



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JOSÉ VICTOR DE OLIVEIRA SANTOS**

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DA  $\Omega$ -HIDROXIEMODINA ISOLADA DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DE ALGAS MARINHAS PARA FORMULAÇÕES ANTITUMORAIS**

Fevereiro – 2018

TERESINA PI

JOSÉ VICTOR DE OLIVEIRA SANTOS

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DA  $\Omega$ -HIDROXIEMODINA ISOLADA DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DE ALGAS MARINHAS PARA FORMULAÇÕES ANTITUMORAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Fevereiro – 2018

Teresina PI

**JOSÉ VICTOR DE OLIVEIRA SANTOS**

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DA  $\Omega$ -HIDROXIEMODINA ISOLADA DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DE ALGAS MARINHAS PARA FORMULAÇÕES ANTITUMORAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dr<sup>a</sup>. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante (Orientadora)**

Departamento de Bioquímica e Farmacologia | *Campus* Ministro Petrônio Portella

---

**Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (Examinador Interno)**

Departamento de Biologia | *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros

---

**Prof. Dr. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar (Examinador Externo)**

Departamento de Bioquímica e Farmacologia | *Campus* Ministro Petrônio Portella

---

**Prof. Dr. Felipe Cavalcante Carneiro (Suplente)**

Departamento de Biologia | *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. José, de Arimatéia Dantas Lopes

**VICE-REITOR**

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

**PRÓ-REITOR PARA DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

*Dedico este trabalho a Deus, pois até aqui me sustentou; à minha família,  
pelo imenso incentivo e aos demais amigos e companheiros de laboratório  
pelo suporte por todo meu percurso até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Único que é digno de receber a honra e a glória, a força e o poder, ao Rei eterno imortal, invisível, mas real, a Ele ministro o louvor, obrigado *Deus*;

Aos meus pais, *José Silva Santos Júnior e Rosângela Maria Oliveira Silva* e minha Avó *Francisca Reis de Sousa Santos* por todo o amor e cuidado, fundamentados em uma educação coerente;

À Universidade Federal do Piauí, por meio do Magnífico Reitor Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes, do Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, através do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, e dos demais integrantes do corpo docente deste Programa de Pós-Graduação;

Aos incríveis amigos, e também irmãos, do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC, em especial *Ag-anne Melo, Antonielly Campinho, Rosália Tôrres, Marcus Vinícius, Leane Brunelle, Ana Maria, Torequl Islam, João Marcelo*;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

À minha orientadora, Profa. Dra. *Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante*, que de forma intensa, me acolheu em seu laboratório desde a iniciação científica e que acreditou no meu potencial e me acompanhou desde o ano 2015 até este momento.

... *Muito Obrigado!*

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>A .Cepa</i>	<i>Allium cepa</i>
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenas
<b>(IDN</b>	Índice de divisão nuclear
<b>IDNC</b>	Índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade
<b>PNP</b>	Pontes nucleoplasmáticas
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>MAPK</b>	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
<b>PTK</b>	Proteína tirosina quinase
<b>ω -hi</b>	ω-hidroxiemodina
<b>Bcl-2,</b>	Célula-B de linfoma
<b>Bcl-xL</b>	Linfoma de células B - extragrande
<b>RMN</b>	Ressonância magnética
<b>EM-IES</b>	Espectrofotometria de massa
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>gHMBC</b>	Coerência Quantum Heteronuclear Múltipla
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>COSY</b>	Espectroscopia de Correlação homonuclear
<b>D.P.M</b>	Desvio padrão da média
<b>DOX</b>	Doxorrubicina

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1.** Divisão esquemática do corpo da dissertação. 18

### CAPÍTULO I

**Figura 1:** Espectro de massas EM-IES (+) da  $\omega$ -hidroxiemodina 51

**Figura 2:** Sobrevivência dos náuplios de artemia tratados 24 e 48 h com a  $\omega$ -hidroxiemodina. Cada ponto de dados é a média de 5 determinações independentes que compõem um total de 50 náuplios. As barras de erro representam  $\pm$  D.P.M. 52

**Figura 3:** Avaliação da toxicidade da  $\omega$ -hidroxiemodina pelo tamanho de raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9  $\mu$ M);  $\omega$ - hi (1,7; 3,4 e 6,9  $\mu$ M). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA de dois caminhos), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN, <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP e <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo  $\omega$  -hi 0,5. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento. 53

**Figura 4:** Avaliação citotóxica da  $\omega$ -hidroxiemodina pelo índice mitótico em meristemas de raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9  $\mu$ M);  $\omega$ - hi (1,7; 3,4 e 6,9  $\mu$ M). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA de dois caminhos), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN, <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP, <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo  $\omega$  -hi 0,5 e <sup>d</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo  $\omega$  -hi 1. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento. 54

**Figura 5:** Aberrações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* em diferentes concentrações da  $\omega$ -hidroxiemodina. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9  $\mu$ M);  $\omega$ - hi (1,7; 3,4 e 6,9  $\mu$ M). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA de dois caminhos), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN, <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP e <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo  $\omega$  -hi 0,5. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento. 55

**Figura 6:** Avaliação mutagênica da  $\omega$ -hidroxiemodina por micronúcleos em raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9  $\mu$ M);  $\omega$ - hi (1,7; 3,4 e 6,9  $\mu$ M). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA de dois caminhos), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN e <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento. 55

### CAPÍTULO II

**Figura 1:** Efeito citotóxico da  $\omega$ -hidroxiemodina pelo teste MTT em células. Os dados foram normalizados (porcentagem) para o grupo controle negativo. Cada concentração em

3 poços com  $1 \times 10^6$  células por replicata. CN: controle negativo; CP: doxorrubicina (6,9  $\mu\text{M}$ );  $\omega$ -hidroxiemodina (2,72; 5,45; 10,9; 21,8125; 43,625; 87,25; 174,5; 349  $\mu\text{M}$ ). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo (CN) e <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo (CP). 78

**Figura 2:** Efeito do  $\omega$ -hidroxiemodina pelo teste de exclusão azul de tripan em células S180. Os dados foram normalizados (porcentagem) para o grupo controle negativo. Cada concentração em 3 poços com  $1 \times 10^6$  células por replicata. CN: controle negativo; CP: doxorrubicina (6,9  $\mu\text{M}$ );  $\omega$ -hidroxiemodina (2,72; 5,45; 10,9; 21,8125; 43,625; 87,25; 174,5; 349  $\mu\text{M}$ ). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN e <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP. 79

**Figura 3:** Avaliação da proporção de apoptose e necrose entre grupos. Os dados foram normalizados quanto a (%) morte celular total de cada replicata dentro grupo. Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M de 3 experimentos independentes. CP: Doxorrubicina 6,9  $\mu\text{M}$ ;  $\omega$ -hi=  $\omega$ -hidroxiemodina. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância de duas vias (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com a apoptose do grupo CP e <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado com a necrose do grupo CP. 83

**Figura 4:** Correlação de *Pearson r* entre o índice de danos e o número de células apoptóticas e necróticas. Os valores representam o valor de *Pearson r* e de significância para  $P < 0,05$  e 0,0001. 84

## CAPÍTULO II

- Tabela 1:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , gHMBC e COSY da  $\omega$ -hidroxiemodina (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) 77
- Tabela 2:** Efeito do  $\omega$ -hidroxiemodina pelo teste de alamar blue em diferentes linhagens tumorais e não tumorais humanas. 80
- Tabela 3:** Avaliação da genotoxicidade do  $\omega$ -hidroxiemodina pelo ensaio cometa em células de S180. 80
- Tabela 4:** Danos citogenéticos induzidos por  $\omega$ -hidroxiemodina E doxorrubicina e  $\omega$ -hi em células de S180 por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. 82
- Tabela 5:** Avaliação da citotoxicidade da  $\omega$ -hidroxiemodina pelo índice de divisão nuclear (IDN), índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade (IDNC) e citostase em culturas de célula S180. 82

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
<b>2.1 Geral</b> .....	19
<b>2.2 Específicos</b> .....	19
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	20
<b>3.1 Câncer</b> .....	20
<b>3.2 Estresse Oxidativo</b> .....	21
<b>3.3 Fungos endofíticos de algas marinhas e potencial produção de moléculas bioativas para formulações farmacêuticas</b> .....	23
<b>3.4 Antraquinonas no tratamento do câncer</b> .....	24
<b>3.5 Biomarcadores toxicogenéticos</b> .....	25
3.5.1 Ensaio para estudos de viabilidade celular .....	25
3.5.2 Toxicidade/citotoxicidade em <i>Artemia salina</i> .....	26
3.5.3 Teste de <i>Allium cepa</i> .....	27
3.5.4 Teste cometa .....	27
3.5.5 Linhagens de células cancerígenas de Sarcoma 180 .....	28
3.5.6 Linhagens celulares .....	29
3.5.7 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) .....	29
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>Capítulo I</b> .....	42
<b>RESUMO</b> .....	43
<b>ABSTRACT</b> .....	44
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	45
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
<b>2.1 Solventes gerais e equipamentos básicos do isolamento da <math>\omega</math>-hidroxiemodina</b> .....	47
<b>2.2 Coleta da macroalga <i>Dichotomaria marginata</i></b> .....	47
<b>2.3 Isolamento e identificação do fungo endofítico</b> .....	47
<b>2.4 Obtenção do extrato acetônitrila do fungo <i>P. citrinum</i> (FMeCNDm) e isolamento da <math>\omega</math>-hidroxiemodina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</b> .....	47
<b>2.5 Caracterização do extrato por (CLAE)</b> .....	48
<b>2.6 Caracterização do extrato e da <math>\omega</math>-hidroxiemodina por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	49

2.7 Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....	49
2.8 Teste de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade em <i>Allium cepa</i> .....	49
2.6 Análise estatística .....	50
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
3.1 Elucidação química do $\omega$ -hidroxiemodina .....	51
3.2 Avaliação tóxica da $\omega$ -hidroxiemodina em <i>Artemia salina</i> .....	51
3.3 Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e em meristemas de raízes de <i>Allium cepa</i> .....	52
3.4 Avaliação genotóxica e mutagênica da $\omega$ -hidroxiemodina, em raízes de <i>Allium cepa</i> .....	54
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>
<b>Capítulo II</b> .....	<b>64</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>65</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>66</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>69</b>
2.1 Reagentes químicos para os ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade .....	69
2.2 Solventes gerais e equipamentos básicos do isolamento do $\omega$ -hidroxiemodina. ....	69
2.3 Coleta da macroalga <i>Dichotomaria marginata</i> .....	69
2.4 Isolamento e identificação do fungo endofítico .....	70
2.5 Obtenção do extrato acetronilia do fungo <i>P. citrinum</i> (FMeCNDm) e isolamento da $\omega$ -hidroxiemodina .....	70
2.6 Caracterização dos extratos da Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	70
2.7 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	71
2.8 Cultivo <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> de S180 .....	71
2.9 Linhagens celulares .....	72
2.10.1 MTT .....	72
2.10.2 Azul de tripan .....	72
2.10.3 Alamar blue .....	73
2.10 Avaliação genotóxica e mutagênica da $\omega$ -hidroxiemodina .....	73
2.10.1 Teste cometa .....	73
2.10.2 Teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) .....	74
2.11 Análise estatística .....	75

<b>3 RESULTADOS</b> .....	75
<b>3.1 Elucidação química da <math>\omega</math>-hidroxiemodina</b> .....	75
<b>3.2 Viabilidade celular da <math>\omega</math>-hidroxiemodina</b> .....	78
<b>3.2.1 Ensaio de citotoxicidade MTT</b> .....	78
3.2.2 Ensaio de exclusão com Azul de Tripán .....	79
3.2.3 Ensaio de alamar blue .....	80
<b>3.4 Avaliação de alterações nucleares, apoptoses e necroses <math>\omega</math>-hidroxiemodina em células de S180</b> .....	81
3.4.1 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) .....	81
<b>3.5 Correlação entre células apoptóticas e necróticas com índice e frequência de dano.</b> .....	84
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	85
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	89
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	95
<b>ANEXO A</b> .....	96
<b>ANEXO B</b> .....	97



**Avaliação toxicogenética do  $\omega$ -hidroxiemodina isolada de fungos endofíticos de algas marinhas para formulações antitumorais. JOSÉ VICTOR DE OLIVEIRA SANTOS.**

Orientadora: Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 102p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2017.

### RESUMO

O câncer é uma patologia genética que tem como base as alterações ao material genético que podem culminar em mutações, principalmente em genes envolvidos no ciclo de divisão celular. A busca por novos fármacos ainda é alternativa para as terapias do câncer, uma vez que ainda existem controvérsias sobre os efeitos dos quimioterápicos em células não tumorais. Assim, os estudos com metabólitos de fungos derivados de algas marinhas continuam a ser uma fonte prolífica de compostos bioativos devido suas diversas propriedades farmacológicas. O estudo teve por objetivo a avaliação toxicogenética e antitumoral da  $\omega$ -hidroxiemodina obtida do fungo *Penicillium citrinum* isolado da alga marinha *Dichotomaria marginata*, com aplicação de biomarcadores citogenéticos. A citotoxicidade, toxicidade e mutagenicidade da  $\omega$ -hidroxiemodina foi avaliada nas concentrações de 1,7; 3,4 e 6,9  $\mu$ M em *Artemia salina* e *Allium cepa*, tendo como controle positivo o sulfato de cobre (6,9  $\mu$ M). Estudos de atividades antitumorais foram feitos em células de Sarcoma 180, linhagens leucêmicas, adenocarcinoma gástrico, melanoma e fibroblastos de pulmão. Em Sarcoma 180 foram avaliados os parâmetros citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade e apoptoses com aplicação dos testes cometa e de micronúcleos com bloqueio de citocinese. A CL50 em 24 h em *A. salina* foi de 4,6  $\mu$ M e em 48 h de 3,6  $\mu$ gM/mL. A elevada toxicidade observada em náuplios de *A. salina* assim como a inibição concentração dependente de mitose em *A. cepa* apontam apenas para toxi/citotoxicidade da  $\omega$ -hidroxiemodina, fato que contribui para a não significância das alterações cromossômicas e formação de micronúcleos em meristemas de raízes de *A. cepa*. A CI50 da  $\omega$ -hidroxiemodina foi de 6,068  $\mu$ M (Sarcoma 180), 16,55  $\mu$ M (linhagens leucêmicas), 2,93  $\mu$ M (adenocarcinoma gástrico), 4,51  $\mu$ M (melanoma) e 12,99  $\mu$ M (fibroblastos de pulmão). Mecanismos citogenéticos podem ser sugeridos para Sarcoma 180, tais como indução de genotoxicidade, alterações nucleares do tipo broto, pontes nucleoplasmáticas e micronúcleos, bem como por morte celular (apoptose e necrose) com baixos índices de divisão nuclear, com e sem morte celular. Os dados sugerem que a  $\omega$ -hidroxiemodina apresenta mecanismos citogenéticos indicativos de compostos antitumorais, a exemplo da doxorubicina e pode ser testada em formulações farmacêuticas para a terapia oncológica.

**Palavras-chave:** Toxicogenética. *Penicillium citrinum*. Genotoxicidade. Mutagenicidade.



## ABSTRACT

Cancer is a genetic pathology that is based on changes in genetic material that can culminate in mutations, especially in genes involved in the cell division cycle. The search for new drugs is still an alternative for cancer therapies, as there are still controversies about the effects of chemotherapy in non-tumor cells. Thus, studies with fungal metabolites derived from marine algae continue to be a prolific source of bioactive compounds because of their diverse pharmacological properties. The objective of the study was the toxicogenic and antitumor evaluation of the  $\omega$ -hydroxyemodin obtained from the fungus *Penicillium citrinum* isolated from the seaweed *Dichotomaria marginata*, with application of cytogenetic biomarkers. The cytotoxicity, toxicity, and mutagenicity of  $\omega$ -hydroxyemodin were evaluated at concentrations of 1.7; 3.4 and 6.9  $\mu\text{M}$  / mL in *Artemia salina* and *Allium cepa*, with copper sulfate (6.9  $\mu\text{M}$ /mL) as positive control. Studies of antitumor activities were performed on Sarcoma 180 cells, leukemic lines, gastric adenocarcinoma, melanoma, and lung fibroblasts. In Sarcoma 180 the cytogenetic parameters indicative of genotoxicity, mutagenicity and apoptosis were evaluated using comet and micronuclei tests with cytokinesis blockade. The LC50 in 24 h in *A. salina* was 4.6  $\mu\text{M}$ /mL and in 48 h of 3.6  $\mu\text{M}$ /mL. The high toxicity observed in *A. salina* nauplii as well as the concentration-dependent inhibition of mitosis in *A. cepa* indicate only toxic / cytotoxicity of  $\omega$ -hydroxyemodin, a fact that contributes to the non-significance of chromosomal alterations and the formation of micronuclei in meristem roots of *A. cepa* strain. The IC50 of  $\omega$ -hydroxyemodin was 6,068  $\mu\text{M}$ /mL (Sarcoma 180), 16,55  $\mu\text{M}$ /mL (leukemic lines), 2,93  $\mu\text{M}$ /mL (gastric adenocarcinoma), 4.51  $\mu\text{M}$  /mL (melanoma), and 12,99  $\mu\text{M}$ /mL (lung fibroblasts). Cytogenetic mechanisms may be suggested for Sarcoma 180, such as genotoxicity induction, nucleus-type changes, nucleoplasmic bridges and micronuclei, as well as cell death (apoptosis and necrosis) with low nuclear division rates, with and without cell death. The data suggest that  $\omega$ -hydroxyemodin exhibits cytogenetic mechanisms indicative of antitumor compounds, such as doxorubicin and can be tested in pharmaceutical formulations for cancer therapy.

**Keywords:** Toxicogenetics; *Penicillium citrinum*; Genotoxicity; Mutagenicity



## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma patologia complexa e multifatorial e sua etiologia provém de mutações genéticas que causam incapacidade de controlar a proliferação celular, perda de resposta aos fatores de inibição do crescimento, evasão de mecanismos de morte celular como a apoptose, capacidade de invasão de outros tecidos corporais e produção de novos vasos sanguíneos (HERCOS et al., 2014). Em 2015, havia 17,5 milhões de casos de câncer em todo o mundo. Entre 2005 e 2015, os casos de câncer aumentaram 33%. Para os homens, o câncer mais comum em todo o mundo foi câncer de próstata (1,6 milhão de casos). O traumatismo traqueal, bronco e pulmonar foi a principal causa de morte por câncer em homens (1,2 milhão de mortes). Para as mulheres, o câncer mais comum foi câncer de mama (2,4 milhões de casos). O câncer de mama também foi a principal causa de morte por câncer para mulheres (523 000 mortes) (FITZMAURICE et al., 2017).

Os mecanismos das drogas antitumorais são diversos, estas agem diretamente sobre alguma vulnerabilidade celular como o desequilíbrio do estresse oxidativo tumoral; citotoxicidade celular por indução de morte celular, apoptose, necrose e autofagia; e a interferência sobre as etapas do ciclo celular das células cancerígenas são exemplos dos principais efeitos pró-oxidantes de antineoplásicos (MÖHLER; PFIRMAN; FREI, 2014). No entanto, as atuais estratégias preventivas, clínicas e de pesquisa não foram suficientes para enfrentar os desafios causados por essa patologia (MENDELSON; RINGBORG; SCHILSKY, 2012).

O custo médio empregado no desenvolvimento de uma nova droga para o tratamento do câncer passando por todos os estágios chega a cerca de 1,042 bilhão de dólares, em 2006 (ADAMS; BRANTNER, 2006) e 1,3 bilhão de dólares em 2007 (DIMASI; GRABOWSKI, 2007), nesse cenário existe a necessidade da exploração para o desenvolvimento de novos compostos para o tratamento do câncer de forma mais produtiva e sustentável financeiramente. Enquanto fontes terrestres de produtos farmacêuticos e bioquímicos foram consideravelmente exploradas, menos de um por cento das espécies marinhas têm sido examinadas para a produção dos novos produtos químicos, portanto substâncias vindas do ambiente marinho representam uma grande fonte de substâncias bioativas com uma vasta gama da sua aplicabilidade principalmente para o desenvolvimento de novos medicamentos na indústria farmacêutica (MOLINSKI et al., 2009; BLUNT et al., 2011).

