

DANIELLE BOGO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO
ÁCIDO LECANÓRICO E DE SEUS PRODUTOS DE MODIFICAÇÃO
ESTRUTURAL**

CAMPO GRANDE

2009

DANIELLE BOGO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO
ÁCIDO LECANÓRICO E DE SEUS PRODUTOS DE MODIFICAÇÃO
ESTRUTURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos.

Co-Orientadora: Profª. Dra. Neli Kika Honda

CAMPO GRANDE

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIELLE BOGO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO ÁCIDO
LECANÓRICO E DE SEUS PRODUTOS DE MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado : Aprovada

Campo Grande (MS), 04 de março de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos

Instituição: UFMS

Prof. Dra. Elenir Cury Pontes

Instituição: UFMS

Prof. Dr. Renato Andreotti e Silva

Instituição: Embrapa Gado de Corte

DEDICATÓRIA

*A meus dois amores, Paulo (minha alma gêmea) e Ian (luz da minha vida).
A vocês dedico minhas conquistas, minhas alegrias, perspectivas e sonhos...
A meus pais, em reconhecimento por terem me dado à vida e me ensinado a
viver. E a minha querida irmã, pelo apoio amigo e dedicação ao Ian.
Dedico este trabalho a todos aqueles que sofreram e ainda sofrem por causa do
câncer. Esta é apenas uma pequena contribuição de alguém que sonha com a
cura desta triste doença, procurando mitigar, quem sabe evitar a dor e o
sofrimento de tantas vidas...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **LUZ DIVINA** que iluminou meus caminhos e permitiu que eu chegasse até aqui. Duas pessoas em especial contribuíram para que a pós-graduação em nível de mestrado se tornasse realidade em minha vida: meu marido **Paulo Haidamus**, pelo apoio incondicional em todos os momentos, companheirismo e amor (saiba que nenhuma ajuda e incentivo passaram despercebidos por mim) e minha orientadora professora doutora **Maria de Fátima Cepa Matos** por ter acreditado e me acolhido como sua orientanda, mesmo com todas limitações (a você querida orientadora, a minha admiração e apreço); aos dois agradeço imensamente e desejo que a Luz Divina os abençoe sempre.

O meu especial agradecimento à minha co-orientadora profa. Dra. **Neli Kika Honda**, pela dedicação, atenção e importante contribuição a meu trabalho, bem como a profa. Dra. **Elenir Pontes**, pela paciência e atenção dedicados ao trabalho estatístico deste estudo.

Sou grata à **minha família** a quem devo grande parte de quem sou e por terem me ensinado o significado de valores humanos inestimáveis, os quais trago sempre em minha vida. A meu pai, minha mãe e minha irmã, a minha gratidão por terem possibilitado e incentivado a carreira profissional, contribuindo em todos os sentidos para com a minha formação.

Meus agradecimentos à **Fundect – Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso do Sul**, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Gostaria de externar meus agradecimentos ao coordenador Prof. **Dr. Ricardo Aydos**, professores e secretários do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela oportunidade de realização do mestrado.

Meu imenso obrigado para as minhas colegas de laboratório, **Patrícia Midori e Evelyn da Silva**, vocês foram pessoas fundamentais no meu aprendizado e colaboraram muito para com este trabalho. Agradeço pela paciência, compreensão e amizade, externando aqui o meu apreço e reconhecimento.

Os meus agradecimentos à Prof^a. Ms. **Renata** e à Prof^a. Ms. **Adriana** pelas suas contribuições importantes na conclusão desta dissertação e também à **Lyara** e à **Regina**, pelo apoio, presença e auxílio durante o tempo em que trabalhamos juntas no laboratório.

Sou grata a todos que de uma maneira ou outra contribuíram para esta pesquisa. Acredito que ninguém consegue nada sozinho, sempre existem em nossas vidas anjos, pessoas especiais e passantes que não menos importantes, nos ajudam a trilhar nossos caminhos. E cabe a nós agradecermos e quando possível e necessário ajudar, assim como fomos ajudados.

Como é instigante a curiosidade do pesquisador. Estimulante é a descoberta, mesmo do que outrora fora; é um passo que o leva a avançar, pensar, questionar, reformular...

Interessante como rapidamente se refaz das idéias, de soluções e conflitos, dúvidas e questionamentos que o fazem caminhar pelas veredas mágicas e científicas da pesquisa...

É estonteante vê-lo dedicar-se ao objeto de seu estudo, mesmo que este não lhe seja grato e nem amigo. São tantas variáveis e dificuldades. Tanto tempo, tanta pressa, tanto, tanto.

E quem é capaz de entendê-lo, senão seus dados, resultados e métodos? Estes que jamais o abandonam e nem o deixam por um só instante: sua mente num maquinar constante.

E no delirante momento dos resultados e conclusão de sua obra é importante eternizá-la porque no momento seguinte, a descoberta poderá ser-lhe obsoleta, incompleta ou se transformar em outro problema... Mas para o pesquisador que instiga e acredita, sua obra nunca ficará guardada, ainda mais numa gaveta.

DANIELLE BOGO

(Dezembro de 2008)

RESUMO

Bogo D. Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural. Campo Grande; 2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Os líquens resultam da associação simbiótica entre um fungo e um ou mais organismos fotossintéticos. Substâncias resultantes do metabolismo secundário de líquens, especialmente aqueles de natureza fenólica, apresentam várias atividades tais como agentes antimicrobianos, antineoplásicos, citotóxicos entre outros. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antineoplásica de orselinatos obtidos por modificações estruturais no ácido lecanórico, um depsídeo isolado do líquen *Parmotrema tinctorum*. O ensaio de citotoxicidade foi realizado *in vitro* com sulforrodamina B (SRB), utilizando as seguintes linhagens de células neoplásicas: laringe (Hep2), mama (MCF-7), pulmão (786-0), pele (B16-F10) e uma linhagem normal de rim de macaco (VERO). Dentre todos os compostos testados o orselinato de *n*-butila foi o composto mais ativo, seguido de orselinato de *sec*-butila e *terc*-butila (IC₅₀: 7,2, 8,9 e 10,2 µg.mL⁻¹). Este último apresentou o maior índice de seletividade (2,6). Orselinato de etila, *n*-propila e *n*-butila foram mais ativos contra Hep2 em comparação com MCF7, 786, e B16. Os orselinatos de *iso*-propila e *n*-pentila, ao contrário, demonstraram maior atividade em 786-0. O composto inicial, ácido lecanórico e orselinato de metila foram inativos nas quatro linhagens de células neoplásicas testadas. Estes resultados indicam e confirmam as informações obtidas previamente de que as modificações estruturais realizadas no ácido lecanórico e a elongação da cadeia dos orselinatos (de metil para butil), potencializam a atividade antineoplásica provavelmente devido ao aumento da lipofilicidade.

Palavras-chave: orselinatos, ácido lecanórico, atividade antineoplásica.

ABSTRACT

Bogo D. Evaluation in vitro of antineoplastic activity of lecanoric acid and their products of structural modification. Campo Grande; 2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Lichens are a symbiotic association of a fungus and one or more photosynthetic partners. Phenolic substances from lichens exhibit a wide range of biological actions, including antimicrobial, antineoplastic, and cytotoxic activities. The purpose of this study was evaluate *in vitro* the antineoplastic activity of orsellinates obtained from structural modifications of lecanoric acid, a depside isolated from the lichen *Parmotrema tinctorum*. A cytotoxicity assay was carried out *in vitro* with sulforhodamine B (SRB) using the following cell lines: larynx (Hep2), breast (MCF-7), lung (786-0), melanoma (B16-F10) and a normal cell line of kidney of monkey (VERO). Among all the compounds tested, *n*-butyl orsellinate was the most active, followed by *sec*-butyl orsellinate and *tert*-butyl orsellinate (IC₅₀: 7,2, 8,9 e 10,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The last one showed the higher selective index (2,6). Ethyl orsellinate, *n*-propyl and *n*-butyl were more active against Hep2 than against MCF7, 786-0, or B16-F10. *Iso*-propyl and *n*-pentyl orsellinates showed greater activity against 786-0. The initial compound lecanoric acid and methyl-orsellinate were inactive against the four cell lines evaluated. These results corroborate previous information that structural modifications of lecanoric acid and chain elongation of orsellinates (from methyl to butyl) increase the potency of antineoplastic activity, probably owing to an increase in lipophilicity.

Keywords: orsellinates, lecanoric acid, antineoplastic activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antineoplásica (IC ₅₀) dos produtos de modificação estrutural do ácido lecanórico em células neoplásicas Hep ₂ , MCF7, 786-0 e B16-F10 e uma linhagem de células normais VERO, em período de incubação de 48 horas.....	44
Tabela 2 - Resultados estatísticos (p)* da análise dos valores de IC ₅₀ entre os compostos obtidos por modificação estrutural do ácido lecanórico.....	45
Tabela 3 - Resultados estatísticos (p)* da análise dos valores de IC ₅₀ entre as linhagens dos compostos obtidos por modificação estrutural do ácido lecanórico	47
Tabela 4 - Índice de Seletividade (IS) dos produtos de modificação estrutural do ácido lecanórico (orselinatos) entre as diferentes linhagens.....	48
Tabela 5 – Resultados de IC ₅₀ * (μM) dos produtos de modificação estrutural do ácido lecanórico (orselinatos) no ensaio com SRB nas linhagens testadas e no ensaio com <i>Artemia salina</i> **.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia do líquen <i>Parmotrema tinctorum</i>	25
Figura 2 – Reações do ácido lecanórico com álcoois	37
Figura 3 – Cultura de células neoplásicas Hep2	39
Figura 4 – Atividade citotóxica dos orselinatos em microgramas.mL ⁻¹ nas linhagens testadas	45
Figura 5 – Intervalo dos valores de IC50 obtidos nas linhagens testadas expressos em µg.mL ⁻¹	46
Figura 6 – Correlação da atividade citotóxica (IC50) e LogP dos produtos de modificação estrutural do ácido lecanórico em células neoplásicas Hep2...	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B16-F10	Linhagem de melanoma murino
Hep2	Linhagem de carcinoma de laringe
IC50	Dose que inibe 50% do crescimento celular
IS	Índice de seletividade
MCF7	Linhagem de carcinoma de mama
NCI	National Cancer Institute
OE	Orselinato de etila
OI	Orselinato de <i>iso</i> - propila
OM	Orselinato de metila
ONB	Orselinato de <i>n</i> -butila
OPe	Orselinato de <i>n</i> -pentila
OSB	Orselinato de <i>sec</i> -butila
OTB	Orselinato de <i>terc</i> -butila
786-0	Linhagem de carcinoma de pulmão
SRB	Sulforrodamina B
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VERO	Linhagem de rim de macaco verde africano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Considerações gerais sobre o câncer	17
2.2 Diferenças genéticas e morfológicas das células neoplásicas	19
2.3 Aspectos epidemiológicos do câncer	20
2.4 Células neoplásicas e ciclo celular	21
2.5 Mecanismo de ação de drogas antineoplásicas	22
2.6 Líquens e seus metabólitos	24
2.6.1 <u>Líquen <i>Parmotrema tinctorum</i></u>	25
2.6.2 <u>Metabólitos de líquens</u>	26
2.6.2.1 Compostos fenólicos	27
2.6.3 <u>Ácido lecanórico e seus produtos de modificação estrutural</u>	28
2.7 Cultura de células e linhagens neoplásicas	29
2.8 Ensaaios de citotoxicidade	31
2.9 Estudo qualitativo de relação estrutura-atividade	33
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Material	36
4.2 Obtenção do ácido lecanórico do líquen <i>Parmotrema tinctorum</i> e seus produtos de modificação estrutural	36
4.3 Avaliação da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural	37
4.3.1 <u>Manutenção das linhagens celulares</u>	37
4.3.2 <u>Preparo da suspensão de células e dos compostos</u>	38
4.3.3 <u>Teste de citotoxicidade (SRB)</u>	39
4.3.3.1 Princípio	39
4.3.3.2 Avaliação da atividade antineoplásica	40
4.4 Estudo qualitativo de estrutura-atividade	41
4.5 Análise de dados	41
4.5.1 <u>Índice de seletividade (IS)</u>	41

4.5.2 <u>Análise dos valores em SRB e <i>Artemia salina</i></u>	41
4.5.3 <u>Análise estatística</u>	42
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	67

1 INTRODUÇÃO

Há pelo menos mil anos antes de Cristo, Ebers já citava em seus papiros o uso de plantas para o tratamento de câncer. O advento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica resultaram no uso de produtos sintéticos com atividade farmacológica. Compostos puros foram facilmente obtidos e modificações estruturais permitiram a produção de drogas cada vez mais potentes e seguras (KINGSTON, 1996).

A fitoquímica deixou de ser o foco e mais estudos sobre função, alvo molecular, regulação e natureza desses compostos foram se tornando mais e mais necessários. A biossíntese foi o elo de transição para o entendimento de novos processos moleculares, levando a uma corrida por novos protótipos de fármacos. Assim diversos grupos de pesquisa têm feito uso de programas de screening para detectar metabólitos com atividades biológicas relevantes (HOSTETTMANN, 1991).

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

Os maiores impactos no setor de fármacos de origem vegetal são confirmados nas drogas antitumorais (taxol, vinblastina, vincristina). Estudos revelaram que 61% das pequenas moléculas introduzidas como fármacos foram derivadas de produtos naturais. Este valor sobe para 74% na área anti-câncer (ROUHI *et al.*, 2003). Pesquisas norte-americanas mostraram que 118 das 150 drogas mais prescritas foram originalmente derivadas de organismos vivos: 74% de plantas, 18% de fungos, 5% de bactérias e 3% de vertebrados (ASSAD *et al.*, 2005).

