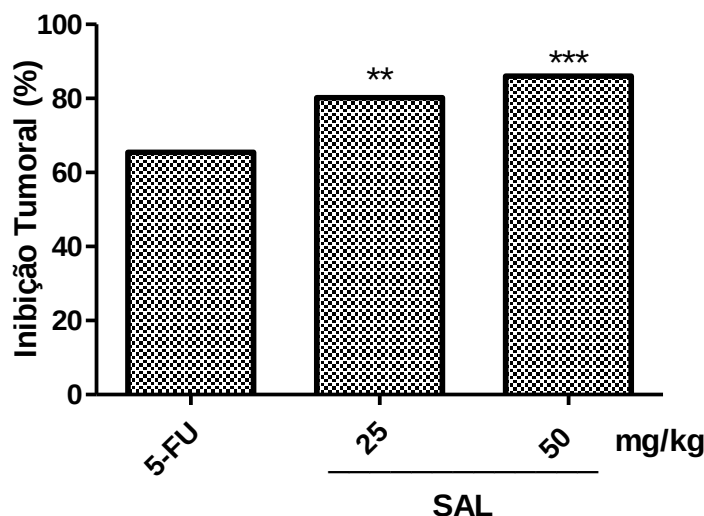
Foi observada uma diferença significativa no peso dos tumores de todos os grupos tratados em comparação com o grupo controle negativo ($5,2 \pm 1,91$ g). Verificou-se uma maior redução estatisticamente significante nos tumores dos animais expostos ao SAL (25 ou 50 mg/kg), $1,03 \pm 0,39$ e $0,73 \pm 0,35$ g, respectivamente. O grupo tratado com o 5-FU apresentou uma média de peso de $1,79 \pm 0,56$ g (Figura 5). Todos os animais sobreviveram ao final do tratamento sem alterações comportamentais.

Figura 5. Crescimento tumoral (mg/kg)

Valores expressos em média $\pm$ DP; (N= 10); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. ***p < 0.001 v.s CN= Controle negativo **(A)**; 5-FU= 5-Fluorouracil **(B)**; SAL= ácido salazínico 25 mg/kg **(C)** e 50 mg/kg **(D)**.

Os animais tratados com as diferentes doses do SAL, apresentaram resultados promissores quanto a porcentagem de inibição do tumor S-180, sendo o grupo tratado com a dose de 50 mg/kg mostrando-se com um melhor percentual, 86% de inibição. Para os animais que receberam a dose de 25 mg/kg foi verificada uma taxa de 80,23% de inibição tumoral. Já o grupo exposto ao 5-FU apresentou porcentagem de inibição de 65,46% (Figura 6).

Figura 6. Inibição tumoral (%)



Valores expressos em média $\pm$ DP; (N= 10); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, **p <0.01; ***p <0.001 v.s 5-FU = 5-Fluorouracil; SAL= ácido salazínico.

O S-180 é considerado um tumor válido para determinar a atividade antitumoral, gerando versatilidade na forma de tumor ascítico e sólido, dependendo do local de inserção, além de sua agressividade ao organismo. Dessa forma, possui um uso seguro para aplicabilidade em estudos pré-clínicos de substâncias naturais ou sintéticas. A utilização dessa linhagem celular *in vitro* e *in vivo* é suficiente para comprovar o potencial antitumoral da molécula testada (Silva, Nascimento e Porto, 2019).

Um agente com um potencial antineoplásico é considerado viável quando tem a capacidade de retardar o processo de proliferação celular e desencadear sinalização de mecanismos que possam iniciar o processo de morte celular (Debnath et al., 2017).

Esses resultados corroboram com os de Alexandrino et al. (2019), que avaliaram o potencial do SAL (33,3 mg/kg) em camundongos portadores do tumor B16-F10 (melanoma de murino) e também verificaram uma redução do crescimento tumoral (83%) nos animais tratados com SAL. No entanto, a concentração do SAL utilizada pelos autores foi maior que a analisada neste estudo (25 mg/kg) e, obteve-se um percentual de inibição tumoral de 80%.

Em seus estudos, Geng et al. (2018) também evidenciaram o efeito antineoplásico de outro fenol liquênico, o ácido úsnico. Este componente, apesar de não ser uma depsidona como o SAL, apresenta diversas similaridades em sua

estrutura química e origem biossintética em comum. Os autores avaliaram ação do ácido úsnico (100 mg/kg) e do 5-FU (25 mg/kg) em ratas BALB/C com câncer gástrico e, verificaram que o tratamento com o ácido úsnico foi significativamente mais eficaz na supressão do crescimento do tumor do que com o fármaco comercial, 5-FU. Corroborando com o presente o estudo, dados mostram que alguns ácidos liquênicos são mais eficazes do que o 5-FU.

O 5-FU é amplamente utilizado na quimioterapia, pertencente ao grupo dos agentes antimetabólitos e, age bloqueando a síntese do DNA inibindo o metabolismo de coenzimas do ácido fólico. É um análogo pirimidínico fluorado e, possui uma taxa de resposta de agente único de 10 a 30%. No entanto, seu uso contínuo pode causar efeitos colaterais graves, incluindo mielossupressão e imunossupressão, devido ao fato de possuir baixa seletividade para células tumorais em relação às células sadias (Longley et al., 2004; Almeida et al., 2005; Zhang et al., 2017).

O mecanismo da toxicidade celular do 5-FU foi atribuído a uma incorporação negativa de fluoronucleotídeos no DNA e no RNA e também na inibição da timidilato sintase (TS) (enzima sintética de nucleotídeo). A atividade enzimática da TS é consideravelmente aumentada em células neoplásicas, sendo que sua atividade está diretamente ligada à velocidade da proliferação tumoral (Longley et al., 2003). Contudo, a quimioterapia ainda é um dos métodos mais eficientes e difundidos para terapias antineoplásicas (Zhao et al., 2014).

Além do mais, a quimioterapia pode ser usada antes ou depois do processo de retirada do tecido afetado, podendo ainda ser utilizada em conjunto com outros meios de tratamentos, dependendo do estágio do câncer e estado clínico do paciente (Wang, Lei e Han, 2018). Acrescenta-se a isto o fato de que, estudos mostram que moléculas bioativas de origem natural destacam-se como pretendentes promissores para este fim (Kapinova et al., 2018).

Por produzir diferentes classes de metabólitos, os líquens são considerados organismos promissores na busca de agentes terapêuticos no combate a doenças neoplásicas. Há diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* que comprovam efeitos antitumoral das substâncias liquênicas (Solárová et al., 2020). Sabe-se ainda que o efeito antitumoral desses metabólitos pode ser mediado pela indução direta a apoptose celular, bem como pela ação antiproliferativa (Solár et al., 2016).

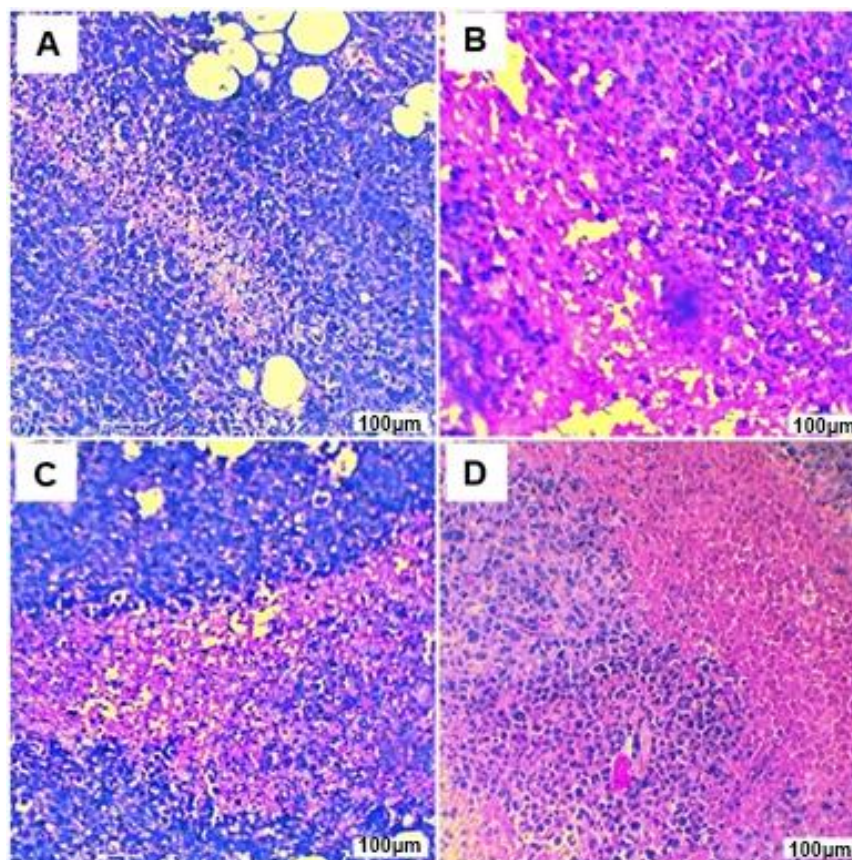
Já foram descritos diversos estudos com ação de metabólitos liquênicos no tratamento do câncer, em modelos murinos (Yang et al., 2018; Geng et al., 2018; El-Garawani et al., 2019; Mammadov et al., 2019). Em adição, foi relatado o potencial da atranorina em células 4T1 (carcinoma de mama) (Solár et al., 2016) e em LLC (carcinoma de pulmão) (Zhou et al., 2017), sugerindo que compostos liquênicos possuem propriedades que inibem células cancerígenas.

Outros estudos confirmam esse fato, como os de Ebrahim et al. (2016), que observaram a ação do ácido norstíctico em linhagem de câncer de mama, MDA-MB-231, inibindo a proliferação, migração e invasão celular e, também no crescimento tumoral. Destaca-se também a eficácia do ácido barbático na inibição do tumor S-180 em ratos (Martins et al., 2016). Tais dados confirmam que metabólitos liquênicos são considerados fortes candidatos a agentes quimioterápicos.

Avaliação histomorfométrica do tumor S-180

As análises histopatológicas dos tumores S-180 dos grupos controle negativo e dos tratados apresentaram características tais como, células pleomórficas e com anaplasia, núcleos hipercromáticos e com vários graus de pleomorfismo. Além disso, foram observadas áreas de invasão muscular, invasão do tecido adiposo unilocular e infiltração de vasos sanguíneos. Esses achados corroboram com o descrito por Santos et al. (2018), que destacam o potencial infiltrativo do S-180 nos tecidos adjacentes, como nervos, gordura e fibras musculares. Todos os grupos apresentaram necrose tecidual, com maior extensão de área para os grupos tratados (Figura 7). Foi vista ainda a presença de proliferação celular, com altos números de fases mitóticas.

Figura 7. Fotomicrografias representativas do tumor S-180 de camundongos tratados com SAL e 5-FU



Grupo controle negativo **(A)**; tratados com 5-FU **(B)**; tratados com SAL nas doses de 25 **(C)** ou 50 mg/kg **(D)**. Coloração em H&E e 100X de ampliação.

Foi observada, em todos os grupos estudados, a presença de mitoses atípicas. Não foram vistas diferenças significativas entre a quantidade de mitoses do grupo controle negativo em relação aos grupos experimentais, obtendo-se como resultados para os animais do controle negativo, 5-FU e SAL (25 e 50 mg/kg) valores médios de $10,63 \pm 2,48$; $10,06 \pm 2,69$; $10,43 \pm 3,99$ e $10,69 \pm 3,34$ números de mitoses por fotomicrografia, respectivamente.

De acordo com Cireşan et al. (2013) e Veta, Van Diest e Pluim. (2015) a quantidade de mitoses visíveis nas seções histológicas é vista como um importante indicador para a triagem e avaliação da neoplasia. Informa também a agressividade das células tumorais fornecendo um valor prognóstico reprodutível e independente em tumores invasivos (Van Diest, Van Der Wall e Baak, 2004; Roux et al., 2013).

No decorrer da proliferação celular ocorrem processos nos quais algumas fases podem ser interpretadas. Logo após a um estado quiescente (G0) as células recebem

estímulos apropriados e entram na fase de crescimento celular (G1), na qual ocorre uma preparação para a fase de síntese de DNA e duplicação do genoma (S), seguida por um intervalo de inatividade aparente (G2), na qual a célula começa a se preparar para separação dos cromátídeos durante a fase mitótica (M). Em seguida, cada nova célula pode entrar na fase G0, ou passar para a fase G1 para dar início a um novo ciclo (Van Diest, Van Der Wall e Baak, 2004).

Durante as fases G1, S e G2, que formam a maior parte do ciclo, não é possível a visualização morfológica, porém durante a fase M, quando coradas em H&E, as células podem ser facilmente reconhecidas devido ao aspecto típico dos cromossomos. Os núcleos estão hipercromáticos, membrana nuclear escura, com saliências ao redor e basofilia em vez de eosinofilia nos arredores do citoplasma (Veta, Van Diest e Pluim, 2015). Esse mecanismo tem sido a base da contagem microscópica óptica de figuras mitóticas, sendo a forma de análise mais antiga para avaliar a proliferação celular (Van Diest, Van Der Wall e Baak, 2004).

Avaliação histomorfométrica do rim, baço e fígado

A análise histomorfológica do fígado mostrou um significativo aumento no número de hepatócitos e, células endoteliais nos grupos expostos às diferentes doses do SAL, em comparação ao controle negativo (Tabela 3). Essas observações podem ter relação ao aumento médio do órgão visto nos animais experimentais.

Em relação ao baço, foi observada diminuição da polpa branca dos grupos tratados com SAL e, aumento da polpa vermelha dos expostos ao SAL50, comparados ao grupo controle negativo (Tabela 3).

Nos dados obtidos do rim, verificou-se uma diminuição significativa do glomérulo renal para o grupo que recebeu o SAL50, comparado ao controle negativo. Não houve diferença significativa entre o tamanho do corpúsculo renal dos grupos tratados em relação ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3. Análise histomorfométrica do fígado, rim e baço de camundongos expostos ao tumor S-180 e tratados com SAL e 5-FU

Grupos	Fígado (média do n° de cél. por fotomicrografia)		Rim (μm^2)		Baço (% por fotomicrografia)	
	Hepatócitos	Células endoteliais	Corpúsculo	Glomérulo	Polpa branca	Polpa vermelha
CN	39,35 $\pm$ 6,87	13,07 $\pm$ 3,71	4455,25 $\pm$ 1600,6	2912,597 $\pm$ 971,7	23,28 $\pm$ 8,01	74,01 $\pm$ 7,37
5-FU	38,41 $\pm$ 9,05	12,69 $\pm$ 3,57	4034,84 $\pm$ 1218,3	2614,538 $\pm$ 784,1	22,46 $\pm$ 7,90	74,53 $\pm$ 7,61
SAL25	54,74 $\pm$ 11,87***	18,95 $\pm$ 5,55***	4570,97 $\pm$ 2064,9	2939,502 $\pm$ 1434,3	15,58 $\pm$ 3,00**	81,97 $\pm$ 2,41**
SAL50	56,74 $\pm$ 14,45***	20,30 $\pm$ 5,93***	4410,087 $\pm$ 1619,7	2602,429 $\pm$ 954,7*	18,96 $\pm$ 6,44*	78,38 $\pm$ 6,66

Teste Mann-Whitney. Valores expressos por média $\pm$ DP; (N=10); *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 v.s CN= Controle negativo; 5-FU= 5-Fluorouracil e SAL= ácido salazínico 25 / 50 mg/kg.

Em adição, Alexandrino et al. (2019) testaram o SAL (33,3; 66,7 ou 100 mg/kg) em camundongos portadores do tumor B16-F10 (melanoma de murino) e, não verificaram alterações hepáticas significativas em seus experimentos. Entretanto, sabe-se que o tecido hepático é muito sensível a lesões induzidas por compostos sintéticos e de origem natural, devido ao seu papel central no metabolismo dessas substâncias (Singh, Cho e Upadhyay, 2016).

A hepatotoxicidade é um dos principais parâmetros a ser estudado durante a verificação da ação da droga no organismo, principalmente em períodos prolongados de uso terapêutico (Mukesh et al., 2015). É no tecido hepático que ocorre o processo de desintoxicação do organismo, muitos fármacos quimioterápicos acumulam seus produtos metabólicos no fígado, causando danos de toxicidade (Debnath et al., 2017).

Aumento na quantidade de células hepáticas podem ser indicação de lesão tecidual. Os hepatócitos possuem importante função metabólica; sua proliferação anormal pode indicar possível regeneração tecidual para contornar condições adversas influenciadas por vários fatores, inclusive pela administração de drogas terapêuticas (Marinho et al., 2017).

As células endoteliais desempenham um relevante papel na manutenção da função hepática durante condições adversas causadas por agentes externos. Seu aumento pode estar relacionado à exposição de toxinas, produtos químicos e agentes farmacológicos (Arii e Imamura, 2000).

O tecido renal também é muito suscetível aos danos causados por agentes estranhos presentes na corrente sanguínea, uma vez que suas células têm a

finalidade de reabsorção e concentração de solutos, fazendo com que compostos metabolizados interajam com suas organelas, podendo modificar o caminho de sinalização celular e, até mesmo causando lesões teciduais (Barnett e Cummings, 2019).

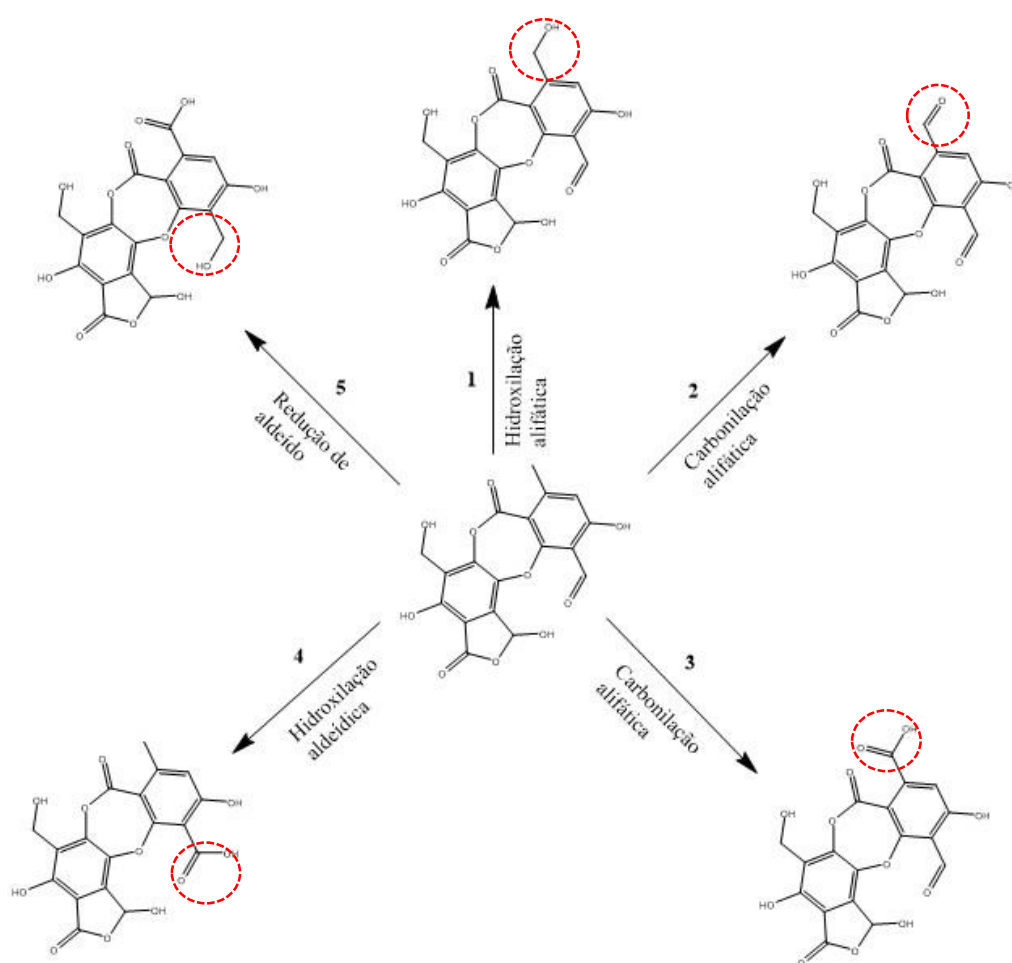
O tecido esplênico também pode sofrer alterações ultraestruturais que surgem não apenas pela ação negativa da substância, mas também pela reação do tecido, elevando o aumento da atividade das células de defesa (El-Shenawy, Hamza e Khaled, 2017), indicando uma proteção do órgão a uma possível reação prejudicial do composto (Crăciunaş et al., 1996).

Análise *in silico*

Obtenção dos metabólitos

Foram selecionadas 5 estruturas dos metabólitos mais prováveis do SAL, com maior pontuação de contribuição (D1-5). A pontuação de contribuição é decorrente da função de probabilidade para o local do metabolismo (P_{SM}), a qual está correlacionada com a energia livre do processo geral de acoplamento enzima-substrato (Cruciani et al., 2005).

A figura 8 relata as transformações com maior probabilidade do SAL e suas respectivas reações.

Figura 8. Metabólitos do SAL (D1-5) e suas respectivas reações

Os três primeiros metabólitos gerados (D1-3) são decorrentes de reações de hidroxilação e carbonilação alifática no carbono do grupo metila do SAL, e possuem as maiores pontuações de contribuição (100%). Já os metabólitos D4-5, são oriundos de reações de hidroxilação aldeídica e redução de aldeídos, possuindo pontuações de contribuição de 50%. Os demais metabólitos (dados não apresentados) obtiveram pontuações de contribuição menores 33,33% e foram desprezados.