Nas últimas décadas, cerca de 60% das drogas utilizadas em hematologia e oncologia foram originalmente derivadas a partir de fontes naturais, e um terço dos agentes mais vendidos



são ou agentes ou derivados naturais (SINGH et al., 2008). Entre todos os produtores de moléculas naturais conhecidas, os fungos representam uma rica fonte de metabólitos biologicamente ativos com larga aplicação como agroquímicos, antitumorais, antiparasitários, imunossupressores entre outros. Estima-se que apenas 1% das bactérias e 5% dos fungos encontrados nos solos são conhecidos, indicando a possibilidade de se encontrarem milhares de espécies ainda desconhecidas. Estes microrganismos são encontrados na Antártida, Ártico, Alpes, desertos, regiões áridas, vulcânicas e solos férteis ou inférteis, englobando assim todo planeta abrangendo todos os ecossistemas, independentemente de suas condições geográficas ou climáticas (LEPTOKARYDIS, 2008).

Os microrganismos marinhos atraíram uma atenção considerável como fontes importantes de metabólitos secundários estruturalmente diversos e como pistas potenciais para a descoberta de drogas. O *Penicillium citrinum* se mostra uma fonte importante de metabólitos secundários estruturalmente diversos e como pistas potenciais para a descoberta de drogas (CHEN et al., 2011). O *Penicillium citrinum* já foi isolado da espécie *Dichotomaria marginata* (DE ANDRADE et al., 2014) que é uma macroalga vermelha que pertence à ordem Nemaliales, classe *Florideophyceae* e família *Galaxauraceae*. Existem poucos estudos químico-farmacológicos para esta espécie, geralmente limitados a estudos taxonômicos para esta alga. (ROZAS et al., 2008), no entanto frações hexânicas dessa alga obtiveram substâncias com potencial citotóxico (LIAO et al., 2003).

Mesmo com o isolamento e obtenção de novos compostos naturais a investigação dos efeitos e genotóxicos e mutagênicos em substâncias aromáticas heterocíclicas com em ensaios de genotoxicidade é indispensável. É de importância crítica a avaliação de danos ao DNA visto que o desenvolvimento do câncer pode decorrer de agentes genotóxicos (KASSIE et al., 2001), no entanto este mesmo processo constitui uma das bases para o tratamento do mesmo (BASANG et al., 2016). O  $\omega$ -hidroxiemodina, sustância isolada no presente estudo, já demonstrou em estudo prévio atividade antitumoral contra linhagens cancerígenas de pulmão (A-549), mama (MCF-7), colorretal HT-29 além inibição da proteína tirosina quinase (PTK), que pode desempenhar um papel importante na inibição do crescimento de células tumorais (KIM et al., 1997), como observado na piora do prognóstico de pacientes com câncer de mama que tinham o nível dessa proteína elevado (GÄRTNER et al., 2014).

O principal problema com o tratamento com antineoplásicos e a sua pouca seletividade a células tumorais, com a indução de danos ao DNA, dentre eles danos oxidativos, mutações genéticas e aberrações cromossômicas (NAITO et al., 2015), o que gera uma alta toxicidade em

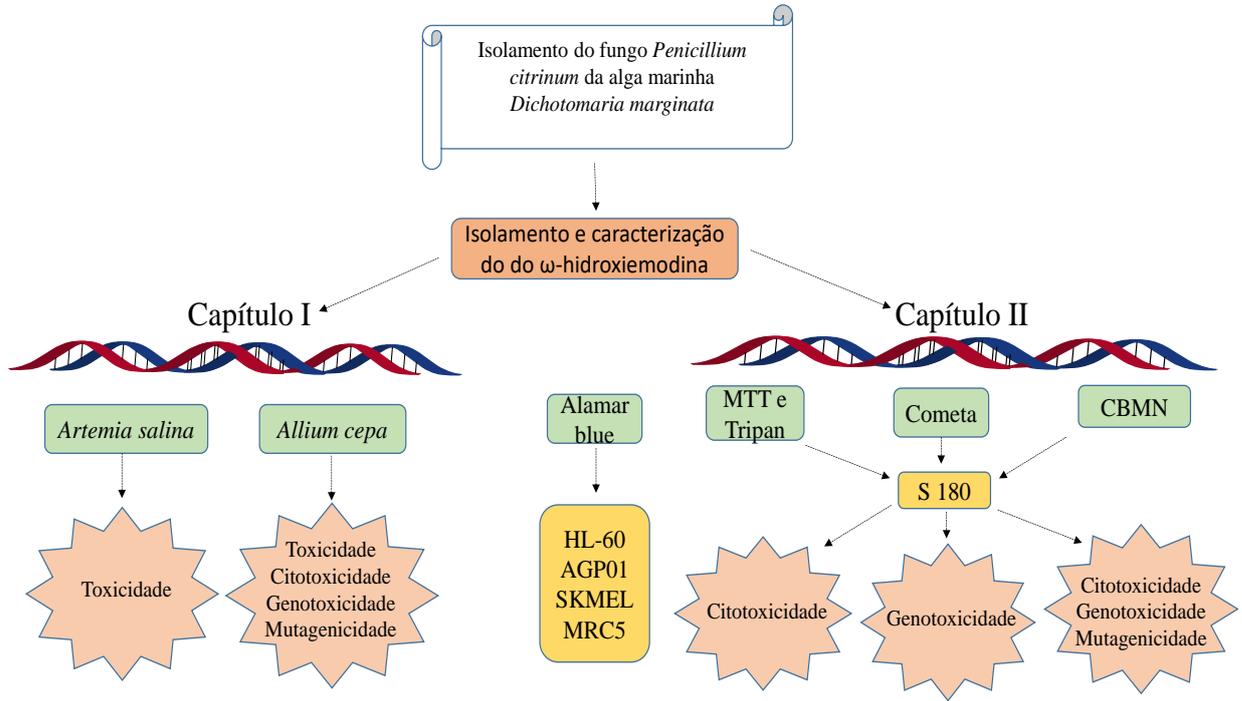


tecidos normais e órgãos, levando ao processo de estresse oxidativo (ROY; CHAKRABORTY; BHATTACHARYA, 2014).

Portanto, o biomonitoramento dos danos oxidativos, nucleares e genotóxicos de produtos naturais e/ou sintéticos, manipulados/ingeridos pelo homem é de fundamental importância para a liberação de substâncias para o uso terapêutico. Neste contexto, ensaios não-clínicos com organismos inferiores como *Artemia salina*, *Allium cepa* e o uso de linhagens de células cancerosas proporcionam um meio alternativo para o teste de drogas e produtos químicos (DOKE; DHAWALE, 2015).

Tendo em vista a necessidade de compreender os possíveis efeitos tóxicos, citogenéticos e genotóxicos do  $\omega$ -hidroxiemodina, o presente trabalho objetivou seu isolamento e elucidação bem como avaliar os efeitos tóxicos em *Artemia salina*, *Allium cepa*; citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos através do estudo em *Allium cepa* e células tumorais de Sarcoma 180 (S180) e linhagens leucêmica (HL-60), adenocarcinoma gástrico (AGP01), melanoma (SKMEL-28) e fibroblastos de pulmão (MRC5) (**Figura 1**). A dissertação compreende um estudo não-clínico com isolamento e elucidação do  $\omega$ -hidroxiemodina e sua avaliação frente a ação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica por meio de tratamentos em náuplios de *Artemia salina* e raízes de *Allium cepa* (**Capítulo I**); Assim como os efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico do  $\omega$ -hidroxiemodina em linhagens tumorais de Sarcoma 180, leucêmica (HL-60), adenocarcinoma gástrico (AGP01), melanoma (SKMEL-28) e fibroblastos de pulmão (MRC5) (**Capítulos II**).

**Figura 1.** Divisão esquemática do corpo da dissertação





## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Avaliar os efeitos toxicogénéticos e antitumorais  $\omega$ -hidroxiemodina isolada do fungo endofítico *Penicillium citrinum*, extraído da alga *Dichotomaria marginata*, com aplicação de biomarcadores citogenéticos em estudos não clínicos.

### 2.2 Específicos

- Realizar o isolamento e caracterização do  $\omega$ -hidroxiemodina obtida do *Penicillium citrinum*, extraído da alga *Dichotomaria marginata*;
- Determinar a toxicidade aguda empregando o microcrustáceo *Artemia salina*;
- Avaliar a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da  $\omega$ -hidroxiemodina isolada do fungo endofítico *Penicillium citrinum*, extraído da Alga *Dichotomaria marginata*) por meio do teste *Allium cepa*;
- Avaliar a viabilidade celular da  $\omega$ -hidroxiemodina em células de Sarcoma 180 e linhagens tumorais de leucêmica (HL-60), adenocarcinoma gástrico (AGP01), melanoma (SKMEL-28) e fibroblastos de pulmão (MRC5).
- Avaliar a atividade antitumoral da  $\omega$ -hidroxiemodina em células de Sarcoma 180 por mecanismos citogenéticos indicativas de genotoxicidade, alterações nucleares (brotos, pontes nucleoplasmáticas, micronúcleo), apoptose e necrose.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Câncer

O câncer é definido como o crescimento descontrolado de células, que podem invadir e se espalhar para locais distantes do corpo, pode ter consequências graves para a saúde, e é uma das principais causas de morte a nível mundial. É causado, na maioria dos casos, por mutação ou ativação anormal dos genes que controlam o crescimento celular (LOURO, 2000), resultando em modificações progressivas da biologia celular caracterizadas por alterações na proliferação, diferenciação e na interação das células com o meio extracelular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000). Pulmão, próstata, colorretal, estômago e câncer de fígado são os tipos mais comuns de câncer em homens, enquanto mama, colorretal, pulmão, colo uterino e câncer de estômago são os mais comuns entre as mulheres (WHO, 2017).

O câncer é uma patologia genética, ou seja, pode ser repassada a uma célula normal por meio da transferência de genes tumorais. As alterações que geram mutações são causadas por agentes físicos e químicos do meio ambiente ou produtos da própria célula levando ao processo de carcinogênese em três estágios (iniciação, promoção e progressão), gerando um acúmulo de mutações no DNA, principalmente em genes envolvidos na ordem dos eventos do ciclo de divisão celular, nos que são responsáveis por consertar erros de replicação do material genético ou diferenciação celular (BELIZÁRIO, 2002).

Mesmo na ausência de qualquer exposição significativa de agentes exógenos, as células de mamífero acabam mantendo milhares de lesões no DNA pró-mutagênicas todos os dias, onde atividades metabólicas normais estão associadas com a hidrólise, desaminação, alquilação, e oxidação, acabando por infligir danos as bases nitrogenadas, quebras de cadeia simples, rupturas de filamentos duplos e entre cadeias de ligação cruzada (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006). Nesse sentido o reparo dos erros ou a apoptose são necessários para manter a integridade do material genético, na ausência ou perda da capacidade de reparo a essas atividades há resultados genotóxicos (KLAPACZ et al., 2016). Células que que acumulam vários danos no DNA e não entram em apoptose acabam por perpetuar os danos quando há replicação de seu material genético gerando um processo que resulta em câncer.

Com o crescente aumento populacional e o envelhecimento contínuo da população, o perfil epidemiológico do câncer tem sofrido alterações, afetando significativamente o impacto das neoplasias no cenário mundial (VERAS; 2007). O estilo de vida da sociedade moderna contribui para aumentar a exposição da população a alguns fatores ambientais, nutricionais,



químicos e hormonais potencialmente carcinogênicos (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

Essa patologia se tornou um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, causando mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (INCA, 2017).

### 3.2 Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelas espécies reativas do oxigênio (ROS) tem sido chamado de estresse oxidativo (PYLVAS et al., 2010), mas pode ser definido também como uma consequência de um aumento da geração de radicais livres e/ou redução da atividade fisiológica das defesas antioxidantes contra os radicais livres (HASTY et al., 2003; POLJSAK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). Quando ROS e as espécies reativas do nitrogênio (RNS) excedem as capacidades de desintoxicação, pode ocorrer danos oxidativos em lipídeos, ácidos nucleicos, proteínas. Se este dano for irreparável, a célula vai sofrer morte celular, sob a forma de quer a apoptose (morte celular programada), ou necrose, dependendo da extensão do dano.  $\text{OH} \cdot$  é o ROS mais reativa para a DNA, e pode danificar o DNA via abstração H ou adição alceno (COOKE et al., 2003; PORTO et al., 2015).

A produção de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas (BARBOSA et al., 2010; GARCIA-SOUZA; OLIVEIRA, 2014). A contínua produção de radicais livres em processos metabólicos resulta no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante que tem o objetivo de limitar os níveis intracelulares de radicais livres e controlar a ocorrência de danos decorrentes (BARBOSA et al., 2010).

Espécies reativas são formados em concentrações fisiológicas e degradada durante o metabolismo aeróbico normal nas células. No entanto, o aumento da produção ou descontrolada destas espécies pode resultar em danos oxidativos de biomoléculas, tais como lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico, interrompendo assim a função celular podendo induzir apoptose ou necrose (GARCIA-SOUZA; OLIVEIRA, 2014). O processo de estresse oxidativo



leva a resultados que podem ser bastante danosos às células, variando bastante entre organismos, tipos celulares e até mesmo entre células de um mesmo tecido, devido a diversificada capacidade antioxidante das células (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006). Há evidências de que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo de fator de risco/patogênico (GRAHAME; SCHLESINGER, 2012), estando envolvido em mais de 100 doenças, como a sua causa ou a consequência (GILKA et al., 2007; POLJŠAK et al., .2011). Existem diversos mecanismos que podem levar à carcinogênese, um deles é a produção excessiva de radicais livres e espécies reativas de oxigênio está associada a danos na fita ou alterações nas bases nitrogenadas ou, ainda, modificações de desoxirribose, podendo gerar danos como apoptose e mutações (BERTOLOZZO et al., 2010).

O estresse oxidativo acelera a erosão dos telômero e promove o envelhecimento biológico. O encurtamento do telômero em si parece ser uma causa de aumento das taxas de morbidade e mortalidade, tanto diretamente como a função do tecido normalmente declina gradualmente e, indiretamente, com o acúmulo de células senescentes acelerando o desenvolvimento de patologias (GRAHAME; SCHLESINGER, 2012). Em condições normais, as mitocôndrias desencadeiam sinalização redox na célula através da liberação de espécies reativas de oxigênio da cadeia de transporte de elétrons. Sob condições fisiopatológicas, a geração de espécies reativas do oxigênio das mitocôndrias também pode contribuir para o início do câncer, bem como, para uma amplificação do fenótipo das células tumorais. Ao mesmo tempo, os as espécies reativas do oxigênio geradas nas mitocôndrias podem tornar as células tumorais vulneráveis, principalmente, a terapias que enfatizam sua capacidade de regular a homeostase redox, abrindo oportunidades para o tratamento do câncer (SABHARWAL; SCHUMACKER, 2014).

Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas. Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

A utilização de métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante ou quantificação de antioxidantes específicos em matrizes complexas como extratos vegetais, frutas e alimentos em geral, pode ser justificado pela relevância comercial e farmacológica,



bem como pela necessidade de metodologias mais simples e baratas (PALANISAMY et al, 2011). Esses testes têm se tornado ferramentas de grande importância como auxiliares na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de matéria-prima para estudo. Devido à crescente busca por substâncias bioativas que substituam os produtos sintéticos e diminuam os efeitos colaterais, um grande número de testes *in vitro* tem sido desenvolvido para avaliar a atividade antioxidante de compostos (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

### **3.3 Fungos endofíticos de algas marinhas e potencial produção de moléculas bioativas para formulações farmacêuticas**

Existe a necessidade de desenvolver novas substâncias para o tratamento de doenças humanas graves, tais como o câncer, infecções microbianas e doenças neurológicas. O desenvolvimento de drogas derivadas de produtos naturais tornou-se uma estratégia altamente promissora para a identificação de novos agentes antitumorais (GARCIA et al., 2015). Organismos marinhos proporcionam potencialmente uma fonte rica de substâncias, o que apoia a pesquisa intensiva para as novas substâncias de organismos marinhos (IMHOFF; LABES; WISE, 2011). A exploração de produtos naturais marinhos pode ser considerada recente datando à década de 1960 com o foco para a descoberta de medicamentos na década de 1980. Esse ambiente tem sido uma fonte de mais de 20000 produtos naturais descobertos nos últimos 50 anos, mas devido a gama de ensaios biológicos ser tão grande ainda há muito o que ser descoberto sobre esses produtos (GERWICK; FENNER, 2013).

A busca por novos medicamentos em produtos naturais bioativos ainda é a principal forma de adquiri-los, sendo assim procura por metabólitos secundários de microrganismos isolados de ambientes ecológicos específicos podem aumentar a chance de encontrar compostos com novos esqueletos e bioatividades variadas (WANG et al., 2013), principalmente devido a situações específicas que estes microrganismos se encontram, podem ativar alguns genes silenciosos e induzir algumas vias biosintéticas originais (BRACHAGE; SCHROECKH, 2011). Devido ao seu habitat, fungos marinhos se tornaram um importante recurso para encontrar diversos compostos biologicamente ativos. (BUGNI; IRELAND, 2004; LU et al., 2008).

Os fungos derivados de algas marinhas continuam a ser uma fonte prolífica para a descoberta de diversos metabólitos secundários com diversas atividades biológicas (BLUNT et al., 2008; BLUNT et al., 2009). Metabolitos de fungos secundários, ou produtos naturais, são conhecidos por possuir propriedades farmacológicas potentes e têm sido muito utilizados para medicamentos humanos (GERWICK; FENNER, 2013). Historicamente produtos naturais de fungos e metabólitos secundários tem sido uma rica fonte de compostos biologicamente ativos



(CAO et al., 2010; CAO; CLARDY, 2011) tais como antibióticos, antimicrobianos, antioxidantes (PARANJAPÉ et al., 2014), anticâncer, e antiparasitária (SCHUEFFLER; ANKE 2014). Os fungos endofíticos possuem uma capacidade de metabolizar constituintes químicos da planta hospedeira, produzindo novos produtos químicos que podem ser utilizados diretamente como drogas ou fonte de novos produtos naturais bioativos (LIU et al., 2016).

O *Penicillium* é um dos fungos mais comuns que ocorrem numa variada gama de ambientes, a vegetação do solo para o ar, ambientes interiores e vários produtos alimentares, com uma distribuição mundial e um grande impacto econômico sobre a vida humana (VISAGIE et al., 2014). *Penicillium* é um gênero muito difundido nos biótopos marinhos. Parece se ajustar facilmente a condições múltiplas e ser uma fonte de novos compostos. As moléculas mais vulgarmente representadas nas estirpes terrestres são emodina e seus derivados, rugulosina, luteosquirina, carviolina e crisofanol (FOUILLAND et al., 2016). A espécie *Penicillium citrinum* é um fungo filamentosamente comum que ocorre com uma distribuição mundial e pode muito bem ser um dos mais comumente ocorrem as formas de vida na Terra eucarióticas (PITT, 1979). Uma de suas características principais é a produção de citrinina uma micotoxina altamente nefrotóxica, hepatotóxica, imunotóxica e carcinogênica (FLAJS; PERAICA, 2009).

### 3.4 Antraquinonas no tratamento do câncer

As antraquinonas, tanto naturais quanto sintéticas, se constituem como uma classe importante de compostos com uma vasta área de aplicações. As plantas contendo antraquinona, por exemplo, ruibarbo e aloe, foram conhecidas e usadas por mais de 4000 anos na medicina popular (MALIK; MÜLLER, 2016). Derivados de antraquinona biologicamente ativos também foram identificados em bactérias (BONADONNA et al., 1969) fungos (GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2013). As antraquinonas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (KOWN et al., 2009; CARO et al., 2012; MALIK; BAQI; MÜLLER, 2015). Há décadas ocorrem debates sobre a carcinogenicidade das antraquinonas em laxantes (HUANG et al., 2007). Devido à sua estrutura química planar, foram postuladas várias antraquinonas para poder intercalar em DNA (HUANG et al., 2007). Estudos também sugerem uma ligação não-covalente das antraquinonas com o DNA (MUELLER; LUTZ; STOPPER, 1998; GHOSH et al., 2013).