Algas, fungos, líquens, macrofungos e plantas superiores constituem importantes fontes para pesquisas de novas moléculas bioativas, ou através do uso direto de metabólitos secundários ou empregando compostos derivados por biossíntese, produzidos no intuito de aumentar a efetividade e a absorção ou diminuir a toxicidade (HOSTETTMANN *et al.* 1997).

O mercado mundial de fitofármacos gira em torno de 15 bilhões de dólares, e constitui um setor em amplo crescimento. Um dos fatores responsáveis pelos avanços científicos é a descoberta de princípios ativos naturais através da interação entre a química e a farmacologia. Estudos sobre a relação estrutura-atividade têm contribuído para correlacionar estrutura química e atividade biológica de compostos, norteando pesquisas para o desenvolvimento de compostos bioativos.

A biodiversidade¹ da região Centro-Oeste revela ótimas oportunidades para pesquisa e desenvolvimento de novos produtos, essa valoração aumenta em função da riqueza da flora e do crescimento do segmento de fitomedicamentos em nível mundial².

O Estado de Mato Grosso do Sul apresenta uma flora bastante rica e diversificada, oferecendo várias possibilidades de estudos de espécies vegetais, por exemplo, estudos sobre líquens, obtidos da flora líquênica da região. A partir de 1990, o grupo de pesquisa em Química de Líquens, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, desenvolve estudos sobre líquens³ com ênfase no isolamento e elucidação estrutural de substâncias fenólicas e a avaliação da atividade biológica das substâncias isoladas (HONDA, 2005; GOMES *et al.*, 2002, 2003, 2006; RAPOSO *et al.*, 2007).

Entre as substâncias avaliadas pelo grupo, está o ácido lecanórico, um composto extraído do líquen *Parmotrema tinctorum* que está presente na flora nativa do Estado de Mato Grosso do Sul. Compostos obtidos a partir da modificação estrutural do ácido lecanórico apresentaram atividade antifúngica, antibacteriana e citotóxica sobre larvas de *Artemia salina* (GOMES *et al.*, 2002, 2003, 2006).

Considerando a importância destes compostos em suas diversas atividades biológicas e o número reduzido de informações quanto a atividade anticâncer, torna-se relevante sua avaliação.

No desenvolvimento de drogas anticâncer, uma potencial citotoxicidade dos compostos é avaliada *in vitro* em linhagens celulares neoplásicas (FRESHNEY, 1994; KEAWPRADUB, 1999). Várias linhagens celulares neoplásicas são utilizadas e, para se verificar a seletividade da droga em linhagens neoplásicas, utiliza-se linhagens de células normais (HOUGHTON *et al.*, 2007). Estes estudos, pelo menos durante a fase de *screening*, têm reduzido os ensaios *in vivo* em animais (CINGI *et al.*, 1991; HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

¹ Biodiversidade refere-se à variedade de vida no planeta Terra, incluindo a variedade de espécies da flora, da fauna, e de microorganismos, a variedade de funções ecológicas desempenhada pelos organismos nos ecossistemas. Ela é responsável por promover o equilíbrio e a estabilidade dos ecossistemas, fonte de matéria-prima, notadamente para a indústria farmacêutica e de alimentos. Possui além de seu valor intrínseco, valor ecológico, genético, social, econômico, científico, educacional, cultural, recreativo e até estético (ASSAD *et al.*, 2005).

² As 125 principais indústrias farmacêuticas do mundo realizam pesquisas com produtos derivados de plantas, 2/3 dos medicamentos lançados nos Estados Unidos nos últimos anos provém direta ou indiretamente de plantas (BARATA, 2005).

³ Os líquens são organismos simbióticos compostos por um fungo (micobionte) e um ou mais participantes fotossintéticos (fotobionte), que podem ser uma alga verde ou uma cianobactéria em íntima integração fisiológica, sendo a simbiose a condição considerada (NASH, 1996 apud HONDA, 1997).

Desta forma, o modelo de cultura de células é uma etapa insubstituível de uma sequência de ensaios que culminará na produção laboratorial ou industrial de novos agentes bioativos.

Este trabalho visa avaliar a atividade antineoplásica do ácido lecanórico e orselinatos bem como realizar estudos qualitativos de relação estrutura-atividade desses compostos frente à células neoplásicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre o câncer

Câncer é um termo comum para todos os tumores malignos, derivado do termo latim caranguejo, câncer – porque um câncer agarra-se de maneira obstinada a qualquer parte daquilo que se apodera, como um caranguejo. Neoplasia significa “novo crescimento” e é então chamado de neoplasma (KUMAR *et al.*, 2005).

A definição de neoplasia mais aceita foi elaborada em 1930, pelo patologista Rupert Willis (COTRAN *et al.*, 1999) que a define como uma massa tumoral anormal de tecido, cujo crescimento excede ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo cessada a causa que a provocou. Dessa forma, a célula cancerígena caracteriza-se pela perda da função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástases. A origem dessa célula é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (SIEBER *et al.*, 2003).

O curso no tempo para desenvolvimento de um câncer após um evento de mutação inicial mostra que o câncer ocorre muitos anos após o evento mutagênico. A incidência de câncer aumenta com a idade, indicando a necessidade do acúmulo de mutações¹.

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

¹ Experiências com células epiteliais humanas primárias mostram que um mínimo de quatro alterações é necessário para gerar uma célula epitelial transformada (DEVLIN, 2005).

O câncer é uma doença onde ocorre profunda alteração no sistema de regulação da proliferação e da diferenciação celulares. Enquanto na maioria dos tecidos as células dividem-se de forma controlada, no câncer esse mecanismo de controle é perdido e ocorre uma proliferação celular acima das necessidades do tecido. O câncer pode ser considerado uma doença genética cujo desenvolvimento se deve a mutações em determinados genes nucleares. Uma mutação em um gene que modula a proliferação ou a diferenciação da célula pode fazer com que seu produto seja hiperativo ou produzido em excesso e, como resultado, tem-se a transformação do fenótipo celular. Esses genes mutantes são, por isso, classificados como oncogenes; ou seja, genes causadores de câncer. Os protooncogenes são genes normais expressos durante o desenvolvimento embrionário e mesmo em células maduras. Muitos deles codificam moléculas que induzem as células a se diferenciarem, receptores para essas moléculas, proteínas relacionadas a transdução de sinais e fatores de transcrição. Quando ocorrem mutações nos protooncogenes, com sua conseqüente hiperativação ou superexpressão, observamos o desenvolvimento de uma neoplasia.

Um grande número de agentes apresenta capacidade de provocar lesão e induzir transformação neoplásica das células, entre eles citam-se:

- **carcinógenos químicos:** de estrutura extremamente diversa, incluindo produtos sintéticos e naturais. Exemplos: agentes alquilantes de ação direta, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aminas aromáticas e corantes nitrogenados, aflatoxina b1, nitrosaminas entre outros.
- **energia radioativa:** sob forma de raios UV da luz solar ou como radiação eletromagnética e a radiação de partículas. São capazes de transformar todos os tipos celulares *in vitro* e induzir neoplasmas *in vivo* em humanos e nos modelos experimentais.
- **vírus oncogênicos e outros micróbios:** diversos vírus DNA foram associados à etiologia do câncer, dentre eles citam-se: Papilomavírus Humanos, vírus de Epstein-Barr, vírus da Hepatite B e o Herpes Vírus do Sarcoma de Kaposi. Apenas um retrovírus humano, o vírus da Leucemia de Células T Humano do Tipo 1 está implicado na origem dos tumores. Algumas evidências relacionam a infecção gástrica pelo vírus *H. pylori* na etiologia de carcinomas gástricos e dos linfomas gástricos.

O diagnóstico laboratorial do câncer se torna, a cada ano, mais sofisticado e complexo. Dentre os principais métodos utilizados encontram-se: métodos histológicos e citológicos,

imuno-histoquímica, diagnóstico molecular, citometria de fluxo e marcadores tumorais (KUMAR *et al.*, 2005).

2.2 Diferenças genéticas e morfológicas das células neoplásicas

Existem grandes diferenças entre as características morfológicas, moleculares e funcionais dos diversos tipos de células neoplásicas: polimorfismo (células diferem muito em tamanho e número), aneuploidia (quantidade anormal de cromossomas), citoplasma geralmente basófilo, devido à riqueza em ribossomas, visto que se multiplicam muito, citoesqueleto desorganizado, características estas que variam de célula para célula neoplásica. Nas células neoplásicas as proteínas de membrana têm maior mobilidade, devido a uma menor fixação do citoesqueleto e na superfície celular ocorrem muitas modificações, com o aparecimento de moléculas novas, principalmente proteínas, apresentando em suas membranas plasmáticas maiores quantidades de proteínas transportadoras de glicose para o citoplasma (JUNQUEIRA *et al.*, 2005).

A maioria dos tumores humanos e experimentais expressa níveis acima do normal e/ou formas anormais de glicoproteínas e glicolipídios de superfície, que podem ser alvos de tratamento. Estas moléculas alteradas são os gangliosídios, antígenos do grupo sanguíneo e mucinas. É o que pode ser exemplificado nos melanomas, cujos gangliosídios G_{M2} , G_{D2} e G_{D3} . As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular contendo diversas cadeias laterais de carboidratos ligadas ao oxigênio num polipeptídeo central, exemplificam-se a MUC-1, expressos no carcinoma de mama (KUMAR *et al.*, 2005).

A fluidez da membrana pode controlar a atividade de enzimas ligadas à membrana e também controlar funções como fagocitose, crescimento e morte celular. A fluidez da membrana lipídica tem um papel crucial na transdução de sinal para uma variedade de moléculas bioativas que ativam funções celulares. O aumento da fluidez levaria a uma diminuição da estabilidade das células, enquanto que a diminuição da fluidez levaria a um aumento da estabilidade. Uma fluidez normal propicia uma melhor função da membrana celular, diminui a atividade da bomba Na/K, altera as reações dos receptores de membrana, reforça as reações normais dos receptores de membrana, otimiza as vias de sinalização celular e não permite a diferenciação da célula tumoral, mantendo a sua imaturidade. Em hepatomas a fluidez da membrana diminui, enquanto que nos linfomas e leucemias parece aumentar. O

fato das membranas plasmáticas de células neoplásicas apresentarem antígenos expostos também pode contribuir para alteração da fluidez da membrana e tem impulsionado um novo campo para investigação de doenças neoplásicas (DELICONSTANTINOS, 1987).

2.3 Aspectos epidemiológicos do câncer

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

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. A distribuição dos casos novos de câncer segundo sua localização primária é bem heterogênea entre Estados e Capitais do País. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2008)

De forma geral, o desenvolvimento do processo tumoral depende da maior ou menor exposição aos agentes carcinogênicos. Sendo assim, o aumento da incidência de câncer pode ser consequência do aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento desta patologia é favorecido também com o envelhecimento do organismo (VERWEIJ & JONGE, 2000).

Diante de tal cenário fica clara a necessidade da continuidade em investimentos e no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer nos diferentes níveis de atuação, tais como: promoção da saúde, detecção precoce, assistência aos pacientes, vigilância, formação de recursos humanos e pesquisa para o desenvolvimento de novos agentes anti-câncer.

2.4 Células neoplásicas e ciclo celular

Duas importantes propriedades de uma célula de câncer são: divisão celular desregulada e resistência a apoptose. As células malignas também podem manifestar imortalidade celular (capacidade das células de câncer aumentarem atividade da telomerase), capacidade de induzir angiogênese (crescimento de novos vasos e tecidos) e metástases, isto é, a célula tumoral passa através da membrana basal e da matriz extracelular circundante para os capilares e chegam pelo sangue até um tecido alvo, onde proliferam e formam um tumor secundário.¹

A imortalidade celular representa a capacidade de uma célula produzir infinitas gerações de descendentes. Células mortais, como as epiteliais humanas normais em cultura de células, produzem de 40 a 50 gerações e depois entram em senescência, enquanto que as imortais continuam a se dividir indefinidamente.

A proliferação celular e a morte celular são mantidas em equilíbrio em tecidos normais e saudáveis. Na hiperplasia há um aumento tecidual, com manutenção da estrutura e função normais, enquanto que na displasia, as células diferem das normais em forma e tamanho do núcleo. Os ciclos de crescimento de algumas dessas células são anormais, e as células em processos de divisão aparecem em porcentagem maior. Já no carcinoma *in situ* as alterações celulares começam mais pronunciadas, sendo que as células apresentam-se como células tumorais, com características de perda da função, proliferação incontrolada, invasão e metástase (RANG *et al.*, 2004).

¹ A telomerase mantém o comprimento das regiões teloméricas das extremidades das cromátides. Um segmento terminal de nucleotídeos é perdido toda vez que as cromátides são duplicadas; se a extensão dos telômeros pela telomerase não ocorrer, as células descendentes entram em senescência para se protegerem contra lesão do DNA devido a telômeros encurtados. As células de câncer retêm a capacidade de expressar telomerase para manter os comprimentos dos telômeros pertencentes às cromátides irmãs e continuar as divisões celulares. Com o avanço da idade, as células normais perdem a atividade da telomerase (DEVLIN, 2007).

2.5 Mecanismos de ação de drogas antineoplásicas

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

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

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

De maneira sucinta, os agentes antineoplásicos podem ser divididos nas seguintes categorias:

- Agentes citotóxicos:

- agentes alquilantes e compostos correlatos, que atuam através da formação de ligações covalentes com o DNA, impedindo a sua replicação. Possuem grupos alquil capazes de formar ligações covalentes com substituintes celulares. Os principais agentes alquilantes são: mostardas nitrogenadas, nitrosouréias, bissulfano, tiotepa, cisplatina.
- antimetabólitos, substâncias que bloqueiam uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA.
- antibióticos citotóxicos, substâncias de origem microbiana que impedem a divisão das células em mamíferos.
- derivados vegetais, substâncias que atingem a função dos microtúbulos e, por conseguinte, a formação do fuso mitótico. São exemplos de derivados vegetais taxol, vincristina, vimblastina.