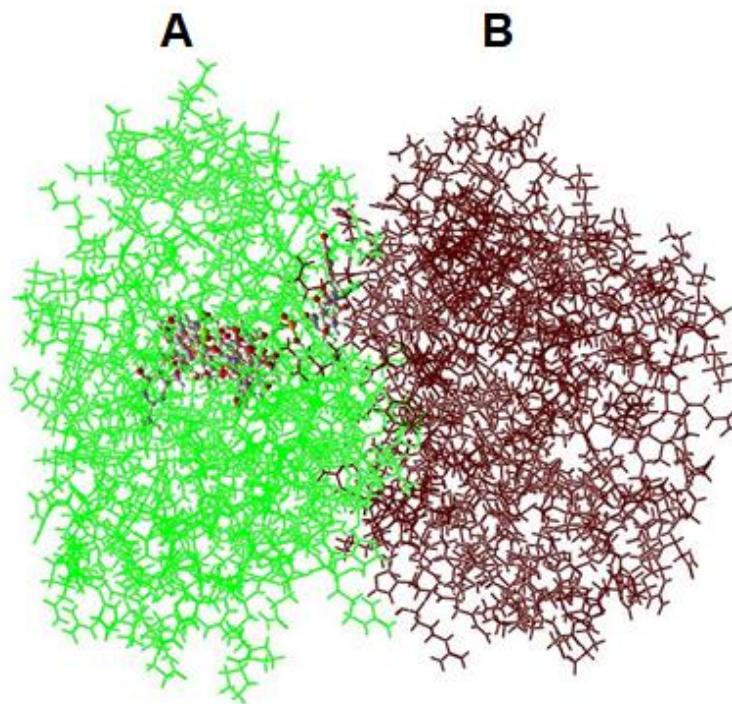
Sítio ativo da timidilato sintase humana (hTS)

A timidilato sintase consiste em um alvo validado para drogas antiproliferativas, que possui função catalisadora no processo de metilação redutiva de 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) em 2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP), através dos cofatores N5, N10-metilenotetra-hidrofolato (mTHF). Além disso, é de extrema

importância para a replicação do DNA e impede os processos de divisão celular rápida através da apoptose celular (Pozzi et al., 2019).

Estruturalmente, hTS é um homodímero obrigatório que apresenta resíduos das duas subunidades, A e B (Figura 9), como contribuintes para o acoplamento do substrato. Além dos resíduos de aminoácidos Arg 50, Phe 80, Ile 108, Trp 109, Asn 112, Arg175', Arg176', Arg215, Gln 214, Asp 218, Gly 222, Phe 225, Asn 226, His 256, Tyr 258 e Met 311, o sítio ativo também contém os resíduos (181-197) e Cys 195 do loop catalítico, que está exposto apenas na conformação ativa (Choi et al., 2016; Chen, et al., 2017; Pozzi et al., 2019).

Figura 9. Cluster dos ligantes e a hTS destacando as subunidades A e B



As pontuações obtidas nos acoplamentos de todos os ligantes foram energeticamente favoráveis. Contudo, a fim de obter uma maior taxa de sucesso na triagem dos compostos, foi realizado o docking consenso.

Estudos mostram que a combinação de diferentes pontuações obtidas em diferentes programas de docking molecular aumentam a probabilidade de acertos (Kukol, 2011). Deste modo, estabeleceu-se um ranking entre as médias do consenso

do SAL, dos seus possíveis metabólicos (D1-5), do FdUMP e do ligante co-cristalizado (Tabela 4).

Tabela 4. Ranking dos compostos baseando-se nas médias do docking consenso

ID	Energias de ligação			Consenso			
	Vina	Autodock 4	Molegro	Vina	Autodock 4	Molegro	Média
D3	-10,1	-7,01	-145,85*	1,00	0,94	1,00	0,98
D5	-9,7	-7,48*	-127,858	0,96	1,00	0,88	0,95
D2	-9,9	-7,37	-124,887	0,98	0,99	0,86	0,94
SAL	-10,1*	-7,26	-122,718	1,00	0,97	0,84	0,94
D1	-9,7	-6,81	-133,029	0,96	0,91	0,91	0,93
D4	-9,3	-6,95	-137,75	0,92	0,93	0,94	0,93
Ligante	-9	-6,22	-135,325	0,89	0,83	0,93	0,88
FdUMP	-8,5	-6,66	-115,548	0,84	0,89	0,79	0,84
5-FU	-4,9	-4,51	-74,4245	0,49	0,60	0,51	0,53

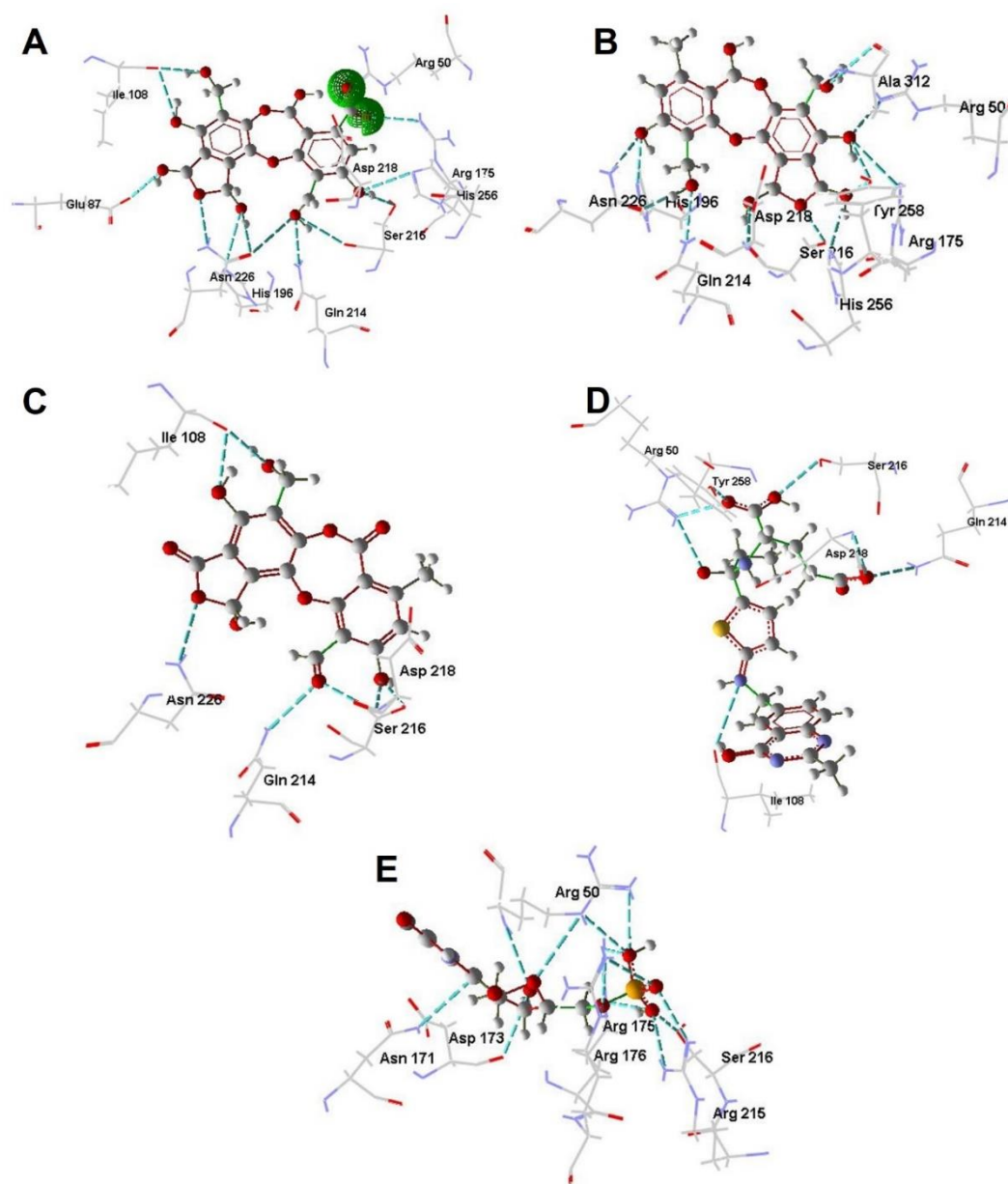
D1-5= derivados metabólitos do SAL; SAL= ácido salazínico; FdUMP= 5-Fluoro-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato e 5-FU= 5-Fluorouracil.

*menores valores de energia de ligação

Conforme visto na Tabela 4, o D3 foi o composto com melhor média de acoplamento (0,98), seguido do D5 (0,95). O SAL e o D2 obtiveram a mesma média de acoplamento (0,94). Já o ligante co-cristalizado e o FdUMP, apresentaram médias de acoplamento 0,88 e 0,84, respectivamente.

A fim de observar quais interações podem ser determinantes para a inibição, os três compostos com as melhores médias de acoplamento, juntamente com os compostos padrão (ligante co-cristalizado e FdUMP), foram analisados quanto as suas interações com os resíduos de aminoácidos da hTS (Figura 10).

Figura 10. Interações entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da hTS e os derivados metabólitos do SAL



D3 **(A)**, D5 **(B)**, SAL **(C)**, ligante co-cristalizado **(D)** e FdUMP **(E)**.
D3-5= derivados metabólitos do SAL; SAL= ácido salazínico; FdUMP= derivado ativo do 5-Fluorouracil.

Todos os compostos interagiram com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da hTS com interação de ligação de hidrogênio.

O D3 apresentou interações do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos Glu 87, Ile 108, Arg 175, His 196, Gln 214, Ser 216, Asp 218, Asn 226 e His 256. Além disso, dois resíduos de Arg (Arg 50 e Arg 175) tiveram duas interações eletrostáticas com o grupo carboxila no anel aromático (Figura 10-A).

O D5 apresentou interações similares ao D3, com os resíduos Arg 50, Arg 175, His 196, Gln 214, Ser 216, Asp 218, Asn 226, His 256, Tyr 258 e Ala 312 (Figura 10-B).

O SAL na sua forma não metabolizada interagiu com quatro resíduos (Ile 108, Gln 214, Ser 216 e Asp 218), sendo Ser 216, o resíduo observado de forma consistente em todas as interações com os demais compostos (Figura 10-C).

Os resíduos de aminoácidos Arg 50, Ile 108, Gln 214, Ser 216, Asp 218 e Tyr 258 interagiram com o ligante co-cristalizado (Figura 10-D). A principal diferença observada entre as interações do ligante co-cristalizado e os outros compostos é a ausência da Arg 175.

Por fim, o FdUMP interagiu com sete resíduos de aminoácidos (Arg 50, Asn 171, Asp 173, Arg 175, Arg 176, Arg 215 e Ser 216) (Figura 10-E).

É possível observar que as interações eletrostáticas com resíduos importantes do sítio ativo de hTS, Arg 50 e Arg 175, não ocorrem em todos os compostos. Logo, se trata de uma peculiaridade do D3 que pode estar relacionada com sua primeira colocação no ranking das médias de acoplamento.

Entretanto, interações de hidrogênio com resíduos como Arg 50, Arg 175 e Ser 216, são encontradas em todos os compostos e aparentemente são de caráter importante para a inibição da hTS.

Dinâmica molecular

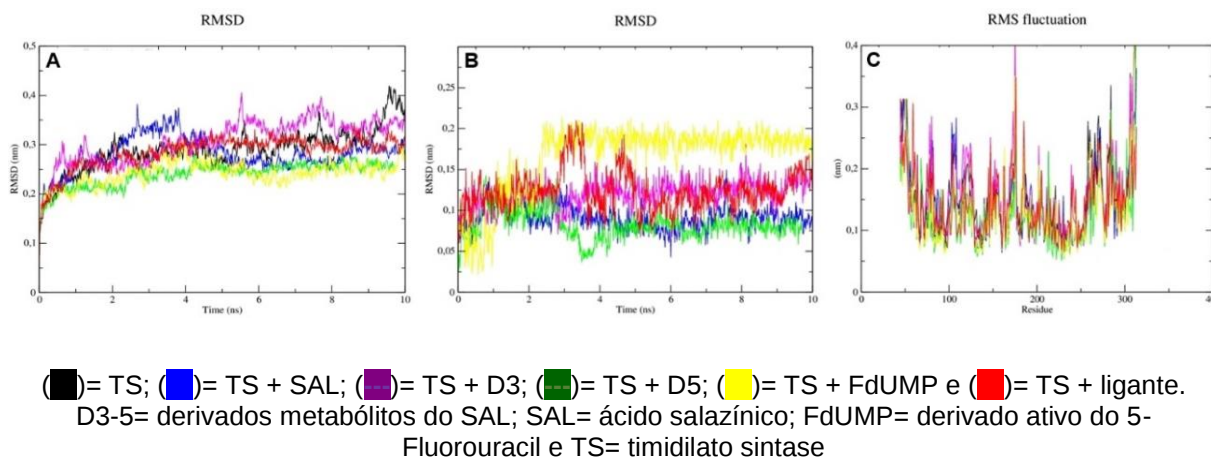
As simulações de dinâmica molecular foram realizadas para investigar se os três compostos com as melhores médias de acoplamento no docking molecular e, os dois compostos padrão, conseguem se ligar a hTS sob a influência de solvente água, íons, temperatura e pressão.

Flexibilidade e mudanças conformacionais na estrutura da hTS também foram investigados para analisar a influência das alterações estruturais nas ligações e interações com os compostos. Para isso, o desvio médio quadrático (RMSD) foi calculado para os átomos de C α da proteína e, do composto separadamente.

A análise de RMSD da hTS mostrou que a proteína atingiu flutuações variando de 0,2 a 0,4 nm em 10 ns, apresentando maior estabilidade em praticamente toda a dinâmica, com alguns picos em 7 e 9 ns (Figura 11-A). A proteína complexada apresentou maior estabilidade ao longo dos 10 ns do que a proteína não complexada. Portanto, nota-se que a hTS complexada aos compostos é mais estável que a proteína

não complexada, permitindo com que os compostos em estudo permaneçam fortemente ligados ao sítio ativo.

Figura 11. RMSD dos átomos de Ca da TS e complexado aos compostos **(A)**; dos átomos de Ca dos compostos **(B)** e RMSF dos átomos de Ca da TS e complexado aos compostos **(C)**.



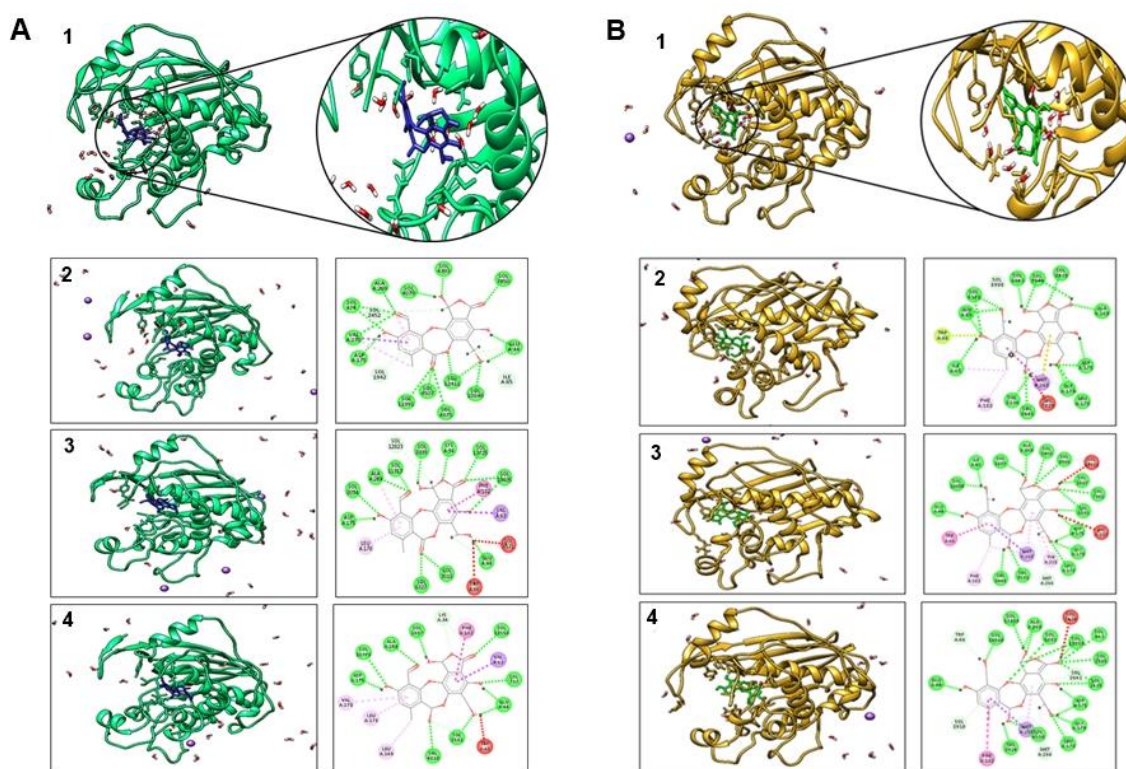
Ao verificar o RMSD dos compostos, observamos estabilidade a partir dos 3 ns (Figura 11-B). Todos os compostos analisados, exceto o ligante, apresentaram estabilidade. Assim, sugerimos que as moléculas SAL, D3, D5 e FdUMP tendem a permanecer no sítio ativo da proteína, mesmo na presença de diferentes fatores como temperatura, pressão, solvente e íons.

Para compreender a flexibilidade dos resíduos e os aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional da hTS, foram calculadas as flutuações médias da raiz quadrada (RMSF) de cada aminoácido da proteína. Resíduos com altos valores de RMSF sugerem maior flexibilidade.

Considerando que os aminoácidos com flutuações acima 0,3 nm contribuem para a flexibilidade da estrutura proteica, constatamos que dentre os 313 aminoácidos presentes na proteína, apenas os aminoácidos 44, 46, 48-51, 175, 310-313 contribuem para a mudança conformacional da proteína complexada (Figura 11-C). Na proteína não complexada, também observamos as mesmas flutuações com os aminoácidos citados. Além disso, verificamos que a maioria dos aminoácidos responsáveis pela mudança conformacional da hTS não fazem parte do sítio ativo, exceto a Arg175, Met311 e Ala312 (Phan, 2001). Portanto, o sítio ativo é considerado estável.

Quando analisada através de programas gráficos, notamos que a hTS complexada à molécula do SAL apresentou pequenas mudanças conformacionais, como identificado pelos valores de RMSD e algumas ligações observadas no docking foram perdidas. Porém, a ligação com o resíduo de aminoácido Arg 175, importante para a inibição da hTS, foi mantida. Além disso, outras ligações mais fortes foram formadas com os aminoácidos Gly 44, Trp 182 (do loop catalítico) e Gln 270 (Figura 12-A).

Figura 12. Simulações de dinâmica molecular durante 1000 ps e interações 2D e 3D em diferentes tempos



A1- Estrutura do complexo TS + SAL e seu sítio ativo; interações 3D e 2D em **A2**– 200ps; **A3**– 600ps e **A4** – 1000ps.

B1 – Estrutura do complexo TS + D5 e seu sítio ativo; interações 3D e 2D em **B2**– 200ps, **B3**– 600ps e **B4**– 1000ps.

Em verde estão destacadas ligações de hidrogênio com o solvente (SOL) e vários aminoácidos. Em roxo e vermelho estão destacadas interações hidrofóbicas e estéricas, respectivamente.

Além disso, ao analisarmos os gráficos de RMSD e RMSF (Figura 11), observa-se que o D5 apresenta uma grande estabilidade em praticamente todo o tempo da dinâmica. Deste modo, a Figura 12-B mostra algumas interações entre o D5 e a hTS.

O D5 manteve a importante interação com o resíduo de aminoácido Arg175, bem como, apresenta novas interações que comparadas com as observadas no docking. Duas novas interações são formadas com os resíduos Trp182 (presente no loop catalítico) e com Arg215 que, juntamente com Arg 50, Arg 175' e Arg 176', formam um cluster de quatro argininas de fundamental importância para a ancoragem do substrato (dUMP) no sítio ativo (Pozzi et al., 2019).

Conclusão

Foi obtido o ácido salazínico, com altos níveis de pureza e rendimento.

O composto não foi tóxico para as linhagens celulares de câncer, no entanto, apresentou atividade antitumoral *in vivo* para Sarcoma-180 sem causar danos expressivos no rim, fígado e baço.

O SAL apresentou capacidade de interação com a hTS com energia altamente favorável, inclusive melhor do que com o 5-FU, e também foi capaz de formar ligações com resíduos críticos importantes do sítio ativo da enzima em estudo.

Com isso, o SAL torna-se um forte candidato a agente antineoplásico.

Agradecimentos

Lira, M.A.C. agradece o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Propesq / UFPE.