Exemplos de derivados de antraquinona que são utilizados na prática clínica incluem antraciclina e medicamentos anticancerígenos relacionados como as hidroxiantraquinonas (MALIK; MÜLLER, 2016). As antraciclina são uma classe importante de drogas

anticancerígenas com alta potência contra uma variedade de neoplasias malignas sólidas e hematológicas. Estruturalmente, eles são caracterizados por um sistema de anel tetracíclico fundido à base de antraquinona, que normalmente está ligado a um amino-açúcar. Com a descoberta da daunorrubicina no início dos anos 1960, isolada de *Streptomyces peucetius* como o primeiro antibiótico antraciclina com uma marcada atividade anticancerígena em humanos, um grande número de análogos naturais, semissintéticos e sintéticos foram avaliados quanto às suas propriedades biológicas e clínicas. Várias antraquinonas são utilizadas na clínica como antineoplásicos dentre elas estão a daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina, mitoxantrone, pixantrone (MINOTTI et al., 2004).

Estudos sugerem que vários grupos substituintes contribuições destes hidroxiantraquinonas naturais para a atividade anticancerígenas. Acredita-se que os grupos hidroxil desempenham um papel importante ao oferecer ligações de hidrogênio com macromoléculas biológicas, tais como proteínas (ZHANG et al., 2010). Ao mesmo tempo, a quantidade e localização de grupos hidroxil são fundamentais para a atividade das antraquinonas (HUANG et al., 2009). Já foram observados efeitos diretos de hidroxiantraquinonas na inibição indireta da atividade catalítica da topoisomerase II (HSIAO et al., 2008; HWANGBO et al., 2012), o que poderia contribuir para a genotoxicidade induzida por antraquinonas além da indução da apoptose através da liberação do fator indutor da apoptose e do citocromo C das mitocôndrias, seguido da ativação da caspase-3 e posterior fragmentação do DNA (LIN; UEN, 2010).

### **3.5 Biomarcadores toxicogenéticos**

#### **3.5.1 Ensaios para estudos de viabilidade celular**

O ensaio com MTT é um dos testes mais populares para avaliar a atividade de potenciais compostos antitumorais potenciais, e ele também é o ensaio mais popular para examinar interações compostos. Esse Foi criado e descrito por Mosmann em 1983 (ŚLIWKA et al., 2016). O ensaio baseia-se no pressuposto de que a redução do sal de tetrazólio MTT para formazan que ocorre nas mitocôndrias de células vivas devido à atividade das desidrogenases mitocondriais (em particular, succinato desidrogenase). No entanto, a precisão do ensaio tem sido debatida ao longo dos anos. O ensaio de MTT é significativamente influenciada por compostos que modificam o metabolismo das células, aumentando o nível de NADPH ou a actividade de LDH (*lactato desidrogenase*) (WANG; HENNING; HEBER, 2010). Além disso,



o MTT pode ser reduzido não somente nas mitocôndrias, mas também dentro do citoplasma, na superfície da célula, endossoma ou lisossoma membranas, ou mesmo no ambiente extracelular (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; WANG; HENNING; HEBER, 2010). Os fatores que influenciam o processo de redução incluem a fase atual de crescimento, a fase do ciclo celular, e as condições de reação, tais como o pH e a concentração de D-glicose (ŚLIWKA et al., 2016).

Devido aos possíveis erros, utilizando um único ensaio está associada com o risco de interpretação errada, portanto existe a necessidade do uso de diferenças métodos de ensaio de viabilidade celular / proliferação e de citotoxicidade (por exemplo, XTT, MTT, Alamar azul, azul de Tripán, e CellTiter-Glo (UZONOGLU et al., 2010). Atualmente, vários métodos são usados simultaneamente para examinar a atividade antitumoral de um composto (PUTNAM; BOMBICK; DOOLITTLE, 2002; WANG; HENNING; HEBER, 2010). O Alamar Blue (Rezasurina) é um corante usado para medir a viabilidade celular baseado no metabolismo celular. A Rezasurina de cor azul é facilmente convertida na forma reduzida de cor rosa altamente fluorescente (Resofurina). Apenas as células com metabolismo ativo (células viáveis) convertem o composto para a forma fluorescente. Portanto, a conversão da rezasurina à resofurina reflete a viabilidade celular e pode ser quantificada pela leitura da fluorescência com um comprimento de onda de excitação/emissão de 465/540 nm (NAKAYAMA et al., 1997).

### 3.5.2 Toxicidade/citotoxicidade em *Artemia salina*

A *Artemia salina* é um organismo regulador hipo / hiper-osmótico capaz de manter as concentrações de íons de hemolinfa, dentro de limites estreitos sobre uma gama de salinidade externa de NaCl a 0,26% em ambientes supersaturados (ATES et al., 2013). A principal razão pela qual este microcrustáceo de água salgada é amplamente utilizado para testar a toxicidade é devido à disponibilidade comercial de ovos dormentes, os quais são colhidos em grandes quantidades em lagos de sal (ARCANJO et al., 2012) onde estes ficam viáveis longos períodos de tempo (anos) e são, portanto, uma excelente fonte biológica para bioensaios rápidos, simples e baratos (MAYORGA et al., 2010).

Vários autores tentaram correlacionar a toxicidade da *Artemia salina* utilizando outras atividades, tais como antifúngicos, antiviral e antimicrobiana (MACBAE et al., 1988), antiparasitária (SAHPAZ et al., 1994), antitripanossoma (ZANI et al., 1995), antiplasmódica (DO AMARANTE et al., 2011), antitumoral (MEYER et al., 1982; MCLAUGHLIN; ROGERS, 1988; NUNES et al., 2009; ARCANJO et al., 2012) entre os outros, incluindo o estudo de correlação entre o crescimento e a defesa química associada a biocompostos de



plantas medicinais (ALMEIDA-CORTEZ et al., 2004), além da possibilidade de investigar a ecotoxicidade de nanomateriais em ecossistemas marinhos (ATES et al., 2013). Esse bioensaio de letalidade demonstra a possibilidade de correlacionar a toxicidade com diversas atividades farmacológicas viabilizando uma prévia avaliação da segurança de compostos naturais e sintéticos com um baixo custo, boa reprodutibilidade e resultados rápidos.

### 3.5.3 Teste de *Allium cepa*

O uso de *Allium cepa* como sistema de teste foi introduzido por Levan (1938) demonstrando distúrbios no fuso mitótico devido ao uso de colchicina, com posterior adaptações realizadas por Fiskesjö (1985) com o objetivo de tornar esse um organismo para monitoramento ambiental, no entanto o teste permite uma avaliação mais abrangente de produtos químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O sistema teste de *Allium cepa* é um excelente parâmetro de análise citotóxica, para a observação da ocorrência de alterações cromossômicas no ciclo celular de *Allium cepa* (AMARAL et al., 2007; FACHINETTO; TEDESCO, 2009). Testes biológicos de mutagenicidade com plantas tem como objetivo verificar a frequência de micronúcleos, aberrações cromossômicas e alterações no índice mitótico nas células do meristema radicular (MELLO et al., 2004). Este teste é de baixo custo, é fácil de usar e produz resultados semelhantes aos ensaios em animais por causa da semelhança em suas composições genéticas, daí mesma resposta aos agentes mutagênicos. As células de *Allium cepa* possuem cromossomos metacêntricos permitindo uma melhor avaliação microscópica (AKINBORO et al., 2011).

As aberrações cromossômicas identificadas no ensaio são indicativas de genotoxicidade (RANK; NIELSEN, 1993), enquanto que a avaliação mutagênica foi proposta via a contagem de micronúcleos, indicador mais efetivo e mais simples de danos citológicos (MA et al., 1995), visto que tanto os fragmentos quanto cromossomos inteiros podem ser reincorporados no núcleo principal durante o ciclo celular (FENECH et al., 2002).

### 3.5.4 Ensaio cometa

O teste tradicionalmente utiliza suspensões de células, que são incorporados em agarose sobre uma lâmina e levada ao microscópio. As células são expostas a lise por exposição a soluções de detergente e sal elevado (AZQUETA et al., 2009) permitindo a remoção de membranas e componentes celulares solúveis, deixando um DNA nucleóide super-enrolado



(AZQUETA et al., 2011). Após serem submetidas a eletroforese, os fragmentos de DNA migram para o ânodo, formando a cauda do cometa, onde a quantidade de quebras na cadeia é em geral proporcional à quantidade de DNA na cauda, respectivamente, para o DNA remanescente na cabeça (HOVHANNISYAN, 2010).

O teste cometa continua a ser uma técnica importante no campo de pesquisa para decifrar mecanismos genéticos processos relacionados com danos no DNA / reparação subjacentes. Esta técnica pode ser utilizada como uma técnica e sensível para avaliar os danos de DNA induzidos por condições de estresse (SANTOS; POURRUT; OLIVEIRA, 2015).

É um teste com alta sensibilidade para detectar genotoxicidade, isso significa que ele pode detectar ampla variedade de compostos com potencial genotóxico desconhecido e que o ensaio pode detectar um nível baixo de genotoxicidade de compostos genotóxicos já conhecidos afim de evitar resultados falso negativos (KAWAGUCHI et al., 2010). Uma das vantagens mais importantes do ensaio do cometa é que os danos do DNA podem ser medidos em qualquer tipo de célula (SASAKI et al., 2000; DE LAPUENTE et al., 2015).

### 3.5.5 Linhagens de células cancerígenas de Sarcoma 180

Sarcomas representam 1% de todas as doenças malignas em adultos em todo o mundo. Estes tumores raros são originários a partir de células mesenquimais em diferentes áreas do corpo. A doxorrubicina demonstrou prolongamento da sobrevivência de pacientes com sarcomas avançados. No entanto, a limitação mais importante na utilização de doxorrubicina é o efeito adverso da cardiotoxicidade (QUINTANA et al., 2017).

Os sarcomas são um grupo heterogêneo de neoplasias mesenquimais que podem ser divididos em dois tipos gerais: sarcoma ósseo primário e sarcoma de tecido mole (SKUBITZ; D'ADAMO, 2007). Sarcoma ósseo primário inclui principalmente osteossarcoma, sarcoma de Ewing e condrossarcoma; sarcoma dos tecidos moles incluem principalmente leiomiossarcoma, sarcoma sinovial, rabdomiossarcoma e lipossarcoma. Sarcoma de tecido ósseo e mole pode ocorrer em todas as faixas etárias, e a incidência tem aumentado nos últimos 30 anos (YOUNG et al., 2014).

O sarcoma 180 é bastante utilizado em estudos experimentais com taxa de disseminação e índice de proliferação determinados, permitindo o estudo comparativo no uso de substâncias potencialmente tóxicas. O transplante de suas células é realizado, em animais, via inoculação



subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, com crescimento em até 100% dos casos, no qual pode ocorrer regressão natural em 8 a 10% (WAL et al., 2003).

### 3.5.6 Linhagens celulares

O estabelecimento de técnicas para manter e crescer as células *in vitro* são um marco importante nas ciências biológicas, desde a sua introdução em 1912 métodos foram desenvolvidos para cultura, expansão, diferenciação de células (MEHLING, 2014). Muitos países já dispõem de legislação e códigos de práticas que regem a utilização de amostras de tecidos humanos e animais para aplicações de pesquisa e estas orientações destacar as principais questões éticas e legais que podem ser encontrados (GERAGHTY, et al., 2014).

Em contraste com os desafios relacionados com *in vivo* estudos, *in vitro*, culturas de células permitem condições altamente controladas, a oportunidade de seguir a progressão das alterações, e a capacidade para testar várias condições experimentais, geralmente em menos tempo do que *in vivo* teste (GILMOUR et al., 2016). Existe um vasto leque de opções para testes *in vitro*, análise de cultura de células de dispositivos e materiais, no entanto estudos sistemáticos que demonstram que estes ensaios traduzem completamente o ambiente *in vivo*, no entanto esses problemas podem ser amezinhados com a seleção do tipo das células, condições de cultivo e protocolos (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012).

### 3.5.7 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

O ensaio Micronúcleo é utilizado em cultura de células previamente expostas a agentes mutagênicos, os fragmentos, ou cromossomos atrasados, são envolvidos pela membrana nuclear e aparecem como pequenos núcleos no citoplasma ou brotos aderido ao núcleo. Para tornar o resultado mais preciso, é adicionado citocalasina B para bloquear a citocinese. O teste permite identificar eventual aumento na frequência de mutação em células que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos, por isso é capaz de expressar os danos no cromossomo como Micronúcleos. Além de fornece uma medida de confiança da perda do cromossomo e da ruptura (FENECH et al., 2010).

O uso da citocalasina B inibe a polimerização da actina, que é necessário para formação dos microfilamentos que constroem o citoplasma entre os nucléolos filhos durante a citocinese. Como isso o uso da citocalasina B possibilita como resultados o acumulam de células em divisão no estágio binucleado a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, na população independente da sincronização e proporção de células em divisão.



Mas, não interfere no processo de divisão nuclear, após a realização desse teste, é possível observar o acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por um ciclo de divisão nuclear (DUTTA; GUPTA, 2013).

O teste de micronúcleo com citocalasina B pode ser utilizada para avaliação de populações expostas a substâncias mutagênicas, os fragmentos, ou cromossomos atrasados, são envolvidos pela membrana nuclear e aparecem como pequenos núcleos no citoplasma ou brotos aderido ao núcleo. Esse teste com bloqueio na citocinese possibilita que tais células sejam reconhecidas por sua aparência binucleada, assim é possível diferenciar as células que não sofreram citocinese e, portanto, apresentam dois núcleos (binucleadas) das que sofreram mitose completa e apresenta apenas um núcleo (mononucleadas), a análise dessas células binucleadas permite a comparação da frequência de danos cromossômicos entre populações celulares, que podem se diferenciar por sua cinética de divisão (FENECH, 2010).

O Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN) é um dos métodos mais utilizado para medir a frequência de micronúcleos em cultura de linfócitos humanos, indicam, portanto, a ocorrência de danos aneugênicos e clastogênicos (CHANG; LI; LI, 2010). É realizado em mamíferos, *in vivo*, e detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastogênicas) que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular (LEE et al., 2014).

Os micronúcleos são pequenos corpos contendo DNA, localizados no citoplasma, onde aparecem na telófase e são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que são perdidos durante a divisão celular e, por este motivo, não estão incluídos em núcleo de células filhas, que permanece no citoplasma durante a interfase, aparece como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular. Do mesmo modo, podem ocorrer alterações nucleares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina. O teste de micronúcleos tem como vantagens: sensibilidade e precisão juntamente com a detecção de perda cromossômica, o que permite detectar a ação de agentes clastogênicos (pequeno micronúcleos) e aneugênicos (grande micronúcleos) (SISENANDO et al., 2011).

Esse ensaio foi desenvolvido para medir micronúcleos MN com cromossomos totais ou fragmentos de cromossomo acêntricos que são deixados para trás durante a anafase e não são distribuídos para o núcleo principal, Além disso, essa técnica permitiu a exploração de novos parâmetros de genotoxicidade e cinética de divisão celular como índice de divisão nuclear (IDN); pontes nucleoplasmáticas (PNP) brotos nucleares; detecção de perdas cromossômicas ou elementos de não disjunção, dentre outros, o CbMN também proporciona informações sobre o atraso do ciclo celular é o resultado de uma estreita interação entre danos ao DNA e reparo do DNA (MILIC et al., 2015).



O teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN), que é ensaio que não mede somente os danos cromossômicos como, micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos celulares, mas também outros eventos celulares como, a apoptose e a necrose (MCHUGH et al., 2013). Além de ser uma técnica amplamente utilizada para avaliar os danos citogenéticos em células de mamíferos. Sua popularidade se deve por ser um procedimento não invasivo e muito econômico, e ao fato de que ele pode ser executado com menos conhecimentos técnicos relativos à análise de aberração cromossômica (PRADEEP, 2014).



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. P.; BRANTNER, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really \$802 million?. **Health affairs**, v. 25, n. 2, p. 420-428, 2006
- AKINBORO, A.; MOHAMMED, K.; RATHNASAMY, S.; MUNIANDY, V.R. Genotoxicity assessment of water samples from the Sungai Dua River in Pulau Pinang, Malaysia, using the *Allium cepa* test. **Tropical life sciences research**, v. 22, n. 2, p. 23, 2011.
- AMARAL, A.M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J.C.; BARROS, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP- Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia** 20, n.1 e 2, 2007.
- ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.
- ASTASHKINA, A.; MANN, B.; GRAINGER, D. W. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacology & therapeutics**, v. 134, n. 1, p. 82-106, 2012.
- ATES, M.; DANIELS, J.; ARSLAN, Z.; FARAH, I. O. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, n. 4, p. 3339-3348, 2013.
- AZQUETA, A.; MEIER, S.; PRIESTLEY, C.; GUZKOW, K.; BRUNBORG, G.; SALLETTE, J.; SOUSSALINE, F.; COLLINS, A. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 393-399, 2011.
- AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. Oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1, p. 101-108, 2009.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BA-SANG, D. Z.; LONG, Z. W.; TENG, H.; ZHAO, X. P.; QIU, J.; LI, M. S. A network meta-analysis on the efficacy of sixteen targeted drugs in combination with chemotherapy for treatment of advanced/metastatic colorectal cancer. **Oncotarget**, 2016.
- BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio reverter o câncer. **Ciência hoje**, v. 31, n. 184, p. 50-57, 2002.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340, 2006.
- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, p. 127-152, 2005.



- BERTOLOZZO, E. L.; FREIRE-MAIA, D. V.; LERCO, M. M.; PLÁCIDO, M. S.; HENRY, M. A. C. D. A. Avaliação dos danos do DNA na mucosa esofágica e sangue periférico de portadores da doença do refluxo gastroesofágico. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (ABCD)**, p. 217-221, 2010.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W. P.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 26, n. 2, p. 170-244, 2009.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product report**, v. 28, n. 2, p. 196-268, 2011.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W.P.; MUNRO, M.H.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 25, n. 1, p. 35-94, 2008.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W.P.; MUNRO, M.H.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 25, n. 1, p. 35-94, 2008.
- BONADONNA, G.; MONFARDINI, S.; DE LENA, M.; FOSSATI-BELLANI, F. Clinical evaluation of adriamycin, a new antitumour antibiotic. **British Medical Journal**, v. 3, n. 5669, p. 503-506, 1969.
- BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites—strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 15-22, 2011.
- BUGNI, T.S.; IRELAND, C.M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 1, p. 143-163, 2004.
- CAO, S.; CLARDY, J. New naphthoquinones and a new  $\delta$ -lactone produced by endophytic fungi from Costa Rica. **Tetrahedron letters**, v. 52, n. 17, p. 2206-2208, 2011.
- CAO, S.; ROSS, L.; TAMAYO, G.; CLARDY, J. Asterogynins: secondary metabolites from a Costa Rican endophytic fungus. **Organic letters**, v. 12, n. 20, p. 4661-4663, 2010.
- CARO, Y.; ANAMALE, L.; FOUILLAUD, M.; LAURENT, P.; PETIT, T.; DUFOSSÉ, L. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. **Natural products and bioprospecting**, v. 2, n. 5, p. 174, 2012.
- CHANG, P; LI, Y; LI, D. Micronuclei levels in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker for pancreatic cancer risk. **Carcinogenesis**. v. 32, p. 210-215, 2010.
- CHEN, L., LIU, W., HU, X., HUANG, K., WU, J. L., & ZHANG, Q. Q. Citrinin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 4, p. 515-517, 2011.
- COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.
- DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G. Economics of new oncology drug development. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 2, p. 209-216, 2007.



- DE ANDRADE, J. A. S.; SOMENSI, A., LOPES, M. N., ARAÚJO, A. R., JASPARS, M., & SILVA, D. H. S Citrinadin A derivatives from *Penicillium citrinum*, an endophyte from the marine red alga *Dichotomaria marginata*. **Planta Medica**, v. 80, n. 10, p. PC37, 2014.
- DO AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, 2011.
- DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015.
- DUTTA, S.; GUPTA, M. L. Alleviation of radiation-induced genomic damage in human peripheral blood lymphocytes by active principles of *Podophyllum hexandrum*: an in vitro study using chromosomal and CBMN assay. **Mutagenesis**, v. 29, n. 2, p. 139-147, 2014.
- FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.11, n.4, p.360-367, 2009.
- FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v. 181, p. 411-416, 2002.
- FENECH, M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. **Health physics**, v. 98, n. 2, p. 234-243, 2010.
- FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1, p. 65-75, 2003.
- FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147, n. 1-2, p. 29-36, 1985.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environment monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.
- FLAJS, D.; PERAICA, M. Toxicological properties of citrinin. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 457-464, 2009.
- FITZMAURICE, C. et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.
- GARCIA, C. S. C.; MENTI, C.; LAMBERT, A. P. F.; BARCELLOS, T.; MOURA, S.; CALLONI, C.; BRANCO, C. S.; SALVADOR, M.; ROESCH-ELY, M.; HENRIQUES, J. A. P. ***Salvia officinalis* (Lamiaceae) Lin.: caracterização química, atividade citotóxica e apoptótica em células de mamíferos**. 2015. Tese de Doutorado.
- GARCIA-SOUZA, L. F.; OLIVEIRA, M. F. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 50, p. 156-160, 2014.