- **Hormônios:** os esteróides são os mais importantes, além de fármacos que suprimem a secreção de hormônios ou antagonizam sua ação.

- **Agentes diversos:** inclui fármacos desenvolvidos especialmente para atingir alvos tumorais específicos. O mitotano que interfere na síntese de esteróides cortico-adrenais é um exemplo. Utilizado exclusivamente para tumores das células do córtex adrenal.

Diversas abordagens moleculares estão em fase de investigação, para o uso de alvos seletivos para atuação dos agentes anticâncer, encluem por exemplo: drogas que atuam na expressão gênica, na inibição da angiogênese, drogas citotóxicas e indutoras de apoptose. Esses grupos encontram-se ainda em fase clínica de estudo (BERNARDI *et al.*, 2003).

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

Há uma ampla utilização clínica dos agentes antineoplásicos quimioterápicos que interagem com o DNA para as diversas neoplasias. Além do mais, em vários casos, a seletividade e eficiência destes agentes têm sido aumentadas por uso de mecanismos de liberação controlada e ou de cito-proteção (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Extensivas pesquisas realizadas a partir da metade do século passado com ingredientes ativos de frutas e vegetais têm identificado vários alvos moleculares que potencialmente poderão ser usadas, não apenas para a prevenção de câncer, mas também para seu tratamento. Dentre eles incluem-se: curcumin, resveratrol, genistein, s-allyl-cisteína, eugenol, beta-caroteno, limonene (AGGARWAL *et al.*, 2006).

Outra contribuição para o aprimoramento da terapia do câncer é a utilização da farmacogenética que estuda a correlação entre as variações genéticas e a resposta aos fármacos. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) lançou recentemente um projeto para analisar a viabilidade do seqüenciamento completo dos genomas de todos os tipos de tumores. Assim, quando da identificação de genes, os seus produtos poderiam ser utilizados como alvos para a terapêutica, aumentando a eficácia do tratamento e reduzindo efeitos adversos (REIS, 2006).

2.6 Líquens e seus metabólitos

Os líquens são estruturas compostas por um fungo (micobionte) e um ou mais participantes fotossintéticos (fotobiontes), desde uma alga verde a uma cianobactéria, em íntima integração fisiológica, sendo a simbiose a condição básica considerada (NASH III, 1996). São encontrados desde o nível do mar até as montanhas mais altas, onde se desenvolvem sobre os mais variados substratos. Sua presença depende de fatores físicos e climáticos que proporcionam as condições necessárias para se desenvolverem e, desta forma, cada região pode apresentar uma comunidade liquênica com componentes específicos próprios em resposta às condições ambientais (BRODO, 1973).

Os líquens têm sido utilizados pela medicina natural ao longo dos anos e seus benefícios correlacionados quimicamente com a presença de polissacarídeos. Das 13.500 espécies distribuídas em todo mundo, menos de 100 tem sido investigadas (OLAFSDOTTIR *et al.*, 2001).

As substâncias produzidas pelos líquens são agrupadas de acordo com a localização no talo em produtos intracelulares (carboidratos, carotenóides, vitaminas, aminoácidos e proteínas) e produtos extracelulares, também chamados metabólitos secundários, encontrados na medula (depsídios e depsidonas) ou no córtex. A concentração de metabólitos secundários pode variar de 0,1% a 10% em relação ao peso seco do talo liquênico (HONDA, 1997).

Diversos metabólitos de líquens possuem atividade biológica, como por exemplo, antibiótica, antifúngica, antitumoral e analgésica. Apresentam também importante papel como bioindicadores de leitura imediata da contaminação ambiental, envolvendo poluição, mudanças climáticas e ecológicas.¹ Um dos mais importantes usos de líquens é exemplificado pela indústria de perfumes; a enzimologia de líquens hoje se constitui em grande importância à biotecnologia de enzimas (RICHARDSON, 1988; VICENTE *et al.*, 1992).

Pesquisas revelam as propriedades dos líquens como antibiótico, preferencialmente sobre as bactérias gram-positivas (BÉZIVIN, 2003), antiproliferativa (OGMUNSDOTTIR *et al.*, 1998) e antioxidante (HIDALGO *et al.*, 1994), anti-HIV (NEAMATI *et al.*, 1997).

¹ Bioindicadores são organismos que manifestam sintomas particulares em resposta às modificações médioambientais, geralmente de maneira quantitativa (HAWKSWORTH *et al.*, 2005).

Um dos maiores interesses no estudo químico dos líquens está na sua possibilidade de sua atividade antitumoral. Os estudos relacionados a esta atividade tiveram início no final da década de 60 (SHIBATA *et al.*, 1968).

2.6.1 Líquen *Parmotrema tinctorum*

O líquen *Parmotrema tinctorum* é um líquen de talo folioso. Cresce mais ou menos horizontalmente sobre o substrato, fixando-se por pontos, de maneira firme ou frouxa através de rizinas ou tomento. A figura abaixo mostra o líquen *Parmotrema tinctorum* sobre o córtex de árvore.



Figura 1 – Fotografia do líquen *Parmotrema tinctorum*.

A análise química de *Parmotrema tinctorum* coletado em Mato Grosso do Sul indicou a presença de Atranorina, Ácido Lecanórico e Orselinato de Etila, sendo que, este último não foi incluído como metabólito secundário desse líquen, mas considerado um artefato de técnica resultante dos processos de isolamento e purificação do ácido lecanórico. O ácido orsenílico pode resultar da hidrólise da ligação éster entre as duas unidades aromáticas do ácido lecanórico (HONDA, 1997).

Os orselinatos de alquila obtidos por modificações estruturais do ácido lecanórico, demonstraram importantes atividades biológicas, tais como ações antibacteriana, antifúngica e antitumoral (GOMES *et al.*, 2002, 2003). A atividade citotóxica de uma série orsenilatos derivados do ácido lecanórico foi pesquisada por Gomes *et al.* (2006) com o crustáceo *Artemia salina*.

2.6.2 Metabólitos de líquens

Os metabólitos dos líquens também apresentam atividades antiinflamatórias, analgésicas, antipiréticas e antiproliferativas (MÜLLER, 2001). As propriedades antioxidantes e antimicrobianas de diversas espécies de líquens foram relatadas por Gulluce *et al.*, (2005).

Entre as substâncias produzidas pelos líquens encontram-se os ácidos úsnico, psoromico, polipórico e os ácidos graxos, nefrosterínico e protoliquesterínico que demonstraram atividade antitumoral *in vitro* (KUPCHAN *et al.*, 1975, NAKAZAWA *et al.*, 1962; CAIN, 1966; HIRAYAMA *et al.*, 1980), bem como *in vivo* e *in vitro* (WILLIAMS *et al.*, 1998).

O ácido girofórico foi descoberto como um potente inibidor do crescimento de queratinócitos, sugerindo um efeito antiproliferativo contra doenças de pele como a psoríase (MÜLLER, 2001).

Derivados do crisofanol, extraídos do líquen *Asashinea chrysantha*, exibiram atividade antineoplásica em células leucêmicas (MÜLLER, 2001).

O composto ambewelamida A extraído do líquen *Usnea sp* exibiu potente citotoxicidade *in vitro* (Leucemia murina P388: IC₅₀ = 8,6 ng/mL), demonstrando também significativa atividade antineoplásica *in vivo* para a mesma célula. (WILLIAMS *et al.*, 1998).

Extratos dos líquens *Cladonia convoluta*, *Cladonia rangiformis*, *Parmelia caperata*, *Plastimatia glauca* e *Romalia cuspidata* apresentaram atividade citotóxica em linhagens de células neoplásicas humanas, mielogenoma leucêmico, metástase de carcinoma de próstata adenocarcinoma de mama e glioblastoma (BÉZIVIN *et al.*, 2003).

Estudos *in vivo* de derivados do ácido lecanórico demonstraram inibição da promoção do tumor de pele induzido pelo acetato de 12-o-tetradecanoilforbol em ratos. Os análogos do

ácido lecanórico antagonizam muitas enzimas, bem como efeitos celulares de promoção do tumor (UMEZAWA *et al.*, 1983,1984).

Kumar & Muller (2000), sintetizaram uma série de análogos do ácido difrático, barbático e obtusático, metabólitos de líquens de espécies do gênero *Parmelia* e realizaram ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e inibição da biossíntese de leucotrieno B4.

Ácidos liquênicos como depsídeos e depsídonas e seus derivados sintéticos foram pesquisados pela sua atividade inibitória contra a enzima integrase. Neste estudo, foram identificados dois farmacóforos associados com a inibição desta enzima (NEAMATI *et al.*, 1997).

Os metabólitos de líquens apresentam muitas atividades, como relatado, e em especial depsídeos e depsídonas devido a atividade antiinflamatória, antiproliferativa e anti-HIV. Modificações químicas adequadas podem aumentar a estabilidade desses metabólitos, reduzindo a sua toxicidade e até mesmo aumentando sua potência (MULLER, 2001).

2.6.2.1 Compostos fenólicos

Os líquens produzem várias classes de compostos fenólicos (NASH III,1996, HALE, 1983) com diversas atividades biológicas: antibiótica, antimicrobiana, antiviral, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antioxidantes (COHEN, 1996; INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1998; KUMAR & MULLER, 1999; NEAMATI *et al.*, 1997; ÖGMUNSDÓTTIR *et al.*, 1998; (NANDI *et al.*, 2007; STICH, 1991, SELASSIE *et al.*, 2005). Entretanto, os compostos fenólicos também atuam como agentes mutagênicos e carcinogênicos (STICH, 1991).

Os efeitos farmacológicos e fisiológicos devem ser originários de suas propriedades antioxidantes, e esta atividade pode estar relacionada a estrutura dos compostos fenólicos. (CAI *et al.*, 2005).

Plantas da medicina tradicional chinesa que apresentam propriedades anticâncer contêm uma grande variedade de compostos fenólicos naturais com diferentes estruturas e com variável atividade antioxidante. Estas diferenças nas atividades antioxidantes podem ser atribuídas a diferenças estruturais quanto a hidroxilações, glicosilações e metoxilações (CAI *et al.*, 2005)

Também foi relatada a atividade antioxidante de compostos fenólicos extraídos de espécies de líquens. Odabasoglu *et al.* (2004), concluíram que fenóis individuais apresentam

distintas atividades antioxidantes devido a interações entre fenóis e outros compostos como carboidratos, proteínas e outros.

Vários extratos de chás e polifenóis extraídos de camélia sinensis, *Ilex paraguaiensis* e *Ardisia compressa* foram testados em linhagem Hep-2 em 11 concentrações diferentes para obtenção da percentagem de inibição (RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004).

Compostos fenólicos extraídos de *Centaurea gigantea* foram avaliados quanto à toxicidade, utilizando-se ensaios com *Artemia salina* e linhagens de células neoplásicas e dentre os compostos pesquisados, foi o ácido clorogênico que exibiu considerável atividade anticólon (SHOEB *et al.*, 2007).

Compostos fenólicos isolados de várias espécies de líquens demonstraram atividades, como inibição da ativação do vírus Epstein-Barr, biossíntese de melanina, crescimento de células animais e microorganismos. Compostos fenólicos monocíclicos, derivados de ácidos orselínicos, atuam como agentes nematocidas (YAMAMOTO *et al.*, 1998).

Os orselinatos (substâncias fenólicas derivadas dos ácido lecanórico) obtidos através de reações do ácido com álcool foram avaliadas em ensaios com *Artemia salina*, microorganismos e quanto a atividade antioxidante (GOMES *et al.*, 2002, 2003 e 2006).

Os fenóis podem ser classificados em dois principais grupos: os doadores de elétrons que inibem o crescimento celular pelos substituintes doadores de elétrons e os receptores de elétrons, através de substituintes receptores de elétrons. Apoptose, captação de radicais, antioxidantes e características pró-oxidantes são os principais mecanismos de ação da atividade antitumoral dos compostos fenólicos e vários estudos quantitativos de estrutura-atividade têm sido realizados (SELASSIE *et al.*, 2005; ODABASOGLU *et al.*, 2005; NANDI *et al.*, 2007).

De acordo com Thompson *et al.*, (1993), os compostos fenólicos são facilmente oxidados via radical fenoxi para uma quinona mais reativa, que podem posteriormente alquilar proteínas celulares e/ou DNA para induzir citotoxicidade.

2.6.3 Ácido lecanórico e seus produtos de modificação estrutural

O ácido lecanórico foi isolado de líquens pela primeira vez em 1913 e é considerado um potente inibidor da histidina descarboxilase, uma enzima que cataliza a produção de histamina a partir da histidina. A histamina está envolvida em vários processos biológicos,

tais como resposta alérgica, hemostase, secreção gástrica e inflamação (UMEZAWA et al. 1983). As propriedades antioxidantes do ácido lecanórico foram estudadas por Choudhary et al., (2009). Quando este composto é submetido a ação de poluentes ocorre uma diminuição da concentração do ácido lecanórico presente no líquen *Parmotrema tinctorum* (MAKOTO et al., 1997).

A modificação estrutural de substâncias tem sido uma ferramenta importante na descoberta de novas drogas. Compostos com atividade biológica desejada podem apresentar características indesejáveis, como alta toxicidade, insolubilidade. A estrutura desses compostos pode ser modificada por síntese com o objetivo de aumentar a atividade desejada e minimizar ou eliminar as propriedades indesejáveis (SILVERMAN, 1992).