Referências

- Abotaleb, M., Kubatka, P., Caprnda, M., Varghese, E., Zolakova, B., Zubor, P., Opatrilova, R., Kruzliak, P., Stefanicka, P., Büsselberg, D., 2018. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. *Biomedicine e Pharmacotherapy* 101, 458-477. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.108>
- Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., Lindahl, E. 2015. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *Software X* 1-2, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Alexerino, C.A.F., Honda, N.K., Matos, M. de F.C., Portugal, L.C., Souza, P.R.B. de, Perdomo, R.T., Guimarães, R. de C.A., Kadri, M.C.T., Silva, M.C.B.L., Bogo, D., 2019. Antitumor effect of depsidones from lichens on tumor cell lines e experimental murine melanoma. *Brazilian J. Pharmacogn.* 29, 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.005>
- Almeida, V.L., Leitão, A., Reina, L.C.B., Montanari, C.A., Donnici, C.L., Lopes, M.T.P., 2005. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nova* 28, 118-129.
- Arii, S., Imamura, M., 2000. Physiological role of sinusoidal endothelial cells e Kupffer cells e their implication in the pathogenesis of liver injury. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* 7, 40–48. <https://doi.org/10.1007/s005340050152>
- Barnett, L.M.A., Cummings, B.S., 2019. Cellular e Molecular Mechanisms of Kidney Toxicity. *Semin. Nephrol.* 39, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.12.004>
- Basile, A., Rigano, D., Loppi, S., Di Santi, A., Nebbioso, A., Sorbo, S., Conte, B., Paoli, L., De Ruberto, F., Molinari, A.M., Altucci, L., Bontempo, P., 2015. Antiproliferative, antibacterial e antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* e its secondary metabolite parietin. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 7861–7875. <https://doi.org/10.3390/ijms16047861>
- Berendsen, H.J.C., Spoel, D.V., Drunem, R.V. 1995. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications* 91, 43-56. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E)
- Bondi, A. 1964. Van der Waals Volumes e Radii. *J. Phys.* 68: 441-451, 1964.
- Cireşan, D.C., Giusti, A., Gambardella, L.M., Schmidhuber, J., 2013. Mitosis detection in breast cancer histology images. *Int. Conf. Med. Image Comput. Comput. Interv.* Springer, Berlin, Heidelb. 411–418. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40763-5_51

Chen, D., Jansson, A., Sim, D., Larsson, A., Nordlund, P. 2017. Structural analyses of human thymidylate synthase reveal a site that may control conformational switching between active e inactive states. J. Biol. Chem. 292, 13449 –13458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.787267>

Choi, Y. M., Yeo, H.K., Park, Y.W., Lee, J.Y. 2016. Structural Analysis of Thymidylate Synthase from Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus with the Anticancer Drug Raltitrexed. PLoS ONE 9, 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168019>

Crăciunaș C., Crăciun C., Crăciun V., Dordea M., Toader-Radu M., 1996. Ultrastructural effects of certain cytostatics on rat spleen. Curr. Probl. e Techn. In Cellular e Molecular Biology 1, 311-317.

Cruciani, G., Carosati, E., De Boeck, B., Ethirajulu, K., Mackie, C., Howe, T., Vianello, R. 2005. MetaSite: Understeing Metabolism in Human Cytochromes from the Perspective of the Chemist. J. Med. Chem. 48, 6970-6979. <https://doi.org/10.1021/jm050529c>

Culberson, C.F., 1972. Improved conditions e new data for the identification of lichen products by a steardized thinlayer-chromatographic method. Journal of Chromatography 72, 113-125. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(72\)80013-x](https://doi.org/10.1016/0021-9673(72)80013-x)

Debnath, S., Karan, S., Debnath, M., Dash, J., Chatterjee, T.K. 2017. Poly-L-Lysine Inhibits Tumor Angiogenesis e Induces Apoptosis in Ehrlich Ascites Carcinoma e in Sarcoma S-180 Tumor. Asian Pac J Cancer Prev. 18, 2255-2268. doi:10.22034/APJCP.2017.18.8.2255

Ebrahim, H.Y., Elsayed, H.E., Mohyeldin, M.M., Akl, M.R., Bhattacharjee, J., Egbert, S., El Sayed, K.A., 2016. Norstictic Acid Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation, Migration, Invasion, e In Vivo Invasive Growth Through Targeting C-Met. Phyther. Res. 30, 557–566. <https://doi.org/10.1002/ptr.5551>

Eifler-Lima, V.L., Sperry, A., Sinbehit, S., Boustie, J., Tomasi, S., Schenkel, E., 2000. NMR spectral data of salazinic acid isolated from some species of Parmotrema. Magn. Reson. Chem. 38, 472–474. [https://doi.org/10.1002/1097-458X\(200006\)38:6<472::AID-MRC658>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1097-458X(200006)38:6<472::AID-MRC658>3.0.CO;2-P)

El-Garawani, I.M., Elkhateeb, W.A., Zaghlol, G.M., Almeer, R.S., Ahmed, E.F., Rateb, M.E., Moneim, A.E.A., 2019. *Ceelariella vitellina* extract triggers in vitro e in vivo cell death through induction of apoptosis: A novel anticancer agent. Food e Chemical Toxicology 127, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.003>

El Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2004. Acute e chronic toxicological studies of Ajuga iva in experimental animals. J. Ethnopharmacol. 91, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.009>

El-Shenawy, N.S., Hamza, R.Z., Khaled, H.E., 2017. Protective effect of α -lipoic acid against spleen toxicity of dimethylnitrosamine in male mice: Antioxidant e ultrastructure approaches. Biomed. Pharmacother. 96, 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.010>

Falcão, E.P.S., Silva, N.H., Gusmão, N.B., Ribeiro, S.M., Pereira, E.C., 2004. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen. Acta bot. bras. 18, 911–918. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000400022>

Hale- JR., M.E., 1983. The Biology of Lichens, third ed. London: Edward Arnold Pub., Engle.

Huneck, S., Yoshimura, I., 1996. Identification of Lichen Substances. Springer –Verlag Berlin Heidelberg New York.

Geng, X., Zhang, X., Zhou, B., Zhang, C., Tu, J., Chen, X., Wang, J., Gao, H., Qin, G., Pan, W., 2018. Usnic acid induces cycle arrest, apoptosis, e autophagy in gastric cancer cells in vitro e in vivo. Med. Sci. Monit. 24, 556–566. <https://doi.org/10.12659/MSM.908568>

Jain, A.P., Bhearkar, S., Rai, G., Yadav, A.K., Lodhi, S., 2016. Evaluation of *Parmotrema reticulatum* Taylor for Antibacterial e Antiinflammatory Activities. Ind. Jour. Pharmac. Scienc. 78, 94-102.

Jain, P.K., Jain, A.P., 2016. Effect of *Parmotrema reticulatum* lichens on dermal wound healing with possible antioxidant e antibacterial mechanism. Asian Journal of Pharmacy e Pharmacology 2, 10–14.

Kapinova, A., Kubatka, P., Golubnitschaja, O., Kello, M., Zubor, P., Solar, P., Pec, M., 2018. Dietary phytochemicals in breast cancer research: Anticancer effects e potential utility for effective chemoprevention. Environ. Health Prev. Med. 23, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0724-1>

Khader, S.Z.A., Ahmed, S.S.Z., Venkatesh, K.P., Chinnaperumal, K., Nayaka, S., 2018. Larvicidal potential of selected indigenous lichens against three mosquito species–*Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*. Chinese Herb. Med. 10, 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2018.03.002>

Kukol, A. 2011. Consensus virtual screening approaches to predict protein liges. European Journal of Medicinal Chemistry 46, 4661-4664. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.026>

Legaz, M.E.E., Vicente, C., 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase e agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiologie* 71, 300-302.

Liu, X., Zheng, L., Zhang, R., Liu, G., Xiao, S., Qiao, X., Wu, Y., Gong, Z., 2016. Toxicological evaluation of advanced glycation end product N ϵ -(carboxymethyl)lysine: Acute e subacute oral toxicity studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 77, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.02.013>

Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G., 2003. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action e clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>

Longley, D.B., Allen, W.L., McDermott, U., Wilson, T.R., Latif, T., Boyer, J., Lynch, M., Johnston, P.G., 2004. The roles of thymidylate synthase e p53 in regulating Fas-mediated apoptosis in response to antimetabolites. *Clin. Cancer Res.* 10, 3562–3571. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0532>

Luz, J.S.B., Oliveira, E.B., Martins, M.C.B., Silva, N.H., Alves, L.C., Santos, F.A.B., Silva, L.L.S., Silva, E.C., Medeiros, P.L., 2015. Ultrastructural Analysis of *Leishmania infantum chagasi* Promastigotes Forms Treated *In Vitro* with Usnic Acid. *The Scientific World Journal* 1-7.

Malde, A.K., Zuo, L., Breeze, M., Stroet, M., Poger, D., Nair, P.C., Oostenbrink, C., Mark, A.E. 2011. An Automated force field Topology Builder (ATB) e repository: version 1.0. *J. Chem. Theory Comput.* 7, 4026-4037.

Mammadov, R., Suleyman, B., Altuner, D., Demirci, E., Cetin, N., Yilmaz, A., Baykal, H., Alpcan, H., Turumtay, E.A., Suleyman, H., 2019. Effect of ethyl acetate extract of *usnea longissima* on esophagogastric adenocarcinoma in rats. *Acta Cir Bras.* 34, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020190030000005>

Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M., Vasiljević, P., Stanojković, T., 2012. Chemical composition of three *Parmelia* lichens e antioxidant, antimicrobial e cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine* 19, 1166–1172. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.07.012>

Marinho, K.S.N., Antonio, E.A., Silva, C.V.N.S., Silva, K.T., Teixeira, V.W., Aguiar Júnior, F.C.A., Santos, K.R.R.P., Silva, N.H., Santos, N.P.S., 2017. Hepatic toxicity caused by PLGA-microspheres containing usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* (AHTI) during pregnancy in Wistar rats. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 1073–1084. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160650>

Martins, M.C.B., Rocha, T.A., Silva, T.D.S., Cavalcanti-Neto, M.P., Santos, N.P.S., Silva, T.G., Aguiar-Junior, F.C.A., Falcão, E.P.S., Pereira, E.C., da Silva, N.H., 2016. *In Vitro e In Vivo Antineoplastic Activity Of Barbatic Acid*. Int. Arch. Med. 1–9. <https://doi.org/10.3823/1934>

Micheletti, A.C., Beatriz, A., Pires, D., Lima, D., Honda, N.K., 2009. Quim. Nova 32, 12–20.

Moreira, A.S.N., Fernees, R.O.S., Lemos, F.J.A., Braz-Filho, R., Vieira, I.J.C., 2016. Larvicidal activity of *Ramalina usnea* lichen against *Aedes aegypti*. Rev. Bras. de Farmacogn. 26, 4–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.006>

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth e survival: Application to proliferation e cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Mukesh K, S., Ganesh N, S., Vishal, V., Ranjan, B., 2015. Hepatotoxicity: A Major Complication with Critical Treatment. MOJ Toxicol. 1, 114–120. <https://doi.org/10.15406/mojt.2015.01.00016>

Mun, E.J., Babiker, H.M., Weinberg, U., Kirson, E.D., Von Hoff, D.D., 2018. Tumor-treating fields: A fourth modality in cancer treatment. Clin. Cancer Res. 24, 266–275. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1117>

Oda, A., Tsuchida, K., Takakura, T., Yamaotsu, N., Hirono, S. 2006. Comparison of Consensus Scoring Strategies for Evaluating Computational Models of Protein-Lige Complexes. J. Chem. Inf. Model. 2006, 46, 380-391. <https://doi.org/10.1021/ci050283k>

Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., Schomaker, S., 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. Toxicology 245, 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.021>

Paluszczak, J., Kleszcz, R., Studzińska-Sroka, E., Krajka-Kuźniak, V., 2018. Lichen-derived caperatic acid e physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. Mol. Cell. Biochem. 441, 109–124. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3178-7>

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Grandenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. 2004. UCSF Chimera--A visualization system for exploratory research e analysis. J. Comput. Chem. 25, 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

Phan, J., Koli, S., Minor, W., Dunlap, R.B., Berger, S.H., Lebioda, L. 2001. Human Thymidylate Synthase Is in the Closed Conformation When Complexed with dUMP e Raltitrexed, an Antifolate Drug. Biochemistry 40, 1897–1902. <https://doi.org/10.1021/bi002413i>

Pozzi, C., Ferrari, S., Luciani, R., Costi, M.P., Mangani, S. 2019. Structural e Functional Characterization of the Human Thymidylate Synthase (hTS) Interface Variant R175C, New Perspectives for the Development of hTS Inhibitors. *Molecules* 24, 1-12. <https://doi.org/10.3390/molecules24071362>

Roux, L., Racocceanu, D., Loménie, N., Kulikova, M., Irshad, H., Klossa, J., Capron, F., Genestie, C., Naour, G., Gurcan, M., 2013. Mitosis detection in breast cancer histological images An ICPR 2012 contest. *J. Pathol. Inform.* 4, 8. <https://doi.org/10.4103/2153-3539.112693>

Santos, G.J.L., Oliveira, E.S., Pinheiro, A.D.N., Costa, P.M., Freitas, J.C.C., Santos, F.G.A., Maia, F.M.M., Morais, S.M., Nunes-Pinheiro, D.C.S., 2018. *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae) latex reduces oxidative stress e modulates CD4+, CD8+, FoxP3+ e HSP-60+ expressions in Sarcoma 180- bearing mice. *Journal of Ethnopharmacology* 220, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.043>

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2019. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 69, 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>

Silva, M.M., Rocha, T.A., Moura, D.F., Chagas, C.A., Aguiar Júnior, F.C.A., Santos, N.P.S., Sobral, R.V.S., Nascimento, J.M., Leite, A.C.L., Pastrana, L., Costa, R.M.P.B., Nascimento, T.P., Porto, A.L.F., 2019. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic e cytological approach. *Regulatory Toxicology e Pharmacology* 103, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.02.009>

Silva, M.M., Nascimento, T.P., Porto, A.L.F. 2019. The importance of Sarcoma-180 as valid model to determine the toxicity e antitumor activity of molecules e extracts. *International Journal of Recent Academic Research* 01, 433-437.

Silva-Junior, E.F., Franca, P. H. B., Ribeiro, F. F., Mendonca-Junior, F. J. B., Scotti, L., Scotti, M.T., Aquino, T.M., Araujo-Junior, J.X. 2018. Molecular Docking Studies Applied to a Dataset of Cruzain Inhibitors. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 14, 68-78. <https://doi.org/10.2174/1573409913666170519112758>

Singh, D., Cho, W.C., Upadhyay, G., 2016. Drug-induced liver toxicity e prevention by herbal antioxidants: An Overview. *Front. Physiol.* 6, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00363>

Solár, P., Hřčková, G., Koptašíková, L., Velebný, S., Solárová, Z., Bačkor, M., 2016. Murine breast carcinoma 4T1 cells are more sensitive to atranorin than normal epithelial NMuMG cells in vitro: Anticancer e hepatoprotective effects of atranorin in vivo. *Chem. Biol. Interact.* 250, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.012>

Solárová, Z., Liskova, A., Samec, M., Kubatka, P., Büsselberg, D., Solár, P., 2020. Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. *Biomolecules* 87, 1-33. <https://doi.org/10.3390/biom10010087>

Song, Y., Dai, F., Zhai, D., Dong, Y., Zhang, J., Lu, B., Luo, J., Liu, M., Yi, Z., 2012. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis e growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT e ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis* 15, 421–432. <https://doi.org/10.1007/s10456-012-9270-4>

Souza, M.V.N., Pinheiro, A.C., Ferreira, M.L., Gonçalves, R.S.B., Lima, C.H.C., 2007. Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Cancer. *Rev. Fitos* 3, 25–42.

Sugiura, K., Stock, C.C., 1952. Studies in a tumor spectrum. I. Comparison of the action of methylbis(2-chloroethyl)amine e 3-bis(2-chloroethyl)aminomethyl-4-methoxymethyl-5-hydroxy-6-methylpyridine on the growth of a variety of mouse e rat tumors. *Cancer* 5, 382–402. <https://doi.org/10.1002/1097-0142>

Valadares, M.C., 2006. Avaliação De Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era Do Teste DL₅₀”. *Rev. Eletrônica Farmácia* 3, 93–98. <https://doi.org/10.5216/ref.v3i2.2083>

Van Diest, P.J., Van Der Wall, E., Baak, J.P.A., 2004. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: A review. *J. Clin. Pathol.* 57, 675–681. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.010777>

Veta, M., van Diest, P.J., Pluim, J.P.W., 2015. Detecting mitotic figures in breast cancer histopathology images. *Med. Imaging: Digit. Pathol.* 8676, 1-7. <https://doi.org/10.1117/12.2006626>

Wang, J.J., Lei, K.F., Han, F., 2018. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 3855–3864. <https://doi.org/10.26355/eurrev-201806-15270>

Wolfsegger, M.J., Jaki, T., Dietrich, B., Kunzler, J.A., Barker, K., 2009. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.06.012>

Yang, Y., Bae, W.K., Lee, J.Y., Choi, Y.J., Lee, K.H., Park, M.S., Yu, Y.H., Park, S.Y., Zhou, R., Taş, İ., Gamage, C., Paik, M.J., Lee, J.H., Chung, I.J., Kim, K.K., Hur, J.S., Kim, S.K., Ha, H.H., Kim, H., 2018. Potassium usnate, a water-soluble usnic acid salt, shows enhanced bioavailability e inhibits invasion e metastasis in colorectal cancer. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34709-9>

Zhang, W., Zhong, Y., Cui, H., Wang, L., Yang, R., Su, Z., Xiang, B., Wei, Q., 2017. Combination of calcineurin B subunit (CnB) e 5-fluorouracil reverses 5-fluorouracil-induced immunosuppressive effect e enhances the antitumor activity in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Lett.* 14, 6135–6142. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6958>

Zhao, T., Mao, G., Zhang, M., Zou, Y., Feng, W., Gu, X., Zhu, Y., Mao, R., Yang, L., Wu, X., 2014. Enhanced antitumor e reduced toxicity effect of Schisanreae polysaccharide in 5-Fu treated Heps-bearing mice. *Int. J. Biol. Macromol.* 63, 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.037>

Zhou, R., Yang, Y., Park, S.Y., Nguyen, T.T., Seo, Y.W., Lee, K.H., Lee, J.H., Kim, K.K., Hur, J.S., Kim, H., 2017. The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility e tumorigenesis. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08225-1>

Zuo, S.T., Wang, L.P., Zhang, Y., Zhao, D.N., Li, Q.S., Shao, D., Fang, X.D., 2015. Usnic acid induces apoptosis via an ROS-dependent mitochondrial pathway in human breast cancer cells in vitro e in vivo. *RSC Adv.* 5, 153–162. <https://doi.org/10.1039/c4ra12340a>

5 ARTIGO III

Artigo aceito na Anais da Academia Brasileira de Ciências

Fator de impacto: 1.020

Histological evaluation of the liver of mice with sarcoma-180 treated with salazinic acid

Maria Aparecida da Conceição de Lira^{1*}; Marllyn Marques da Silva²; Wanessa Karina de Moura Silva³; Emerson Peter da Silva Falcão¹; Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior³; Sebastião José de Melo⁴.

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular. Rua Alto do Reservatório, 55608-680, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, Brazil; [https://orcid.org/ 0000-0002-2662-1003](https://orcid.org/0000-0002-2662-1003) / [https://orcid.org/ 0000-0003-2346-8477](https://orcid.org/0000-0003-2346-8477).

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células. Rua Alto do Reservatório, 55608- 680, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, Brazil; [https://orcid.org/ 0000-0002-1768- 9831](https://orcid.org/0000-0002-1768-9831).

³Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Biotecnologia e Fármacos. Rua Alto do Reservatório, 55608-680, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, Brazil; [https://orcid.org/ 0000-0001-7802-1854](https://orcid.org/0000-0001-7802-1854). / [https://orcid.org/ 0000- 0001-8676-4826](https://orcid.org/0000-0001-8676-4826).

⁴Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos. Av. Prof. Moraes Rego, 50740-560, Recife – Pernambuco, Brazil; <https://orcid.org/0000-0002-4134-6169>.

Keywords: Cancer, hepatotoxicity, lichen, sarcoma-180.

Running title: Action of SAL on the liver of mice with S-180 Biological sciences

***Correspondence:** Maria Aparecida da Conceição de Lira; Rua Jasmelino Correia de Lima, Gravatá-Pernambuco, Brazil; Tel.: +55-81-995210118; lira.macbio@gmail.com.

Abstract: Many of the drugs used to fight cancer cells induce various damage causing hepatotoxic effects which are characterized by tissue changes. The aim of the study is to know the possible effects of salazinic acid on livers of mice exposed to Sacoma-180. The tumor was grown in the animals in ascystic form and inoculated subcutaneously in the axillary region of the mouse developing the solid tumor. Treatment with salazinic acid (25 or 50 mg/kg) or 5-Fluorouracil (20 mg/kg) started 24-hours after inoculation, and was performed for 7 days. To verify these effects, the qualitative method of histological criteria investigated in liver tissue was used. It was observed that all treated groups showed an increase of pyknotic nucleus in relation to the negative control. There was an increase in steatosis in all groups compared to the negative control but there was a decrease in the groups treated with salazinic acid in the 5-Fluorouracil. There was no necrosis in the salazinic acid treated groups. However, this effect was seen in 20% of the positive control group. Therefore, it can be concluded that salazinic acid did not show hepatoprotective action on mice, but demonstrated a decrease in steatosis and absence of tissue necrosis.

INTRODUCTION

Cancer is the term used to describe a set of more than 100 diseases that have in common the disordered growth of altered cells that invade organs and tissues. The different types of cancer correspond to the various types of cells in the body. When cancer cells grow in epithelial tissues, such as skin or mucous membranes, they are called carcinomas. If the starting point are connective tissues, such as bone, muscle or cartilage, this is referred to as a sarcoma. It is called metastasis, when cancer cells in disarray spread to other regions of the body through the blood stream (INCA, 2019).