GERAGHTY, R. J.; CAPES-DAVIS, A.; DAVIS, J. M.; DOWNWARD, J.; FRESHNEY, R. I.; KNEZEVIC, I.; THRAVES, P. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. **British journal of cancer**, v. 111, n. 6, p. 1021-1046, 2014.

GERWICK, William H.; FENNER, Amanda M. Drug discovery from marine microbes. **Microbial ecology**, v. 65, n. 4, p. 800-806, 2013.

GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Fungal anthraquinones. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 49, n. 2, p. 85-99, 2013.

GHOSH, P.; DEVI, G. P.; PRIYA, R.; AMRITA, A.; SIVARAMAKRISHNA, A.; BABU, S.; SIVA, R. Spectroscopic and in silico evaluation of interaction of DNA with six anthraquinone derivatives. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 5, p. 1127-1137, 2013.

GILMOUR, A. D.; WOOLLEY, A. J.; POOLE-WARREN, L. A.; THOMSON, C. E.; GREEN, R. A. A critical review of cell culture strategies for modelling intracortical brain implant material reactions. **Biomaterials**, v. 91, p. 23-43, 2016.

GRAHAME, T. J.; SCHLESINGER, R. B. Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. **Particle and fibre toxicology**, v. 9, n. 1, p. 21, 2012.

HASTY, P.; CAMPISI, J.; HOEIJMAKERS, J.; STEEG, H.V.; VIJG, J. Aging and genome maintenance: lessons from the mouse?. **Science**, v. 299, n. 5611, p. 1355-1359, 2003.

HERCOS, T. M., VIEIRA, F. S., OLIVEIRA, M. S., BUETTO, L. S., SHIMURA, C. M., & SONOBE, H. M. The work of nursing professionals in intensive care units in oncology patient care. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 1, p. 51-8, 2014.

HOVHANNISYAN, G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Molecular cytogenetics**, v. 3, n. 1, p. 17, 2010.

HSIAO, C. J.; LI, T. K.; CHAN, Y. L.; HSIN, L. W.; LIAO, C. H.; LEE, C. H.; LYU, P. C.; GUH, J. H. WRC-213, an l-methionine-conjugated mitoxantrone derivative, displays anticancer activity with reduced cardiotoxicity and drug resistance: identification of topoisomerase II inhibition and apoptotic machinery in prostate cancers. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 847-856, 2008.

HUANG, H.; JIA, Q.; MA, J.; QIN, G.; CHEN, Y.; XI, Y.; LIN, L.; ZHU, W.; DING, J.; JIANG, H.; LIU, H. Discovering novel quercetin-3-O-amino acid-esters as a new class of Src tyrosine kinase inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1982-1988, 2009.

HUANG, Q.; LU, G.; SHEN, H. M.; CHUNG, M.; ONG, C. N. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. **Medicinal research reviews**, v. 27, n. 5, p. 609-630, 2007.

HWANGBO, K.; ZHENG, M. S.; KIM, Y. J.; IM, J. Y.; LEE, C. S.; WOO, M. H.; JAHNG, Y.; CHANG, H. W.; SON, J. K.; Inhibition of DNA topoisomerases I and II of compounds from *Reynoutria japonica*. *Archives of pharmacal research*, v. 35, n. 9, p. 1583-1589, 2012.  
IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 5, p. 468-482, 2011



INCA. **Câncer**: O que é Câncer?. Disponível em:

<[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 10 maio 2017.

KASSIE, F.; LAKY, B.; NOBIS, E.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of methyl isothiocyanate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 490, n. 1, p. 1-9, 2001.

KAWAGUCHI, S.; NAKAMURA, T.; YAMAMOTO, A.; HONDA, G.; SASAKI, Y.f. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity?. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, 2010.

KLAPACZ, J.; POTTENGER, L.H.; ENGELWARD, B.P.; HEINEN, C.D.; JOHNSON, J.D.; CLEWELL, R.A.; CARMICHAEL, P.L.; ADELEYE, Y.; ANDERSEN, M.E. Contributions of DNA repair and damage response pathways to the non-linear genotoxic responses of alkylating agents. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 77-91, 2016.

KWON, S. A.; HUH, C.; KIM, J. S.; KIM, B. J. **Photoresist composition and method of manufacturing a color filter substrate by using the same**. U.S. Patent n. 7,615,322, 10 nov. 2009.

LEE, M. Y.; SEO, C. S.; KIM, J.Y.; SHIN, H. K. Genotoxicity evaluation of Guibi-Tang extract using an in vitro bacterial reverse mutation assay, chromosome aberration assay, and in vivo micronucleus test. **BMC- complementary and alternative medicine**, 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEMO, A.S.; RODRIGUES, V.L.C.; DE ALENCAR, M.V.O.B.; ISLAM, M.T.; DE AGUIAR, R.P.S.; DA MATA, A.M.O.F.; DE CARVALHO, R.M.; PAZ, M.F.C.J.; FEITOSA, C.M.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C. Possible oxidative effects of isotretinoin and modulatory effects of vitamins A and C in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 145-152, 2016.

LEPTOKARYDIS, I. H.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. D. S.; YOUNG, M. C. M.; SILVA, D. H. S.; ARAÚJO, Â. R.; LOPES, M. N. Two new bioactive metabolites produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus of *Michelia champaca* L. **Planta Medica**, v. 74, n. 09, p. PB93, 2008.

LIAO, J. Y.; LIN, W. Y.; SHIEH, W. L.; JEN, R. H. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 433-439, 2003.

LIN, K. Y.; UEN, Y. H. Aloe-emodin, an anthraquinone, in vitro inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon carcinoma cells. **Oncology letters**, v. 1, n. 3, p. 541-547, 2010.

LIU, Y.; YANG, M.H.; WANG, X.B.; LI, T.X.; KONG, L.Y. Caryophyllene sesquiterpenoids from the endophytic fungus, *Pestalotiopsis* sp. **Fitoterapia**, v. 109, p. 119-124, 2016.

LOURO, I. D. Oncogenética. **Revista Brasileira de Cancereologia**, n.11, p.36-42, 2000.



- LU, Z.Y.; LIN, Z.J.; WANG, W.L.; DU, L.; ZHU, T.J.; FANG, Y.C.; GU, Q.Q.; ZHU, W.M. Citrinin dimers from the halotolerant fungus *Penicillium citrinum* B-57. **Journal of natural products**, v. 71, n. 4, p. 543-546, 2008.
- MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.
- MACBAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 143-172, 1988.
- MALIK, E. M.; BAQI, Y.; MÜLLER, C. E. Syntheses of 2-substituted 1-amino-4-bromoanthraquinones (bromaminic acid analogues)–precursors for dyes and drugs. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 11, p. 2326, 2015.
- MALIK, E.; M.; MÜLLER, C. E. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. **Medicinal research reviews**, v. 36, n. 4, p. 705-748, 2016.
- MAYORGA, P., PÉREZ, K. R., CRUZ, S. M., & CÁCERES, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 897-903, 2010.
- MCHUGH, M.K.; LOPEZ, M.S.; HO, C.H.; SPITZ, M.R.; ETZEL, C.J.; EL-ZEIN, R.A. Use of the Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay (CBMN) to Detect Gender Differences and Genetic Instability in a Lung Cancer Case-Control Study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v.22, n.1, p.135-145, 2013.
- MCHUGH, R. K.; WHITTON, S. W.; PECKHAM, A. D.; WELGE, J. A.; OTTO, M. W. Patient preference for psychological vs. pharmacological treatment of psychiatric disorders: a meta-analytic review. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 74, n. 6, p. 595, 2013.
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug information journal**, v. 32, n. 2, p. 513-524, 1998.
- MEHLING, M.; TAY, S. Microfluidic cell culture. **Current opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 95-102, 2014.
- MELLO, M.L.S.; JUNQUEIRA, A.C.; MARIA, C.C.J.; RIBEIRO, D.M.; FERREIRA, R.C.; VERÍSSIMO, R.V.; SCHILDKNECHT, P.H.P.A.; MONTEIRO, G.; COLTRI, P.P.; OGUSUCU, R.; FARIA, V.G.; SANTOS, A.B.; BORGES, I.G.; SILVA, E.A. Monitoramento por ensaios biológicos de poluição ambiental no lago do parque ecológico Hermóneges Freitas Leitão Filho (1998 a 2004). In: I Congresso de Meio Ambiente Paulínia e Região Metropolitana de Campinas, 2004, Paulínia. Anais - CD-Rom. Campinas: UNICAMP, 2004. p. 1-8.
- MENDELSON, J.; RINGBORG, U.; SCHILSKY, R. L. Personalized cancer medicine—A strategy to counteract an increasing cancer challenge. **Molecular oncology**, v. 6, n. 2, p. 109-110, 2012.



MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MILIC, M; ROZGAJ, R; KASUBA, V; JAZBEC, A. M; STARCEVIC, B; LYZBICKI, B; RAVEGNINI, G; ZENESINI, C; MUSTI, M; HRELIA, P; ANGELINI, S. Polymorphisms in DNA repair genes: CBMN cytome assay in workers chronically exposed to low doses of ionising radiation. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 66, n. 2, p. 109-120, 2015.

MILIC, M; ROZGAJ, R; KASUBA, V; JAZBEC, A. M; STARCEVIC, B; LYZBICKI, B; RAVEGNINI, G; ZENESINI, C; MUSTI, M; HRELIA, P; ANGELINI, S. Polymorphisms in DNA repair genes: CBMN cytome assay in workers chronically exposed to low doses of ionising radiation. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 66, n. 2, p. 109-120, 2015.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological reviews**, v. 56, n. 2, p. 185-229, 2004.

MÖHLER, H.; PFIRMAN, R. W.; FREI, K. Redox-directed cancer therapeutics: Taurolidine and Piperlongumine as broadly effective antineoplastic agents (Review). **International Journal of Oncology**, v. 45, p. 1329-1336, 2014.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 1, p. 69, 2009.

MUELLER, S. O.; LUTZ, W K.; STOPPER, H. Factors affecting the genotoxic potency ranking of natural anthraquinones in mammalian cell culture systems. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 414, n. 1, p. 125-129, 1998.

NAITO, T.; BABA, T.; TAKEDA, K.; SASAKI, S.; NAKAMOTO, Y.; MUKAIDA, N. High-dose cyclophosphamide induces specific tumor immunity with concomitant recruitment of LAMP1/CD107a-expressing CD4-positive T cells into tumor sites. **Cancer Letters**, v. 366, p. 93-99, 2015.

NAKAYAMA, G. R., CATON, M. C., NOVA, M. P., & PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of immunological methods**, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.

NUNES, L. C. C., GALINDO, A. B., DEUS, A. D. S. O. D., RUFINO, D. A., RANDAU, K. P., XAVIER, H. S., CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM NETO, P. J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 524-529, 2009.

PARANJAPE, S.R.; CHIANG, Y.M.; SANCHEZ, J.F.; ENTWISTLE, R.; WANG, C.C.; OAKLEY, B.R.; GAMBLIN, T.C. Inhibition of Tau aggregation by three *Aspergillus nidulans* secondary metabolites: 2, $\omega$ -dihydroxyemodin, asperthecin, and asperbenzaldehyde. **Planta Medica**, v.80, n.1, p.77-85. Janeiro 2014.



PITT, J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.**, 1979.

POLJŠAK, B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, 2011.

POLJŠAK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

PORTO, M.; LÍRIO, L. M.; DIAS, A. T.; BATISTA, A. T.; CAMPAGNARO, B. P.; MILL, J. G.; MEYRELLES, S. S.; BALDO, M. P. Increased oxidative stress and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of fructose-fed rats. **Toxicology In Vitro**, v. 29, p. 1977–1981, 2015.

PRADEEP, M. R.; GURUPRASAD, Y.; JOSE, M.; SAXENA, K. K. D.; PRABHU, V. Comparative Study of Genotoxicity in Different Tobacco Related Habits using Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 8, n. 5, 2014.

PRADEEP, M. R.; GURUPRASAD, Y.; JOSE, M.; SAXENA, K. K. D.; PRABHU, V. Comparative Study of Genotoxicity in Different Tobacco Related Habits using Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 8, n. 5, 2014.

PUTNAM, K. P.; BOMBICK, D. W.; DOOLITTLE, D. J. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. **Toxicology in vitro**, v. 16, n. 5, p. 599-607, 2002.

PYLVAS, M.; PUISTOLA, U.; KAUPPILA, S.; SOINI, Y.; KARIHTALA, P. Oxidative stress-induced antioxidant enzyme expression is an early phenomenon in ovarian carcinogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 9, p. 1661-1667, 2010.

QUINTANA, R. A.; BANCHS, J.; GUPTA, R.; LIN, H. Y.; RAJ, S. D.; CONLEY, A.; VADHAN-RAJ, S. Early Evidence of Cardiotoxicity and Tumor Response in Patients with Sarcomas after High Cumulative Dose Doxorubicin Given as a Continuous Infusion. **Sarcoma**, v. 2017, 2017.

RANK, J.; NIELSEN, Mette Hviid. A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, n. 1, p. 49-53, 1993.

RAHAL, A., KUMAR, A., SINGH, V., YADAV, B., TIWARI, R., CHAKRABORTY, S., & DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

ROY, S. S.; CHAKRABORTY, P.; BHATTACHARYA, S. Intervention in cyclophosphamide induced oxidative stress and DNA damage by a flavonyl-thiazolidinedione based organoselenocyanate and evaluation of its efficacy during adjuvant therapy in tumor bearing mice. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 73, p. 195-209, 2014.

SABHARWAL, S. S.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 11, p. 709, 2014.



SAHPAZ, S.; BORIES, CH.; LOISEAU, PM.; CORTÈS, D.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, n. 06, p. 538-540, 1994.

SÁNCHEZ-MORENO, Concepción. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANTOS, C.L.V.; POURRUT, B.; OLIVEIRA, J.M.P.F. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. **Frontiers in genetics**, v. 6, 2015.

SASAKI, Y.F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and US NTP Carcinogenicity Database. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, n. 6, p. 629-799, 2000.

SCHUEFFLER, A.; ANKE, T. Fungal natural products in research and development. **Natural product reports**, v. 31, n. 10, p. 1425-1448, 2014.

SILVA, A. E. D.; SERAKIDES, R.; FERREIRA, E.; MORAES, J. R. C.; OCARINO, N. D. M.; CASSALI, G. D. Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, p. 867-74, 2004.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p.625-633. Março-abril 2004.

SINGH, R.; SHARMA, M.; JOSHI, P.; RAWAT, D. S. Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 8, n. 6, p. 603-617, 2008.

SISENANDO, H. A.; DE MEDEIROS, S. R. B.; SALDIVA, P. H.; ARTAXO, P.; HACON, S. S. Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by *Tradescantia micronucleus* bioassay: a toxicity assessment study. **Environmental Health**, v. 10, n. 1, p. 41, 2011.

SKUBITZ, Keith M.; D'ADAMO, David R. Sarcoma. In: Mayo Clinic Proceedings. **Elsevier**, 2007. p. 1409-1432.

ŚLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; MILCZAREK, M.; MIELCZAREK, S.; LUBLIN, C.; CIERPIAŁ, T.; ŁYŻWA, P.; KIEŁBASIŃSKI, P.; JAROMIN, A.; FLIZ, A.; CHILMONCZYK, Z. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0155772, 2016.

TAMBURINI, E.; MASTROMEI, G. Do bacterial cryptic genes really exist?. **Research in microbiology**, v. 151, n. 3, p. 179-182, 2000.

UZUNOGLU, S.; KARACA, B.; ATMACA, H.; KISIM, A.; SEZGIN, C.; KARABULUT, B.; USLU, R. Comparison of XTT and Alamar blue assays in the assessment of the viability of various human cancer cell lines by AT-101 (–/– gossypol). **Toxicology mechanisms and methods**, v. 20, n. 8, p. 482-486, 2010.

VERAS, R. Forum. Population aging and health information from the National Household Sample Survey: contemporary demands and challenges. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 10, p. 2463-2466, 2007.



VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; HONG, S.B.; KLAASSEN, C.W.H.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R.A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014

WAL, R.; SATO, D.; OLIVEIRA, C. C.; LOPES, L.; OLIVEIRA, S. M; DIBERNARDI, R. P; GEHRKE, S.; PALAURO, F. R.; BUCHI, D. F. Immunomodulation in Sarcoma-180 Bearing Mice. **Cell and Molecular Biology of Cancer**, p. 34, 2003.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10202, 2010.

WHO. **Cancer**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>. Acesso em: 1 maio 2017.

YANG, T. M.; QI, S. N.; ZHAO, N.; YANG, Y. J.; YUAN, H. Q.; ZHANG, B.; JIN, S. Induction of apoptosis through caspase-independent or caspase-9-dependent pathway in mouse and human osteosarcoma cells by a new nitroxyl spin-labeled derivative of podophyllotoxin. **Apoptosis**, v. 18, n. 6, p. 727-738, 2013.

YANG, Y. J.; QI, S. N.; SHI, R. Y.; YAO, J.; WANG, L. S.; YUAN, H. Q.; JING, Y. X. Induction of apoptotic DNA fragmentation mediated by mitochondrial pathway with caspase-3-dependent BID cleavage in human gastric cancer cells by a new nitroxyl spin-labeled derivative of podophyllotoxin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 131-138, 2017.

YOUN, P.; MILANO, M. T.; CONSTINE, L. S.; TRAVIS, L. B. Long-term cause-specific mortality in survivors of adolescent and young adult bone and soft tissue sarcoma: A population-based study of 28,844 patients. **Cancer**, v. 120, n. 15, p. 2334-2342, 2014.

ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 47-50, 1995.

ZHANG, J. Y.; TAO, L. Y.; LIANG, Y.; CHEN, L. M.; MI, Y. J.; ZHENG, L. S.; WANG, F.; SHE, Z. G.; LIN, Y. C.; TO, K. K.; FU, L.W. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. **Marine drugs**, v. 8, n. 4, p. 1469-1481, 2010.



## Capítulo I

---

**Avaliação da capacidade tóxica, genotóxica e antimitótica da antraquinona marinha  $\omega$ -hidroxiemodina no sistema teste *Artemia salina* e *Allium cepa***

## **Avaliação da capacidade tóxica, genotóxica, mutagênica e antimitótica da antraquinona $\omega$ -hidroxiemodina nos sistemas testes *Artemia salina* e *Allium cepa***

José Victor de Oliveira Santos<sup>1,2</sup> Ag-Anne Pereira Melo de Menezes,<sup>1,2</sup> Antonielly Campinho dos Reis<sup>2</sup>, Rai Pablo de Sousa Aguiar<sup>3</sup>, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar<sup>2,4</sup>, João Marcelo de Castro e Sousa<sup>1</sup>, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade<sup>5</sup>, Muhammad Torequl Islam<sup>4</sup>, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>2</sup> Núcleo de Tecnologia farmacêutica, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>3</sup> Pós-graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>4</sup> RENORBIO Rede de Biotecnologia do Nordeste

<sup>5</sup>NIAC-Núcleo de Pesquisa Aplicado às Ciências-IFMA-Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (São Raimundo das Mangabeiras Campus), Brasil

### **RESUMO**

O câncer é considerado uma das maiores causas de morte no mundo. Anualmente, milhões de novos casos da doença são diagnosticados. A quimioterapia constitui uma das bases do tratamento contra o câncer. Na terapia são utilizadas drogas citotóxicas, de forma isolada ou em associação terapêutica, que causam danos ao DNA, levando à morte células cancerosas. Também são utilizadas drogas citostáticas, que interferem na síntese de DNA, interrompendo a reprodução das células e induzindo a um estágio de senescência. O *Penicillium citrinum* tem sido citado com um produtor de metabólitos secundários citotóxicos, o que aumenta o interesse por este fungo para a pesquisa de compostos antitumorais. O estudo teve por objetivo isolar e caracterizar a substância  $\omega$ -hidroxiemodina do fungo *Penicillium citrinum*, este, isolado da alga marinha *Dichotomaria marginata*, bem como avaliar seus efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos nos testes *Artemia salina* e *Allium cepa*. A  $\omega$ -hidroxiemodina foi testada nas concentrações de 1,7; 3,4 e 6,9  $\mu$ M. O sulfato de cobre na concentração de 6,9  $\mu$ M e água desclorificada foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. A  $\omega$ -hidroxiemodina em *Artemia salina* obteve concentração letal que mata 50% dos indivíduos (CL<sub>50</sub>) em 24h de 4,6  $\mu$ M, e em 48h 3,6  $\mu$ M. No teste *Allium cepa* a  $\omega$ -hidroxiemodina induziu toxicidade e citotoxicidade pela inibição de divisão celular, entretanto os dados em relação às aberrações cromossômicas foram significantes apenas para a menor concentração testada, nas demais os dados observados não foram significantes em relação ao controle negativo. Não houve a formação significativa de micronúcleos. Os dados apontam que a  $\omega$ -hidroxiemodina em baixas concentrações, induz toxicidade e citotoxicidade e genotoxicidade nos sistemas testes usados. Essas atividades são importantes para candidatos a agentes antitumorais.