Tentativas de correlacionar estrutura química e atividade biológica têm sido realizadas desde 1948. Shibata et al., (1948) estudaram os efeitos de substituições nos anéis do ácido úsnico na ação antibiótica destes. Takai et al., (1979) pesquisaram as relações estrutura atividade, indicando que a lipofilicidade era fator importante para os efeitos citotóxicos.

Assim sendo, no intuito de aumentar a atividade biológica do ácido lecanórico, este composto, foi submetido a reações com alcóois resultando em derivados com uma atividade antifúngica mais potente que o composto natural (GOMES et al., 2002).

Verificou-se ainda através de reações do ácido lecanórico que a homologação da cadeia carbônica para orselinatos e ácido orselínico conduziu a compostos mais ativos em relação à atividade antibacteriana (GOMES et al., 2003).

2.7 Cultura de células e linhagens neoplásicas

A cultura de tecidos foi inicialmente utilizada no início do século como um método para estudar o comportamento de células animais livres ou variações sistêmicas que podem surgir no animal durante a homeostase normal e sob estresse de um experimento. Como o nome sugere, a técnica, primeiramente, foi elaborada com a desagregação de fragmentos de tecido. Essa técnica dominou o campo de cultura de células por mais de 50 anos e, desta forma, o termo permaneceu a fim de denominar cultura de células dispersas. O termo cultura de tecidos é usado genericamente para cultura de órgãos (implica em uma cultura tridimensional) e cultura celular se refere às culturas derivadas de células dispersas obtidas de um tecido original (FRESHNEY, 1994).

As culturas celulares devem ser derivadas de explantes primários ou de suspensão de células dispersas, então cultivadas em monocamadas aderentes em substrato sólido, ou em suspensão em meio de cultura, quando as células não aderem ao substrato (FRESHNEY, 1994).

Várias pesquisas podem ser realizadas em cultura de tecidos:

- a) atividade intracelular, síntese de proteínas, metabolismo de energia e de drogas;
- b) fluxo intracelular (hormônios, RNA, transdução de sinal);
- c) interação com o ambiente (carcinogênese, infecção, nutrição, ação de drogas);
- d) interação célula-célula (adesão celular, cinética celular, invasão);
- e) produtos e secreções celulares, e
- f) genética (análise, manipulação, transformação e imortalização).

Portanto, estudos *in vitro* a respeito da indução e progressão da transformação celular induzida por carcinógenos químicos podem propiciar importantes esclarecimentos a respeito dos mecanismos envolvidos neste processo e serem de utilidade para o desenvolvimento de estratégias quimiopreventivas ou quimioterapêuticas para o uso humano (ZHU & GOODERHAM, 2002).

No desenvolvimento de drogas anticâncer, os potenciais de citotoxicidade dos compostos são avaliados *in vitro* em linhagens celulares tumorais, sendo tais efeitos avaliados por parâmetros que incluem, desde a morte celular, até a alteração de seu metabolismo (FRESHNEY, 1994; KEAWPRADUB, 1999).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células são importantes para a avaliação de agentes anticâncer, sendo que, pelo menos durante a fase de *screening*, têm reduzido os ensaios *in vivo* em animais. Além disso, são muito utilizados como métodos alternativos aos testes farmacológicos em órgãos isolados (CINGI *et al.*, 1991; HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). A técnica de cultura de células constitui um importante meio para se explorar a regulação celular, com benéficas implicações na área médica, inclusive pesquisa em câncer e virologia (FRESHNEY, 1994).

As vantagens da cultura de células residem no controle fisiológico do pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e O₂, além das condições fisiológicas que podem ser mantidas relativamente constantes. Mais adiante disso, a cada replicação celular as amostras serão idênticas e as características da linhagem irá se perpetuar por manter a homogeneidade das amostras. Outra vantagem importante a ser destacada é que para o *screening* de drogas onde se fazem muitas replicatas e se testam inúmeros compostos, a cultura de células é menos custosa economicamente que os testes *in vivo*, além de reduzir o

uso de animais em experimentos, evitando questões éticas e morais desses ensaios (FRESHNEY, 1994).

O Instituto Nacional do Câncer (NCI) conduz pesquisas, diagnósticos e tratamento do câncer; coletando, analisando e disseminando os resultados das investigações realizadas nos Estados Unidos e outros países. Em sete anos (1990-1997), o Programa do NCI havia avaliado mais de 60.000 compostos contra um painel de 60 linhagens de células tumorais humanas (WEINSTEIN *et al.*, 1997). Estudos analisaram a relação entre a atividade de compostos em modelos *in vitro* e *in vivo* e testes pré-clínicos, por meio do Programa de Desenvolvimento Terapêutico do NCI, demonstrando que essa fonte de informações representa uma estratégia efetiva capaz de gerar novos agentes clinicamente ativos (JOHNSON *et al.*, 2001). O modelo de cultura de células é, portanto, uma etapa insubstituível de uma seqüência de ensaios que culminará na produção laboratorial ou industrial de novos agentes bioativos (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

2.8 Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade é considerada um parâmetro para a detecção da atividade antitumoral (RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004). A metodologia mais utilizada para os testes de atividade antitumoral é através dos ensaios de citotoxicidade, usando linhagens celulares. A taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador de crescimento através da formação do aparecimento de coloração e a intensidade de cor é diretamente proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON *et al.*, 2007). A citotoxicidade das drogas pode ser avaliada em culturas de células tumorais de várias linhagens através de métodos como: variações da morfologia celular, viabilidade celular utilizando corantes como o azul de tripan e a eosina, que se baseiam na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis causando a captação do corante (MACIEL *et al.*, 2002).

O uso de testes *in vitro* tem sido amplamente utilizado para pesquisa de agentes anticâncer. Várias linhagens neoplásicas são utilizadas e, para se verificar a seletividade da droga em linhagens neoplásicas, utiliza-se linhagens normais (HOUGHTON *et al.*, 2007).

Os ensaios de citotoxicidade podem ser desenvolvidos em várias metodologias: contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos (HENRIKSSON *et al.*, 2006).

Existem diferentes tipos de ensaios colorimétricos, dentre os quais citam-se (HENRIKSSON *et al.*, 2006):

- cristal violeta: corante violeta cuja função é detectar células vivas.
- MTT: (sais de tetrazolio), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). Consiste no ensaio de proliferação celular que quantifica a habilidade das células viáveis reduzirem o sal amarelo de tetrazolium a cristais púrpuros de formazan, usando uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. O ensaio detecta células metabolicamente ativas e a leitura é feita em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). A absorbância é determinada a 540 ou 570nm em leitor de ELISA.
- XTT: (hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[fenilamina]carbonil]-2H-tetrazólio). Ensaio de proliferação celular mais rápido e menos trabalhoso que MTT. As enzimas de células metabolicamente ativas das células dividem o sal XTT em derivados de formazan coloridos e solúveis em água. A absorbância é determinada a 450 nm em leitor de ELISA.
- alamar blue: é um corante solúvel em água que é utilizado para quantificar a viabilidade das células, extremamente estável e não tóxico para as células, considerado teste superior ao MTT. A forma oxidada do alamar blue entra no citosol e é convertida por enzimas mitocondriais. A coloração do meio muda de azul índigo para rosa fluorescente.
- SRB: baseia-se no princípio de que o SRB cora proteínas dentro das células. Constitui-se em um método simples, sensível, reprodutível, rápido, podendo armazenar as placas, podendo-se fazer a leitura das células em espectrofotômetro depois do ensaio e não necessariamente imediatamente como no ensaio do MTT (HOUGHTON *et al.*, 2007). O princípio do ensaio da sulforrodamina B baseia-se na habilidade que tem este composto de se ligar a componentes protéicos das células, fixadas pelo ácido tricloroacético; ou seja, o método independe da atividade metabólica das células, ao contrário do MTT.

No método SRB, o corante utilizado é uma aminoxantina de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfônicos que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com o ácido tricloroacético (SKEHAN *et al.*, 1990).

Para a avaliação da atividade antineoplásica, os testes de citotoxicidade mais utilizados na rotina de triagem de drogas anticâncer pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) para uso em programas de avaliação de drogas anticâncer (FRESHNEY, 1994;

RUBINSTEIN *et al.*, 1990) são o Teste do sal de tetrazolium- MTT (MOSMANN,1983); e Teste da Sulforrodamina B (SRB) (SKEHAN *et al.*, 1990).

A superioridade do método SRB em relação ao MTT foi descrita por Keepers *et al* (1991), reforçando a hipótese de que SRB cora células lisadas recentemente, diferente do MTT (KEEPERS *et al.*, 1991). Constitui-se em um método que permite que um número maior de substâncias sejam testadas em poucos dias, além de não requerer reagentes de alto custo e nem equipamentos mais sofisticados. (VICHAI *et al.*, 2006).

2.9 Estudo qualitativo de relação estrutura-atividade

Compostos com estruturas semelhantes tendem a apresentar a mesma atividade biológica, mas podem apresentar diferentes potências e/ou apresentando efeitos colaterais e em alguns casos até mesmo atividades diferentes. As diferenças estruturais relacionadas são referidas como relação estrutura atividade. Estas relações são determinadas fazendo-se pequenas alterações nas estruturas dos protótipos, seguidas da avaliação do efeito que estas tiveram sobre a atividade biológica (GARETH, 2003).

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

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

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

A lipofilicidade (logP) é definida pelo coeficiente de partição de uma substância entre a fase aquosa e a orgânica, consiste na razão entre a concentração da substância na fase orgânica e sua concentração na fase aquosa em um sistema em equilíbrio. As substâncias que apresentam maior coeficiente de partição, tendem a ultrapassar com maior facilidade as biomembranas hidrofóbicas¹ (BARREIRO *et al.*, 2001).

Quanto maior o coeficiente de partição, maior facilidade do composto atravessar as biomembranas das células neoplásicas. Entretanto, a polaridade dos compostos é um parâmetro que também deve ser analisado. Os compostos menos polares se difundem com maior facilidade nas membranas do que os mais polares, devido a estrutura da membrana celular.

Outro parâmetro de importância para se verificar relações entre estrutura-atividade é o pKa dos compostos que consiste no pH em que as concentrações das formas ionizadas e não-ionizadas são iguais (KATUNG, 2006). O pKa representa a constante de dissociação iônica dos compostos (pKa). O grau de ionização de um eletrólito em solução aquosa depende do pH da solução (SILVA, 2006).

A introdução de novos substituintes em uma molécula, como por exemplo, grupamentos metila, pode resultar em análogos com propriedades farmacocinéticas diferentes, interferindo assim em parâmetros como a lipofilicidade. As reações de alcoólise do ácido lecanórico extraído do líquen *Parmotrema tinctorum* levaram à obtenção de derivados com diferentes cadeias alquílicas. Estas modificações estruturais contribuíram para que houvesse um aumento na atividade antifúngica destes compostos. Ou seja, as ramificações presentes na cadeia carbônica influenciaram a atividade biológicas dos orselinatos (GOMES *et al.*, 2002).

Em continuação a estes estudos, os orselinatos obtidos por modificação estrutural do ácido lecanórico foram avaliados quanto a sua atividade citotóxica e suas estruturas químicas relacionadas com suas respectivas atividades, no intuito de verificar correlações existentes entre os grupamentos substituintes e o aumento ou diminuição da atividade citotóxica.

¹ A estrutura da membrana é uma organização de um bicamada fluida de fosfolípidos com proteínas e outras substâncias tais como esteróides e glicolípidios, associados a sua superfície ou embebida nela em graus variados (GARETH, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Avaliar a atividade antineoplásica do ácido lecanórico extraído do líquen *Parmotrema tinctorum* e de seus derivados obtidos por modificação estrutural em quatro linhagens de células neoplásicas;

3.2 Avaliar a seletividade dos compostos em uma linhagem de células normais (IS);

3.3 Realizar estudos qualitativos de relação estrutura-atividade entre os derivados do ácido lecanórico frente às linhagens de células neoplásicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O líquen *Parmotrema tinctorum* foi coletado na região de Piraputanga (MS), secos à temperatura ambiente e triturados para obtenção do ácido lecanórico.

As linhagens de células estabelecidas para o estudo são: Hep₂ (carcinoma de laringe), MCF7 (carcinoma de mama.), 786-0 (carcinoma de rim), linhagem B16-F10 (células de melanoma murino) e linhagem normal de rim de macaco, VERO.

Todos os reagentes utilizados nos experimentos eram procedentes da SIGMA (Cisplatina [cis-diclorodiamino-platinum (II)], meios de cultura, tripsina). O soro fetal bovino era proveniente da SORALI (MS-Brasil) e os antibióticos estreptomicina e penicilina da Invitrogen.

4.2 Obtenção do Ácido Lecanórico do líquen *Parmotrema tinctorum* e seus produtos de modificação estrutural

O ácido lecanórico e seus produtos de síntese foram obtidos no Laboratório de pesquisa (LP-2) do Departamento de Química da UFMS pelo grupo de pesquisa da Professora Dra. Neli Kika Honda.

O líquen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale foi coletado na região de Piraputanga, em Mato Grosso do Sul. Após remoção de substratos e outros resíduos que acompanham os talos dos líquens, estes foram secos ao ar à temperatura ambiente. A homogeneidade das amostras para análise química foi realizada através de lupa e avaliação cromatográfica (CCD) de extratos obtidos a partir de pequenos fragmentos de cada talo. Os talos foram fragmentados com auxílio de tesoura e os fragmentos triturados em almofariz com auxílio de pistilo. Após extração exaustiva e sequencial do pó com clorofórmio e acetona em banho-maria à temperatura de 45-50°C, os extratos obtidos foram evaporados sob baixa pressão em evaporador rotativo. O extrato acetônico concentrado foi tratado de acordo com o método descrito por Ahmann & Mathey (1967) para o isolamento e purificação do ácido lecanórico.