These cancer groups of disease as a public health issue are the second leading cause of death in the United States. Therefore, cancer has become a major challenge for research in the search for definitive solutions, such as healing through a drug (Siegel et al. 2019). Thus, experimental animal models are important and essential to determine the antitumor potential of molecules and extracts for healing, as well as understanding their action and effects throughout treatment. One such experimental model / method, is the use of tumors in mice and specifically, Sarcoma-180 (S-180),

which is widely accepted due to its characteristic of forming ascystic, or solid tumors (Cai et al. 2012; Debnath et al. 2017; Ramos et al. 2019).

However, it is not enough to only determine the antitumor potential according to tumor weight or ascystic volume. In addition, it is important to verify the effects of the drug, whether isolated or not, on the organs of potential animals, through histological e/or histomorphometric analysis. This is in order that a new drug to be developed for use, a greater safety path and possible adverse effects and achievements to be considered by the competent agencies such as ANVISA (National Health Surveillance Agency) in the case of Brazil, and the Food and Drug Administration (FDA) which is a federal agency in the United States Department of Health and Human Services responsible for oversight of drug development, manufacturing and use (Silva et al. 2012; Silva et al. 2019).

One of the main organs responsible for maximum activity, right after feeding, is the liver, so it is the target of every drug, especially when administered orally. In addition, in cancer patients, the liver is often reached, through metastases for example. For these reasons, the liver is often the first to be investigated for possible changes, or adverse effects, such as hepatotoxicity (disease caused by toxins), followed by the spleen and kidneys (Saad-Hossne et al. 2004; Marinho et al. 2017).

In view of the great challenge of curing cancer, lichen are part of an extremely diverse group of fungi found in nature, symbiotically associated with algae e/or cyanobacteria which have been studied for a long time, as they produce secondary metabolites with large pharmaceutical properties. Usnic acid abundant in *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* and *Evernia*, is example of metabolites widely studied for having anti-proliferative activity (Ingólfssdóttir, 2002). Kupchan & Kopperman (1975) first presented his antitumor activity against Lewis lung carcinoma in rats. Some extracts of *Cladonia convoluta*, *C. rangiformis*, *Parmelia caperata*, *Platismatia glauca* and *Ramalina cuspidata* demonstrated activities against various strains of human cancer cells (Bézivin et al. 2003).

In addition to usnic acid, salazinic acid (SAL) is also a secondary lichen metabolite, present in some species of the Parmeliaceae Family, such as *Parmotrema lichexanthonicum*, and presents antibiotic and cytotoxic activity against human tumor cells (Micheletti et al. 2009), and *P. cetratum* have antitumor action against neoplastic cells of mice (Alexerino et al. 2019).

Considering the importance of qualitatively characterizing the possible effects caused by SAL in relevant organs such as the liver, this study's main objective was to histologically evaluate the liver tissue of mice exposed to S-180 and treated with SAL, as well as to analyze the activities of transaminases Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT). This is the first study that aims to determine probable reversals, promoted by SAL, to possible liver damage of mice with malignant tumors.

MATERIAL E METHODS

Obtaining salazinic acid

SAL was provided by the Molecular Synthesis and Isolation Laboratory, of the Academic Center of Vitória, coordinated by Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão. The lichen compound was isolated from the acetone extract of the lichen *Parmotrema concurrens*, with more than 90% of purity level.

Experimental animals

Male Swiss albin mice (*Mus musculus*) (35-45g) were used, at 60 days of age. The animals were fasted for 8 hours before each experiment. The experimentation protocols were approved by the Animal Experimentation Ethics Commission (CEEa) of UFPE (Nº 23076.012019/2018.58), with as standards proposed by the National Council for Animal Experimentation (CONCEA) and by international standards established by the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Tumor Assay

The experimental tumour, S-180 was kept in Swiss Albine mice, males, in the ascitic form with maintenance frequency of 7 days. Ascitic tumor cells (5.0×10^6 mL⁻¹ cells) were inoculated subcutaneously in the right axillary region of the mouse developing the solid tumor.

Treatment started 24 hours after inoculation and was performed for 7 consecutive days. Injections of SAL were administered intraperitoneally at doses of 25

or 50 mg/kg of body weight of the animal. The animals in the negative control group were treated with saline solution + tween 80 to 5 %, as well as the animals of the positive control group treated with 5-Fluorouracil (20mg/kg of body weight). Fifty animals per group were used for the experimental model.

At the end of treatment, the animals were anesthetized with ketamine (1.25 g/kg) and xylazine (0.62 g/kg), and the liver was removed, dissected and fixed in formaldehyde solution (10 %) buffered, and then submitted to histopathological analyses (Martins et al. 2016).

Qualitative study of liver histopathology

The organs were packed in a 10% buffered formaldehyde solution, remaining in this solution for a period of 48 hours. After this procedure, the samples were dehydrated in Ethyl alcohol at increasing concentrations, diaphanized by Xilol, impregnated and included in paraffin.

Tissue cuts, 4 μ m thick, were submitted to the staining technique by Hematoxylin-Eosin. Histological images were captured by digital camera Moticom 2300, coupled under optical microscope, under fixed focus and field clarity, using the 40x lens and obtaining 20 fields per blade.

Histological findings were interpreted according to qualitative criteria on the appearance of pyknotic nucleus, microvesicular steatosis, tissue necrosis, hepatic fibrosis and micro hemorrhages with erythrocytes extravasation (Fontes et al. 2004).

Statistical analysis

The results of animal and liver weight analyses, together with liver enzyme activity, are expressed as the means of repetitions $\pm$ standard deviation. For variance analysis (ANOVA) the Tukey test was performed for multiple comparisons. A value of $p < 0.05$ was adopted as a significance level.

RESULTS AND DISCUSSION

All animals exposed to ascystic S-180 presented solid tumor growth in the right axillary region, during the 7 days of treatment. Death was not observed among the groups undergoing treatment.

On the last day of treatment, the weight of the animals was verified, and no significant differences were observed in the weight of the treated groups in relation to those of the negative control group. The mice were euthanized for organ removal. In macroscopic analysis of the collected livers, no apparent damage was seen. Overall, the organs seemed healthy, with no morphological changes or macroscopic lesions. In the analysis of liver weight, there were no significant differences between those exposed to treatment and those who only received the vehicle. Data in the table I.

For enzymatic analysis of AST and ALT transaminases, serum samples were collected from mice. There were no significant differences between the groups exposed to SAL treatment, and the negative control group for the ALT and AST activities, table I. These enzymes are considered markers sensitive to liver lesions (Liu et al. 2016). However, it can be confirmed that treatment with SAL did not cause lesions in the liver tissue.

The histological evaluation showed that the negative control group presented liver tissue in good condition, with well-defined nucleus and visible presence of Kupffer and endothelial cells, but 20 % of the animals presented pyknotic nucleus and 10% microvesicular steatosis.

In the group treated with 5-Fluorouracil, the presence of pyknotic nucleus, microvesicular steatosis and small regions of tissue necrosis were verified. The animals treated with salazinic acid (25 or 50 mg/Kg) presented pyknotic nucleus, microvesicular steatosis and only at the dose of 50 mg/kg were observed some regions of hepatic fibrosis. These lesions are presented in figures 1 and 2. The presence of micro haemorrhages was not seen in analysed groups (Table II).

It was also seen that the negative control group presented, preserved hepatic parenchyma and without severe cellular damage, hepatocytes with round central nucleus and homogeneous cytoplasm. Regarding histomorphology of hepatocytes e Kupffer cells, no cell differences were observed compared to the negative control group. The results of this study are in accordance with those evaluated by Alexerino et al. (2019), who analysed the acute toxicity of SAL (100 mg/kg), and verified the low toxicity of this substance in liver histopathology.

However, Araújo et al. (2019) observed that usnic acid (2000 mg/kg), a lichen compound, caused liver tissue lesions. The pyknotic nucleus present in hepatocytes indicates a destructive fragmentation of the nucleus, which is characterized by irregular

distribution of chromatin, causing programmed cell death (apoptosis), promoting future damage, such as tissue necrosis (Kumar et al. 2010).

Hepatic steatosis is defined as an accumulation of lipids in the cytoplasm of hepatocytes, especially triglycerides. Nicotinamide adenine dinucleotide present in hepatocytes leads to disturbance of β -oxidation of fatty acids in mitochondria, which leads to lipid changes in the tissue. The excess of these free fatty acids in hepatocytes exceeds the ability of it to process and re-export them (Baraona & Lieber 1979). These changes lead to cell death and cause elevation of serum marker enzymes that are released by the liver into the bloodstream (Lowry et al. 1951).

However, it was considered that there is an interrelationship between metabolic processes, such as oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, insulin resistance and inflammatory response at the hepatic level with the triggering of hepatic steatosis and its progression of chronic diseases such as inflammation, fibrosis and cirrhosis (steatohepatitis) commonly associated with non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD (Valenzuela & Videla, 2011).

NAFLD is caused by the excess of triglycerides accumulated in liver cells resulting from increased lipogenesis, which can be caused by the ingestion of various drugs and multiple defects in energy metabolism (Rolo; Teodoro & Palmeira, 2012). NAFLD can cause inflammation causing negative regulation of PPAR α (Peroxisome proliferator-activated α), causing an increase in the activation of the pro-inflammatory nuclear transcription factor, Nuclear factor-kB (NF-kB) (Valenzuela & Videla, 2011).

PPARs are transcription factors of nuclear receptors that have the function of regulating energy homeostasis, lipid metabolism and inflammation (Tavares; Hirata & Hirata, 2007). They are considered sensors for fatty acids acting on gene expression controlling metabolic pathways that act in the maintenance of energy balance (Viswakarma et al., 2010). Its activation may decrease the activity of other transcription factors, such as NF-kB, thus acting directly in inflammatory processes (Wang et al., 2002).

Activation of NF-kB can result in oxidative stress and inflammatory processes. To minimize these causing damages in the body, the transcription factors PPAR- α e Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) come into action, acting in the inhibition of NF-kB, thus causing a decrease of metabolic disorders in the tissue, reducing the proinflammatory, pro-lipogenic and oxidative stress effects (Hernández-

Rodas et al. 2017; Valenzuela et al. 2017, Barbosa et al., 2019). It is known that damage to liver tissue can be caused mainly by oxidative stress and inflammatory response (Rolo; Teodoro & Palmeira, 2012; Valenzuela et al. 2017).

Liver damage is also associated with the use of ethanol, obesity, viral infection and the use of synthetic and natural medicines (Hewawasam et al. 2003). It is very important to understand the mechanisms of action caused by the side effects of antineoplastic agent in different organs, thus having a considerable significant role in establishing the treatment strategy. Thus, there is an adaptation to the body's response in relation to the action of anti-tumor agents and tolerance of different tissues regarding immunosuppressive state induced by chemotherapy (Crăciun & Pașca 2014).

Further, liver tissue is very sensitive to lesions induced by synthetic compounds and of natural origin. This is due to its central role in the metabolism of these substances and it is possible to induce some degree of tissue damage during this experimentation, and many of these compounds are involved in the mechanisms that lead to liver cell damage. For example, disorders in vital cellular organelles result in impairment of homeostatic balance, thus resulting in intracellular oxidative stress with excessive formation of reactive oxygen species and suppressed immune response (Singh et al. 2016).

Studies have evidenced that hepatotoxicity is one of the main reasons for the withdrawal of Cancer medicines from the market. Natural products have already shown themselves to be promising in combating the toxicity of several commonly used drugs. In addition, many of these natural substances, such as resveratrol and curcumin, are now used as widely accepted chemo-preventive agents. It is known that compounds of natural origin not only reduce the risk of liver damage caused by medication, but also provide an alternative solution to remedy drug-induced hepatotoxicity response (Singh et al. 2016).

CONCLUSION

In conclusion, the main finding of this study is that the treatment with SAL in mice with S-180 caused apparent lesions in the liver tissue, however, at the enzymatic level no damage was seen. However, treatment with SAL caused a noticeable decrease in microvesicular steatosis compared to the positive control group. Tissue necrosis was not observed in the groups treated with lichen acid.

ACKNOWLEDGMENTS

Lira gratefully acknowledge the support by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Maria Aparecida da Conceição de Lira, designed the study and performed the experiments;

Marllyn Marques da Silva, contributed in performed the histological analyzes; Wanessa Karina de Moura Silva, assisted in the preparation of experiments; Emerson Peter da Silva Falcão, supervised the lichen acid isolation technique; Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, was responsible for monitoring the histological analysis and Sebastião José de Melo, supervised all experiments.

REFERENCES

- ALEXERINO CAF, HONDA NK, MATOS MFC, PORTUGAL LC, SOUZA PRB, PERDOMO RT, GUIMARÃES RCA, KADRI MCT, SILVA MCBL & BOGO D. 2019. Antitumor effect of depsidones from lichens on tumor cell lines and experimental murine melanoma. *Brazilian Journal Pharmacogn* 29: 449–456.
- ARAUJO HDA, SILVA JG, OLIVEIRA JRS, RIBEIRO MHML, MARTINS MCB, BEZERRA MAC, AIRES AL, ALBUQUERQUE MCPA, MELO MR, FILHO NTP, PEREIRA EC, SILVA DJR, DOS ANJOS JV, FALCÃ EPS, SILVA NH & LIMA VLM. 2019. Usnic acid potassium salt: Evaluation of the acute toxicity and antinociceptive effect in murine model. *Molecules* 24: 1–17.
- BARAONA E & LIEBER CS. 1979. Effects of ethanol on lipid metabolism. *Journal of Lipid Research* 20: 289-315.
- BARBOSA JE, STOCKLER-PINTO MB, CRUZ BO, SILVA ACT, ANJOS JS, MESQUITA CT, MAFRA D & CARDOZO LFMF. 2019. Nrf2, NF- κ B e PPAR β/δ mRNA Expression Profile in Patients with Coronary Artery Disease. *Arq Bras Cardiol* 113: 1121-1127.
- BÉZIVIN C, TOMASI S, LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT F & BOUSTIE J. 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine e human cancer cell lines. *Phytomedicine* 499-03.
- CAI Z, LI W, WANG H, YAN W, ZHOU Y, WANG G, CUI J & WANG F. 2012. Antitumor effects of a purified polysaccharide from *Rhodiola rosea* and its action mechanism. *Carbohydr. Polym* 90: 296–300.
- CRĂCIUN C & PAȘCA C. 2014. Structural and ultrastructural data on side effects of cisplatin in spleen, kidney e liver of rats. *Acta Metallomica* 1: 9-22.
- DEBNATH S, KARAN S, DEBNATH M, DASH J & CHATTERJEE TK. 2017. PolyL-Lysine Inhibits Tumor Angiogenesis and Induces Apoptosis in Ehrlich Ascites Carcinoma and in Sarcoma S-180 Tumor. *Asian Pacific Organ Cancer Prev* 18: 2255–2268.
- FILHO MOM, MOURA AF, BARRETO FS & RIBEIRO WLC. 2016. Avaliação da Possível Atividade Anticâncer da Fosfoetanolamina Sintética (Fs) no Sarcoma. <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/ciencia/SEPED/Saude/fosfoetanolamina/arquivos/Relatorio-3-Fosfoetanolamina-no-SARCOMA-180-v01-de-15-05-2016.pdf>. Acessado em 04 de março de 2020.
- FONTES CER, TAHA MO, FAGUNDES DJ, FERREIRA MV, FILHO ORP & MARDEGAN MJ. 2004. Estudo comparativo do uso de cola de fibrina e cianoacrilato em ferimento de fígado de rato. *Acta Cirúrgica Brasileira* 19: 37-42.

HERNÁNDEZ-RODAS MC, VALENZUELA R, ECHEVERRÍA F, RINCÓN CERVERA MA, ESPINOSA A, ILLESCA P, MUÑOZ P, CORBARI A, ROMERO N, GONZALEZ-MAÑAN D & VIDELA LA. 2017. Supplementation with docosahexaenoic acid and extra virgin olive oil prevents liver steatosis induced by a high-fat diet in mice through PPAR α e Nrf2 upregulation with concomitant SREBP-1c and NF-kB downregulation. *Molecular Nutrition & Food Research* 1-35.

HEWAWASAM RP, JAYATILAKA KAPW, PATHIRANA C & MUDDUWA LKB. 2003. Protective effect of *Asteracantha longifolia* extract in mouse liver injury induced by carbon tetrachloride and paracetamol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1413-1418.

INCA, Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer. INCA (Instituto Nacional do Câncer), INCA, 2019. <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acessado em 27 de Julho de 2019.

INGÓLFSDÓTTIR K. 2002. Usnic acid. *Phytochemistry* 61: 729–736. KUMAR, V. et al. 2010. Robbins E Cotran, *Bases Patológicas Das Doenças*. Elsevier. Brasil: Rio de Janeiro, 1–1479 p.

KUPCHAN SM & KOPPERMAN HL. 1975. Usnic Acid: Tumor Inhibitor Isolated from Lichens. *Experientia* 625- 752.

LIU X, ZHENG L, ZHANG R, LIU G, XIAO S, QIAO X, WU Y & GONG Z. 2016. Toxicological evaluation of advanced glycation end product N ϵ -(carboxymethyl) lysine: Acute and subacute oral toxicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 77: 65-74.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL & REALL RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Che* 193: 265-275.

MARINHO KSN, ANTONIO EA, SILVA CVNS, DA SILVA KT, TEIXEIRA VÉW, DE AGUIAR JÚNIOR FCA, DOS SANTOS KRRP, DA SILVA NH & SANTOS NPS. 2017. Hepatic toxicity caused by PLGA-microspheres containing usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* (AHTI) during pregnancy in Wistar rats. *An Acad Bras Cienc*. 89: 1073–1084.

MARTINS MCB, ROCHA TA, SILVA TDS, NETO MPC, SANTOS NPS, SILVA TG, AGUIAR-JUNIOR FCA, FALCÃO EPS, PEREIRA EC & SILVA NH. 2016. In Vitro e in Vivo Antineoplastic Activity of Barbatic Acid. *International archives of Medicine* 9: 1-9.

MICHELETTI AC, BEATRIZ A, DE LIMA DP, HONDA NK, PESSOA CDÓ, MORAES MO, LOTUFO LV, MAGALHÃES HIF & CARVALHO NCP. 2009. Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler - Isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. *Quim Nova* 32: 12–20.

RAMOS DBM, ARAÚJO MTMF, ARAÚJO TCL, NETO OGS, SILVA MG, SILVA YA, TORRES DJL, PATRIOTA LLS, MELO CML, LORENA VMB, PAIVA PMG, MENDES RL & NAPOLEÃO TH. 2019. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. *J Ethnopharmacol* 233: 148–157.

SAAD-HOSSNE R, PRADO RG & HOSSNE WS. 2004. Effect of acetylsalicylic acid and acetic acid solutions in liver of rabbits. *Acta Cirúrgica Brasileira* 19: 677-686.

SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. 2019. Cancer statistics, *Cancer J Clin* 69: 7–34.

SILVA DC, FREITAS ALP, BARROS FCN, LINS KOAL, ALVES APNN, ALENCAR NMN, FIGUEIREDO IST, PESSOA C, MORAES MO, COSTA-LOTUFO LV, FEITOSA JPA, MACIEL JS & PAULA RCM. 2012. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. *Carbohydr Polym* 87: 139– 145.

SILVA MM, ROCHA TA, MOURA DF, CHAGAS CA, JÚNIOR FCAA, SANTOS NPS, SOBRAL RVS, NASCIMENTO JM, LEITE AC, PASTRANA L, COSTA RMPB, NASCIMENTO TP & PORTO ALF. 2019. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. *Regul Toxicol Pharmacol* 103: 282–291.

SINGH D, CHO WC & UPADHYAY G. 2016. Drug-induced liver toxicity and prevention by herbal antioxidants: An Overview. *Front Physiol* 6: 1–18.

TAVARES V, HIRATA MH & HIRATA RDC. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism e therapeutic approach. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51: 526-533.

VALENZUELA R, ILLESCA P, ECHEVERRÍA F, ESPINOSA A, RINCÓN CERVERA MA, ORTIZ M, HERNÁNDEZ-RODAS MC, VALENZUELA A & VIDELA L. 2017. Molecular adaptations underlying the beneficial effects of hydroxytyrosol in the pathogenic alterations induced by a high-fat diet in mouse liver: PPAR- α e Nrf2 activation, and NF- κ B down-regulation. *Food Funct* 7: 1-35.

ROLO AP, TEODORO JS & PALMEIRA CM. 2012. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology & Medicine* 52: 59–69.

VALENZUELA R & VIDELA LA. 2011. The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct* 2: 644–648.

VISWAKARMA N, JIA Y, BAI L, VLUGGENS A, BORENSZTAJN J, XU J & REDDY JK. 2010. Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Research* 1-21.

WANG N, VERNA L, CHEN NG, CHEN J, LI H, FORMAN BM & STEMERMAN MB. 2002. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. J Biol Chem 277: 34176-34181.

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1. Photomicrograph of the histological section of the liver of mice exposed to S180. (N=5). **A-** Negative control; **B-** 5-Fluorouracil treatment; **C** and **D-** Treatment with SAL (25 e 50 mg / kg); **PN-** Pyknotic nucleus and **ST-** microvesicular steatosis. HE staining with 40X magnification.

Figure 2. Photomicrograph of histological section of the liver of mice exposed to S-180. (N=5). **A-** treatment with 5-Fluorouracil and **B-** treatment with SAL (50 mg / kg). **NC-** Liver necrosis e **FB-** liver fibrosis. HE staining with 10X magnification.