**Palavras-chave:** Toxicogenética. *Penicillium citrinum*. Genotoxicidade. Mutagenicidade.



## ABSTRACT

Cancer is considered one of the biggest causes of death in the world. Annually, millions of new cases of the disease are diagnosed. Chemotherapy is one of the bases of cancer treatment, in which cytotoxic drugs are used alone or in combination, causing DNA damage, leading to the death of cancer cells. Cytostatic drugs are also used, which interfere with the synthesis of DNA and mitosis, disrupting cell reproduction and inducing a stage of senescence. *Penicillium citrinum* has been cited with a producer of cytotoxic secondary metabolites, which increases interest in this fungus for the research of antitumor compounds. The objective of this study was to isolate and characterize the  $\omega$ -hydroxyemodin substance of the fungus *Penicillium citrinum* isolated from the seaweed *Dichotomaria marginata*, as well as to evaluate its toxic, cytotoxic genotoxic and mutagenic effects in the *Artemia salina* and *Allium cepa* tests.  $\Omega$ -hydroxyemodin was tested at concentrations of 1.7, 3.4, 6.9  $\mu\text{M}$ . Copper sulphate at the concentration of 6.9  $\mu\text{M}$  and dechlorinated water were used as positive and negative controls, respectively. The  $\omega$ -hydroxyemodin in *Artemia salina* obtained a lethal concentration that kills 50% of individuals (LC50) in 24h of 4.6  $\mu\text{M}$  and in 48h of 3,6  $\mu\text{M}$ . In the *Allium cepa* test,  $\omega$ -hydroxyemodin induced toxicity, genotoxicity and cytotoxicity by the inhibition of cell division, however the data regarding chromosomal aberrations were significant only for the lowest concentration tested, in the others the data observed were not significant in relation to the negative control. There was no significant micronucleus formation. The data indicate that  $\omega$ -hydroxyemodin at low concentrations induces toxicity, genotoxicity and cytotoxicity in the test systems used. These activities are important for candidates for antitumor agents.

**Keywords:** Toxicogenetics. *Penicillium citrinum*. Genotoxicity. Mutagenicity.



## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo com cerca de 7,6 milhões de óbitos. Todo ano quase 13 milhões de novos casos da doença são diagnosticados (WHO, 2017). A quimioterapia constitui uma das bases do tratamento contra o câncer. Durante a terapia são utilizadas drogas citotóxicas, de forma isolada ou em associação terapêutica, que causam danos ao DNA, levando à morte células cancerosas. Drogas citostáticas também são utilizadas durante o tratamento, essas, interferem na síntese de DNA e na mitose, interrompendo a reprodução das células e induzindo a um estágio de senescência (SWIFT; GOLSTEYN, 2014; HUSSAIN; VERMA; CHOUHAN, 2017).

A quimioterapia está associada a uma série de efeitos colaterais indesejáveis (TAMBURINI; CASALI; MICCINESI, 2000; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002) bem caracterizados incluindo mal-estar, lesão, fadiga, redução de apetite, náuseas, vômitos e infecções (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002), que estão associados ao aumento da morbidade e à redução da qualidade de vida (TAMBURINI; CASALI; MICCINESI, 2000), o que suscita à procura de novos fármacos para o tratamento do câncer. Os agentes que interrompem a montagem do fuso mitótico, chamados de antimitóticos, surgiram como uma estratégia nova e muito promissora no tratamento de uma grande variedade de cânceres (BADRIA; IBRAHIM, 2013; MARZO; NAVAL, 2013; NOVÍO; FREIRE-GARABAL; NÚÑEZ, 2014).

Os fármacos antimitóticos bem caracterizados como colchicina, alcaloides da vinca e taxanos têm sido utilizados clinicamente no tratamento do câncer em humanos (KUO et al., 2004; MIAO et al., 2010), incluindo câncer de mama, câncer de pulmão, neuroblastoma, rabiomiossarcoma, leucemia aguda, doença de Hodgkin e linfoma não Hodgkin (MARZO; NAVAL et al., 2013). No entanto, os agentes antimicrotúbulos, assim como outros quimioterápicos, são conhecidos por apresentarem desvantagens severas, especialmente alta citotoxicidade e efeitos colaterais indesejáveis (JORDAN; WILSON, 2004), além da probabilidade de desenvolvimento de resistência durante o tratamento (DRUKMAN; KAVALLARIS, 2002).

O rastreamento antimitótico no ensaio *Allium cepa*, um sistema *in vitro* confiável, demonstra efeitos específicos e permite a seleção de candidatos antimitóticos promissores. Este teste foi inicialmente utilizado por Levan (1938) em estudos sobre o efeito de extratos de plantas e várias composições químicas em células meristemáticas e modificado por Fiskesjö (1985), que tem sido amplamente utilizado para a detecção de propriedades citostáticas e citotóxicas de



diferentes compostos, incluindo antraquinonas e hidroxiantraquinonas (BADRIA; IBRAHIM, 2013). Dentre os microorganismos marinhos, o *Penicillium citrinum* se mostra uma fonte importante de metabolitos secundários estruturalmente diversos como pistas potenciais para a descoberta de drogas de caráter citotóxico (CHEN et al., 2011).

Assim, este estudo teve como objetivo o isolamento e caracterização da  $\omega$ -hidroxiemodina de fungos endofíticos de algas marinhas e sua caracterização, bem como analisou a toxicidade em *Artemia salina* e o potencial tóxico, citotóxico genotóxico e mutagênico em *Allium cepa*.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Solventes gerais e equipamentos básicos do isolamento da $\omega$ -hidroxiemodina.

Foram utilizados solventes padrões analíticos (PA) das marcas Synth, Dinâmica, Vetec, Merck: metanol (MeOH), etanol, acetato de etila, *n*-hexano, *sec*-butanol, acetonitrila (MeCN). Estes solventes foram usados para extração, fracionamento. Os extratos e frações foram concentrados em evaporador rotatório da *Buchi* R-114, sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo FABBE; Autoclave vertical *Quimis* Aparelhos Científicos Ltda; Câmara de Fluxo laminar vertical – Panchane; Incubadora Rotatória (“Shaker”) Marconi. Foi utilizado no auxílio à dissolução dos extratos e frações um equipamento de ultrassom modelo Unique, sendo as massas medidas em balança Kern 410 e Digimed KN5000L, ambas da Marconi. Para a separação cromatográfica em coluna aberta foi utilizado a fase estacionária Sephadex LH-20 *Sigma-Aldrich*. Para isolamento e crescimento dos microrganismos foram utilizados os meios sólidos: Arroz parboilizado (Marcon<sup>®</sup>) e BDA (Batata Dextrose Agar-Sigma<sup>®</sup>).

### 2.2 Coleta da macroalga *Dichotomaria marginata*

A macroalga vermelha *Dichotomaria marginata* foi coletada em dezembro de 2009 na região norte de São Paulo, na praia de Fortaleza, na cidade de Ubatuba, no Brasil (23°24'93 'e 45°03'41"W) durante o tempo de maré baixa. A Dra. Nair Yokoga (Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil) realizou a identificação de *D. marginata*, e uma espécime do voucher foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, Brasil (comprovante n. ° SP 400960).

### 2.3 Isolamento e identificação do fungo endofítico

O fungo endofítico *P. citrinum* foi isolado e classificado a partir do tecido interno da macroalga vermelha marinha *D. marginata* conforme descrito em de Andrade et al. (2014).

### 2.4 Obtenção do extrato acetonitrila do fungo *P. citrinum* (FMeCNDm) e isolamento da $\omega$ -hidroxiemodina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A substância  $\omega$ -hidroxiemodina foi isolada do microrganismo *Penicillium citrinum*. Para isso linhagens dos microrganismos foram repicadas para placas de Petri em PDA e posteriormente inoculado. A linhagem foi distribuída em seis frascos erlenmeyer de 500 mL,



contendo cada um 90 g de arroz parboilizado e 75 mL de água destilada, por 21 dias. Após este período, a cultura foi triturada e extraída com AcOEt (7 x 350 mL). O solvente foi evaporado em rotaevaporador fornecendo 10 g e 36 g respectivamente, de cada extrato bruto. O extrato bruto foi re-solubilizado em AcOEt e submetido a partição com água *Milli-Q*. A fase em AcOEt foi rota-evaporada e re-solubilizada em MeCN e submetida a partição com hexano. Os solventes orgânicos foram eliminados utilizando evaporador rotatório, fornecendo o extrato FMeCNDm. Uma porção (900 mg) da fração acetonitrila de *P. citrinum* (FMeCNDm) foi fracionado por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (70 cm x 3,0 cm) eluída com MeOH:DCM (1:1), obtendo-se 45 frações de aproximadamente 80 mL cada. A análise por CCD e CLAE-DAD/EM-IES [Coluna C18; MeOH:H<sub>2</sub>O (5-100% MeOH), 254 nm], permitiu seu agrupamento em 16 novos grupos de frações por similaridade dos cromatogramas (*FDm1Se-FDm16Se*). A fração FDm11Se após lavagem com metanol, obteve-se um precipitado amarelo, cuja análise do perfil em CLAE-DAD-EM-IES confirmou a presença de apenas um pico com tempo de retenção em 16,73 min. As análises de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C levaram à identificação da substância ω-hidroxiemodina (15 mg).

## 2.5 Caracterização do extrato por (CLAE)

Para análises via CLAE foram usados solventes J. T. Baker (acetonitrila, metanol) e água ultra pura (18 MΩ) obtida no sistema *Milli-Q Plus*. Foram utilizadas colunas Phenomenex Gemini C18 analítica (250 mm x 4,60 mm, 5 μm) e SunFire C18 (250 mm X 10 mm, 10 μm). A caracterização da ω-hidroxiemodina foi feito por:

- (a) Analítico e preparativo sistema binário Shimadzu LC-10AD, com autoinjeter Shimadzu SIL-10A e detector UV-*Diodo Array*; (Laboratório- NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia);
- (b) Cromatógrafo Líquido acoplado ao espectrômetro de massas (CLAE-PDA/EM-IES) Thermo Instruments MS system (LTQ XL/ LTQ *Orbitrap Discovery* acoplado a sistema de CLAE, binário-Thermo *Fisher Scientific*, detector PDA, injeter automático. As análises foram realizadas com voltagem do capilar 45V, temperatura do capilar 260°C, gás de arraste (N<sub>2</sub>), fluxo 10-20 (unidades arbitrárias). O software *Xcalibur* (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos (*Marine Biodiscovery Centre; University of Aberdeen- Scotlând-UK*).



## 2.6 Caracterização do extrato e da $\omega$ -hidroxiemodina por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance DRX-500 e Varian Inova, operando a 500 MHz e 400 MHz na frequência de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e o solvente utilizado na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foram  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO}-d_6$  (CIL e Isotec-INC), sendo utilizado TMS ou o solvente residual não deuterado como referência interna.

## 2.7 Teste de toxicidade com *Artemia salina*

O teste de toxicidade com o microcrustáceo *Artemia salina* foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Mclaughlin, Chang, Smith, (1991) com adaptações. Os cistos de *Artemia salina* foram eclodidos em água de salinidade a 12 ppm e após 48 horas, as larvas foram coletadas para o bioensaio. As diluições das amostras e do teste em branco foram realizadas em água de salinidade a 12 ppm e 0,5 mL de dimetil sulfóxido concentrado. Foram preparadas soluções em quintuplicata das amostras de  $\omega$ -hidroxiemodina, a serem testadas nas concentrações 500, 100, 1  $\mu\text{M}$  e adicionadas 10 artemias em cada frasco, sendo a contagem das sobreviventes realizada após 24. O processo foi repetido com concentrações intermediárias afim de definir a CL50 da droga.

## 2.8 Teste de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade em *Allium cepa*

O sistema *Allium cepa* foi realizado com base no protocolo descrito por Fiskesjö (1985). Foram utilizadas cebolas médias (*Allium cepa*), mantidas em contato direto com as substâncias por 48h em temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , ao abrigo da luz e manutenção da solução a cada 24 h. As concentrações testadas de  $\omega$ -hidroxiemodina foram de 1,7; 3,4 e 6,9  $\mu\text{M}$ . Compuseram os grupos positivo e negativo, sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) a 6,9  $\mu\text{M}$  e água da torneira desclorificada, respectivamente. Após o tratamento, as raízes foram retiradas e fixadas por 24h em uma solução de Carnoy (3:1). Em seguida, as raízes foram lavadas com água destilada (3 banhos de 5 minutos cada), fez-se a hidrólise das raízes com 1N HCl a  $60^\circ\text{C}$  por 11 minutos e repetiu-se o banho. As estruturas basófilas foram coradas mergulhando-as no reativo de Schiff por 2 horas e depois lavadas com água corrente. Para a montagem da lâmina, a região apical da raiz foi

retirada com um bisturi e adicionada uma gota de carmim acético 2% para a coloração da região nuclear cobrindo-a com uma lamínula. Realizou-se uma leve pressão sobre a lamínula um lápis borracha para o esmagamento da raiz e uma melhor separação das células. As células foram observadas com o aumento de 400x no microscópico óptico e foram contadas 5.000 células por concentração testada (1.000 células/lâmina).

## 2.6 Análise estatística

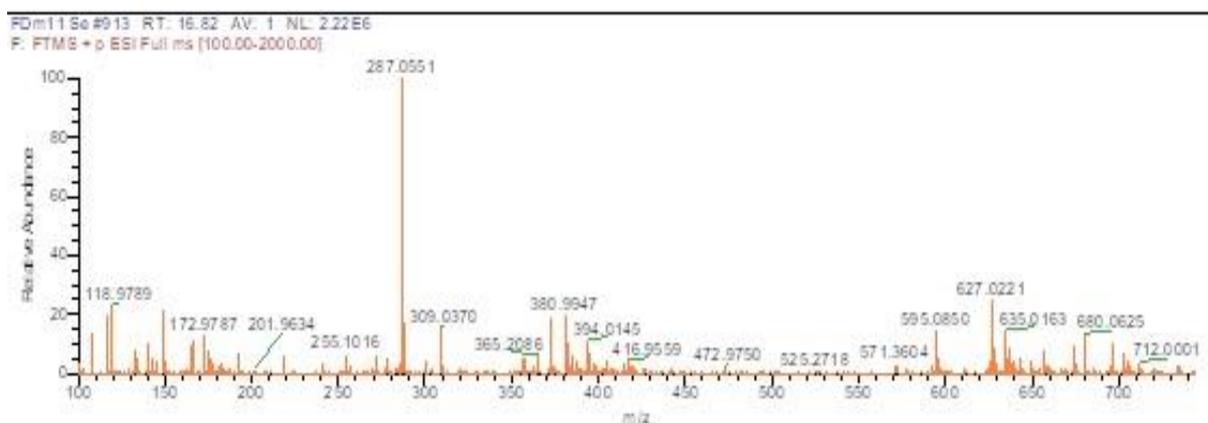
Os dados da *Artemia salina* foram normalizados, transformados em logaritmo e submetidos a uma regressão não linear, afim de determinar a concentração que mata 50% dos microcrustáceos. Os resultados do *Allium cepa* foram expressos como média  $\pm$  D.P.M. Todas as análises foram realizadas em software GraphPad Prism 6. Os dados foram verificados quanto à distorção, e um teste de normalidade de Shaphiro-Wilk foi realizado para avaliar se a distribuição dos valores era gaussiana. A comparação entre grupos foi feita por um teste de ANOVA com pós hoc de Tukey. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Elucidação química do $\omega$ -hidroxiemodina.

As análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  levaram à identificação da substância  $\omega$ -hidroxiemodina o EM-IES (+) mostrou pico da molécula protonada em  $m/z$  287,0551  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  309,0370  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e  $m/z$  595,0850  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ , 287.0556) (**Figura 1**);  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.25 (s, H-2), 7.64 (s, H-4), 7.14 (d,  $J = 2.0$  Hz, H-5), 6.60 (d,  $J = 2.4$  Hz, H-7), 4.60 (s, 3- $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 12.09 (s, 1-OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz): 163.1 (C-1), 109,7 (C-2), 164,3 (C-3), 111.6 (C-4), 134.8 (C-4a), 118.3 (C-5), 136.7 (C-5a), 153.7 (C-6), 122.5 (C-7), 163.1 (C-8), 113.5 (C-8a), 184.0 (C-9), 189.4 (C-10), 62.5 (3- $\text{CH}_2\text{OH}$ ).

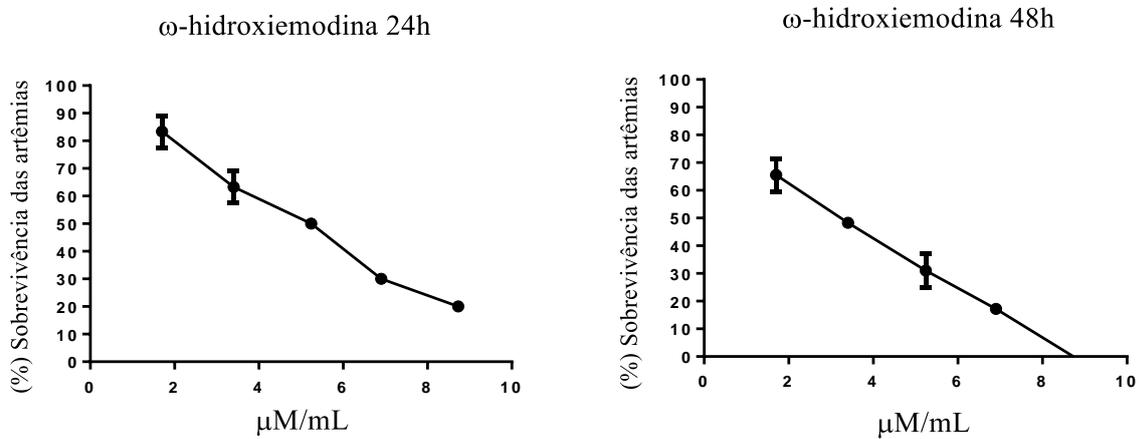
**Figura 1:** Espectro de massas EM-IES (+) da  $\omega$ -hidroxiemodina.



#### 3.2 Avaliação tóxica da $\omega$ -hidroxiemodina em *Artemia salina*.

Os valores de CL50 em *Artemia salina* obtidos da  $\omega$ -hidroxiemodina em 24 e 48h foram apresentados na **Figura 1**. O grau de letalidade foi diretamente proporcional à concentração da substância em ambas as análises. Na avaliação de toxicidade geral, a CL50 da  $\omega$ -hidroxiemodina em 24h foi de 4,6  $\mu\text{M}$  e em 48h 3,6  $\mu\text{M}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevivência das artemias nos tempos avaliados. Os dados apontam que a  $\omega$ -hidroxiemodina induziu toxicidade em baixas concentrações.