As reações de modificação estrutural visando a obtenção dos orselinatos de alquila a partir do ácido lecanórico foram realizadas com 50ml de álcool a 40°C em banho-Maria (Bachelor *et al.* 1979), a saber: orselinatos de metila, etila, *n*-propila, *n*-butila, *n*-pentila, isopropila, *sec*-butila e *terc*-butila. Após o término da reação, a mistura foi concentrada e seus componentes separados por cromatografia em coluna de sílica com clorofórmio e gradiente de clorofórmio/acetona. Em todas as reações foram obtidos os correspondentes ésteres 2,4-diidroxí-6-metilbenzoatos (orselinatos), (I-VIII) (Figura 2). As estruturas foram confirmadas através de análises de RMN de ^1H , ^{13}C e Dept 135.

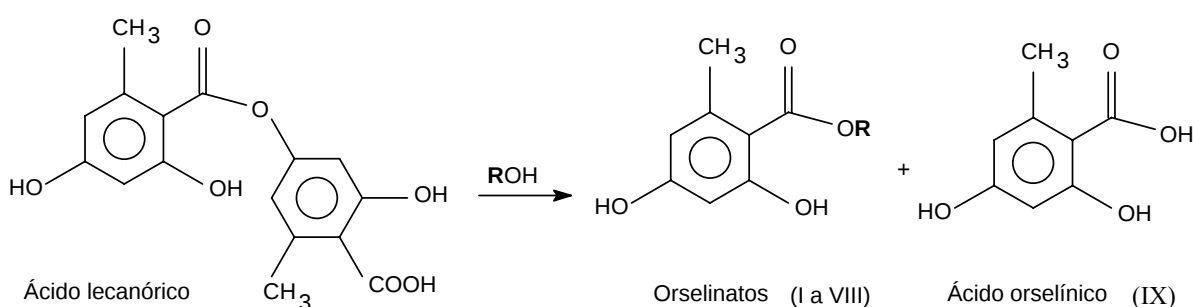


Figura 2 - Reações do ácido lecanórico com alcóois (R = - CH₃ (I), -CH₂CH₃ (II), -CH₂CH₂CH₃ (III), -CH₂(CH₂)₂CH₃ (IV), -CH₂(CH₂)₃CH₃ (V), CH(CH₃)₂ (VI), -CH(CH₃)CH₂CH₃ (VII), -C(CH₃)₃ (VIII). Produzindo orselinatos de metila (I), etila (II), *n*-propila (III) *n*-butila (IV), *n*-pentila (V), *iso*-propila (VI), *sec*-butila (VII), *terc*-butila (VIII).

4.3 Avaliação da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e orselinatos

4.3.1 Manutenção das linhagens

Foi realizado o cultivo das seguintes linhagens de células neoplásicas: Hep₂ (ATCC - CCL-23, de carcinoma de laringe) adquirida do Instituto Adolpho Lutz, MCF7 (ATCC - HTB-22, carcinoma de mama.) e 786-0 (ATCC - CRL-1932, carcinoma de rim), doadas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP) e a linhagem B16-F10 (ATCC CRL-6322, células de melanoma murino) doada pelo Prof. Dr. Auro Nomizo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Também foi cultivada uma

linhagem normal de rim de macaco verde africano, VERO (ATCC- CCL-81) adquirida do Instituto Adolpho Lutz.

As linhagens celulares foram mantidas em meio completo em incubadora de CO₂, até alcançarem o crescimento exponencial. Foram então divididas em alíquotas, mantidas durante 24h a -86°C para o congelamento gradual e transferidas para container de nitrogênio líquido (-196°C) para estocagem. Para os testes, foram descongeladas rapidamente a 37 °C até seu crescimento.

4.3.2 Preparo da suspensão de células e dos compostos

Todos os procedimentos descritos a seguir foram executados de forma idêntica para todas as linhagens (GARCEZ *et al.*, 2005, 2006; MATOS *et al.*, 2006).

Células Hep2 e VERO foram cultivadas em frascos estéreis na presença de Meio Mínimo Essencial modificado por Dulbecco (DMEM); células 786-0, B16-F10 e MCF7 em RPMI-1640, ambos suplementados com 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina (meio completo). A seguir foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo CO₂ (5%). Uma vez que estas células são aderentes, a sua remoção foi feita com a solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos contendo meio de cultura completo. Após centrifugação a baixa rotação, o meio e tripsina foram desprezados e as células ressuspendidas em pequeno volume de meio completo. A contagem foi feita com uma alíquota dessas células em uma câmara de Neubauer para que em cada cavidade da placa de 96 poços fosse depositado um volume de 100 µL de meio contendo 10.000 - 12.000 células (100 a 120.000/mL). Na Figura 3 encontram-se ilustrados o controle negativo (Células da linhagem Hep2) e o controle positivo (cisplatina na concentração de 5,0 µg.mL⁻¹).

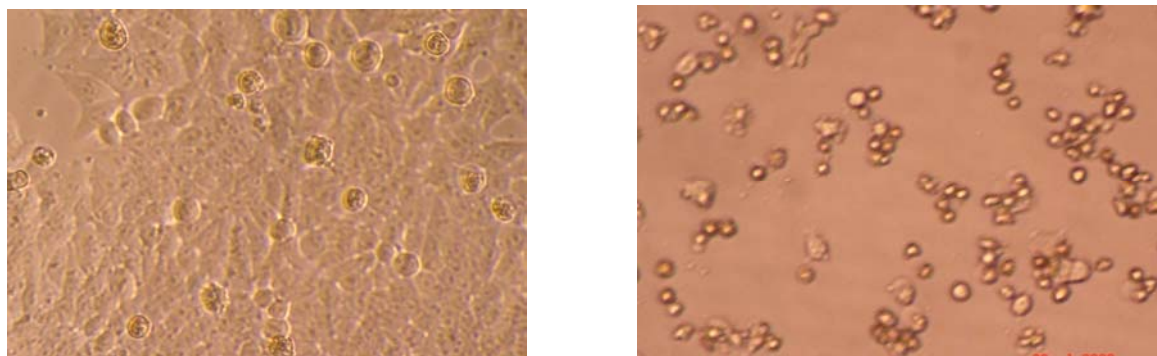


Figura 3 – Cultura de células neoplásicas Hep2. A esquerda o controle negativo; a direita, o controle positivo, cisplatina ($5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Após 20 horas, para permitir a fixação das células semeadas, o meio foi aspirado para a adição dos compostos. Uma alíquota dos compostos previamente dissolvidos em DMSO, foi diluída em meio de cultura, de tal forma que a concentração final do solvente (DMSO), não excedesse 0,5%. Foram utilizadas 4 concentrações de cada composto (entre 5 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo cada concentração do composto adicionada em 3 cavidades (triplicata). Na coluna 1, denominada controle negativo, as células foram crescidas na ausência de qualquer composto e contendo o solvente usado para dissolver os compostos-teste, DMSO (0,5%). Adicionalmente também foram adicionadas a algumas cavidades em duplicata, somente meio de cultura (Branco) e a outras cavidades compostos em meio de cultura (Branco do composto), ambas sem as células. O controle positivo utilizado foi o agente antineoplásico Cisplatina [cis-diclorodiamino-platinum (II)]. Todas as placas foram novamente mantidas na mesma incubadora, até o final do período de exposição das células frente aos compostos-teste ou controle positivo (48 h).

4.3.3 Teste de citotoxicidade (SRB)

4.3.3.1 Princípio

O teste de citotoxicidade adotado baseia-se na coloração das proteínas, pelo corante sulforrodamina B (SRB). Este corante possui dois grupos sulfônicos, e liga-se às proteínas das células fixadas na placa, cujas proteínas são precipitadas previamente pelo Ácido Tricloro

Acético (TCA). A dissolução do corante é realizada com Tris Base 10mM e a leitura da absorbância realizada em leitor de microplacas a 540nm.

4.3.3.2. Avaliação da atividade antineoplásica

Ao final de 48 horas o meio foi removido e substituído por 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 20%. As placas foram incubadas por meia hora, a 4 °C em geladeira, e, posteriormente a solução TCA foi removida e as placas lavadas 5 vezes com água corrente. Adicionou-se às placas 50 μ L de SRB 0,1% (diluída em ácido acético 1%) e novamente foram incubadas por meia hora em temperatura ambiente. Após a remoção da solução de SRB, foram lavadas 4 vezes com ácido acético 1%, secas e o corante dissolvido com Tris Base 10mM (Sigma). Após agitação durante 10 minutos, foi determinada a absorbância a 540 nm.

A absorbância encontrada para o controle negativo, ou seja, para as células crescidas na ausência dos compostos-teste ou do controle positivo, corresponde ao valor de 100% de sobrevivência. Como parâmetro para a citotoxicidade, foi utilizado o valor da IC₅₀ que representa a atividade antineoplásica dos compostos (concentração que inibe 50% do crescimento celular) (ATOPKINA *et al.*, 1999; KEAWPRADUB *et al.*, 1999). Os cálculos da IC₅₀ e o limite de confiança a 95% foram determinados em programa PROBITOS (FINNEY, 1971), a partir das diferenças de leituras de absorbância entre o controle negativo (sem tratamento) e o composto-teste (com tratamento), não sendo consideradas as leituras do meio de cultura (Branco) e dos compostos em meio de cultura (Branco do composto), uma vez que os resultados de ambos foram similares e a absorbância menor que 0,08. Foram realizados 3 experimentos independentes.

O Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anti-câncer considera forte atividade antineoplásica valores de IC 50 menor ou igual a 4,0 μ g/mL (SUFFNESS and PEZZUTO, 1991). No presente trabalho os compostos foram considerados inativos quando IC₅₀ > 50 μ g.mL⁻¹).

4.4 Estudo qualitativo de relação estrutura-atividade

Os estudos qualitativos de relação estrutura atividade foram baseados principalmente na lipofilicidade, expressa através do LogP, relacionando-os com as atividades antineoplásicas (IC₅₀) encontradas. Para tanto, o LogP foi calculado no Programa ACD versão 10 – livre.

4.5 Análise de dados

4.5.1 Índice de seletividade (IS)

O índice de seletividade pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos.

Assim, neste estudo, o IS corresponde a divisão entre o valor da IC₅₀ de cada composto na linhagem de células normais VERO e o valor da IC₅₀ de cada composto na linhagem de células neoplásicas. ($IS = IC_{50} \text{ VERO} / IC_{50} \text{ células neoplásicas}$).

Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991), ou seja, este valor significa que o composto é duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais (VERO).

4.5.2 Análise dos valores em SRB e *Artemia salina*

Outra abordagem realizada refere-se a comparação dos valores de IC₅₀ (μM) obtidos nas linhagens testadas e os valores de LC₅₀ (μM) em *Artemia salina* (GOMES *et al.*, 2006).

4.5.3 Análise estatística

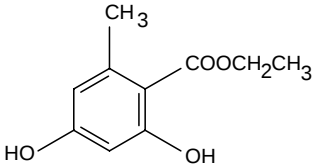
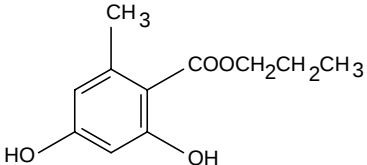
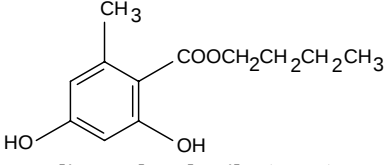
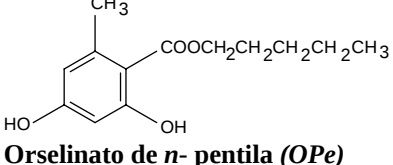
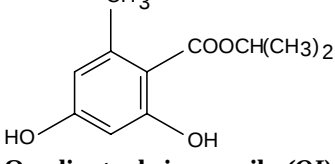
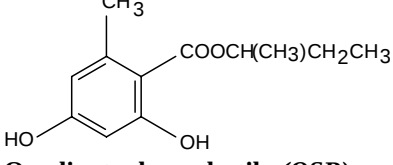
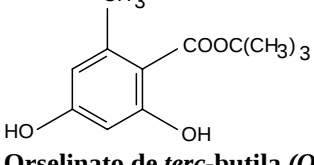
Para verificação da ocorrência de diferenças estatísticas significativas entre os diferentes compostos e diferentes linhagens, os valores de IC50 resultantes da média de três experimentos (n=3) foram analisados por ANOVA – 2 critérios (t-student, $p < 0,05$) no programa BioEstat, versão 2005.

5 RESULTADOS

A atividade antineoplásica de 9 compostos foi avaliada pelo método da SRB em período de incubação de 48 horas em 4 linhagens de células neoplásicas (Hep2, MCF7, 786-0 e B16-F10) e uma linhagem de células normais (VERO). Esta última foi inserida com o objetivo de calcular o índice de seletividade (IS). O composto inicial, ácido lecanórico, foi inativo até a maior concentração testada, ($IC_{50} > 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o mesmo aconteceu com o produto de modificação estrutural, OM. Para estes dois compostos não foi possível calcular a IC_{50} no programa Probitos, uma vez que não houve diferença entre as leituras de absorbância nas diferentes doses testadas (resultados não mostrados).

Os valores de IC_{50} para os produtos de modificação estrutural do ácido lecanórico em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ estão representados na Tabela 1 e Figura 4. No Apêndice A, os mesmos resultados estão apresentados em micromolaridade.