Table I. Analysis of the weight of livers and animals exposed to treatment with salazinic acid and enzymatic activity of transaminases

Data expressed as mean $\pm$ SD. The statistical differences determined by ANOVA followed by the Tukey test. N= 5. P <0.05 vs. NC. AST= Aspartate aminotransferase; ALT= Alanine aminotransferase; 5-FU= 5-fluorouracil; NC= Negative control; SAL= salazinic acid

Table II. Qualitative histopathological analysis of the liver of mice exposed to S-180

Data expressed as a percentage in number of animals. N=5. Negative control= saline + tween 80 to 5 %; Positive control= 5-Fluorouracil (20 mg/Kg); SAL= salazinic acid (doses of 25 or 50 mg/Kg).

TABLE

Table I. Analysis of the weight of livers and animals exposed to treatment with salazinic acid and enzymatic activity of transaminases

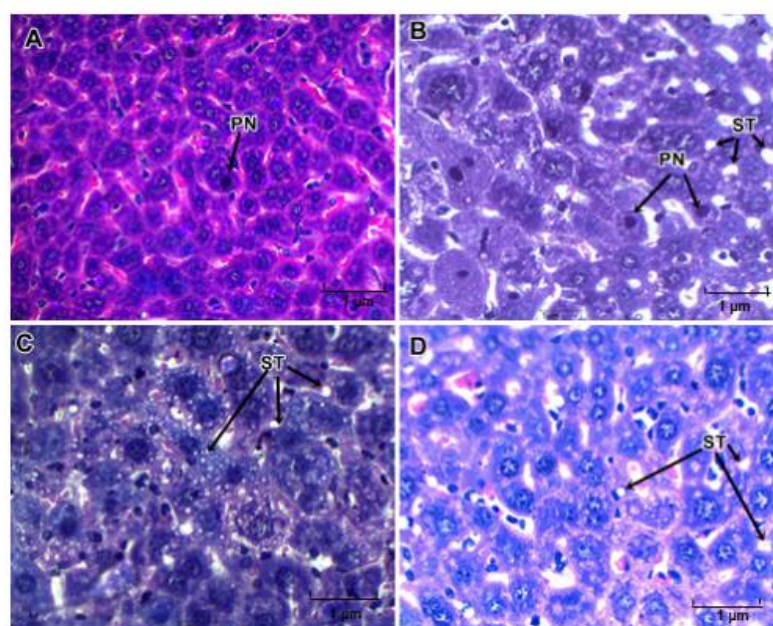
Groups	Weight (g)		Enzymatic activity (U/L)	
	Animal	Liver	ALT	AST
Negative control	52,02 $\pm$ 4,69	3,25 $\pm$ 0,57	64,04 $\pm$ 5,95	218,12 $\pm$ 36,70
Positive control	50,80 $\pm$ 5,84	3,26 $\pm$ 0,36	47,94 $\pm$ 8,07	216,07 $\pm$ 38,80
SAL (25mg/Kg)	48,92 $\pm$ 6,11	3,26 $\pm$ 0,46	50,64 $\pm$ 12,89	205,82 $\pm$ 31,78
SAL (50mg/Kg)	48,34 $\pm$ 5,07	3,51 $\pm$ 0,28	44,87 $\pm$ 6,37	184,11 $\pm$ 46,93

Data expressed as mean $\pm$ SD. The statistical differences determined by ANOVA followed by the Tukey test. N= 5. P <0.05 vs. Negative control. AST= Aspartate aminotransferase; ALT= Alanine aminotransferase; SAL= salazinic acid (doses of 25 or 50 mg/kg).

Table II. Qualitative histopathological analysis of the liver of mice exposed to S-180

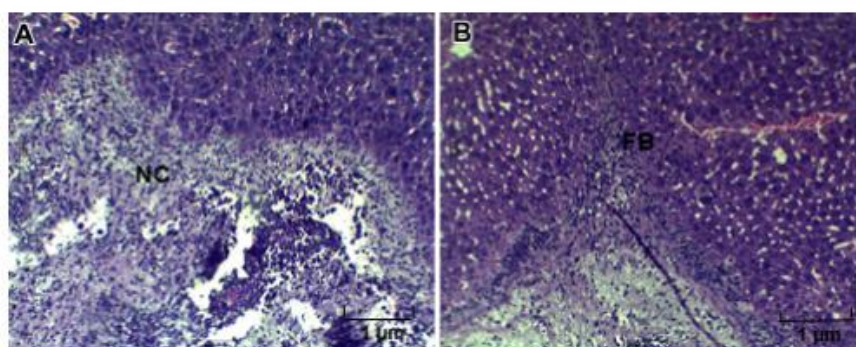
Groups	Pyknotic nuclei	Qualitative analysis criteria (%)			
		Steatosis	Necrosis	Fibrosis	Micro hemorrhage
Negative control	40 (2)	20 (1)	0	0	0
Positive control	80 (4)	100 (5)	40 (2)	0	0
SAL (25 mg/Kg)	100 (5)	80 (4)	0	0	0
SAL (50 mg/Kg)	80 (4)	60 (3)	0	20 (1)	0

Data expressed as a percentage in number of animals. N=5. Negative control= saline + tween 80 to 5 %; positive control= 5-Fluorouracil (20 mg/kg); SAL= salazinic acid (doses of 25 or 50 mg/kg).

Figure 1.

A- Negative control; B- 5-Fluorouracil treatment; C and D- Treatment with SAL (25 and 50 mg / kg); PN- Pyknotic nucleus and ST- microvesicular steatosis. HE staining with 40X magnification.

Figure 2.



A- treatment with 5-Fluorouracil and B- treatment with SAL (50 mg / kg).

6 ARTIGO IV

Artigo a ser submetido a Journal of Ethnopharmacology

Fator de impacto: 3.690

Avaliação do potencial antitumoral do extrato etéreo do líquen *Parmotrema flavescens*

Maria Aparecida da Conceição de Lira^a, Marlllyn Marques da Silva^b, Tamiris Alves Rocha^c, Danielle Feijó de Moura^c, Maria de Lourdes Lacerda Buril^d, Eugênia Cristina Gonçalves Pereira^d, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior^e, Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira^b, Noemia Pereira da Silva Santos^b, Emerson Peter da Silva Falcão^f, Sebastião José de Melo^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Centro de Biociências - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

^b Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células, Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil;

^c Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

^d Laboratório de Geografia Ambiental, Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil;

^e Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil;

^f Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular. Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil;

Resumo

Os líquens produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, em sua maioria de natureza fenólica. O minucioso estudo científico destes organismos notáveis e seus fenóis tem mostrado seu potencial farmacológico e biotecnológico. Este trabalho avaliou o potencial antineoplásico *in vitro* e *in vivo* do extrato etéreo do líquen *Parmotrema flavescens*. Foi realizado o ensaio de citotoxicidade por MTT, utilizando a linhagem celular Sarcoma-180. O extrato apresentou atividade citotóxica dose dependente, com viabilidade celular de $36,51\% \pm 4,85$ e $20,55\% \pm 3,02$ em 24 e 48 h, respectivamente, na maior dose, 200 µg/mL. A ação antitumoral foi avaliada e utilizou-se o modelo murino (camundongos Albinos Swiss), e Sarcoma-180. Os animais foram divididos em grupos controle negativo (tween 80 a 5% + salina), tratados com 5-Fluorouracil (20 mg/kg) e o grupo teste que recebeu o extrato etéreo, nas doses de 25 ou 50 mg/kg. O tratamento teve duração de 7 dias consecutivos com aplicações diárias, por via intraperitoneal. Foi feita a análise histomorfométrica do tumor, fígado, rim e baço dos animais experimentais. Foram obtidos percentuais de inibição tumoral de 72,31% (25 mg/kg) e 70,49% (50 mg/kg) para os animais tratados com o extrato etéreo. Os animais que receberam o 5- Fluorouracil, apresentaram inibição tumoral de 65%. Não foi verificado danos severos nos órgãos analisados, porém, a histomorfologia hepática mostrou diminuição no número dos hepatócitos e células endoteliais dos grupos tratados em relação ao não tratado. É possível concluir que o extrato etéreo de *P. flavescens* apresentou forte potencial antineoplásico *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: câncer; citotóxicidade; sarcoma-180.

Introdução

O Câncer é um importante problema de saúde pública que tende a aumentar com o crescimento da expectativa de vida. Esta situação tem levado a uma intensa busca por novas moléculas que possam auxiliar em sua terapia. A maioria das drogas atualmente em uso é de origem natural, ou tem seu protótipo em um composto originado em uma planta ou fungo. Os fungos liquenizados vêm ganhando destaque científico pelos seus metabólitos secundários e podem representar uma importante fonte de protótipos moleculares no enfrentamento das doenças neoplásicas (Ebrahim et al., 2016; Alexandrino et al., 2019; Siegel, Miller e Jemal, 2019).

Biologicamente, os fungos liquênicos costumam ser interpretados como um organismo que faz simbiose entre um fungo e uma alga ou cianobactéria, associados em um talo comum, mas para taxonomia é visto como uma forma de vida de fungos ascomicetos; sendo um fungo formador de líquen ou "micobionte", classificado como o parceiro simbiótico dominante entre as duas espécies (Stocker-Wörgötter, 2008). São organismos incríveis, capazes de produzir substâncias fascinantes que afastam predadores e possibilitam sua sobrevivência em lugares com condições adversas e restritas, além de possuir uma grande diversidade química de metabólitos secundários (Yousuf, Choudhary e Atta-ur-Rahman, 2014).

Seus metabólitos são derivados das vias de acetil polimalonil, mevalônico e chiquimato. Seus produtos podem compreender uma proporção significativa do peso seco de seu talo, com cerca de 0,1-5% ou até mais, sendo a maioria policetídeos aromáticos (Stocker-Wörgötter, 2008). São organismos considerados importantes, pois seus compostos são biologicamente ativos (Barnes et al., 2000) e, considerados agentes promissores na busca de novas drogas para fins terapêuticos (Solárová et al., 2020).

Contudo, a necessidade na busca de novos agentes terapêuticos, provindos de meios naturais, é de extrema importância para combater neoplasias. Como visto, moléculas bioativas derivadas de liquens apresentam-se com um forte potencial biológico e inovador para a produção de novos análogos potencialmente ativos. Portanto, esse estudo consiste em avaliar a ação do extrato etéreo do líquen *Parmotrema flavescens* frente a linhagem celular cancerígena Sarcoma-180, *in vitro* e *in vivo*. Além de analisar a histomorfometria do tumor, fígado, rim e baço dos animais em estudo.

Materiais e método

Coleta e identificação da espécie

A *P. flavescens* foi coletada no município de Taquaritinga do Norte, situado no agreste Pernambucano, Nordeste do Brasil, altitude de 785 m e coordenadas de latitude 07° 54' 11" S e longitude de 36° 02' 39" O. O material *in natura* foi identificado pela Dr^a Maria de Lourdes Lacerda Buril, do Laboratório de Geografia Ambiental do Departamento de Ciências Geográficas – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); uma exsicata do mesmo foi depositada no Herbário UFP - Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de depósito UFP84253.

Extração do líquen

A extração foi feita pelo método de exaustão em aparelho de Soxhlet. Foram utilizados 4g do material *in natura* limpo e seco, triturado em Moinho MA 630/1. Como solvente de extração foi utilizado o éter etílico (100 mL) à temperatura de 30 °C. Em seguida o solvente foi evaporado em rotaevaporador. E o extrato posto em dissecador.

Atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi determinada através do método do MTT (Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Mosmann, 1983) em linhagem celular de Sarcoma-180 (S-180) proveniente do Departamento de Antibióticos da UFPE. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico, Penicilina (10.000 UI) e Estreptomicina (10 mg/mL), em incubadora a 37 °C a 5 % de CO₂. As células (10⁵ células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida, o extrato foi dissolvido em DMSO a 1% (Dimetilsulfóxido) e adicionado aos poços nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL. O experimento foi feito em duas placas distintas, e após os períodos de 24 e 48 h de incubação foram adicionados 25 µL de MTT (5 mg.mL⁻¹) em cada poço e as células reincubadas por 3 h. O meio de cultura, juntamente com o MTT, foram aspirados dos poços e, adicionados 100 µL de DMSO a cada poço para solubilizar os cristais de

formazan. A absorbância foi obtida a um comprimento de onda de 630 nm em leitor de microplaca (Biotek Elx808). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores de citotoxicidade foram expressos como viabilidade celular: (A_{bs} de célula tratada população $\times 100 / A_{bs}$ da população de células não tratadas) (Silva et al., 2019).

Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Albinos *Swiss* (*Mus musculus*) machos (35-45g), com idade de 60 dias. Os camundongos foram submetidos a jejum de 8 horas antes do experimento. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (Nº 23076.012019/2018.58), com as normas proposta pelo Conselho Nacional de experimentação Animal (CONCEA) e pelas normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care e Use of Laboratory Animals.

Atividade antitumoral

Células do tumor ascítico do S-180 ($5,0 \times 10^6$ células mL^{-1}) foram inoculadas via subcutânea na região axilar direita do camundongo, de modo a desenvolver o tumor sólido. O tratamento teve início 24 h após inoculação das células e foi realizado por 7 dias consecutivos. Injeções de soluções do extrato etéreo foram administrados intraperitonealmente nas doses de 25 ou 50 mg/kg, sendo 1,25 ou 2,5% da dose máxima da toxicidade aguda (dados não apresentados). Os camundongos do grupo controle negativo receberam solução de salina + tween 80 a 5% e, os animais do grupo controle positivo foram tratados com 5-Fluorouracil (20 mg/kg). Foram utilizados 10 animais por grupo para o modelo experimental.

Um dia após término do tratamento, os animais foram anestesiados com solução de cetamina (1,25 g/kg) e xilazina (0,62 g/kg) para a realização da coleta de sangue por punção cardíaca para análise bioquímica e, consecutivamente, foram sacrificados por overdose de anestésicos e coletados tumores e órgãos, como o fígado rins e baço, para posterior análise histopatológica.

A inibição tumoral foi determinada a partir do peso médio dos tumores dos grupos tratados em relação ao grupo não tratado: $IT\% = (C - T)/C \times 100\%$, onde C é

o peso médio do grupo controle negativo e T corresponde ao peso médio dos tumores dos grupos tratados.

Para o cálculo da média dos pesos dos tumores dos grupos controle foram desconsiderados aqueles cujos pesos corresponderam a 0,39 g ou menos, denominados “no-takes” (Martins et al., 2016).

Avaliação do peso corporal, dos órgãos e tumor

Os animais foram pesados durante os oito dias de experimento. Os pesos corporais médios de cada grupo foram calculados na razão do ganho de peso corporal, de acordo com a seguinte fórmula:

$(\text{peso médio final} - \text{peso médio inicial}) / \text{peso médio inicial} * 100\%$

O tumor e os órgãos (baço, rins e fígado) foram coletados e pesados após o sacrifício dos camundongos. O peso relativo dos órgãos foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $(\text{peso médio do órgão} / \text{peso médio corporal}) * 100$ (Zhang et al., 2017).

Análise histomorfométrica

Tumores e órgãos foram dissecados e fixados em solução de formol tamponada a 10%, permanecendo nesta por um período de 48 h. Logo após, as amostras foram desidratadas em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizadas pelo xilol, impregnadas e incluídas em parafina.

Os blocos parafinizados foram cortados (4 µm) em um micrótomo. Os cortes teciduais já inclusos nas lâminas foram mantidos em estufa com uma temperatura de 60 °C por 24 h e, submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H&E). As imagens histológicas dessas lâminas foram capturadas por câmera digital Moticam 2300, acoplada ao microscópio óptico, sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se assim 20 campos por lâmina, com uma ampliação de 100x para lâminas de baço e, 400x para lâminas de fígado, rim e tumor.

A avaliação das fotomicrografias foram feitas através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

A análise do tecido hepático foi feita através de contagens de hepatócitos e células endoteliais. As estruturas renais foram avaliadas pela mensuração da área do glomérulo e do corpúsculo renal. O baço foi avaliado através da porcentagem de mensuração das áreas das polpas branca e vermelha. O tecido tumoral foi avaliado por contagem de células em fase de mitótica.

Análise estatística

Os resultados da atividade citotóxica foram expressos como as médias das repetições $\pm$ desvio padrão. Para análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste de Tukey para comparações múltiplas. Um valor de $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância.

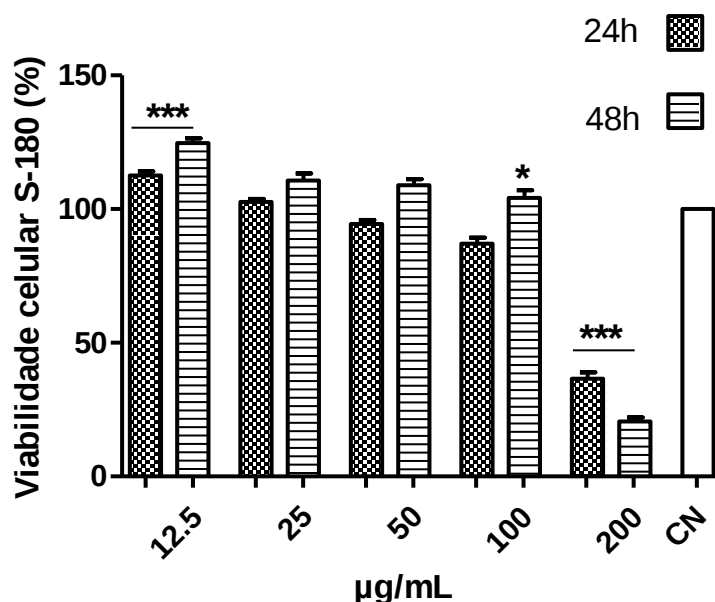
Para avaliação histomorfométrica foi realizado um teste de normalidade utilizando o Teste Smirnov Kolmogorov, para a análise da normalidade. Dessa forma, um teste não paramétrico (Mann-Whitney U) calculado pelo SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) foi utilizado para analisar esses dados. Os dados são expressos como média $\pm$ DP, com valores de $p < 0,05$ comparado com o controle considerado significativo.

Resultado e discussão

Atividade citotóxica

O extrato etéreo apresentou viabilidade celular de $36,51\% \pm 4,85$ e $20,55\% \pm 3,02$ nos períodos de 24 e 48 h, respectivamente, na maior dose, 200 $\mu\text{g/mL}$, com uma citotoxicidade de dose dependente, figura 1.

Figura 1. Viabilidade celular de S-180 frente ao extrato etéreo de *Parmotrema flavescens*



Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ v.s. Controle negativo (CN); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Mitrović et al. (2011), em seus estudos com extratos de Parmeliaceae, também observaram efeitos tóxicos para linhagens de células cancerígenas. Analisaram o extrato metanólico de 4 espécies de Parmeliaceae em ensaios com adenocarcinoma de cólon (HCT-116). Os autores verificaram resultados significativos de baixa viabilidade celular de modo dependente da dose e tempo de incubação, com resultados de índices menores que 20% de viabilidade celular para as espécies testadas.

Fernández-Moriano et al. (2016) estudaram 10 espécies de Parmeliaceae em ensaios de toxicidade celular com linhagens cancerígenas de MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) e Hep-G2 (carcinoma hepatocelular humano) e concluíram os extratos (metanol) mostraram diminuição na viabilidade celular de maneira dependente da dose.

Ghate et al. (2013) também evidenciaram a ação citotóxica do extrato (hidrometanólico) de *P. reticulatum* em linhagem de MCF-7. Seus resultados mostraram uma inibição de crescimento celular com um valor de IC_{50} 130 µg/mL, num período de 48 h de incubação.

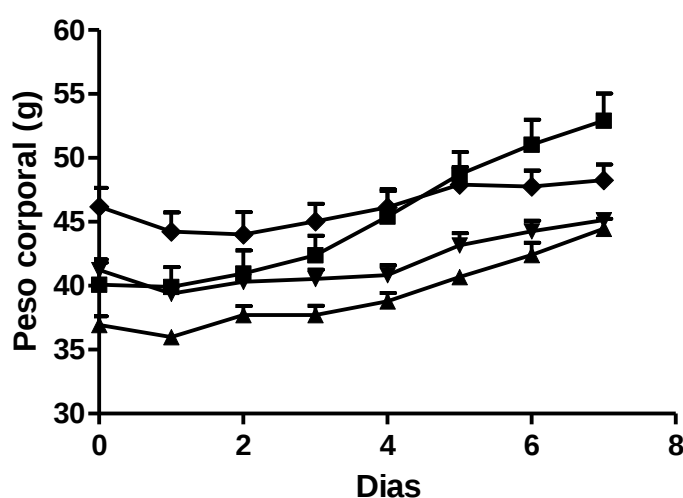
As propriedades biológicas demonstradas podem estar atribuídas à presença de compostos bioativos presentes no extrato liquênico. *P. flavescens* produz os ácidos salazínico, úsnico e girofórico (Benatti, 2013). Já foram comprovadas as ações desses metabólitos em diferentes linhagens celulares de câncer (Bačkorová et al., 2011 e 2012; Manojlović et al., 2012). Porém, alguns autores mencionam a ação sinérgica de fenóis liquênicos durante os ensaios biológicos (Falcão et al., 2004).