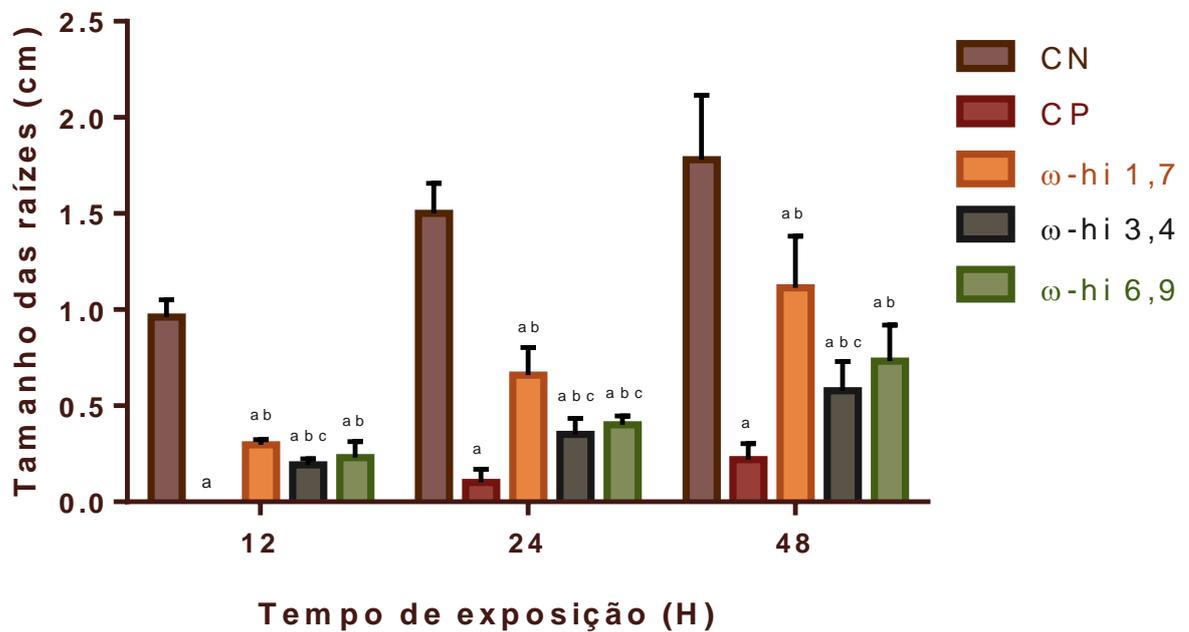
**Figura 2:** Sobrevivência dos náuplios de artemia tratados 24 e 48h com a  $\omega$ -hidroxiemodina. Cada ponto de dados é a média de 5 determinações independentes que compõem um total de 50 náuplios. As barras representam  $\pm$  D.P.M.



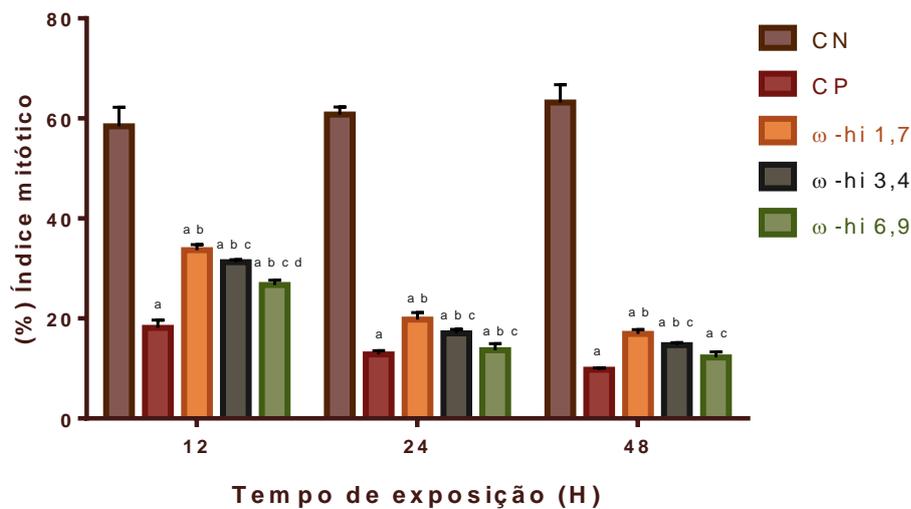
### 3.3 Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e em meristemas de raízes de *Allium cepa*

Quanto a toxicidade em raízes de *Allium cepa* às concentrações da  $\omega$ -hidroxiemodina mostraram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no crescimento (**Figura 3**) e nos valores do índice mitótico em comparação com o controle negativo indicando toxicidade e citotoxicidade da  $\omega$ -hidroxiemodina (**Figura 4**). Nessas análises, a redução foi parcial ou inteiramente dependente da concentração para o crescimento médio da raiz e no índice mitótico, respectivamente.

**Figura 3:** Avaliação da toxicidade da  $\omega$ -hidroxiemodina pelo tamanho de raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9  $\mu$ M);  $\omega$ -hi (1,7; 3,4 e 6,9  $\mu$ M). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA de dois caminhos), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN, <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP e <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo  $\omega$ -hi 1,7. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.



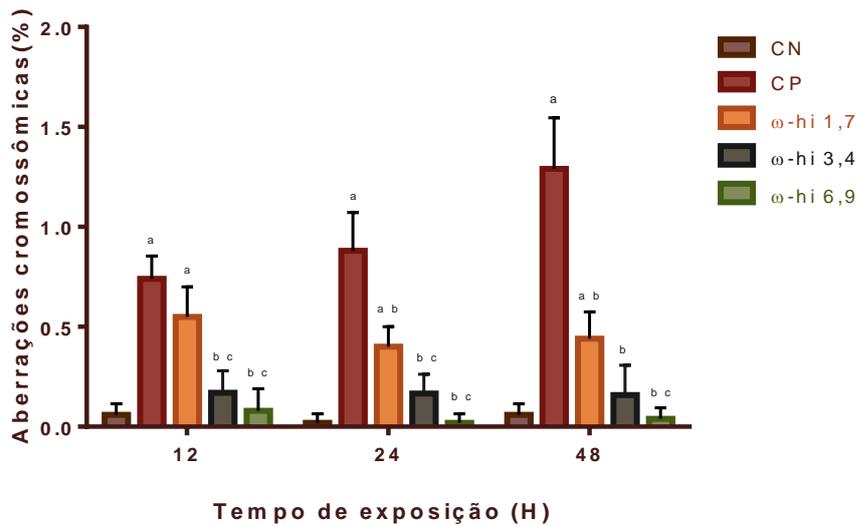
**Figura 4:** Avaliação citotóxica da  $\omega$ -hidroxiemodina pelo índice mitótico em meristemas de raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9  $\mu$ M);  $\omega$ -hi (1,7; 3,4 e 6,9  $\mu$ M). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA de dois caminhos), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN, <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP, <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo  $\omega$ -hi 1,7 e <sup>d</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo  $\omega$ -hi 3,4. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.



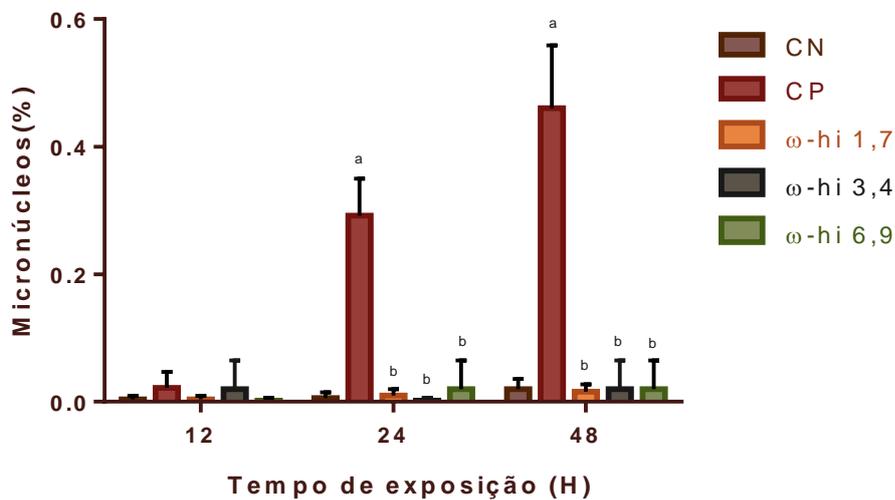
### 3.4 Avaliação genotóxica e mutagênica da $\omega$ -hidroxiemodina, em raízes de *Allium cepa*

Com relação às aberrações cromossômicas os dados obtidos indicam que a  $\omega$ -hidroxiemodina foi genotóxica em meristemas de raízes de *A. cepa* apenas na menor concentração testada quando comparado ao controle negativo (**Figura 5**), especialmente pela indução de cromossomos em atrasos. Entretanto não foram significantes os dados para formação de micronúcleos (**Figura 6**).

**Figura 5:** Avaliação genotóxica da  $\omega$ -hidroxiemodina por aberrações cromossômicas em raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9  $\mu$ M);  $\omega$ -hi (1,7; 3,4 e 6,9  $\mu$ M). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA de dois caminhos), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN, <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP e <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo  $\omega$ -hi 1,7. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.



**Figura 6:** Avaliação mutagênica da  $\omega$ -hidroxiemodina por micronúcleos em raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9  $\mu$ M);  $\omega$ -hi (1,7; 3,4 e 6,9  $\mu$ M). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA de dois caminhos), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN e <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.





#### 4 DISCUSSÃO

A análise conjunta dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , massas de alta resolução EM-IES (+) em comparação com dados da literatura (SANCHEZ et al., 2011) permitiu identificar a substância como 1, 3, 8 tri-hidroxi-6-(hidroximetil) antraceno-9,10 diona (ou  $\omega$ -hidroxiemodina).

Os resultados obtidos durante a avaliação de 24 e 48 de exposição dos náuplios das artêmias a  $\omega$ -hidroxiemodina demonstraram uma alta toxicidade segundo o estudo de Meyer et al., 1982. A alta toxicidade de compostos em vários estudos com *Artemia salina* foi correlacionada com a atividade antitumoral (NUNES et al., 2009; GLINIMA et al., 2014; KUMMARA; PATIL; URIAH, 2016). O ensaio de citotoxicidade de *Artemia salina* é uma ferramenta científica importante para a análise preliminar citotóxica de drogas naturais e sintéticas frente a estudos mais complexos e que demandam evidências para ser proposta a análise desses compostos em organismos superiores.

Devido à complexa natureza do câncer, caracterizada pela proliferação descontrolada e anormal das células, esta doença se apresenta em mais de cem patologias clínicas diferentes (ZEB et al., 2014). O desenvolvimento rentável de medicamentos citotóxicos se tornou um verdadeiro desafio. Fármacos utilizados no tratamento do câncer em conjunto com a radiação mesmo sendo produzidos para matar seletivamente as células cancerosas, com o intuito de produzir efeitos limitados sobre as células normais, ainda são capazes de causar mutações no DNA em células em divisão ativa. Os tratamentos disponíveis só são eficazes contra certos tipos de câncer e estão associados a efeitos tóxicos em células normais, com posterior desenvolvimento de efeitos adversos graves (AYAZ et al., 2016). Portanto, a busca de novas drogas anticâncer tanto de origem natural e sintética é crucial.

Mesmo que o comportamento das células tumorais seja bastante heterogêneo, uma característica apresentada frequente em células cancerígenas é o aumento da taxa de proliferação quando comparado às células normais (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MARZO; NAVAL, 2013). Drogas que interferem na progressão normal da mitose são os compostos quimioterápicos atualmente mais bem sucedidos, com vasta utilização para o tratamento do câncer. Independente do sucesso apresentado na clínica existe uma preocupação significativa com os agentes antimicrotúbulos devido seus efeitos colaterais significativos, como neutropenia e neurotoxicidade (VERRILLS; KAVALLARIS, 2005; MALIK; STILLMAN, 2008; MARZO; NAVAL, 2013). Porém, o maior problema com o uso de agentes

antimicrotúbulos no tratamento do câncer é sua eficácia limitada como agentes únicos, durante a quimioterapia, o que levar a busca de medicamentos mais direcionados para a mitose.

Portanto, tem havido grande interesse em identificar novos agentes antimitóticos com novas vias de ação, melhores características farmacológicas, especialmente em relação a redução dos efeitos colaterais durante o tratamento. A descoberta de drogas em produtos naturais tem sido objeto de pesquisas recentes no desenvolvimento de medicamentos contra o câncer (CHAN; KOH; LI, 2012; DALL'ACQUA, 2014). Nos últimos anos o ambiente marinho despertou o interesse dos pesquisadores pela descoberta de novos compostos bioativos (BLUNT et al., 2015; MONTASER; LUESCH, 2011), dentre eles metabólitos secundários de fungos marinhos (EBEL; LIU, 2010) como antraquinonas e hidroxiantraquinonas (FOUILLAUD et al., 2016).

As Antraquinonas representam uma classe de moléculas da família quinona, com base numa estrutura composta de três anéis de benzeno. A estrutura básica 9,10-antracenediona, também chamado 9,10-dioxoanthracene (fórmula  $C_{14}H_8O_2$ ), inclui dois grupos cetona no anel central (FOUILLAUD et al., 2016). Durante anos, tem-se mostrado muito interesse no desenvolvimento e uso de antraquinonas e seus derivados para prevenção e tratamento do câncer.

A  $\omega$ -hidroxiemodina teve ação antimitótica, pela inibição do índice mitótico, como observado no estudo em todas as concentrações testadas. Em estudos prévios a  $\omega$ -hidroxiemodina demonstrou efeito citotóxico *in vitro* contra linhagens cancerígenas de ovário (SK-OV-3), cólon (HT-29), fígado (HepG-2), pulmão (A549) (HWANGBO et al., 2012; SHEN et al., 2012), mama (MFC-7), promielócitos (HL-60), linfoblastos (RAJI) (SHEN et al., 2012). Através dessas evidências de citotoxicidade, vários mecanismos foram propostos quanto à sua atividade anticancerígena. Um dos mecanismos refere-se à capacidade da  $\omega$ -hidroxiemodina de inibir a DNA topoisomerase I e II (HWANGBO et al., 2012) efeito já observado em hidroxiantraquinonas (ESMAT; TOMASETTO; RIO, 2006; HSIAO et al., 2008). Outro mecanismo refere-se que a  $\omega$ -hidroxiemodina inibe a indução de COX-2 através da inibição da via de sinalização de Akt/NF- $\kappa$ B a Akt que desempenham um papel fundamental no crescimento, proliferação e sobrevivência celular através da regulação de múltiplos sinais, entre eles a via NF- $\kappa$ B (LU et al., 2012).

A atividade antimitótica foi avaliada utilizando o modelo de meristema de raiz de *Allium cepa*, bioensaio rápido, altamente sensível e reprodutível para a detecção de eventos antimitóticos (FISKESJÖ, 1985; BAGATINI; DA SILVA; TEDESCO, 2007). Em estudos prévios foi observada a capacidade antimitótica da hidroxiantraquinonas aloe emodina, reína,



quinizarina e emodina (BADRIA; IBRAHIM, 2013). O que demonstra a capacidade das hidroxiantraquinonas como possíveis agentes anticancerígenos a serem explorados.

Vale ressaltar que, embora as estruturas químicas básicas de várias antraquinonas sejam semelhantes, os grupos funcionais específicos anexados em posições específicas, particularmente para o grupo hidroxil, pode conferir bioatividades notavelmente diferentes observado em estudos que relatam a parada da mitose induzida por hidroxiantraquinonas (FOTIA et al., 2012; CHOI et al., 2016; SUBOJ et al., 2016; DONG et al., 2017). A análise demonstrou mudanças no índice mitótico quando as raízes foram tratadas com a  $\omega$ -hidroxiemodina, a atividade mitótica foi reduzida ou inibida, demonstrando atividade dependente da concentração utilizada.

As hidroxiantraquinonas contendo uma estrutura de anel poliaromático podem se ligar ao DNA formando cross-links e adutos (GHOLIVAND et al., 2011; GHOSH et al., 2013), além de induzirem a formação de radicais livres produzindo lesões oxidativas ao DNA (CHOI et al., 2016; XIE et al., 2014). Foi observado um aumento nas aberrações cromossômicas nas raízes tratadas com a  $\omega$ -hidroxiemodina, no entanto com o aumento da concentração, houve redução do efeito genotóxico, o que pode ser explicado pelo baixo índice mitótico, pois quanto menos células estiverem em divisão, menor será a possibilidade de avaliar os efeitos genotóxicos sobre o DNA das células, o que também pode justificar a ausência de mutagenicidade, avaliada pela frequência de micronúcleos ( $p > 0,05$ ).



## 5 CONCLUSÃO

A  $\omega$ -hidroxiemodina demonstrou elevada toxicidade no ensaio de bioletalidade com náuplios de *Artemia salina*, bem como efeitos tóxicos e citotóxicos, com ênfase para a redução da mitose em modelo de *Allium cepa*. Também foram observados mecanismos citogenéticos de indução de aberrações cromossômicas, no entanto não induz a formação de micronúcleos em meristemas de raízes de *A. cepa*. Os dados sugerem que as atividades observadas são compatíveis com candidatos a fármacos antitumorais.



## REFERÊNCIAS

- ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.
- AYAZ, M.; JUNAID, M.; ULLAH, F.; SADIQ, A.; SUBHAN, F.; KHAN, M. A.; AHMAD, W.; ALI, G.; IMRAN, M.; AHMAD, S. Molecularly characterized solvent extracts and saponins from *Polygonum hydropiper* L. show high anti-angiogenic, anti-tumor, brine shrimp, and fibroblast NIH/3T3 cell line cytotoxicity. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, 2016.
- BADRIA, F. A.; IBRAHIM, A. S. Evaluation of natural anthracene-derived compounds as antimitotic agents. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 7, n. 2, p. 84-89, 2013.
- BAGATINI, M. D.; DA SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 116-211, 2015.
- CHEN, L., LIU, W., HU, X., HUANG, K., WU, J. L., & ZHANG, Q. Q. Citrinin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 4, p. 515-517, 2011.
- CHOI, H. K.; RYU, H.; SON, A. R.; SEO, B.; HWANG, S. G.; SONG, J. Y.; AHN, J. The novel anthraquinone derivative IMP1338 induces death of human cancer cells by p53-independent S and G2/M cell cycle arrest. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 79, p. 308-314, 2016.
- DALL'ACQUA, S. Natural products as antimitotic agents. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 20, p. 2272-2285, 2014.
- DONG, X.; FU, J.; YIN, X.; QU, C.; YANG, C.; HE, H.; NI, J. Induction of Apoptosis in HepaRG Cell Line by Aloe-Emodin through Generation of Reactive Oxygen Species and the Mitochondrial Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 685-696, 2017.
- DRUKMAN, S.; KAVALLARIS, M. Microtubule alterations and resistance to tubulin-binding agents. **International journal of oncology**, v. 21, n. 3, p. 621-628, 2002.
- EBEL, R.; MANDER, L.; LIU, H. Natural product diversity from marine fungi. **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**, v. 2, p. 223-262, 2010.
- ESMAT, Amr Y.; TOMASETTO, Catherine; RIO, Marie-Christine. Cytotoxicity of a natural anthraquinone (aloin) against human breast cancer cell lines with and without ErbB-2: Topoisomerase II- $\alpha$  coamplification. **Cancer biology & therapy**, v. 5, n. 1, p. 97-103, 2006.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.



FOTIA, C.; AVNET, S.; GRANCHI, D.; BALDINI, N. The natural compound Alizarin as an osteotropic drug for the treatment of bone tumors. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 9, p. 1486-1492, 2012.

FOUILLAUD, M.; VENKATACHALAM, M.; GIRARD-VALENCIENNES, E.; CARO, Y.; DUFOSSÉ, L. Anthraquinones and Derivatives from Marine-Derived Fungi: Structural Diversity and Selected Biological Activities. **Marine drugs**, v. 14, n. 4, p. 64, 2016.

GHOLIVAND, M. B.; KASHANIAN, S.; PEYMAN, H.; ROSHANFEKR, H. DNA-binding study of anthraquinone derivatives using chemometrics methods. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2630-2638, 2011.

GHOSH, P.; DEVI, G. P.; PRIYA, R.; AMRITA, A.; SIVARAMAKRISHNA, A.; BABU, S.; SIVA, R. Spectroscopic and in silico evaluation of interaction of DNA with six anthraquinone derivatives. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 5, p. 1127-1137, 2013.