Tabela 1 - Atividade antineoplásica (IC₅₀) dos produtos de modificação estrutural do ácido lecanórico em células neoplásicas Hep₂, MCF7, 786-0 e B16-F10 e uma linhagem de células normais VERO, em período de incubação de 48 horas

Compostos	Hep2	MCF7	786	B16	Vero
 Orselinato de etila (<i>OE</i>)	31,2 ± 1,4	>50	47,5 ± 0,62	>50	>50
 Orselinato de <i>n</i> -propila (<i>ONP</i>)	13,5 ± 0,9	23,5 ± 4,18	18,8 ± 1,68	33,4 ± 0,65	28,1 ± 1,76
 Orselinato de <i>n</i> -butila (<i>ONB</i>)	7,2 ± 0,2	14,0 ± 0,035	12,6 ± 1,49	11,4 ± 3,89	12,1 ± 0,14
 Orselinato de <i>n</i> - pentila (<i>OPe</i>)	17,3 ± 0,6	18,5 ± 0,58	14,3 ± 4,9	17,98 ± 0,05	18,9 ± 0,84
 Orselinato de isopropila (<i>OI</i>)	34,9 ± 0,3	30,2 ± 4,73	22,0 ± 7,03	26,5 ± 2,86	47,3 ± 2,05
 Orselinato de <i>sec</i> -butila (<i>OSB</i>)	8,9 ± 1,1	16,2 ± 0,09	20,6 ± 1,06	17,3 ± 0,11	15,0 ± 1,48
 Orselinato de <i>terc</i> -butila (<i>OTB</i>)	10,2 ± 0,6	17,8 ± 2,33	14,9 ± 6,01	15,4 ± 1,94	26,3 ± 1,55
Cisplatina (controle positivo)	1,8 ± 0,3	3,22 ± 1,33	1,4 ± 0,46	12,5 ± 2,79	2,84 ± 0,21

* IC₅₀ - Dose que inibe 50% do crescimento celular (µg.mL⁻¹), média ± desvio padrão

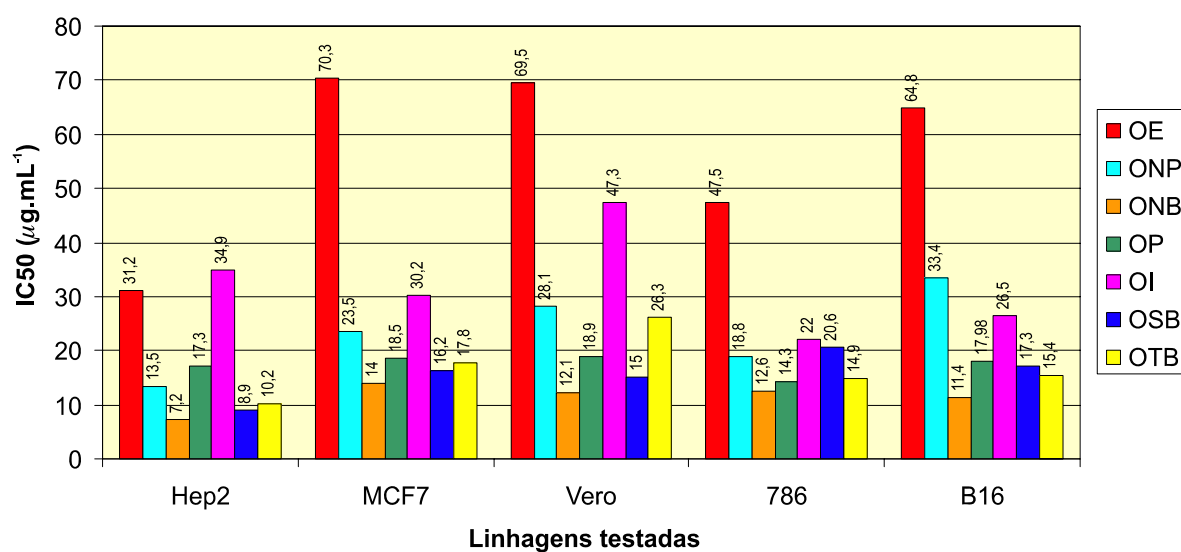


Figura 4 – Atividade citotóxica dos orselinatos em microgramas.mL⁻¹ nas linhagens testadas.

A análise estatística pelo teste ANOVA 2 critérios; t student, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) está apresentada na Tabela 2. A Figura 5 mostra a faixa de variação das IC₅₀ dos compostos em µg.mL⁻¹ obtidos por modificação estrutural do ácido lecanórico.

Tabela 2 – Resultados estatísticos (p)* da análise dos valores de IC₅₀ entre os compostos obtidos por modificação estrutural do ácido lecanórico.

COMPOSTOS	OE	ONP	ONB	OPe	OI	OSB	OTB
OE 31,2 a 70,3**	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
ONP 13,5 a 33,4	< 0,001	-	0,014	0,190	0,060	0,090	0,160
ONB 7,2 a 14	< 0,001	0,014	-	0,200	< 0,001	0,370	0,240
OPe 14,3 a 18,9	< 0,001	0,190	0,200	-	0,003	0,690	0,910
OI 22,0 a 47,3	< 0,001	0,060	< 0,001	0,003	-	< 0,001	0,002
OSB 8,9 a 20,6	< 0,001	0,090	0,370	0,690	< 0,001	-	0,770
OTB 10,2 a 26,3	< 0,001	0,160	0,240	0,910	0,002	0,770	-

* p ANOVA 2 critérios; t student, $p < 0,05$

** faixa de variação das IC₅₀ dos compostos em µg.mL⁻¹

OE apresentou a faixa mais ampla de valores de IC₅₀, sendo considerado o composto menos ativo ($p < 0,001$). (OE # ONP, ONB, OPe, OI, OSB, OTB).

ONP é mais ativo que OE e menos ativo que ONB e apresenta atividade semelhante a todos os demais compostos. (ONP#OE, ONP#ONB, ONP = OPe, OI, OSB, OTB)

ONB é mais ativo que OE, OI e ONP, e apresenta atividade semelhante a OPe, OSB e OTB. (ONB#OE, ONB#OI, ONB#ONP e ONB = OPe, OSB, OTB).

OI é mais ativo que OE e menos ativo que ONB, OPe, OSB, OTB, apresentando atividade semelhante a ONP. (OI # OE, OPe, ONB, OSB, OTB, OI = ONP).

OSB é mais ativo que OE e OI e apresenta atividade semelhante a ONP, ONB, OPe, OTB. (OSB#OE, OI, OSB= ONP, ONB, OPe, OTB).

OTB é mais ativo que OE e OI e apresenta atividade semelhante a ONP, ONB, OPe, OTB. (OTB#OE, OI, OTB= ONP, ONB, OPe, OSB).

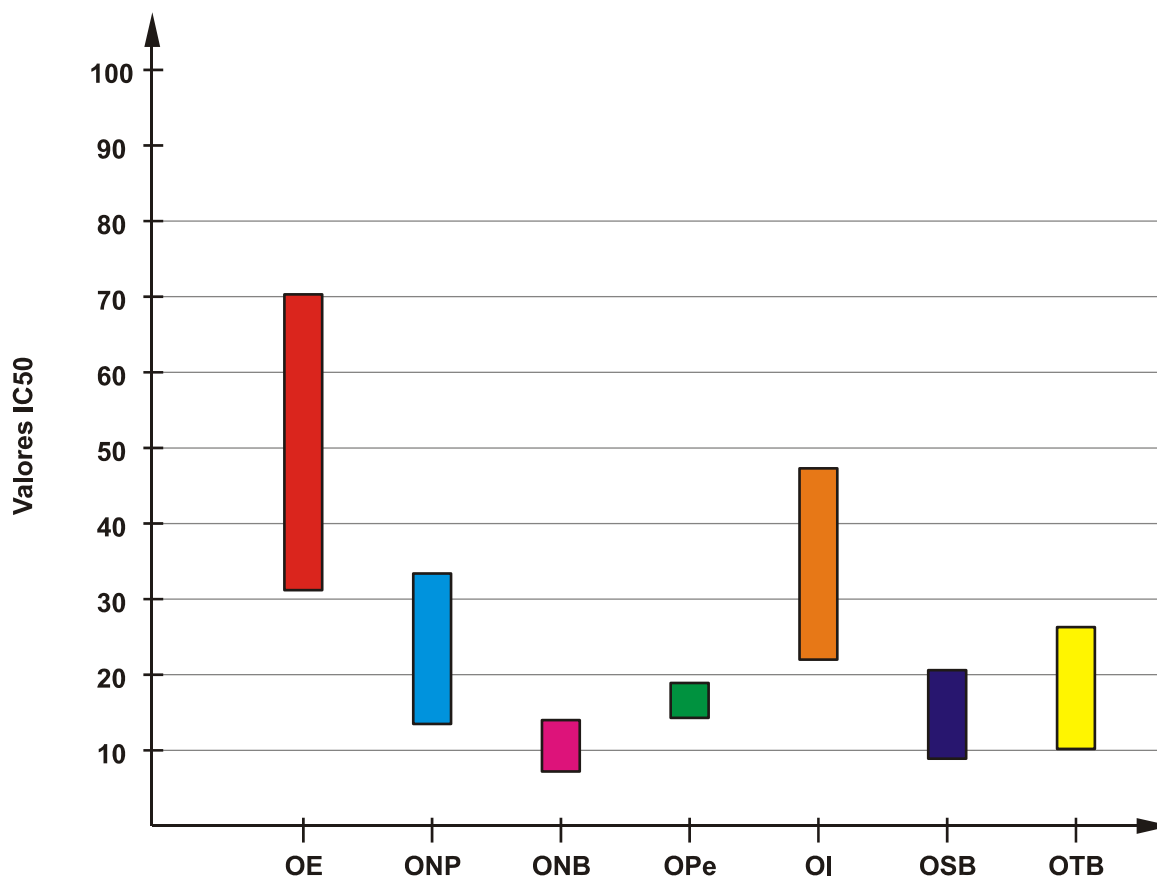


Figura 5 – Intervalo dos valores de IC50 obtidos nas linhagens testadas expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$

A análise estatística pelo teste ANOVA 2 critérios; t student, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) apresentada na Tabela 3 compara os valores de IC50 de cada linhagem neoplásica e normal considerando as variações dos valores de IC50 encontradas

para os compostos: HEP2 (7,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 34,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), MCF7 (IC50 14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 70,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 786-0 (12,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 47,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), B16-F10 (11,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 64,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), VERO (12,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 69,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Tabela 3 – Resultados estatísticos (p)* da análise dos valores de IC50 entre as linhagens dos compostos obtidos por modificação estrutural do ácido lecanórico.

LINHAGENS	HEP	MCF7	VERO	786	B16
HEP 7,2 a 34,9**	-	0,010	0,001	0,310	0,020
MCF7 14 a 70,3	0,010	-	0,330	0,150	0,890
VERO 12,1 a 69,1	0,001	0,330	-	0,020	0,270
786-0 12,6 a 47,5	0,310	0,150	0,020	-	0,190
B16 11,4 a 64,8	0,020	0,890	0,270	0,190	-

* p ANOVA 2 critérios; t student, $p < 0,05$

** faixa de variação das IC50 dos compostos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Os compostos são mais ativos em Hep2 em relação a MCF7, B16-F10 e VERO e em Hep2 a atividade dos compostos foi semelhante quando comparada a 786-0. A atividade dos compostos em MCF7, B16-F10 e VERO também foi semelhante. Em 786-0 os compostos apresentaram atividade semelhante em relação a Hep2, MCF7 e B16-F10. Sendo 786-0 mais sensível aos compostos que a linhagem de células normal (VERO).

Na tabela 4 observa-se o índice de seletividade (IS) para os compostos derivados do ácido lecanórico, nos quais foi possível calcular IC50 (ver Tabela 1). Este resultado foi obtido pela razão entre o valor da IC50 de cada composto na linhagem de células normais VERO e o valor da IC50 de cada composto na linhagem de células neoplásicas.

Tabela 4 - Índice de Seletividade (IS)* dos produtos de modificação estrutural do ácido lecanórico (orselinatos) entre as diferentes linhagens.

Orselinatos	Hep2	MCF7	786-0	B16-F10
OE	2.2	1.0	1.4	1.1
ONP	2.0	1.2	1.4	0.8
OI	1.3	1.6	2.1	1.8
OP	1.0	1.0	1.3	1.0
ONB	1.7	0.9	1.0	1.1
OSB	1.7	0.9	0.7	0.9
OTB	2.6	1.5	1.8	1.7
Cisplatina	1.6	0.5	2.0	0.2

* IS significativo para valores maiores ou iguais a 2,0 (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991).

A Figura 6 demonstra a relação entre os resultados de logP (lipofilicidade) dos orselinatos de cadeia linear e ramificada e os valores de IC₅₀ obtidos na linhagem Hep2.