Avaliação da atividade antitumoral

Avaliação do peso corporal, tumor e órgãos

Os dados mostram que após a inserção das células tumorais os animais perderam peso. Após o segundo dia de tratamento, todos os grupos, inclusive o controle negativo, começaram a ganhar peso. Os animais que receberam o extrato etéreo na dose de 50 mg/kg, apresentaram uma estabilização em seu peso a partir do quinto dia, até o último dia de tratamento, figura 2. Contudo, essas mudanças nos pesos corporais dos animais tratados com o extrato etéreo não foram significativamente diferentes do controle negativo. Entretanto, houve diferença significativa apenas para o grupo que recebeu o 5-FU.

Figura 2. Peso corporal



Valores expressos em média $\pm$ DP do ganho de peso corporal. (N= 10); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. (■) = Controle negativo; (▲) = 5-Fluorouracil; (▼) = Extrato etéreo (25 mg/kg); (◆) = Extrato etéreo (50 mg/kg).

Na avaliação do índice de ganho corporal foi visto que os animais tratados com o extrato etéreo, nas duas doses testadas, tiveram um percentual de ganho de peso inferior ao grupo dos controles positivo e negativo (Tabela 1). Além do mais, a possível relação da instabilidade do apetite desses animais pode ter relação com a dieta de alimentos e água *ad libitum* (Aniagu et al., 2005).

Na análise macroscópica dos órgãos não foram observadas lesões ou diferenças de coloração. No geral, os órgãos pareciam saudáveis, sem alterações morfológicas ou danos macroscópicos. Não houve diferença significativa no peso dos órgãos tratados com o extrato etéreo, em comparação ao grupo não tratado. Porém houve um aumento na média do peso do fígado dos animais que receberam o 5-FU (Tabela 1). Portanto, os pesos relativos dos órgãos dos animais tratados com extrato etéreo não mostraram qualquer evidência de toxicidade.

Mudança de peso corporal durante o uso de drogas para fins terapêuticos, pode estar relacionada ao efeito tóxico ao organismo, causado pela substância aplicada (Sugiura e Stock, 1952; El Hilaly, Israili e Lyoussi, 2004), ou até mesmo pelo comprometimento causado pela doença. Contudo, é de extrema importância fazer essa análise da comparação estatística de pesos de órgãos entre animais tratados e não tratados, pois pode-se prever um possível potencial tóxico da substância testada. Além do mais, tem sido muito utilizada na experimentação animal (Wolfsegger et al., 2009).

Tabela 1. Índice de ganho de peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos com tumor S-180 e tratados com extrato etéreo de *Parmotrema flavescens* e com 5-FU

Grupos	Índice de peso corporal (%)	Baço (g)	Rins (g)	Fígado (g)
CN	30,19	0,66 ± 0,22	1,15 ± 0,24	5,61 ± 0,54
5-FU	20,35	0,55 ± 0,12	1,20 ± 0,11	6,49 ± 0,32*
EE25	9,49	0,75 ± 0,16	1,33 ± 0,15	6,36 ± 0,72
EE50	4,49	0,84 ± 0,16	1,27 ± 0,14	5,38 ± 0,42

Valores expressos em média ± DP; (N= 10); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, *p <0.05 v.s CN= Controle negativo; 5-FU= 5-Fluorouracil e EE= extrato etéreo 25 / 50 mg/kg.

Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Não foram verificadas diferenças significativas nos valores dos níveis séricos de albumina, proteínas totais, glicose, colesterol, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) presentes no plasma sanguíneo dos animais tratados com o extrato etéreo, em comparação com o grupo não tratado. Porém houve uma leve diminuição nos níveis de triglicerídeos para os grupos que receberam o extrato etéreo (50 mg/kg) e o 5-FU. Também houve aumento no nível de glicose para os animais tratados com o 5-FU (Tabela 2).

Contudo, a dieta foi bem aceita pelos animais durante o tratamento, sugerindo que o extrato etéreo não tenha causado nenhuma alteração no metabolismo de carboidratos, proteínas ou gorduras aos organismos.

Tabela 2 . Análise dos parâmetros bioquímicos dos camundongos com o tumor S-180 e tratados com o extrato etéreo de *Parmotrema flavescens* e o 5-FU

Grupos	ALT (U/L)	AST (U/L)	Albumina (g/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Proteínas totais (g/dL)	Glicose (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
CN	59,70 ± 9,94	246,30 ± 42,86	2,87 ± 0,10	213,43 ± 30,10	4,74 ± 0,14	68,60 ± 20,40	127,72 ± 6,43
5-FU	45,73 ± 8,56	230,77 ± 43,72	2,99 ± 0,10	149,66 ± 22,68***	4,93 ± 0,27	132,06 ± 9,32***	120,95 ± 8,97
EE25	63,54 ± 15,15	249,33 ± 28,26	3,17 ± 0,18	222,10 ± 33,84	5,05 ± 0,20	89,04 ± 17,08	130,06 ± 5,66
EE50	51,37 ± 13,05	231,33 ± 27,90	2,91 ± 0,47	166,58 ± 19,64*	4,91 ± 0,43	87,35 ± 18,17	130,88 ± 7,98

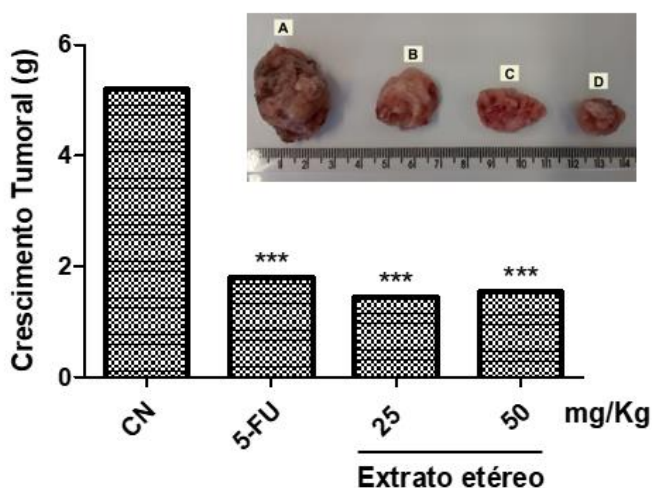
Valores expressos em média ± DP; (N= 10); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, *p <0.05; ***p <0.001 v.s CN= Controle negativo; 5-FU= 5-Fluorouracil; EE= extrato etéreo 25 / 50 mg/kg; ALT= Alanina aminotransferase e AST= Aspartato aminotransferase.

Crescimento e inibição tumoral

Foi verificada uma diferença significativa no peso dos tumores de todos os animais que receberam tratamento, em comparação com o grupo não tratado (5,2 ± 1,91 g). Foi visto uma maior redução, estatisticamente significante, nos tumores dos animais expostos ao extrato etéreo (25 ou 50 mg/kg), 1,43 ± 0,40 e 1,3 ± 0,30 g, respectivamente. O grupo tratado com o 5-FU apresentou uma média de peso de 1,79 ± 0,56 g (Figura 3). Nenhuma alteração comportamental foi observada nos animais

durante todo o tratamento, não sendo também registrada nenhuma morte até o seu final.

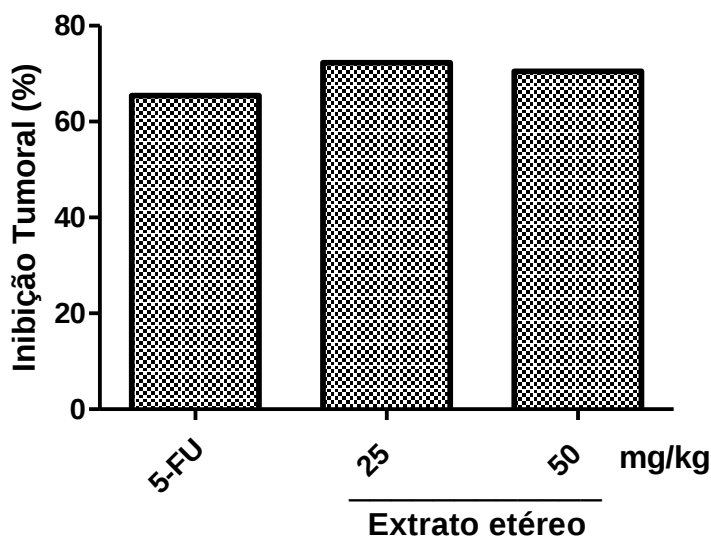
Figura 3. Crescimento tumoral (mg/kg)



Valores expressos em média $\pm$ DP; (N= 10); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. ***p <0.001 v.s CN= Controle negativo (**A**); 5-FU= 5-Fluorouracil (**B**); Extrato etéreo 25 (**C**) e 50 mg/kg (**D**).

Os animais que receberam diferentes doses do extrato etéreo, apresentaram resultados promissores quanto a porcentagem de inibição do tumor S-180, com valores percentuais de 72,31% (25 mg/kg) e 70,49% (50 mg/kg) de inibição tumoral. Por outro lado, o grupo exposto ao 5-FU obteve porcentagem de inibição de 65,46% (Figura 4).

Figura 4. Inibição tumoral (%)



Valores expressos em média $\pm$ DP; (N= 10); A diferença estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. 5-FU= 5-Fluorouracil.

Embora ainda não existam estudos clínicos sobre a eficácia de substâncias produzidas pelos líquens no tratamento do câncer, há uma série de estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstram tais efeitos de seus metabólitos secundários (Solárová et al., 2020). Porém, alguns líquens são utilizados popularmente em algumas regiões como agentes medicinais. Há relatos de que *Parmelia caperata* trata doenças estomacais, inflamações na garganta e infecções cutânea e *Umbilicaria sp* age nas infecções (Muñoz, 1981). *Cladonia rangiferina* tem sido utilizada como um remédio para tratar febre, resfriados, artrite, convulsões, infecções hepáticas, tosse, constipação e tuberculose (Shukla et al., 2017).

Estudos realizados com o extrato acetônico de *Flavocetraria cucullata* (Parmeliaceae) relatam a eficácia do extrato na inibição tumoral do adenocarcinoma de pulmão humano (A549). Os autores ainda mostram que a ação do extrato foi mais potente do que a do ácido úsnico, constituinte majoritário do extrato. Possivelmente a ação do extrato estaria relacionada a eventual ação sinérgica com outras moléculas presentes na sua composição, incluindo o ácido salazínico (Nguyen et al., 2014). Os resultados relatados por aqueles autores estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, visto que as espécies correspondem a mesma família e, ambos extratos possuem os ácidos úsnico e salazínico em sua composição.

Estudos com a linhagem celular de S-180 são considerados válidos para se determinar a atividade antitumoral de novas drogas e extratos, devido à versatilidade tumoral nas formas de tumor ascítico e sólido, além de sua agressividade ao organismo. Possui uma relevante aplicabilidade em estudos pré-clínicos de substâncias naturais ou sintéticas. A utilização dessa linhagem celular *in vitro* e *in vivo* é suficiente para comprovar o potencial antitumoral do extrato testado (Silva, Nascimento e Porto, 2019).

Avaliação histomorfométrica do tumor S-180

As análises histomorfométrica das células do tumor S-180 dos grupos controle negativo e tratados apresentaram características em comum, como células pleomórficas e com anaplasia, núcleos hipercromáticos e com vários graus de pleomorfismo. Foram observadas também áreas de invasão muscular, invasão do tecido adiposo unilocular e, infiltração de vasos sanguíneos. Esses achados corroboram com as características vistas por Santos et al. (2018), os quais destacam o potencial infiltrativo do S-180 nos tecidos adjacentes, como nervos, gordura e fibras musculares. Todos os grupos apresentaram áreas de necrose tecidual. Ainda foi observada a presença de proliferação celular, com altos números de fases mitóticas e mitoses atípicas (Figura 5).

Foi avaliada a quantidade de mitoses presentes nos tecidos tumorais, através de fotomicrografias dos tecidos corados em H&E. Não foram vistas diferenças significativa entre a média do número de mitoses por fotomicrografia do grupo controle negativo ($10,63 \pm 2,48$) em relação ao grupo que recebeu o 5-FU ($10,06 \pm 2,69$). Entretanto, foram observados nos tumores dos animais que receberam tratamento com o extrato etéreo, uma diminuição significativa de células em fases mitóticas, EE25 e EE50 com valores médios de $6,88 \pm 2,34$ e $6,30 \pm 2,00$ de números de mitoses por fotomicrografia, respectivamente.

Avaliar a quantidade de células em fase mitótica de tumores é considerado um importante indicador para a triagem e avaliação da neoplasia, possibilitando informações sobre agressividade celular e, fornecendo valores de prognóstico reprodutível e independente em tumores invasivos (Van Diest, Van Der Wall e Baak, 2004; Cireşan et al., 2013; Roux et al., 2013; Veta, Van Diest e Pluim, 2015).

A visualização morfológica das células, durante as fases de mitose, pode ser facilmente reconhecida devido ao aspecto típico dos cromossomos durante os diferentes períodos da fase. Essa técnica tem sido a base da contagem microscópica óptica de figuras mitóticas, sendo a forma de análise mais antiga para avaliação da proliferação celular (Van Diest, Van Der Wall e Baak, 2004). Durante essa fase, os núcleos possuem características morfológicas bem aparentes quando coradas em H&E, são hipercromáticos, com membrana nuclear escura, saliências ao redor e basofilia em vez de eosinofilia nos arredores do citoplasma (Veta, Van Diest e Pluim, 2015).

Avaliação histomorfométrica do rim, baço e fígado

Na análise histomorfométrica do tecido hepático, foi observada uma diminuição significativa na média dos números de hepatócitos e células endoteliais nos grupos que receberam o tratamento com o extrato etéreo, em comparação com grupo não tratado, tabela 3.

Na avaliação do tecido renal não foi verificada diferença significativa no tamanho dos corpúsculos renais e, dos glomérulos analisados dos grupos que receberam tratamento, em comparação ao grupo controle negativo, tabela 3.

Também não houve diferença significativa nas estruturas analisadas do tecido esplênico dos grupos tratados com o extrato etéreo, em comparação ao grupo controle, tabela 3.

Tabela 3. Análise histomorfométrica do fígado, rim e baço de camundongos com tumor S-180 e tratados com extrato etéreo de *Parmotrema flavescens* e 5-FU

Grupos	Fígado (média do nº de cél. por fotomicrografia)		Rim (μm^2)		Baço (% por fotomicrografia)	
	Hepatócitos	Células endoteliais	Corpúsculo	Glomérulo	Polpa branca	Polpa vermelha
CN	39,35 $\pm$ 6,87	13,07 $\pm$ 3,71	4455,25 $\pm$ 1600,62	2912,59 $\pm$ 971,69	23,28 $\pm$ 8,01	74,01 $\pm$ 7,37
5-FU	38,41 $\pm$ 9,05	12,69 $\pm$ 3,57	4034,845 $\pm$ 1218,27	2614,54 $\pm$ 784,12	22,46 $\pm$ 7,90	74,53 $\pm$ 7,61
EE25	31,09 $\pm$ 8,26***	10,67 $\pm$ 2,46***	4346,075 $\pm$ 1332,96	3339,70 $\pm$ 1028,11	21,70 $\pm$ 7,07	76,31 $\pm$ 7,37
EE50	28,35 $\pm$ 5,89***	10,58 $\pm$ 2,10***	4131,79 $\pm$ 976,73	3006,19 $\pm$ 796,25	19,30 $\pm$ 4,00	78,92 $\pm$ 3,89

Teste Mann-Whitney. Valores expressos por média $\pm$ DP; (N=10); ***p<0,001 v.s CN= Controle negativo; 5-FU= 5-Fluorouracil e EE= extrato etéreo 25 e 50 mg/kg.

De acordo com Singh, Cho e Upadhyay (2016), lesões hepáticas induzidas por xenobióticos são comuns, pois o órgão exerce um papel central no metabolismo destas substâncias. É no tecido hepático onde ocorre o processo de desintoxicação no organismo. Dessa forma, muitos fármacos quimioterápicos acumulam seus produtos metabólicos, causando danos de toxicidade (Debnath et al., 2017).

O rim também é considerado um órgão muito sensível a agentes estranhos. Metabolizam tais substâncias interagindo com suas organelas, podendo modificar o caminho de sinalização celular e, até mesmo, causar danos inflamatórios e lesão tecidual (Barnett e Cummings, 2019).

Logo após tratamento com substâncias estranhas ao organismo, sendo de origem sintética ou natural, o baço pode sofrer alterações ultraestruturais que surgem não apenas pela ação danosa da substância, mas também pela reação do tecido, aumentando a ação dos macrófagos, plasmócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos (El-Shenawy et al., 2017), indicando uma proteção do órgão a uma possível reação prejudicial da substância (Crăciunaș et al., 1996).

Contudo, não é possível de afirmar se as lesões no fígado foram causadas pelo contato com as substâncias testadas, ou simplesmente pelos danos metabólicos ocasionado pelo tumor. Além do mais, não foram observados danos expressivos nos órgãos em estudo.

Conclusão

O extrato etéreo da *P. flavescens* apresentou ação citotóxica para a linhagem celular de câncer testada, Sarcoma-180, e foi eficiente na inibição tumoral, apresentando atividade similar ao fármaco 5-Fluorouracil. Mesmo com a ação antitumoral o extrato não promoveu danos expressivos no baço, fígado e rim, indicando uma possível segurança no uso.

Agradecimentos

Lira, M.A.C. agradece o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Propesq / UFPE.

Referências

- Alexerino, C.A.F., Honda, N.K., Matos, M. de F.C., Portugal, L.C., Souza, P.R.B. de, Perdomo, R.T., Guimarães, R. de C.A., Kadri, M.C.T., Silva, M.C.B.L., Bogo, D., 2019. Antitumor effect of depsidones from lichens on tumor cell lines e experimental murine melanoma. *Brazilian J. Pharmacogn.* 29, 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.005>
- Aniagu, S.O., Nwinyi, F.C., Akumka, D.D., Ajoku, G.A., Dzarma, S., Izebe, K.S., Ditse, M., Nwaneri, P.E.C., Wambebe, C., Gamaniel, K. 2005. Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. *African Journal of Biotechnology* 4, 72-78.
- Barnes, J., Halksworth, D., Shaw, C., Hider, B., Kinghorn, D., 2000. Pharmacognosy in the 21st century. *Pharmacology Journal* 264, 701-703.
- Barnett, L.M.A., Cummings, B.S., 2019. Cellular e Molecular Mechanisms of Kidney Toxicity. *Semin. Nephrol.* 39, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.12.004>
- Báčkorová, M., Báčkor, M., Mikeš, J., Jendželovský, R., Fedoročko, P. 2011. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid e gyrophoric acid. *Toxicology in vitro* 25, 37 – 44. doi:10.1016/j.tiv.2010.09.004
- Báčkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Báčkor, M., Mikeš, J., Fedoročko, P. 2012. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 e A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in vitro* 26, 462–468. doi:10.1016/j.tiv.2012.01.017
- Benatti, M.N. 2013. Espécies de Parmotrema (Parmeliaceae, Ascomycota) no Parque Estadual da Cantareira, Estado de São Paulo, Brasil, II. As espécies emaculadas ou com máculas irregulares. *Hoehnea* 41, 81-102.
- Cireşan, D.C., Giusti, A., Gambardella, L.M., Schmidhuber, J., 2013. Mitosis detection in breast cancer histology images. *Int. Conf. Med. Image Comput. Comput. Interv.* Springer, Berlin, Heidelb. 411–418. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40763-5_51
- Crăciunaş C., Crăciun C., Crăciun V., Dordea M., Toader-Radu M., 1996. Ultrastructural effects of certain cytostatics on rat spleen. *Curr. Probl. e Techn. In Cellular e Molecular Biology* 1, 311-317.
- Debnath, S., Karan, S., Debnath, M., Dash, J., Chatterjee, T.K. 2017. Poly-L-Lysine Inhibits Tumor Angiogenesis e Induces Apoptosis in Ehrlich Ascites Carcinoma e in

Sarcoma S-180 Tumor. Asian Pac J Cancer Prev. 18, 2255-2268. doi:10.22034/APJCP.2017.18.8.2255

Ebrahim, H.Y., Elsayed, H.E., Mohyeldin, M.M., Akl, M.R., Bhattacharjee, J., Egbert, S., El Sayed, K.A., 2016. Norstictic Acid Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation, Migration, Invasion, e In Vivo Invasive Growth Through Targeting C-Met. Phyther. Res. 30, 557–566. <https://doi.org/10.1002/ptr.5551>

El Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2004. Acute e chronic toxicological studies of Ajuga iva in experimental animals. J. Ethnopharmacol. 91, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.009>

El-Shenawy, N.S., Hamza, R.Z., Khaled, H.E., 2017. Protective effect of α -lipoic acid against spleen toxicity of dimethylnitrosamine in male mice: Antioxidant e ultrastructure approaches. Biomed. Pharmacother. 96, 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.010>

Falcão, E.P.S., Silva, N.H., Gusmão, N.B., Ribeiro, S.M., Pereira, E.C., 2004. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen. Acta bot. bras. 18, 911–918. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000400022>

Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., Divakar, P.K., Crespo, A., Gómez-Serranillos, M.P., 2016. Evaluation of the antioxidant capacities e cytotoxic effects of ten parmeliaceae lichen species. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/3169751>

Ghate, N.B., Chaudhuri, D., Sarkar, R., Sajem, A.L., Panja, S., Rout, J., Meal, N., 2013. An antioxidant extract of tropical lichen, Parmotrema reticulatum, induces cell cycle arrest e apoptosis in breast carcinoma cell line MCF-7. PLoS One 8, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082293>

Geng, X., Zhang, X., Zhou, B., Zhang, C., Tu, J., Chen, X., Wang, J., Gao, H., Qin, G., Pan, W., 2018. Usnic acid induces cycle arrest, apoptosis, e autophagy in gastric cancer cells in vitro e in vivo. Med. Sci. Monit. 24, 556–566. <https://doi.org/10.12659/MSM.908568>

Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M., Vasiljević, P., Stanojković, T., 2012. Chemical composition of three Parmelia lichens e antioxidant, antimicrobial e cytotoxic activities of some their major metabolites. Phytomedicine 19, 1166–1172. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.07.012>

Martins, M.C.B., Rocha, T.A., Silva, T.D.S., Cavalcanti-Neto, M.P., Santos, N.P.S., Silva, T.G., Aguiar-Junior, F.C.A., Falcão, E.P.S., Pereira, E.C., da Silva, N.H., 2016.