GLINMA, B.; KPOVIESSI, S. D.; GBAGUIDI, F. A.; KAPANDA, C. N.; BERO, J.; QUETIN-LECLERCQ, J.; MOUDACHIROU, M.; POUPAERT, J.; ACCROMBESSI, G. C.; GACHOMO, E. W.; BABA-MOUSSA, L.; KOTCHONI, S. O. Trypanocidal and cytotoxic evaluation of synthesized thiosemicarbazones as potential drug leads against sleeping sickness. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 3, p. 1617-1622, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HSIAO, C. J.; LI, T. K.; CHAN, Y. L.; HSIN, L. W.; LIAO, C. H.; LEE, C. H.; LYU, P. C.; GUH, J. H. WRC-213, an l-methionine-conjugated mitoxantrone derivative, displays anticancer activity with reduced cardiotoxicity and drug resistance: identification of topoisomerase II inhibition and apoptotic machinery in prostate cancers. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 847-856, 2008.

HUSSAIN, A.; VERMA, C. K.; CHOUHAN, U. Identification of novel inhibitors against Cyclin Dependent Kinase 9/Cyclin T1 complex as: Anti cancer agent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 6, p. 1229-1242, 2017.

HWANGBO, K.; ZHENG, M. S.; KIM, Y. J.; IM, J. Y.; LEE, C. S.; WOO, M. H.; JAHNG, Y.; CHANG, H. W.; SON, J. K.; Inhibition of DNA topoisomerases I and II of compounds from *Reynoutria japonica*. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 9, p. 1583-1589, 2012.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253, 2004.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 3, p. 154-159, 2002

KUMMARA, S.; PATIL, M. B.; URIAH, T. Synthesis, characterization, biocompatible and anticancer activity of green and chemically synthesized silver nanoparticles—A comparative study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 10-21, 2016.

KUO, C. C.; HSIEH, H. P.; PAN, W. Y.; CHEN, C. P.; LIOU, J. P.; LEE, S. J.; CHANG, Y. L.; CHEN, L. T.; CHEN, C. T.; CHANG, J. Y. BPR0L075, a novel synthetic indole



compound with antimitotic activity in human cancer cells, exerts effective antitumoral Activity in vivo. **Cancer research**, v. 64, n. 13, p. 4621-4628, 2004.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938.

LI, H.; WEI, J.; PAN, S. Y.; GAO, J. M.; TIAN, J. M. Antifungal, phytotoxic and toxic metabolites produced by *Penicillium purpurogenum*. **Natural product research**, v. 28, n. 24, p. 2358-2361, 2014.

LONGHIN, S. R. Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos. [Tese de Doutorado]. Programa de Doutorado em Química, do Instituto de Química da Universidade de Brasília. 2008.

LU, Y.; SUH, S. J.; LI, X.; HWANG, S. L.; LI, Y.; HWANGBO, K.; PARK, S. J.; MURAKAMI, M.; LEE, S. H.; JAHNG Y, SON JK, KIM CH, CHANG HW. Citreorosein, a naturally occurring anthraquinone derivative isolated from *Polygoni cuspidati radix*, attenuates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin D 2 generation by blocking Akt and JNK pathways in mouse bone marrow-derived mast cells. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 3, p. 913-919, 2012.

MALIK, B.; STILLMAN, M. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Current neurology and neuroscience reports*, v. 8, n. 1, p. 56-65, 2008.

MARZO, I.; NAVAL, J. J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 6, p. 703-710, 2013.

MARZO, I.; NAVAL, J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 6, p. 703-710, 2013.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. Bench-top bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. **Studies in natural products chemistry**, v. 9, p. 383-409, 1991.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MIAO, B.; CHEN, Y.; LI, J.; XIN, X.; GAN, L.; FU, X.; GENG, M. Oligomannururate sulfate, a novel antimitotic agent, exerts anti-cancer activity by binding to tubulin on novel site. **Cancer biology & therapy**, v. 10, n. 1, p. 89-98, 2010.

MONTASER, R.; L, H. Marine natural products: a new wave of drugs?. **Future**, v. 3, n. 12, p. 1475-1489, 2011.

NOVÍO, S.; FREIRE-GARABAL, M.; NÚÑEZ, M. J. Target driven preclinical screening for new antimitotic chemotherapy agents. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 20, p. 2263-2271, 2014.

NUNES, L. C. C., GALINDO, A. B., DEUS, A. D. S. O. D., RUFINO, D. A., RANDAU, K. P., XAVIER, H. S., CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM NETO, P. J. Variabilidade sazonal dos



constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 524-529, 2009.

SANCHEZ, J. F.; ENTWISTLE, R.; HUNG, J. H.; YAEGASHI, J.; JAIN, S.; CHIANG, Y-M.; WANG, C. C.; OAKLEY, B. R. Genome-Based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 11, p. 4010-4017, 2011.

SESE, B. T.; GRANT, A.; REID, B. J. Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 72, n. 19, p. 1168-1180, 2009.

SUBOJ, P.; BABYKUTTY, S.; SRINIVAS, P.; GOPALA, S. Aloe emodin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via activation of caspase-6 in human colon cancer cells. **Pharmacology**, v. 89, n. 1-2, p. 91-98, 2012.

SWIFT, L. H.; GOLSTEYN, R. M. Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. **Int. J. Mol. Sci**, v. 15, p. 3403-3431, 2014.

TAMBURINI, M.; CASALI, P. G.; MICCINESI, G. Outcome assessment in cancer management. **Surgical Clinics of North America**, v. 80, n. 2, p. 471-486, 2000.

VERRILLS, N. M.; KAVALLARIS, M. Improving the targeting of tubulin-binding agents: lessons from drug resistance studies. **Current pharmaceutical design**, v. 11, n. 13, p. 1719-1733, 2005.

WHO, 1in 2 countries unprepared to prevent and manage cancers. 2017.

XIE, M. J.; MA, Y. H.; MIAO, L.; WANG, Y.; WANG, H. Z.; XING, Y. Y.; XI, T.; LU, Y. Y. Emodin-Provoked oxidative stress induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through a p53-mitochondrial apoptotic pathway. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 13, p. 5201-5205, 2014.

ZEB, A.; SADIQ, A.; ULLAH, F.; AHMAD, S.; AYAZ, M. Phytochemical and toxicological investigations of crude methanolic extracts, subsequent fractions and crude saponins of *Isodon rugosus*. **Biological research**, v. 47, n. 1, p. 57, 2014.

SANCHEZ, J. F.; ENTWISTLE, R.; HUNG, J. H.; YAEGASHI, J.; JAIN, S.; CHIANG, Y-M.; WANG, C. C.; OAKLEY, B. R. Genome-Based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 11, p. 4010-4017, 2011.



## Capítulo II

---

**Atividade antitumoral da  $\omega$ -hidroxiemodina por mecanismos citogenéticos em células de sarcoma 180 e avaliação da citotoxicidade em linhagens tumorais e não tumorais**



## Atividade antitumoral da $\omega$ -hidroxiemodina por mecanismos citogenéticos

José Victor de Oliveira Santos<sup>1,2</sup>, Ag-Anne Pereira Melo de Menezes,<sup>1,2</sup> Antonielly Campinho dos Reis<sup>2</sup>, Rai Pablo de Sousa Aguiar<sup>3</sup>, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar<sup>2,4</sup>, João Marcelo de Castro e Sousa<sup>1</sup>, Muhammad Torequl Islam<sup>4</sup>, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>2</sup> Núcleo de Tecnologia farmacêutica, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>3</sup> Pós-graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>4</sup> RENORBIO Rede de Biotecnologia do Nordeste

### RESUMO

Anualmente as perspectivas para novos casos de câncer estão aumentando, principalmente devido ao envelhecimento da população. Devido a esses desafios a demanda para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento do câncer se torna cada vez maior. A  $\omega$ -hidroxiemodina devido a sua capacidade de ligação intramolecular possui uma vasta gama de atividades farmacológicas, mas são raros os relatos como antitumoral. O objetivo do estudo foi de realizar o isolamento da  $\omega$ -hidroxiemodina de extratos do *Penicillium citrinum* isolado da alga marinha *Dichotomaria marginata*, bem como sua caracterização e avaliações citotóxicas em células de Sarcoma 180 e em linhagens tumorais de leucemia (HL-60), adenocarcinoma gástrico (AGP01), melanoma (SKMEL-28) e linhagem normal de fibroblastos de pulmão (MRC5) e genotóxicas em células de Sarcoma 180. A viabilidade celular foi avaliada pelos ensaios MTT, Azul de tripan e Alamar blue, a genotoxicidade pelo teste cometa na sua versão alcalina e mutagenicidade pelo teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese. A  $\omega$ -hidroxiemodina apresentou citotoxicidade em células de Sarcoma 180 e em todas as linhagens celulares usadas pela significativa ( $p < 0,05$ ) redução da viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Também induziu genotoxicidade em todas as concentrações testadas, em células de Sarcoma 180, pelos significantes aumentos dos índices e frequências de danos ao DNA, que possivelmente não foram reparados devido ao aumento de micronúcleos, pontes e brotos nucleoplasmáticos, bem como de apoptoses e necroses. A citotoxicidade da  $\omega$ -hidroxiemodina foi observada pela redução do índice de divisão nuclear. Foram observadas correlações positivas entre o número de células apoptóticas e necróticas respectivamente e índice de danos ( $r = 0,9033$ ,  $r = 0,93009$ ) e a frequência de danos ( $r = 0,7779$ ,  $r = 0,8435$ ) nas células de Sarcoma 180. Os dados genotóxicos bem como as alterações nucleares são possíveis mecanismos de importância para a citotoxicidade da  $\omega$ -hidroxiemodina, como uma substância promissora para formulações farmacêuticas antitumorais.

**Palavras-chave:** Toxicogenética. *Penicillium citrinum*. Genotoxicidade. Mutagenicidade



## ABSTRACT

Annually the outlook for new cancer cases is increasing, mainly due to the aging of the population. Due to these challenges the demand for the development of new drugs for the treatment of cancer becomes increasing. The  $\omega$ -hydroxyemodin because of its intramolecular binding ability has a wide range of pharmacological activities, but reports are rare as antitumor. The objective of the study was to carry out the isolation of  $\omega$ -hydroxyemodin from extracts of *Penicillium citrinum* isolated from the seaweed *Dichotomaria marginata*, as well as its characterization and cytotoxic evaluations in Sarcoma 180 cells and in leukemia tumor cells (HL-60), adenocarcinoma (AGP01), melanoma (SKMEL-28) and normal line of lung fibroblasts (MRC5) and genotoxic in Sarcoma 180 cells. Cell viability was assessed by the MTT, Trypan blue and Alamar blue assays, genotoxicity by the test in its alkaline version and mutagenicity by the micronucleus test with block of cytokinesis. The  $\omega$ -hydroxyemodin showed cytotoxicity in Sarcoma 180 cells and in all cell lines used by the significant ( $p < 0.05$ ) reduction in cell viability) at all concentrations tested. It also induced genotoxicity at all concentrations tested in Sarcoma 180 cells by significant increases in DNA damage rates and frequencies, which possibly were not repaired due to increased nucleoplasmic micronuclei, bridges and buds, as well as apoptosis and necrosis. The cytotoxicity of  $\omega$ -hydroxyemodin was observed by reduction of the nuclear division index. Positive correlations were observed between the number of apoptotic and necrotic cells respectively and damage index ( $r = 0.9033$ ,  $r = 0.93009$ ) and the frequency of damage ( $r = 0.7779$ ,  $r = 0.8435$ ) in the cells of Sarcoma 180. Genotoxic data as well as nuclear alterations are possible mechanisms of importance for the cytotoxicity of  $\omega$ -hydroxyemodin as a promising substance for antitumor pharmaceutical formulations.

**Keywords:** Toxicogenetics; *Penicillium citrinum*; Genotoxicity; Mutagenicity



## 1 INTRODUÇÃO

Mesmo que o comportamento celular seja bastante heterogêneo entre os diferentes tipos de cânceres, uma característica similar das células tumorais é o aumento da taxa de proliferação quando comparado às células normais, geralmente consequência da ausência de resposta aos sinais inibitórios do crescimento e/ ou a autossuficiência em fatores de crescimento. Nesse sentido alguns dos compostos utilizados na terapia oncológica, agem bloqueando a mitose e subsequentemente induzindo a morte celular (MARZO; NAVAL, 2013). Porém anualmente as perspectivas para novos casos de câncer estão aumentando com ausência de uma melhora desses números no futuro, principalmente devido ao envelhecimento da população. Esse aumento no diagnóstico de casos de câncer terá um crescimento de aproximadamente 60% nos próximos 20 anos com mortalidade similar em porcentagem. Claramente, as atuais estratégias preventivas, clínicas e de pesquisa não foram suficientes para enfrentar os desafios causados por essa patologia (MENDELSON; RINGBORG; SCHILSKY, 2012). Devido a esses desafios a demanda para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento do câncer se torna cada vez maior.

O  $\omega$ -hidroxiemodina possui diversas atividades farmacológicas como a inibição da  $\mu$ -calpaína (LIANG et al., 2012) composto reconhecido por ser chave da neurodegeneração em diversas condições patológicas (WANG et al., 2013); antiobesidade (NOINART et al., 2017); Antiviral contra metapneumovírus aviário, vírus da diarreia bovina, herpes tipo 1 (IÓCA et al., 2016); anti-promastigotas de *Leishmania brasiliensis*, antibacteriano contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (MARINHO et al., 2013); anti-hemolítica (SHIA et al., 2010); inibição da protease do vírus da hepatite C (HAWAS et al., 2016); anti-inflamatória (DALY et al., 2015; LU et al., 2012a; LU et al., 2012b) e potente inibição *in vitro* e *in silico* da calmodulina (GONZÁLEZ-ANDRADE et al., 2013), a qual, está envolvida em uma variedade de funções fisiológicas e fisiopatológicas relacionadas ao câncer, incluindo, crescimento celular, diferenciação, proliferação bem como resposta imune (SEALES; MICOLI; MCDONALD, 2006) e ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (GONZÁLEZ-ANDRADE et al., 2013).

A morte celular programada se constitui como uma barreira natural que restringem a sobrevivência e difusão de células malignas. No entanto, as células cancerosas desenvolveram várias estratégias para contornar a morte celular programada através da geração de mutações genéticas ou modificações epigenéticas nos moduladores chave das vias de morte celular programada (SU et al., 2015). Durante processos de combate a células cancerosas como a



irradiação ou quimioterapia, as células mortas, se tornam susceptíveis a se decomporem por meio de um processo necrótico que pode desencadear uma resposta inflamatória (SILVA, 2010) causando trauma nos tecidos adjacentes (CHAN, 2014). A vasta gama de atividades farmacológicas do  $\omega$ -hidroxiemodina se devem a sua forte ligação de hidrogênio intramolecular (RAHIMIPOUR et al., 2001) e sua capacidade antitumoral (GÄRTNER et al., 2014) observada contra diversas linhagens cancerígenas que o tornam um composto atrativo para a terapia oncológica. Assim, o estudo teve como objetivo o isolamento, caracterização do  $\omega$ -hidroxiemodina e contribuição para a compreensão da atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica em células de Sarcoma 180 (S180) e em linhagens tumorais de leucemia (HL-60), adenocarcinoma gástrico (AGP01), melanoma (SKMEL-28) e linhagem normal de fibroblastos de pulmão (MRC5).



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes químicos para os ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade

O agente antineoplásico doxorrubicina foi adquirido pela Eurofarma ® Laboratories, citocalasina-B; DMSO (dimetilsulfóxido), MTT ([3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio brometo] 98% e resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO). O Azul de Tripam foi adquirido da Invitrogen.

### 2.2 Solventes gerais e equipamentos básicos do isolamento do $\omega$ -hidroxiemodina.

Foram utilizados solventes padrões analíticos (PA) das marcas Synth, Dinâmica, Vetec, Merck: metanol (MeOH), etanol, acetato de etila, *n*-hexano, *sec*-butanol, acetonitrila (MeCN). Estes solventes foram usados para extração, fracionamento. Os extratos e frações foram concentrados em evaporador rotatório da *Buchi* R-114, sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo FABBE; Autoclave vertical *Quimis* Aparelhos Científicos Ltda; Câmara de Fluxo laminar vertical – Panchane; Incubadora Rotatória (“Shaker”) Marconi. Foi utilizado no auxílio à dissolução dos extratos e frações um equipamento de ultrassom modelo Unique, sendo as massas medidas em balança Kern 410 e Digimed KN5000L, ambas da Marconi. Para a separação cromatográfica em coluna aberta foi utilizado a fase estacionária Sephadex LH-20 *Sigma-Aldrich*. Para isolamento e crescimento dos microrganismos foram utilizados os meios sólidos: Arroz parboilizado (Marcon<sup>®</sup>) e BDA (Batata Dextrose Agar-Sigma<sup>®</sup>).

### 2.3 Coleta da macroalga *Dichotomaria marginata*

A macroalga vermelha *Dichotomaria marginata* foi coletada em dezembro de 2009 na região norte de São Paulo, na praia de Fortaleza, na cidade de Ubatuba, no Brasil (23°24'93 'e 45°03'41"W) durante o tempo de maré baixa. O Dr. Nair Yokoga (Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil) realizou a identificação de *D. marginata*, e uma espécime do voucher foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, Brasil (comprovante n. ° SP 400960).



## 2.4 Isolamento e identificação do fungo endofítico

O fungo endofítico *P. citrinum* foi isolado e classificado a partir do tecido interno da macroalga vermelha marinha *D. marginata* conforme descrito em (DE ANDRADE et al., 2014).

## 2.5 Obtenção do extrato acetronilia do fungo *P. citrinum* (FMeCNDm) e isolamento da $\omega$ -hidroxiemodina.

A substância  $\omega$ -hidroxiemodina foi isolada do microrganismo *Penicillium citrinum*. Para isso linhagens dos microrganismos foram repicadas para placas de Petri em PDA e posteriormente inoculado. A linhagem foi distribuída em seis frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo cada um 90 g de arroz parboilizado e 75 mL de água destilada, por 21 dias. Após este período, a cultura foi triturada e extraída com AcOEt (7 x 350 mL). O solvente foi evaporado em rotaevaporador fornecendo 10 g e 36 g respectivamente, de cada extrato bruto. O extrato bruto foi re-solubilizado em AcOEt e submetido a partição com água Milli-Q. A fase em AcOEt foi rota-evaporada e re-solubilizada em MeCN e submetida a partição com hexano. Os solventes orgânicos foram eliminados utilizando evaporador rotatório, fornecendo o extrato FMeCNDm.

Uma porção (900 mg) da fração acetone nitrila de *P. citrinum* (FMeCNDm) foi fracionado por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (70 cm x 3,0 cm) eluída com MeOH:DCM (1:1), obtendo-se 45 frações de aproximadamente 80 mL cada. A análise por CCD e CLAE-DAD/EM-IES [Coluna C18; MeOH:H<sub>2</sub>O (5-100% MeOH), 254 nm], permitiu seu agrupamento em 16 novos grupos de frações por similaridade dos cromatogramas (*FDm1Se-FDm16Se*). A fração FDm11Se após lavagem com metanol, obteve-se um precipitado amarelo, cuja análise do perfil em CLAE-DAD-EM-IES confirmou a presença de apenas um pico com tempo de retenção em 16,73 min. As análises de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C levaram à identificação da substância  $\omega$ -hidroxiemodina (15 mg).

## 2.6 Caracterização dos extratos da Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para análises via CLAE foram usados solventes J. T. Baker (acetone nitrila, metanol) e água ultra pura (18 M $\Omega$ ) obtida no sistema Milli-Q Plus. Foram utilizadas colunas Phenomenex Gemini C18 analítica (250 mm x 4,60 mm, 5  $\mu$ m) e SunFire C18 (250 mm X 10 mm, 10  $\mu$ m).



(a) Analítico e preparativo sistema binário Shimadzu LC-10AD, com auto injetor Shimadzu SIL-10A e detector UV-*Diodo Array*; (Laboratório- NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia);

(b) Cromatógrafo Líquido acoplado ao espectrômetro de massas (CLAE-PDA/EM-IES) Thermo Instruments MS system (LTQ XL/ LTQ *Orbitrap Discovery* acoplado a sistema de CLAE, binário-Thermo *Fisher Scientific*, detector PDA, injetor automático. As análises foram realizadas com voltagem do capilar 45V, temperatura do capilar 260°C, gás de arraste (N<sub>2</sub>), fluxo 10-20 (unidades arbitrárias). O software *Xcalibur* (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos (*Marine Biodiscovery Centre; University of Aberdeen- Scotland-UK*).