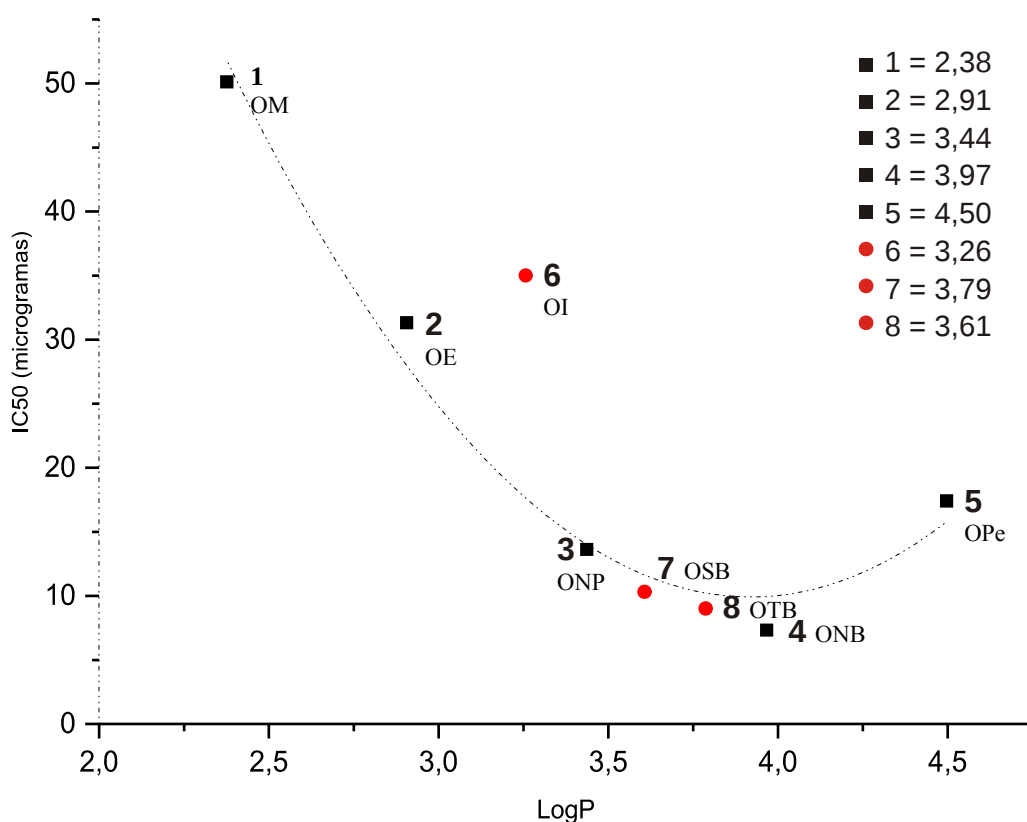


Figura 6 – Correlação da atividade citotóxica (IC₅₀) e LogP dos produtos de modificação do ácido lecanórico em células neoplásicas Hep2. Legenda: ■ orselinatos de metila à *n*-pentila (1 a 5); ● orselinatos de cadeia ramificada (6, 7, 8).

A linhagem Hep foi escolhida para esta análise do comportamento dos orselinatos em relação ao logP porque a maioria dos compostos foram mais ativos nesta linhagem em comparação com as outras estudadas.

A análise dos valores atividade citotóxica em SRB (IC50) e *Artemia salina* (LC50) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados de IC50* (µM) dos produtos de modificação estrutural do ácido lecanórico (orselinatos) no ensaio com SRB nas linhagens testadas e no ensaio com *Artemia salina***

ORSELINATOS	<i>Artemia salina</i>	Hep2	MCF7	VERO	786-0	B16-10
OE	495	159	358	352	242	330
ONP	137	64.2	112	134	89.8	158
ONB	85	32.1	62.7	53.9	56.3	50.9
OPe	39	72.6	77.6	79.3	60.3	75
OI	229	166	143	225	104	126
OSB	123	39.6	72.3	67.1	92	77.2
OTB	210	45.4	79.6	117	66.5	69

* Dose que inibe 50% do crescimento celular

** LC50 em *Artemia salina* - Gomes *et al.*, 2006

6 DISCUSSÃO

A atividade antineoplásica do composto ácido lecanórico isolado do líquen *Parmotrema tinctorum* e de oito compostos obtidos por modificação estrutural foi avaliada em quatro linhagens de células neoplásicas (Hep2, MCF7, 786-0 e B16-F10). Os compostos derivados do ácido lecanórico apresentaram aumento da atividade em relação ao ácido lecanórico, o qual foi inativo até a maior concentração testada, ($IC_{50} > 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o mesmo acontecendo com OM. Este composto foi isolado do líquen *Peltigera leucophlebia* e também não mostrou efeito em células neoplásicas de mama, pâncreas e cólon ($IC > 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (INGOLFSDOTTIR *et al.*, 2002).

Determinadas modificações químicas, podem levar a aumento ou diminuição de atividade. Nesse contexto, derivados do limonemo contendo uma unidade tiouréia substituída foram testados para avaliação da atividade antiproliferativa e os resultados mostraram potencialização de alguns derivados como inibidores da proliferação celular (FIGUEIREDO *et al.*, 2006), enquanto Kim *et al.* (2001) em estudos de estrutura atividade com derivados do ácido botulínico em células neoplásicas, observaram que o carbono na posição 20 do ácido botulínico não é responsável pela atividade biológica destes compostos.

Quanto maior o coeficiente de partição ($\log P$), maior a lipofilicidade e portanto maior a facilidade do composto atravessar as membranas celulares (BARREIRO *et al.*, 2001). A potencialização da atividade antineoplásica no teste de citotoxicidade da SRB, foi evidenciada nos compostos de cadeia linear OM ($\log P$ 2,38), OE ($\log P$ 2,91), ONP ($\log P$ 3,44) e ONB ($\log P$ 3,97). Este aumento da atividade pode estar relacionado a elongação da cadeia carbônica. A atividade citotóxica dos compostos aumenta gradualmente até o ONB, quando então, volta a apresentar valores de IC_{50} maiores para OPe, em relação a ONB. Tanto que, na linhagem B16-F10, o composto ONB foi tão potente quanto cisplatina (controle positivo), respectivamente IC_{50} $11,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 1).

Entretanto, o composto OPe que tem o maior $\log P$ (4,5) não foi o composto mais ativo (Tabela 5). Esta mesma série de compostos foi submetida ao teste de toxicidade com *Artemia salina* (TAS) e a potencialização da atividade citotóxica ocorreu até OPe. As diferenças nos dois testes de citotoxicidade em relação a metodologia e a constituição das membranas celulares dos dois modelos biológicos utilizados podem justificar as diferenças nos resultados encontrados (HOUGHTON *et al.*, 2007; HENRIKSSON *et al.*, 2006).

Outro fator que pode ser considerado, tanto para o composto OPe como para outros compostos que apresentaram diferenças de IC₅₀ entre as linhagens utilizadas no estudo é a presença de receptores nas membranas celulares. O receptor é uma entidade conceptual para explicar a natureza da interação do fármaco com organismos vivos produzindo determinado efeito biológico. A capacidade do fármaco adaptar-se ao receptor depende das características estruturais, configuracionais e conformacionais de ambos, fármaco e receptor; entretanto, conhecer as forças de interação que os ligam aos receptores por métodos experimentais é muito difícil (SILVA, 2006).

Além disso, podem existir vários receptores para uma mesma substância ou composto em tecidos diferentes, é o caso do receptor nicotínico da acetilcolina, também chamado canal nicotínico de acetilcolina, este nome é usado para diferenciar esse receptor de outros receptores de acetilcolina que funcionam de modo diferente (DEVLIN, 2007).

Observando-se os valores de IC₅₀, as cadeias ramificadas também podem interferir na ligação aos receptores (SILVERMAN, 1992) (Tabela 1).

A atividade antineoplásica de OTB foi maior quando comparado com OI. Analisando-se as suas estruturas verifica-se a presença de apenas um grupamento metila a mais em OTB, que poderia favorecer a atividade antineoplásica em decorrência de sua conformação estrutural. Os valores de IC₅₀ para OTB e OSB obtidos em *Artemia salina* quando comparados aos obtidos no ensaio de citotoxicidade foram maiores, demonstrando serem menos ativos em *Artemia salina* e mais ativos nas linhagens testadas (Tabela 5).

Quanto ao composto OI, a sua conformação estrutural com a presença de dois grupamentos metila ligados não favorece a potencialização da atividade antineoplásica, mesmo apresentando valores de logP muito semelhantes aos demais compostos de cadeia ramificada, como o OTB e OSB.

Os compostos não polares se difundem mais na membrana que os compostos polares, devido à estrutura da membrana celular (quanto mais polar, menos lipofílico). Os compostos OM e OE são os mais polares, e se difundem menos na biomembrana, o que está de acordo com os resultados obtidos, uma vez que foram menos ativos. Enquanto os menos polares (ONP, ONB, OPe, OI, OSB, OTB), que apresentaram valores maiores de logP, se difundem mais e apresentaram maior atividade.

Quando se compara a atividade antineoplásica em uma linhagem de células normais e antineoplásicas a seletividade resultante foi mais significativa em células de carcinoma de laringe (Hep2), onde três compostos apresentaram IS maior que 2,0, tendo o composto OTB apresentado o maior índice de seletividade (IS=2,6). Entretanto a maioria dos compostos não

apresentou seletividade ($IS < 2,0$) (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991), indicando que os mesmos podem ser considerados citotóxicos para todas as linhagens, até para a linhagem normal de rim de macaco (VERO). Itharat *et al.*, (2004) utilizando produtos naturais e células VERO, encontraram alta seletividade ($IS = 14,0$), enquanto nos estudos de Girardet *et al.*, (2000) utilizando NHF-fibroblastos normais humanos não houve seletividade. É possível que diferenças no tipo de célula normal utilizada e o teste de citotoxicidade selecionado possam explicar estes resultados.

Por outro lado, o controle positivo cisplatina, também foi citotóxico em células VERO (Tabela 1). Entretanto, este agente é citotóxico para células normais *in vivo* e mesmo assim é utilizada no tratamento de diversas neoplasias. A cisplatina provoca morte celular em todos os estágios do ciclo celular, inibindo a síntese de DNA através de ligações cruzadas entre as fitas de DNA (KATZUNG, 2006). Estudos *in vitro* para avaliação de diferentes ensaios no intuito de mensurar a indução de morte celular pela cisplatina foram realizados e os resultados dos ensaios foram comparados as doses de cisplatina utilizadas clinicamente (HENRIKSSON *et al.*, 2006).

Segundo Selassie *et al.*, (2005), os níveis de citotoxicidade são maiores nos compostos em que apresentam na sua estrutura química grupamentos OH ligados nas posições orto e para. O mecanismo de ação de citotoxicidade dos compostos fenólicos pode estar baseado na oxidação via radical fenoxi para uma quinona reativa que pode posteriormente alquilar proteínas celulares ou o DNA. Entretanto, nos orselinatos testados, os grupos C-2 e C-4 e o grupo metil no C-6 estão localizados em posição meta.

O pKa é outro parâmetro que contribui para a toxicidade dos fenóis. Os compostos derivados do ácido lecanórico, testados nesta pesquisa apresentam valores de pKa (C4-OH) em torno de 8,0 e são 10% ionizados quando em pH 7.0 (GOMES *et al.*, 2006). Embora estes compostos produzam radicais fenóxi, as diferenças de atividade entre eles depende basicamente da elongação da cadeia carbônica, relacionada com a hidrofobicidade. Muitos estudos correlacionam a toxicidade dos fenóis com a hidrofobicidade (SELASSIE *et al.*, 1998).

As diferenças genéticas e morfológicas das células neoplásicas podem interferir no desenvolvimento de uma determinada metodologia para pesquisa de novas drogas. Quando os compostos são avaliados em um número maior de linhagens e provenientes de diferentes tipos histológicos, que expressam diferentes receptores, as possibilidades de identificação de agentes com atividade anticâncer aumentam. Isto pode ser exemplificado pelas diferenças na estrutura da membrana que ocorre nas linhagens de células neoplásicas B16-F10 e B16-F1 de

melanoma (SCHROEDER, 2003). Diante de tais questões, o NCI (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos) contempla várias linhagens celulares tumorais humanas de um mesmo tipo histológico de célula (por exemplo, 14 diferentes linhagens de células neoplásicas de mama poderiam ser similares a 14 pacientes requeridos para a fase II da triagem clínica) com o propósito de aproximar-se da heterogeneidade observada na clínica (VON HOFF, 1985).

Desta forma, sabendo-se das características únicas de cada neoplasia, pode-se inferir que as diferenças de comportamento dos compostos entre as diferentes linhagens também podem estar associadas às diferenças estruturais e químicas de suas membranas.

REFERÊNCIAS¹

Almeida de VL, Leitão A, Reina B, Del Carmen L, Montanari CA, Donnici LC, Lopes P T M. Cancer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não-Específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*. 2005; 28(1): 118-129.

Aggarwal B, Bharat SS. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2006; 7: 1397-1421.

Ahmann B, Mathey A. Lecanoric acid and some constituents of *Parmelia tinctorum* and *Pseudoevernia intense*. *The Bryologist*. 1967; 70: 93-97.

Assad ALD, Ferro AFP. Biodiversidade e sua utilização na geração de fitoterápicos. *Fármacos e Medicamentos*. nov./dez 2005; Ano VI, 37.

Atopkina LN, Malinovskaya GV, Elyakov GB. Cytotoxicity of natural ginseng glycosides and semisynthetic analogues. *Planta Medica*. 1999; 65: 30-34.

Barata LES. Fitoterápicos: alternativa para o Brasil. *Revista eletrônica de jornalismo científico*. [Acesso em 15 de fevereiro de 2005]. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/farmacos>.

Barreiro EJ, Fraga CAM. *Química Medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed Editora; 2001.

¹ As normas seguidas para elaboração das referências seguem o Estilo Vancouver (1979), atualizado em fevereiro de 2007).

Bernardi A, Jacques-Silva MC, Lenz G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. *Infarma*. 2003; 15(9-10): 61-64.

Bézivin C, Tomasi F, Lohézie-Le D, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*. 2003; 10: 499-503.

Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life sciences*. 2006; 78: 2872-2888.

Cain BF. Potential antitumor agents. IV. Polyporic acid series. *J Chem Soc*. 1966; 11: 1041-1045.

Choudhary MI, Ali S, Thadani VM, Karunaratne V. Natural novel antioxidants such as lecanoric acid, erythrin, sekikaic acid, and lobaric acid, derived from lichen exts. U.S. Pat. Appl. Puubl., 2009.