In Vitro e In Vivo Antineoplastic Activity Of Barbatic Acid. Int. Arch. Med. 1–9. <https://doi.org/10.3823/1934>

Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., Stefanović, O., Čomić, L., Đačić, D., Ćurčić, M., Marković, S. 2011. Antioxidant, Antimicrobial e Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. Int. J. Mol. Sci. 12, 5428-5448. doi:10.3390/ijms12085428

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth e survival: Application to proliferation e cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Muñoz, M., Barrera, E., Meza, I. 1981. El uso medicinal y alimentício de plantas nativas y naturalizadas em Chile. Museo Nacional de Historia Natural 33, 3-89.

Nguyen, T.T., Yoon, S., Yang, Y., Lee, H-B., Oh, S., Jeong, M-H., Kim, J-J., Yee, S-T., Criaşan, F., Moon, C., Lee, K.Y., Kim, K.K.K., Hur, J-S., Kim, H. 2014. Lichen Secondary Metabolites in Flavocetraria cucullata Exhibit Anti-Cancer Effects on Human Cancer Cells through the Induction of Apoptosis e Suppression of Tumorigenic Potentials. PlosOne 9, 1-14.

Roux, L., Racocceanu, D., Loménie, N., Kulikova, M., Irshad, H., Klossa, J., Capron, F., Genestie, C., Naour, G., Gurcan, M., 2013. Mitosis detection in breast cancer histological images An ICPR 2012 contest. J. Pathol. Inform. 4, 8. <https://doi.org/10.4103/2153-3539.112693>

Santos, G.J.L., Oliveira, E.S., Pinheiro, A.D.N., Costa, P.M., Freitas, J.C.C., Santos, F.G.A., Maia, F.M.M., Morais, S.M., Nunes-Pinheiro, D.C.S., 2018. *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae) latex reduces oxidative stress e modulates CD4+, CD8+, FoxP3+ e HSP-60+ expressions in Sarcoma 180- bearing mice. Journal of Ethnopharmacology 220, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.043>

Silva, M.M., Rocha, T.A., Moura, D.F., Chagas, C.A., Aguiar Júnior, F.C.A., Santos, N.P.S., Sobral, R.V.S., Nascimento, J.M., Leite, A.C.L., Pastrana, L., Costa, R.M.P.B., Nascimento, T.P., Porto, A.L.F., 2019. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic e cytological approach. Regulatory Toxicology e Pharmacology 103, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.02.009>

Silva, M.M., Nascimento, T.P., Porto, A.L.F. 2019. The importance of Sarcoma-180 as valid model to determine the toxicity e antitumor activity of molecules e extracts. International Journal of Recent Academic Research 01, 433-437.

Singh, D., Cho, W.C., Upadhyay, G., 2016. Drug-induced liver toxicity e prevention by herbal antioxidants: An Overview. *Front. Physiol.* 6, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00363>

Shukla, I., Azmi, L., Gupta, S.S., Upreti, D.K., Rao, C.V. 2017. Melioration of anti-hepatotoxic effect by Lichen rangiferinus against alcohol induced liver damage in rats. *Journal of Ayurveda e Integrative Medicine* 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaim.2017.08.007>

Solár, P., Hřčková, G., Koptašíková, L., Velebný, S., Solárová, Z., Bačkor, M., 2016. Murine breast carcinoma 4T1 cells are more sensitive to atranorin than normal epithelial NMuMG cells in vitro: Anticancer e hepatoprotective effects of atranorin in vivo. *Chem. Biol. Interact.* 250, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.012>

Solárová, Z., Liskova, A., Samec, M., Kubatka, P., Büsselberg, D., Solár, P., 2020. Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. *Biomolecules* 87, 1-33. <https://doi.org/10.3390/biom10010087>

Stocker-Wörgötter, E. 2008. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide e shikimate metabolite production, e PKS genes. *Natural Product Reports* 25, 188–200. <http://pubs.rsc.org> | doi:10.1039/B606983

Sugiura, K., Stock, C.C., 1952. Studies in a tumor spectrum. I. Comparison of the action of methylbis(2-chloroethyl)amine e 3-bis(2-chloroethyl)aminomethyl-4-methoxymethyl-5-hydroxy-6-methylpyridine on the growth of a variety of mouse e rat tumors. *Cancer* 5, 382–402. <https://doi.org/10.1002/1097-0142>

Valadares, M.C., 2006. Avaliação De Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era Do Teste DL₅₀”. *Rev. Eletrônica Farmácia* 3, 93–98. <https://doi.org/10.5216/ref.v3i2.2083>

Van Diest, P.J., Van Der Wall, E., Baak, J.P.A., 2004. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: A review. *J. Clin. Pathol.* 57, 675–681. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.010777>

Veta, M., van Diest, P.J., Pluim, J.P.W., 2015. Detecting mitotic figures in breast cancer histopathology images. *Med. Imaging: Digit. Pathol.* 8676, 1-7. <https://doi.org/10.1117/12.2006626>

Wolfsegger, M.J., Jaki, T., Dietrich, B., Kunzler, J.A., Barker, K., 2009. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.06.012>

Yang, Y., Bae, W.K., Lee, J.Y., Choi, Y.J., Lee, K.H., Park, M.S., Yu, Y.H., Park, S.Y., Zhou, R., Taş, İ., Gamage, C., Paik, M.J., Lee, J.H., Chung, I.J., Kim, K.K., Hur, J.S.,

Kim, S.K., Ha, H.H., Kim, H., 2018. Potassium usnate, a water-soluble usnic acid salt, shows enhanced bioavailability e inhibits invasion e metastasis in colorectal cancer. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34709-9>

Yousuf, S., Choudhary, M.I., Atta-ur-Rahman. 2014. Lichens: Chemistry e Biological Activities. *Studies in Natural Products Chemistry* 43, 223-259. . <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63430-6.00007-2>

Zhang, W., Zhong, Y., Cui, H., Wang, L., Yang, R., Su, Z., Xiang, B., Wei, Q., 2017. Combination of calcineurin B subunit (CnB) e 5-fluorouracil reverses 5-fluorouracil-induced immunosuppressive effect e enhances the antitumor activity in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Lett.* 14, 6135–6142. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6958>

Zhou, R., Yang, Y., Park, S.Y., Nguyen, T.T., Seo, Y.W., Lee, K.H., Lee, J.H., Kim, K.K., Hur, J.S., Kim, H., 2017. The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility e tumorigenesis. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08225-1>

7 CONCLUSÃO

Foram obtidos os extratos de interesse e isolado o ácido salazínico de *P. concurrens* com um alto nível de pureza e com bom rendimento.

Todos os extratos apresentaram níveis elevados de viabilidade celular, em células de macrófagos J774, e não foram considerados tóxicos para camundongos Albinos Swiss.

O ácido salazínico não apresentou ação citotóxica para as linhagens celulares de câncer, porém exibiu uma alta porcentagem de inibição tumoral, sendo mais elevado do que o padrão comercial 5-Fluorouracil.

O SAL também apresentou capacidade de interação com a hTS com energia altamente favorável, inclusive melhor do que com o 5-FU, sendo capaz de formar ligações com resíduos críticos importantes do sítio ativo da enzima em estudo.

O ácido salazínico mostrou ser um composto viável e seguro, possivelmente elegível a ensaios *in vivo* mais abrangentes, que avaliem sua aplicação em ensaios clínicos, especialmente relacionando-se seu efeito antitumoral e baixa toxidez em camundongos.

O ácido salazínico não foi considerado como um agente hepatoprotetor.

O extrato etéreo foi considerado um agente tóxico para o Sarcoma-180 nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, não foi considerado tóxico para os camundongos em estudo.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, C. A. F. et al. Antitumor effect of depsidones from lichens on tumor cell lines and experimental murine melanoma. **Brazilian Journal Pharmacognosia**, v. 29, p. 449–456, 2019.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- 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, p. 139-143, 2014.
- ANASTASIOU, D. Tumour microenvironment factors shaping the cancer metabolism landscape. **British Journal of Cancer**, v. 116, p. 277–286, 2016.
- ANIAGU, S. O. et al. Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 72-78, 2005.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. Chemistry of Lichen Substances. **Japan Society from the Promotion of Science**, Tokyo, p. 240, 1954.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, p. 1-71, 2015.
- BÁČKOROVÁ, M. et al. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology in vitro**, v. 25, p. 37 – 44, 2011.
- BASILE, A. et al. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 7861–7875, 2015.
- BENATTI, M. N. Espécies de Parmotrema (Parmeliaceae, Ascomycota) no Parque Estadual da Cantareira, Estado de São Paulo, Brasil, II. As espécies emaculadas ou com máculas irregulares. **Hoehnea**, v.41, n. 1, p. 81-102, 2013.
- BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, v. 10, n. 6-7, p. 499–503, 2003.
- BOGO, D. et al. In vitro Antitumour Activity of Orsellinates. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 65 p. 43–48, 2010.

BOLTON, E. E. et al. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. **Annual Reports in Computational Chemistry**, v 4, p. 217–241, 2008.

BRAGA, G. M. S. et al. Obtenção de Extratos Liquênicos no Cerrado Maranhense para controle do *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Pesquisa em Foco**, v. 20, n. 1, p. 165-172, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Câncer: sintomas, causas, tipos e tratamentos. Acesso em 16 de junho de 2020. <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer>.

CÁCERES, M. E. S. et al. Líquens brasileiros: novas descobertas evidenciam a riqueza no Norte e Nordeste do país. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, n. 35, p. 101-119, 2014.

CANDAN, M. et al. Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Parmelia sulcata* and its Salazinic Acid Constituent. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, p. 619-621, 2007.

CAO, Z. et al. Enhancement of Antitumor Activity of Low-Dose 5-Fluorouracil by Combination With Fuzheng-Yiliu Granules in Hepatoma 22 Tumor-Bearing Mice. **Integrative Cancer Therapies**, v. 12, p. 174–181, 2013.

CHEN, D. Q., et al. Natural Products as a Source for Antifibrosis Therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, p. 1-16, 2018.

CHENG, M-R. et al. Galactosylated chitosan/5-fluorouracil nanoparticles inhibit mouse hepatic cancer growth and its side effects. **World Journal of Gastroenterol**, v. 18, p. 6076-6087, 2012.

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

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

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

DEBNATH, S. et al. Poly-L-Lysine Inhibits Tumor Angiogenesis and Induces Apoptosis in Ehrlich Ascites Carcinoma and in Sarcoma S-180 Tumor. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, p. 2255-2268, 2017.

DUNKEL, M. et al. SuperNatural: a searchable database of available natural compounds. **Nucleusc Acids Research**, v. 34, p. D678–D683, 2006.

EBRAHIM, H. Y. et al. Norstictic Acid Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation, Migration, Invasion, and *In Vivo* Invasive Growth Through Targeting C-Met. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 557–566, 2016.

EINSTEIN, Albert. **Como vejo o mundo**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1981.

FALCÃO, E. P. F. et al. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, p. 43-49, 2002.

FERREIRA, L. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, p. 13384–13421, 2015.

FERNÁNDEZ-MORIANO, C. et al. Evaluation of the Antioxidant Capacities and Cytotoxic Effects of Ten Parmeliaceae Lichen Species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-11, 2016.

GAULTON, A. et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. **Nucleusc Acids Research**, v. 40, p. D1100–D1107, 2011.

GECHEV, T. S. et al. Natural products from resurrection plants: Potential for medical applications. **Biotechnology Advances**, p. 1-11, 2014.

GENG, X. et al. Usnic Acid Induces Cycle Arrest, Apoptosis, and Autophagy in Gastric Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo*. **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 556-566, 2018.

GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. et al. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. **RSC Advances**, v. 4, p. 59017–59047, 2014.

GONZALEZ-TEJERO, M. R. et al. Three lichens used in popular medicine in eastern andalucia (spain). **Economic Botany**, v. 49, p. 96-98, 1994.

GRANIER, C. et al. Immunothérapie des cancers: rationnel et avancées récentes Cancer immunotherapy: Rational and recent breakthroughs. **La Revue de Médecine Interne**, p. 1-7, 2016.

GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophyscal Reviews**, v. 6, p. 75–87, 2014.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica Bn**, v. 7, n. 2, p. 119–136, 2017.

HALE-JR., M. E. **The Biology of Lichens**. 3. ed. London: Edward Arnold Pub., 1983.

HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C. e GUNSTEREN, W. V. Molecular dynamics simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, p. 190-196, 2002.

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

HONDA, N. K. et al. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 328–332, 2010.

HONG, J. M. et al. Anti-Cancer Activity of Lobaric Acid and Lobarstin Extracted from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum*. **Molecules**, v. 23, n. 658, p. 1-10, 2018.

INCA. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer - INCA. Como surge o câncer? Acesso em 16 de Junho de 2020. <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>.

IRWIN, J. J. et al. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, p. 1757–1768, 2012.

IVANOVA, V. et al. Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 40, p. 377–388, 2010.

JAIN, A. P. et al. Evaluation of *Parmotrema reticulatum* Taylor for Antibacterial and Antiinflammatory Activities. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 94-102, 2016.

JAIN, P. K.; JAIN, A. P. Effect of lichens on dermal wound healing with possible *Parmotrema reticulatum* antioxidant and antibacterial mechanism. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 10-14, 2016.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 13 ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional. 2002, p. 100-106.

KAPINOVA, A. et al. Dietary phytochemicals in breast cancer research: Anticancer effects and potential utility for effective chemoprevention. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, p. 1–18, 2018.

- KARAGOZ, I. D. et al. *In vivo* Antitumoral Effect of Diffractaic Acid from Lichen Metabolites on Swiss Albino Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma: An Experimental Study. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, p. 307-314, 2014.
- KARPLUS, M. e McCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 9, p. 646-652, 2002.
- KHADER, S. Z. A. et al. Larvicidal Potential of Selected Indigenous Lichens against Three Mosquito Species- *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi*. **Chinese Herbal Medicines**, p. 1-7, 2018.
- KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 739–753, 2018.
- KOSANIĆ, M. et al. Biological Activities and Chemical Composition of Lichens from Serbia. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 1226-1238, 2014.
- LAI, D. et al. Phenolic compounds with in vitro activity against respiratory syncytial virus from the nigerian lichen Ramalina farinacea. **Planta Medica**, v. 79, n. 15, p. 1440–1446, 2013.
- LAGORCE, D. et al. FAF-Drugs2: Free ADME/tox filtering tool to assist drug discovery and chemical biology projects. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 396, 2008.
- LIU, T. et al. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. **Nucleusc Acids Research**, v. 35, p. D198–D201, 2007.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 330–338, 2003.
- LONGLEY, D. B. et al. The roles of thymidylate synthase and p53 in regulating Fas-mediated apoptosis in response to antimetabolites. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 3562–3571, 2004.
- LUZ, J. S. B. et al. Ultrastructural Analysis of Leishmania infantum chagasi Promastigotes Forms Treated *In Vitro* with Usnic Acid. **The Scientific World Journal**, p. 1-7, 2015.
- MANOJLOVIC, N. T. et al. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae), **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-8, 2012.
- MARTINS, M. C. B. et al. *In Vitro* and *in Vivo* Antineoplastic Activity of Barbatic Acid. **International archlves of Medicine**, v. 9, n. 63, p. 1-9, 2016.

MERLO, L. M. F. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature**, v. 6, p. 924-935, 2006.

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.

MODOLO, F. Células-tronco, câncer e as células-tronco tumorais. 2017. Acesso em 16 de junho de 2020. <https://cientistasdescobriramque.com/2017/11/28/celulas-tronco-cancer-e-as-celulas-tronco-tumorais/>.

MOREIRA, A. S. N. et al. Larvicidal activity of Ramalina usnea lichen against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 4–6, 2016.

MUN, E. J. et al. Tumor-treating fields: A fourth modality in cancer treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 24, p. 266–275, 2018.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, p. 13-24, 2008.

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

NICHOLS, S. N. et al. Predictive power of molecular dynamics receptor structures in virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, p. 1439-1446, 2011.

ODABASOGLU, F. et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 59–65, 2006.

OETTL, S. K. et al. Imbricatic Acid and Perlatolic Acid: Multi-Targeting Anti-Inflammatory Depsides from *Cetrelia monachorum*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.

PALUSZCZAK, J. et al. Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 441, p.109-124, 2018.

PARAGUASSÚ-BRAGA, F. H.; BONONO, A. Células-Tronco e Câncer: vida e morte com uma origem comum? 2004. Acesso em 16 de junho de 2020. <http://www.comciencia.br/dossies-1-72/reportagens/celulas/13.shtml>.

PHILIPS, G. K.; ATKINS, M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. **International Immunology**, v. 27, p. 39–46, 2014.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RAJ, P. S. et al. *Parmotrema tinctorum* exhibits antioxidant, antiglycation and inhibitory activities against aldose reductase and carbohydrate digestive enzymes: an *in vitro* study. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 28, n. 18, p. 1480–1484, 2014.

RANKOVIC´, B.; KOSANIC´, M. Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. Lichen Secondary Metabolites. **Springer**, p. 1-26, 2015.

SAHIN, S. et al. *Ramalina* Lichens and their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant and Antimicrobial Agents. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, p. 471–477, 2015.

SALSBURY Jr, F. R. Molecular Dynamics Simulations of Protein Dynamics and their relevance to drug Discovery. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 738–744, 2010.

SANT' ANNA, C. C. et al. Molecular biology as a tool for the treatment of cancer. **Clinical and Experimental Medicine**, 2018.

SEYMOUR, F. A.; CRITTENDEN, P. D.; DYER, P. S. Sex in the extremes: lichen-forming fungi. **Mycologist**, v. 19, p. 51-18, 2005.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA. Cancer Journal Clinical**, v. 69, p. 7-34, 2019.

SILVA, J. A. C. Avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante do extrato hidroalcoólico do líquen *Cladonia clathrata*. 2009. Dissertação (Pós-Graduação em Medicina), Universidade Federal de Sergipe, Aracajú.

SILVA, L. S. Estudos Computacionais de Esfingomielinases D: Docking, Dinâmica Molecular e Métodos Híbridos QM/MM. 2015. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

SILVA, M. M.; NASCIMENTO, T. P.; PORTO, A. L. F. The importance of Sarcoma-180 as valid model to determine the toxicity and antitumor activity of molecules and extracts. **International Journal of Recent Academic Research**, v. 01, p. 433-437, 2019.

SIMONETTI, A. C. Atividade antitumoral e toxicidade de nanocápsulas contendo o ácido fumarprotocetrárico isolado de *Cladonia verticillaris* (líquen). 2004. Dissertação

(Programa de pós-graduação em bioquímica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SOLÁR, P. et al. Murine breast carcinoma 4T1 cells are more sensitive to atranorin than normal epithelial NMuMG cells *in vitro*: Anticancer and hepatoprotective effects of atranorin *in vivo*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 250, p. 27-37, 2016.

SOLÁROVÁ, Z. et al. Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. **Biomolecules**, n. 10, v. 87, p. 1-33, 2020.

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

SONG, Y. et al. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. **Angiogenesis**, v. 15, p. 421–432, 2012.

SOUZA, M. V. N. et al. Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Cancer. **Revista Fitos**, v. 3, p. 25–42, 2007.

SPIELMANN, A. A.; MARCELLI, M. P. *Parmeliaceae* (Ascomycota liquenizados) nos barrancos e peraus da encosta da Serra Geral, Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil. II. Gêneros *Canoparmelia*, *Hypotrachyna*, *Myelochroa*, *Parmelinopsis* e *Relicina*. **Iheringia**, v. 63, n. 2, p. 193-212, 2008.

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.

SUGIURA, K.; STOCK, C. C. Studies in a tumor spectrum. I. Comparison of the action of methylbis(2-chloroethyl)amine and 3-bis(2-chloroethyl)aminomethyl-4-methoxymethyl-5-hydroxy-6-methylpyridine on the growth of a variety of mouse and rat tumors. **Cancer**, v. 5, p. 382–402, 1952.

THIAGO, L. S. A Persistência dos Cânceres e as Células-tronco Tumorais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, p. 375-88, 2006.

VALADARES, M. C. Avaliação De Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era Do Teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica Farmácia**, v. 3, p. 93–98, 2006.

JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VU, T. H. et al. Depsides: Lichen metabolites active against hepatitis C virus. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2015.

WANG, J. J.; LEI, K. F.; HAN, F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 3855–3864, 2018.

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

YANG, Y. et al. Potassium usnate, a water-soluble usnic acid salt, shows enhanced bioavailability and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–11, 2018.

ZHANG, W. et al. Combination of calcineurin B subunit (CnB) and 5-fluorouracil reverses 5-fluorouracil-induced immunosuppressive effect and enhances the antitumor activity in hepatocellular carcinoma. **Oncology Letters**, v. 14, p. 6135–6142, 2017.