Cingi MR, De Angelis I, Fortunati E. *et al*. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. *Toxicology in vitro*. 1991; 5:119-125.

Cohen PA, Hudson JB, Towers GHN. Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. *Experientia*. 1996; 52: 180-183.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic Basis of Disease. 6th. WB Saunders International. Chapters 1,2,4,6 e 8, 1999.

Deliconstantinos G. *Anticancer Research*. 1987; 7(5b): 1011-1021.

Devlin TM. Manual de Bioquímica Química com Correlações Clínicas. São Paulo: Editora Blücher, 2007.1186p.

Finney DJ. Probit Analysis. 3 ed. Cambridge University Press, 1971.

Figueiredo IM, dos Santos LV, da Costa WF, de Carvalho JE, da Silva CC, Sacoman JL, Kohn LK, Sarragiotto MH. Synthesis and antiproliferative actiity of novel limonene derivatives with a substituted thiourea moiety. J. Braz. Chem. Soc. 2006; 17(5): 954-960.

Freshney IR. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. 3º ed. New York, Wiley-Liss, 1994.

Garcez FR, Garcez WS, Martins M, Matos MFC, Guterrez ZR, Mantovani MS, Misu C K, Nakashita ST. Cytotoxic and Genotoxic Butanolides and Lignans from *Aiouea trinervis*. Planta Medica. 2005; 71: 923-927.

Garcez FR, Garcez WS, Santana ALBD, Alves MM, Matos MFC. Bioactive Flavonoids and Triterpenes from *Teminalia fagifolia*. J. Braz. Chem. Soc.2006; 17:1223-1228.

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

Gomes AT, Honda NK, Roese FM, Muzzi RM, Marques MR. Bioactive derivatives obtained from lecanoric acid, a constituent of lichen Parmotrema tinctorium (Nyl.) Hale (Parmeliaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. 2002; 12: 74-75.

Gomes AT, Smânia-júnior A, Seidel C, Smania EFA, Honda NK, Roese FM, Muzzi R. Antibacterial Activity of Orsellinates. Brazilian Journal of Microbiology. 2003; 34: 194-196.

Gomes AT, Honda NK, Roese FM, Muzzi RM, Sauer L. Cytotoxic activity of orsellinates. *Z Naturforsch.* 2006; 61: 653-657.

Gulluce M, Aslan A, Sokmen M, Sahin F, Adiguzel A, Agar G, Sokmen A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Plasmatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine.* 2006; 13: 515-521.

Hale Jr. ME. *The Biology of Lichens*, 3rd ed. London, Edward Arnold; 1983.

Hamburguer M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry.* 1991; 30: 3864-3874.

Hansch C, McKarns SC, Smith CK, Doolittle DJ. Comparative QSAR evidence for a free radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chemical and Biological Interaction.* 2000; 127: 61-72.

Henriksson E, Kjellén E, Wahlberg P, Wennerberg J, Kjellstrom JH. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal.* 2006; 42: 320-323.

Hidalgo ME, Fernandez E, Quilhot W. Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry.* 1994; 37: 1585-1587.

Hill PH, Tannock IF. Introduction: Cancer as a Cellular Disease. *In: The Basic Science of Oncology.* Tannock, I.F. & Hill, R.P. 2nd ed. USA: McGraw-Hill; 1992

Honda NK, Vilegas W. A química dos liquens. *Quimica Nova.* 1999; 22: 110-125.

Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of ethnopharmacology*. 2007; 110: 391-400.

Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, v. 42: 377-387, 2007.

Hostettmann K. Assays for bioactivity. In: Dey PM, Haerborne JB. (Ed). *Methods in plant biochemistry*. San Diego: Academic press, 1991; 6: 360p.

Hostettmann K, Wolfender JL, Rodriguez S. Rapid detections and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica*.1997; 63, p.2-10.

Hirayama T, Fujikawa F, Kasahara T, Otsuka M, Nishida N, Mizuno D. *Yakug Zasshi*.1980; 100: 755-759.

Ingólfssdóttir K, Bloomfield SF, Hylands PJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985; 28: 289-292.

INCA. Estimativa 2008. Incidência de câncer no Brasil. [acesso em out 2006]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.

Itharat A, Houghton PJ, Eno-Amooquaye E, Burke PJ, Sampson, JH, Raman A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 90: 33-38.

Junqueira LC, Carneiro J. Biologia Celular e Molecular. 8ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. 332p

Katzung BG. Farmacologia básica e clínica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. 991p.

Keapradub N, Eno-Amooquaye E, Burke PJ *et al*. Cytotoxic activity of indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. Planta Medica. 1999; 65: 311-315.

Keepers YP, Pizao EP, Peters G J, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo, HM. Comparison of the sulphorhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. Eur. J. Câncer. 1991; 27(12): 1717.

KimYJ, Koo H, Kim DSHL. Development of C-20 modified betulinic acid derivates as antitumor agents. Biorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2001; 11, 2405-2408.

Kingston DGI. Natural products as pharmaceutical and sources for lead structures. In: WERMUTH, C. G. (Ed). The practice of medicinal chemistry. Academic press, 1996. p.102-114.

Kumar KCS, Müller K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. Journal of Natural Products. 1999; 62: 821-823.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & COTRAN. Patologia - bases Patológicas das doenças. 7ed. Rio de Janeiro, Elsevier; 2005.

Kupchan SM, Kopperman HL. l-usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia*. 1975; 31: 625.

Maciel MMA, Pinto AC, Veiga VE, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova*. 2002; 25(3): 429-438.

Magalhães FIE. Atividade Antitumoral (*in vitro e in vivo*) das fisalinas B e D isoladas da *Physalis angulata* LIN.[Dissertação].Ceará: Universidade do Ceará.

Makoto B, Sugino M. Effects of air pollutants on the lecanoric acid content of the lichen *Parmotrema tinctorum*. *Kinki Daigaku Nogakubu*. 1997; 30: 1-6.

Matos MFC, Leite LISP, Brustolim D, Siqueira JM, Carollo CA, Hellmann AR, Pereira NFG, Silva DB. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. *Fitoterapia*. 2006; p.227-229.

Matos MFC, Matsubara MH, Oguma PM, Siqueira JM, Silva DB, Garcez FR, Martins M. Evaluation of Antineoplastic Activity of Compounds Isolated from Annonaceae and Lauraceae. In: 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005, Ribeirão Preto. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)*. 2005; 41(supl. 1): 321.

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

Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2001; 56: 9-16.

Nakasawa S, Komatsu N, Yamamoto I, Fujikawa F, Hirai K. Antitumor activity of components of lichens. *J. Antibiotics*. 1962; 15: 282-289.

Nandi S, Vracko M, Bagchi MC. Anticancer activity of selected phenolic compounds : QSAR studies using ridge regression an neural networks. *Chemical Biology and Drug Design*. 2007; 70: 424-436.

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

NCI. National Cancer Institute. Acesso em dezembro de 2008. Disponível em <http://nci.nih.gov/>.

Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Suner S, Nicklaus MC, Milne GWA, Proska B, Pommier Y. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 Integrase : discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997; 40: 942-951.

Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Bayir Y, Halici M. Antioxidant activity, reducing power phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*. 2005; 76: 216-219.

Ögmundsóttir HM, Zoéga GM, Gissurasson SR, Ingólfsóttir K. Antiproliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1998; 50: 107-115.

Olafsdottir E, Ingolfssdottir K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. *Planta Med*. 2001; 67: 199-208.

Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly J, Delage C, Chulia A. Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2001; 11: 3095-3097.

Ramirez-Mares MV, Chandra S de MEG. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguaiensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research*. 2004; 554: 53-65.

Rang HP, Ritter JM, Dale MM. In: *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. 904p.

Raposo JJ, Ré-Poppi N, Honda NK. Avaliação da concentração de alguns íons metálicos em diferentes espécies de líquens do cerrado Sul-Mato-Grossense. *Quím. Nova*. 2007(maio/jun); 30 (3).

Reis M. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. *Medicina Ribeirão Preto*. out/dez, 2006; 39(4): 577-586.

Richardson DSH. Medicinal and other economic aspects of lichens; In *CRC Handbook of Lichenology*, V.III. Ed. CRC Press, Flórida, 1988, p.93.

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

Rubinstein LV, Shoemaker KD, Paull RM. In Vitro Anticancer-Drug-Screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 1990; 82: 1113-1118.

Schroeder F. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes*. 1984; 776(2): 299-312.

Selassie CD, DeSoyza TV, Rosario M, Gao H, Hansch C. Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process? *Chemico-Biological Interactions*. 1998; 113: 175-190.

Selassie CD, Kapur S, Varma RP, Rosario M. Cellular apoptosis and cytotoxicity of phenolic compounds: Quantitative structure-activity relationship study. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005; 48: 7234 – 7242.

Shibata S, Miura Y. Antibacterial effects of lichen substances, II – Studies on didimic acid and related compounds. *Japan Med. Journal of science in Biology*. 1948; 2:22-24.

Shibata S, Nishikawa Y, Takeda T, Tanaka M. *Chem. Pharm. Bull.* 1968; 16: 2362.

Shoeb M, Jaspars M, Macmanus SM, Celik S, Nahar L, Kong-Thoo-Lin P, Sarker SD. Anti-cólon cancer potencial of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantean* (Asteraceae). *J Nat Med*. 2007; 61: 164-169.

Silva P. *Farmacologia*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. 1369p.

Silverman RB. *The organic chemistry of drug design and drug action*. Academic Press, Inc., California, 1992.

Sieber OM, Heinimann K, Tomlinson IPM. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. *Nature Rev.* 2003; 3: 701-708.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. *Journal of The National Cancer Institute*. 1990; 82: 1107-1112.

Stich HF. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. *Mutation Research*. 1991; 259: 307-324.

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

Kim SJ, Lee HJ; Suh ME, Choo HY, Lee SK, Park HJ, Park SW, Lee CO Synthesis and cytotoxicity of 1-substituted 2-methyl-1H-imidazol[4,5-g]phthalazine-4,9-dione derivatives. *Bioorganic Medical Chemistry*. 2004;.12: 3683-3686.

Takai M, Uehara Y, Beisler JA. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1979; 22: 1380-1384.

Thakur M, Agarwal A, Thakur A, Khadikar PV. QSAR study on phenolic activity: need of positive hydrophobic term ($\log P$) in QSAR. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004; 12: 2287-2293.

Thompson DC, Thompson JA, Sugumaran M, Modeus P. Biological and Toxicological Consequences of Quinone Methide Formation. *Chemico-Biological Interactions*. 1993; 86: 129-162.

Umezawa K, Maramatsu S, Ishizuka M, Sawa T, Takeuchi T, Matsushima T. Inhibition of histidine decarboxylase and tumor promoter-induced arachidonic acid release by lecanoric acid analogs. *Biochemical and Biophysical Communications*. 1983; 110: 733-739.

Verweij J, Jonge MJA. Achievements and future of Chemotherapy. *Eur.J.Cancer*. 2000; 36: 1479-1487.

Vicente C, Cambon C, Garcia-Junceda E. *Planta Sci.* 1992; 85: 143

Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols.* 2006; 1(3): 1112-1116.

Von Hoff DD. Use of radiometric system to screen for antineoplastic agents: correlation with a human tumor cloning system. *Cancer Res.* 1985; 45(9): 4032-4038.

Weinstein JN, Myers TG, Oconnor PM, Friend SH *et al.* An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science.* 1997; 275: 343-349.

Willians DE, Karunamanda B, Emil L, Dilip de S, Veranja K, Allen T, Clardy J, Andersen R. Ambewelamides A e B, antineoplastic epidithiapiperaziinediones isolated from the lichen *Usnea sp.* *Tetrahedron Letters.* 1998; 39: 9579-9582.

Yamamoto Y, Kinoshita Y, Matsubara H, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K, Kurokawa T, Yoshimura I. Screening of biological activities and isolation of biological-active compounds from lichens. *Recent Res. Devel in Phytochem.* 1998; 23-34.

Zhu H, Gooderham N. Neoplastic transformation of human lung fibroblast MRC-5 SV2 cells induced by benzo[α]pyrene and confluence culture. *Cancer Res.* 2002; 62: 4605-4609.

APÊNDICE A – Atividade antineoplásica (IC50) dos produtos de modificação estrutural do ácido lecanórico.

Tabela A - Atividade antineoplásica (IC50)* dos produtos de modificação estrutural do ácido lecanórico em micromolaridade e em microgramas por ml, nas linhagens neoplásicas e em linhagem de células normais.

COMPOSTOS	HEP2		MCF7		VERO		786		B16	
	μM	μg.mL ⁻¹	μM	μg.mL ⁻¹	μM	μg.mL ⁻¹	μM	μg.mL ⁻¹	μM	μg.mL ⁻¹
OE	159	31.2	358	70.3	352	69.1	242	47.5	330	64.8
ONP	64.2	13.5	112	23.5	134	28.1	89.8	18.8	158	33.4
OI	166	34.9	143	30.2	225	47.3	104	22	126	26.5
OP	72.6	17.3	77.6	18.5	79.3	18.9	60.3	14.3	75	17.9
ONB	32.1	7.2	62.7	14	53.9	12.1	56.3	12.6	50.9	11.4
OSB	39.6	8.9	72.3	16.2	67.1	15	92	20.6	77.2	17.3
OTB	45.4	10.2	79.6	17.8	117	26.3	66.5	14.9	69	15.4
Cisplatina (controle positivo)	5.9	1.8	20.3	6.1	9.46	2.84	4.66	1.4	41.6	12.5

* IC50 - Dose que inibe 50% do crescimento celular em μg.mL⁻¹ e μM