ZHAO, T. et al. Enhanced antitumor and reduced toxicity effect of Schisanreae polysaccharide in 5-Fu treated Heps-bearing mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 114–118, 2014.

ZHOU, R. et al. The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility and tumorigenesis. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–13, 2017.

ZUGIC, A. et al. Evaluation of Anticancer and Antioxidant Activity of a Commercially Available CO₂ Supercritical Extract of Old Man's Beard (*Usnea barbata*). **PLoS ONE**, p. 1-14, 2016.

ZUO, S. T. et al. Usnic acid induces apoptosis via an ROS-dependent mitochondrial pathway in human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **RSC Advances**, v. 5, p. 153–162, 2015.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 20 de dezembro de 2018

Ofício nº 109/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Emerson Peter da Silva Falcão**

Departamento de Nutrição

Centro Acadêmico de Vitória

Universidade Federal de Pernambuco

Processo online nº 23076.012019/2018-58

Certificamos que a proposta intitulada "**Estudo do Potencial Biológico de Espécies Liquênicas Remanecentes da Mata Atlântica, Agreste de Pernambuco.**" registrada com o nº 23076.012019/2018-58, sob a responsabilidade de **Prof. Emerson Peter da Silva Falcão** que envolvem a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 18/12/2018.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro/2018 a junho/ 2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos
Nº de animais	175
Peso/Idade	25-35g/ 60 dias
Sexo	(175) Macho
Origem	Bioterio do LIKA

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

ANEXO B - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA – *P. flavescens*

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Departamento de Botânica
Herbário UFP – Geraldo Mariz**

Nº: UFP84253

Fam.: Parmeliaceae

Sp.: *Parmotrema flavescens* (Kremp.) Hale

Nome vulgar:

Col.: Maria Aparecida da Conceição de Lira (01)
04/IX/2017.

Det.: Maria de Lourdes Lacerda Buril 21/XI/2017.

Proc.: Brasil. Pernambuco. Taquaritinga do Norte,
Altitude de 785 m, Coordenadas: latitude 07°54'11" S e
longitude 36°02'39" W, área com solo arenoso.

Obs.: Material coletado sobre rocha.
Tipo de talo - folioso.

ANEXO C - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA – *P. concurrens*

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Departamento de Botânica
Herbário UFP – Geraldo Mariz**

Nº: UFP84254

Fam.: Parmeliaceae

Sp.: *Parmotrema concurrens* (Hale)

Nome vulgar:

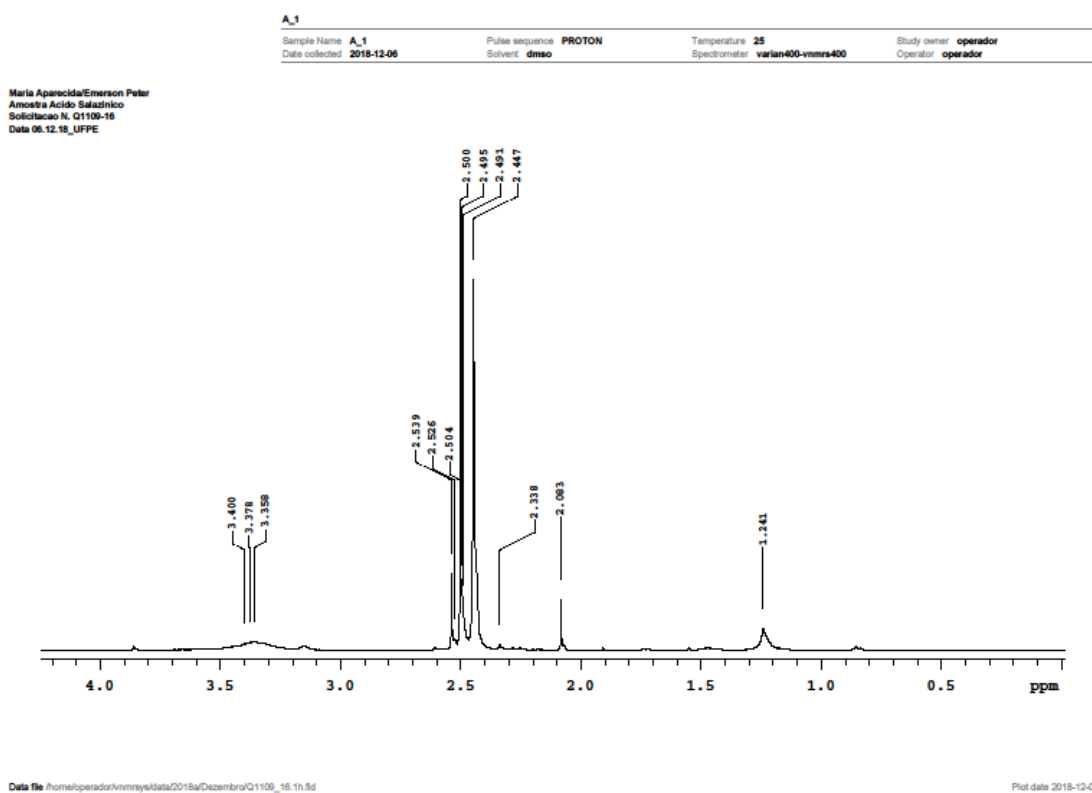
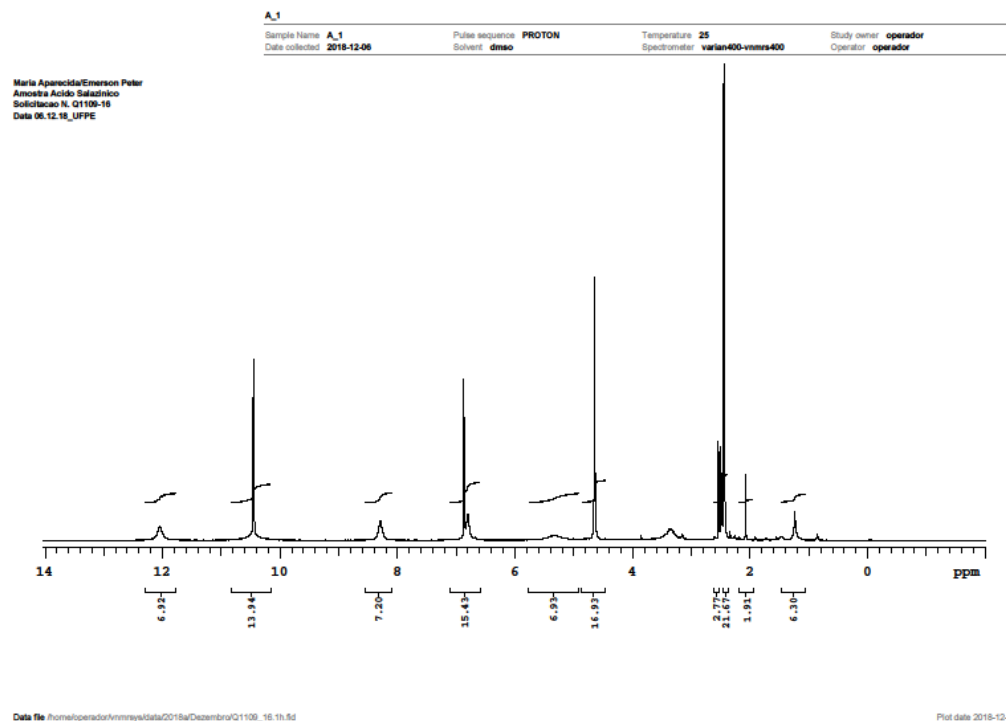
Col.: Maria Aparecida da Conceição de Lira (01)
04/IX/2017.

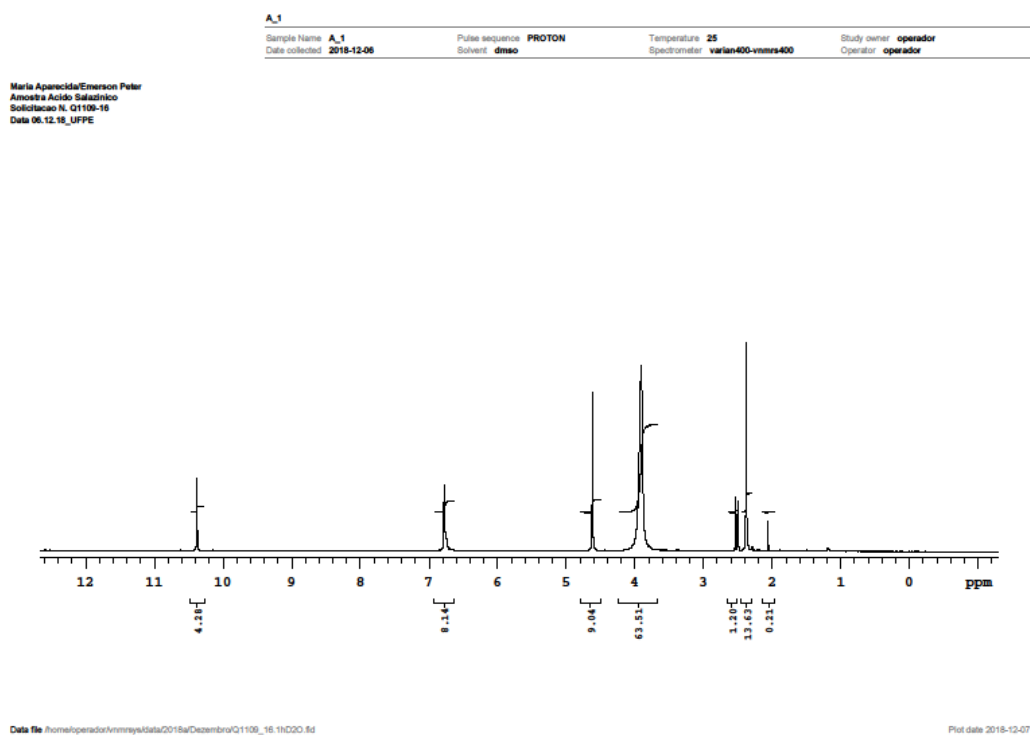
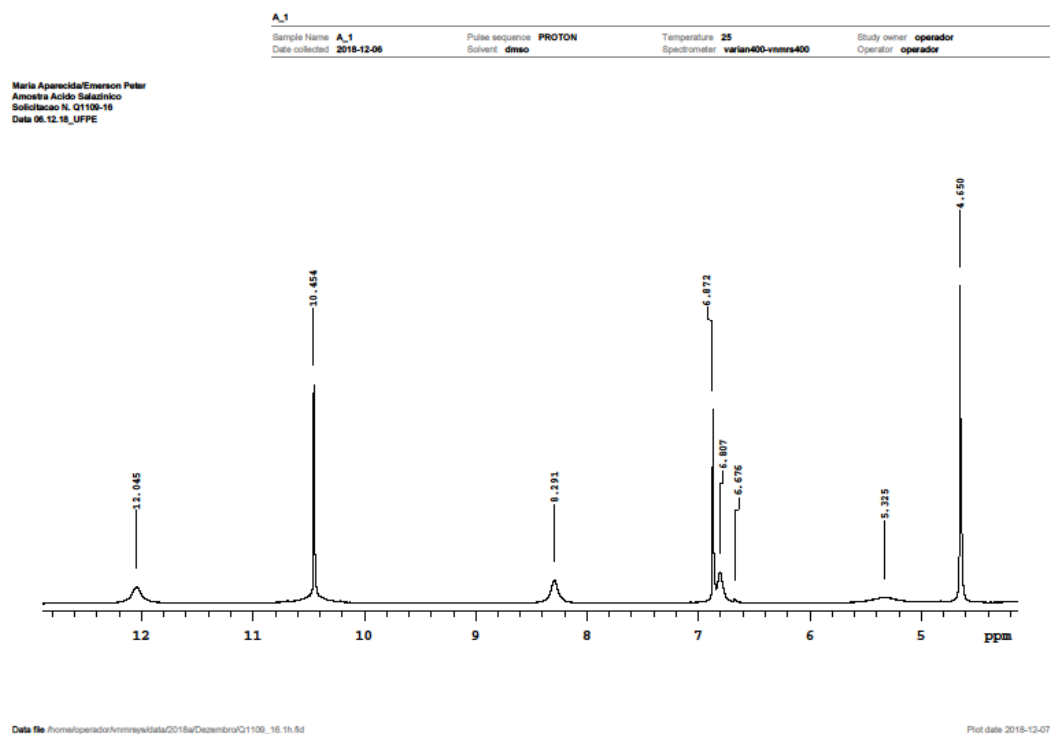
Det.: Maria de Lourdes Lacerda Buril 21/XI/2017.

Proc.: Brasil. Pernambuco. Taquaritinga do Norte,
Altitude de 785 m, Coordenadas: latitude 07°54'11" S e
longitude 36°02'39" W, área com solo arenoso.

Obs.: Material coletado sobre rocha.
Tipo de talo - folioso.

ANEXO D - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

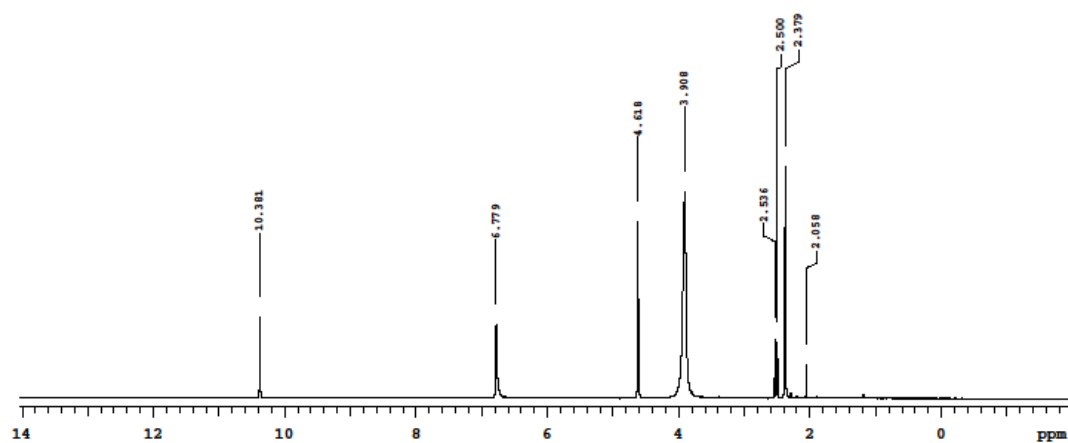




A_1

Sample Name	A_1	Pulse sequence	PROTON	Temperature	25	Study owner	operador
Date collected	2018-12-06	Solvent	dmsc	Spectrometer	varian400-vnmrs400	Operator	operador

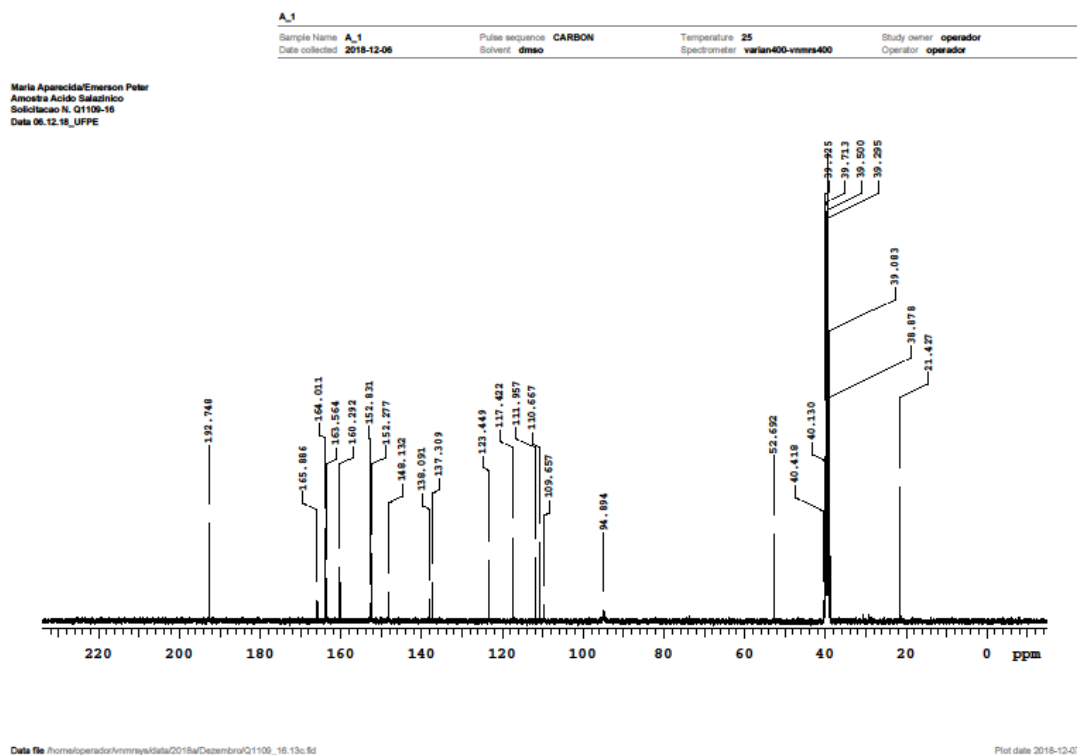
Maria Aparecida Emerson Peter
Amostra Acido Salicilico
Solicitacao N. Q1109-16
Data 06.12.18_UFPE



Data file: /home/operador/vnmrs/data/2018/Dezembro/Q1109_16.1hD2O.fid

Plot date: 2018-12-07

ANEXO E - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13



ANEXO F - COORIENTAÇÃO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LUANA CRISTINA DA SILVA

ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO EM INTESTINO DELGADO (DUODENO E JEJUNO) DE
CAMUNDONGOS NORMAIS E PORTADORES DO SARCOMA 180 TRATADOS COM ÁCIDO
SALAZÍNICO

Projeto de pesquisa apresentado como critério para
obtenção da nota de avaliação da disciplina de
Trabalho de Conclusão de Curso 1, no 7º período de
Bacharelado em Enfermagem da Universidade Federal
de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória (UFPE-
CAV).

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de
Aguar Júnior

Coorientador: Maria Aparecida da Conceição de Lira

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO - PE

2019

ANEXO G - COLABORAÇÃO DE PROJETO – PIBIC

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO

- ESTUDO DA GENOTOXICIDADE DO ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRIO ISOLADO DE *C. verticillaris* (Liquen)

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

- Química de Produtos Naturais

UNIDADES DE EXECUÇÃO

- Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão – CAV/UFPE
- Laboratório de química e Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica/UFPE.

EQUIPE

- Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão – CAV/UFPE (Pesquisador)
- Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva – Departamento de Bioquímica – UFPE (Colaborador)
- Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas - CAV/UFPE (Colaborador)
- MS^a Maria Aparecida da Conceição de Lira - Doutoranda em Ciências Biológicas - UFPE(Colaboradora)
- Hugo Renan da Silva Amaral – CAV/UFPE (Executor)

ANEXO H- COLABORAÇÃO DE PROJETO – PIBIC

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO

- ESTUDO DA GENOTOXICIDADE DO ÁCIDO SALAZÍNICO OBTIDO DE EXTRATOS ORGÂNICOS DO LIQUEN *Parmotrema concursens*

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

- Química de Produtos Naturais

UNIDADES DE EXECUÇÃO

- Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão – CAV/UFPE
- Laboratório de química e Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica/UFPE.

EQUIPE

- Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão – CAV/UFPE (Pesquisador)
- Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva – Departamento de Bioquímica – UFPE (Colaborador)
- Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas - CAV/UFPE (Colaborador)
- MS^a Maria Aparecida da Conceição de Lira - Doutoranda em Ciências Biológicas – UFPE (Colaboradora)
- Hugo Renan da Silva Amaral – CAV/UFPE (Executor)

ANEXO I - COLABORAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA



ANEXO J - COLABORAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA

Título: Avaliação histomorfométrica do pulmão de camundongos portadores do tumor Sarcoma-180 tratados com ácido salazínico

Aluno: Matheus Vinícius Barbosa da Silva

**ANEXO K - CARTA DE DECISÃO DA REVISTA ANAIS DA ACADEMIA
BRASILEIRA DE CIÊNCIAS**

28 May 2020

Dear Mrs. de Lira:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "HISTOLOGICAL EVALUATION OF THE LIVER OF MICE WITH SARCOMA-180 TREATED WITH SALAZINIC ACID" in its current form for publication in the Annals of the Brazilian Academy of Sciences. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Annals of the Brazilian Academy of Sciences, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Marcia Couri

Editor-in-Chief, Annals of the Brazilian Academy of Sciences

Associate Editor

Comments to the Author:

(There are no comments.)

Entire Scoresheet:

Reviewer: 1

Recommendation: Accept

Comments:

The authors made the suggested changes. The manuscript can be accepted for publication.

Additional Questions:

Does the manuscript contain new and significant information to justify publication?:

Yes

Does the Abstract (Summary) clearly and accurately describe the content of the article?: Yes

Is the problem significant and concisely stated?: Yes

Are the methods described comprehensively?: Yes

Are the interpretations and conclusions justified by the results?: Yes

Is adequate reference made to other work in the field?: Yes

Is the language acceptable?:

Please rate the priority for publishing this article (1 is the highest priority, 10 is the lowest priority): 3

Length of article is: Adequate

Number of tables is: Adequate

Number of figures is: Adequate

Please state any conflict(s) of interest that you have in relation to the review of this paper (state "none" if this is not applicable): I do not have conflict of interest

Rating:

Interest: 2. Good

Quality: 2. Good

Originality: 2. Good

Overall: 2. Good