## 2.7 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance DRX-500 e Varian Inova, operando a 500 MHz e 400 MHz na frequência de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e o solvente utilizado na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foram CDCl<sub>3</sub> e DMSO-*d*<sub>6</sub> (CIL e Isotec-INC), sendo utilizado TMS ou o solvente residual não deuterado como referência interna.

## 2.8 Cultivo *in vivo* e *ex vivo* de S180

Os experimentos de manutenção do tumor S180 em camundongos *Mus musculus* foram iniciados sob a aprovação prévia pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, com documento comprobatório de número 167/16. As células tumorais do S180 foram mantidas em camundongos através de passagens intraperitoneais semanais. O líquido ascítico, com células de S180 germinadas por 7 a 9 dias, foi aspirado da cavidade intraperitoneal dos animais em condições assépticas e centrifugado (500 g, 5 min, 4° C) para obtenção do *pellet* celular. A concentração celular para a cultura em RPMI foi ajustada a 1 x 10<sup>6</sup> células/mL segundo Ferreira et al. (2011) com adaptações. Em frascos de cultura contendo 1mL de meio RPMI suplementados com soro bovino fetal (20%), antibióticos (Sigma, St. Louis, MO) e fitohemaglutinina A (Gibco, Grand Island, NY) foram adicionados 20μL de suspensão celular de S180 (1.5 x 10<sup>6</sup>/mL).



## 2.9 Linhagens celulares

As células leucêmicas HL-60 (*Homo sapiens*), melanoma SKMEL-28 (*Homo sapiens*) e fibroblastos de pulmão MRC5 (*Homo sapiens*) foram obtidas da ATCC (The Global Bioresource Center), enquanto que adenocarcinoma gástrico AGP01 (*Homo sapiens*) foi obtida do estudo de Leal et al. (2009) e foram cultivadas em frascos de cultura (25 cm<sup>2</sup>) com 10 mL de DMEM (Meio de Eagle Modificado Dulbecco) (Invitrogen, Carlsbad, CA) que foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen), 0,1% de penicilina e estreptomicina (Invitrogen), em uma incubadora de DBO a 37 ° C. Todos os tratamentos apresentados foram realizados com três repetições independentes.

### 2.10 Ensaio de viabilidade celular

#### 2.10.1 MTT

O ensaio MTT foi realizado para verificar a capacidade citotóxica do composto, seguindo o protocolo sugerido por Mosmann (1983) com adaptações. Em placas de cultura celular de 96 poços, cada poço foi semeado com  $1 \times 10^6$  células em meio DMEM suplementado com 10% de soro de bovino fetal e com 1% de estreptomicina e penicilina. Foram utilizados os seguintes grupos: controle (200  $\mu$ L de DMEM, como controle negativo), o agente citotóxico doxorrubicina (6,9  $\mu$ M / mL, como controle positivo) e o  $\omega$ -hidroxiemodina ( $\omega$ -hi: 2,72; 5,45; 10,9; 21,8125; 43,625; 87,25; 174,5; 349  $\mu$ M). As células foram então incubadas durante 68 h, após este tempo, o DMEM foi substituído por 0,2 mL de meio isento de soro e MTT 0,167 mg / mL. As placas foram incubadas por mais 4 h. O meio contendo MTT foi então descartado e cada poço recebeu 0,1 mL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazam. As absorvências foram medidas em um leitor de microplacas a 550 nm. Os dados de absorvência foram normalizados para controle (Absorvência do tratamento/Absorvência do controle x 100).

#### 2.10.2 Azul de tripan

O protocolo de exclusão de azul de tripan foi executado segundo Strober (2001) com adaptações, avaliado em placas de cultura celular de 24 poços. Em cada poço, as células  $1 \times 10^6$  foram semeadas em 1 mL de meio de cultura completo com os seguintes tratamentos: controle negativo (sem tratamento), agente citotóxico doxorrubicina (6,9  $\mu$ M, como controle positivo) e  $\omega$ -hid: ( $\omega$ -hi: 2,72; 5,45; 10,9; 21,8125; 43,625; 87,25; 174,5; 349  $\mu$ M). 90  $\mu$ L de cada grupo



de células S180 foram removidas da cultura e adicionadas a 10  $\mu\text{L}$  de azul de tripan. As células não viáveis foram contadas por sua cor azul, portanto, consideradas como células mortas. Em contraste, células viáveis não apresentaram essa cor devido à sua capacidade de expulsar o azul de tripan. A diferenciação celular foi observada sob um microscópio óptico com uma ampliação de 40X aumentada com a assistência da câmara de Neubauer onde as células que apresentavam coloração azul eram incapazes de barrar a entrada do corante pela perda da integridade da membrana plasmática e foram consideradas inviáveis.

### 2.10.3 Alamar blue

O ensaio de Alamar blue foi executado conforme Nakayama et al. (1997). As linhagens celulares utilizadas foram a HL-60 (leucemia), AGP01 (adenocarcinoma gástrico), SKMEL-28 (melanoma) e MRC5 (fibroblasto normal). Todas as células foram semeadas em placas de 96 poços (cinco mil células por poço) e mantidas na estufa com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C por 24 horas para permitir a adesão celular. Findado o tempo, as células foram tratadas por 72 horas com a curva concentração-resposta para determinar o CI50 da substância em estudo nas seguintes concentrações: 0  $\mu\text{M}$ , 0,001  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ . Ao final do tempo de tratamento, foi adicionada a solução de Alamar Blue (proporção de 1:20) na placa, e após 3 horas de incubação na estufa as placas foram mensuradas no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 465/540 nm. Os valores de fluorescência de três experimentos independentes.

## 2.10 Avaliação genotóxica e mutagênica da $\omega$ -hidroxiemodina

### 2.10.1 Teste cometa

O ensaio cometa foi realizado segundo Uno et al (2015) com modificações. 10  $\mu\text{L}$  dos tratamentos foram misturados a 90  $\mu\text{L}$  de agarose *low melting* (com baixo ponto de fusão) a 0,75% sob uma temperatura de 37°C e dispostos sobre lâminas de pré-cobertura com agarose sob ponto de fusão normal a 0,75%, cobertas com lamínulas (24 x 60 mm), e mantidas em temperatura ambiente até a solidificação. Retirou-se a lamínula e mergulhou-se a lâmina em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) a 4°C e protegida da luz, por 72 horas. Em seguida, realizou-se a corrida de eletroforese com a solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13), sob banho de gelo para a manutenção da temperatura em torno de 4°C, por 20 minutos, para o desenrolamento do DNA,



o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcalino-lábeis. A eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA, por 20 minutos na presença de luminárias com baixo comprimento de onda. Posteriormente, as lâminas foram retiradas da cuba de eletroforese e mergulhadas na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos; e expostas por 10 minutos, à solução fixadora (Ácido tricloroacético 15%, Sulfato de zinco heptahidratado 5%, e Glicerol 5%). Após secas, as lâminas foram coradas com solução de Nitrato de Prata (0,02%) e lavadas com água destilada por 3 vezes. Adicionou-se a solução de parada (ácido acético) por 5 minutos, lavou-se as lâminas 3 vezes com água destilada, sendo estas deixadas em bandejas para secagem em temperatura ambiente. Para cada grupo foram fotografadas 100 células por lâmina, sendo 2 lâminas por tratamento. A avaliação foi realizada a partir da análise do tamanho e intensidade de degradação e arraste do material genético, onde 5 classes de danos foram identificadas: classe 0, material genético sem danos ou intacto; classe 1, classe 2; classe 3; até o máximo de dano, classe 4. Por fim, calculou-se o índice de dano (ID), variando de 0 a 400, segundo a fórmula:  $ID = \sum 0x(C0) + 1x(C1) + 2x(C2) + 3x(C3) + 4x(C4)$ . Vale ressaltar “C0” representa o número de núcleos em Classe 0, “C1” representa o número de núcleos em Classe 1, “C2” representa o número de núcleos em Classe 2, “C3” representa o número de núcleos em Classe 3 e “C4” representa o número de núcleos em Classe 4; em 100 núcleos avaliados. Também foi calculada a frequência de dano (FD), variando de 0 a 100%, segundo a fórmula:  $FD = 100\% - \text{danos de classe 0}$ .

$$FD (\%) = 100 - C0$$

Nota: “C0” representa o número de células em Classe 0, em 100 núcleos avaliados.

### 2.10.2 Teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN)

O protocolo para a identificação de células binucleadas e parâmetros do ensaio CBMN foi descrito por Fenech (2007), e seguido com algumas modificações. Foi adicionado 1mL de uma suspensão de células com  $1 \times 10^6$  / mL em de cultura de meio DMEM suplementado com 10% de soro de bovino fetal e com 1% de estreptomicina e penicilina em placa de 24 poços. Cada poço foi tratado com. As células foram incubadas durante 44 h a  $37 \pm 1$  ° C. Após a incubação, foram adicionados ao balão de cultura 6 µg / mL de citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO). Em seguida, os frascos foram retornados para incubação por mais 28 horas. No final das fases de incubação, as culturas foram transferidas para tubos Falcon e centrifugadas a 800 rpm

durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e os grânulos celulares foram agitados suavemente, adicionou-se 5 mL de ácido fixador (metanol: ácido acético 5: 1) e 3 gotas de formaldeído, os tubos foram novamente centrifugados. O procedimento foi repetido duas vezes com uma solução fixadora (3: 1) e sem formaldeído. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e 2 a 4 gotas de suspensão celular foram pingadas em lâminas, que foram coradas com Giemsa 5% (tempo de exposição de 7 minutos). As lâminas previamente codificadas foram examinadas em um teste cego com um microscópio óptico a 1000X ampliação, considerando o dano citogenético apresentado em 1000 células por slide em duplicado. O índice de citotoxicidade da divisão nuclear (IDNC) foi calculado com a equação:  $IDNC = (Ap + Nec + M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4)) / N *$ , em que Ap representa o número de células apoptóticas, Nec, o número de células necróticas, M1-M4, o número de células viáveis com 1-4 núcleos e N \*, enquanto que o  $IDN = (M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4)) / N *$ . O número total de células viáveis e não viáveis marcadas, de acordo com Fenech (2007). A citostase foi calculada conforme Cavalcante et al. (2017).

## 2.11 Análise estatística

Para este estudo, os dados de absorvância que foram obtidos a partir do ensaio MTT normalizados e as porcentagens de células viáveis no teste de viabilidade celular do azul de tripan foram transformados em logaritmo e submetidos a uma regressão não linear a fim de ser encontrado a CI50 em ambos os ensaios. A normalidade das variáveis contínuas foi verificada pela prova Shapiro-Wilk. Os valores de apoptose, necrose, ID e FD foram submetidos a correlação de Pearson com significância para  $p < 0,05$  e  $0,0001$ . As porcentagens de ambos os ensaios de viabilidade celular, o número médio de micronúcleos, do IDN, IDNC, apoptose e necrose foram submetidos a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Os valores calculados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (D.P.M) e considerados estatisticamente significativos com  $p < 0,05$ , foi usado Graph Pad Prism 6.0 (Graph pad Inc., San Diego, CA).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Elucidação química da $\omega$ -hidroxiemodina

As análises de RMN (**Tabela 1**)  $^1H$  e  $^{13}C$  levaram à identificação da substância  $\omega$ -hidroxiemodina. EM-IES (+) mostrou pico da molécula protonada em  $m/z$  287,0551  $[M+H]^+$ ,

$m/z$  309,0370  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  595,0850  $[2M+Na]^+$  (calculado para  $C_{15}H_{10}O_6$ , 287.0556);  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.25 (s, H-2), 7.64 (s, H-4), 7.14 (d,  $J = 2.0$  Hz, H-5), 6.60 (d,  $J = 2.4$  Hz, H-7), 4.60 (s, 3-CH<sub>2</sub>OH), 12.09 (s, 1-OH);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz): 163.1 (C-1), 109,7 (C-2), 164,3 (C-3), 111.6 (C-4), 134.8 (C-4a), 118.3 (C-5), 136.7 (C-5a), 153.7 (C-6), 122.5 (C-7), 163.1 (C-8), 113.5 (C-8a), 184.0 (C-9), 189.4 (C-10), 62.5 (3-CH<sub>2</sub>OH).



**Tabela 1:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , gHMBC e COSY da  $\omega$ -hidroxiemodina (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )

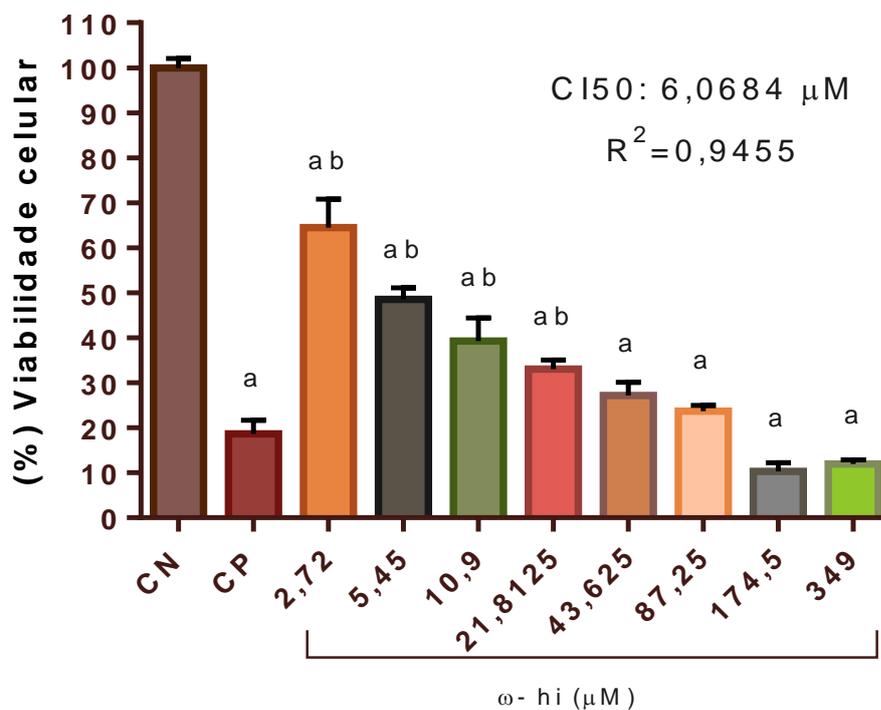
Posição	$\delta^1\text{H}$ (m, J <sub>H<sub>z</sub></sub> )	$\delta^{13}\text{C}$ $\mu\text{g/mL}$				gHMBC (H→C)	COSY
		Experimental DMSO	SANCHEZ et al., 2011 DMSO	LIANG et al., 2012 DMSO	FUJIMOTO et al., 2004 ACETONA		
1OH	12,15	163,1	162,1	161,05	162,6	-	-
1 <sup>a</sup>	-	116,4	114,38	-	-	-	-
2	6,56 (d; 2,0)	109,7	108,6	120,83	120,9	C1/C3	H4
3	OH	164,3	165,2	152,92	153,1	-	-
4	7,11 (d; 2,0)	111,6	109,7	117,12	117,3	C2/C9	H2
4 <sup>a</sup>	-	134,8	133,6	132,97	131,2	-	-
5	7,65 (s)	118,3	117,7	108,94	109,0	C11/C8a/C7/C10	H11
5a	-	136,7	135,8	-	-	-	-
6	-	153,7	153,5	164,02	165,5	-	-
7	7,25 (s)	122,5	121,5	107,98	108,1	C11/C8a/C5	H11
8	OH	163,1	162,1	165,62	165,7	-	-
8 <sup>a</sup>	-	113,5	114,38	109,07	109,7	-	-
9	C=O	184,0	182,1	189,8	191,0	-	-
10	C=O	189,4	190,3	181,43	181,4	-	-
11	4,60 (s)	63,9	62,7	62,05	62,9	C6/C5/C7	H5/H7

### 3.2 Viabilidade celular da $\omega$ -hidroxiemodina

#### 3.2.1 Ensaio de citotoxicidade MTT

No ensaio de citotoxicidade MTT a CI50 do  $\omega$ -hidroxiemodina em células de S180 com 72 hr de tratamento foi de 6,0684  $\mu$ M. Os dados de viabilidade obtidos das absorvâncias normalizadas (porcentagem), comparados entre si, demonstraram efeito citotóxico em todas as concentrações testadas (2,72-349  $\mu$ M), devido a todos os resultados serem estatisticamente significantes quando comparados ao controle negativo (**Figura 1**). Como esperado, o CP foi citotóxica ( $p < 0,05$ ) obtendo uma viabilidade média de 18%, confirmando a capacidade de resposta do teste. Ao comparar os valores médios do  $\omega$ -hidroxiemodina com o tratamento com o CP, observaram-se valores significativos superiores de viabilidade (02,72-21,8125  $\mu$ M) ( $p < 0,05$ ).

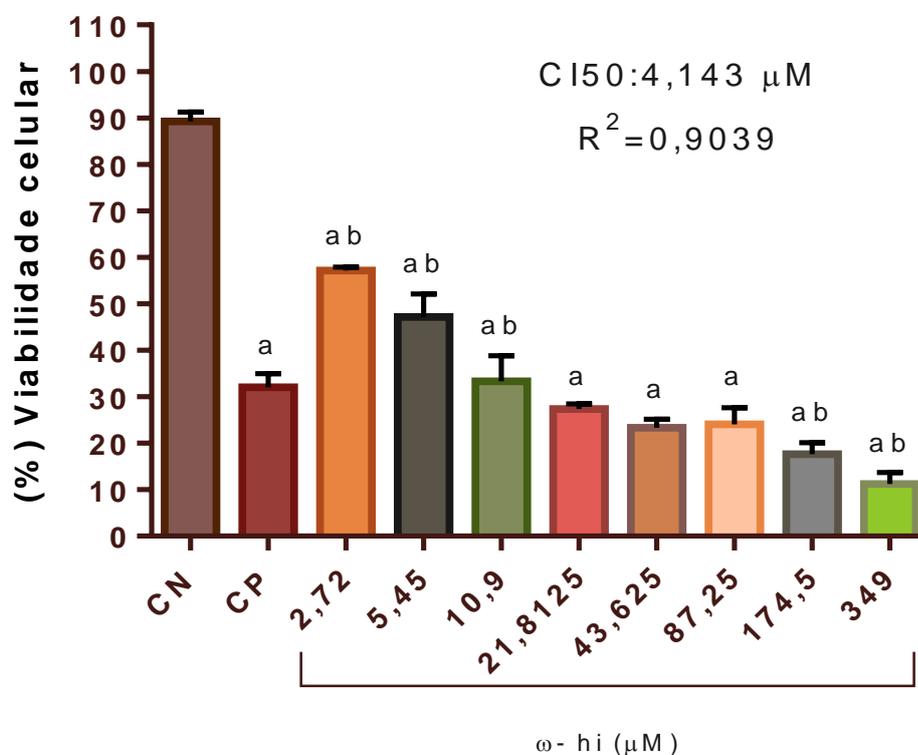
**Figura 1:** Efeito citotóxico da  $\omega$ -hidroxiemodina pelo teste MTT em células S180. Os dados foram normalizados (porcentagem) para o grupo controle negativo. Cada concentração em 3 poços com  $1 \times 10^6$  células por replicata. CN: controle negativo; CP: doxorrubicina (6,9  $\mu$ M);  $\omega$ -hidroxiemodina (2,72; 5,45; 10,9; 21,8125; 43,625; 87,25; 174,5; 349  $\mu$ M). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo (CN) e <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo (CP).



### 3.2.2 Ensaio de exclusão com Azul de Tripán

O  $\omega$ -hidroxiemodina no ensaio de exclusão de azul de tripan obteve uma CI50 de 4,143  $\mu\text{M}$ . Em todas as concentrações testadas comprometeu significativamente a viabilidade celular das células de S180 em 72 h de tratamento (**Figura 2**). Como esperado, os tratamentos com o CP mostraram uma viabilidade celular média inferior a 30% ( $p < 0,05$ ) no mesmo tempo de exposição, confirmando a capacidade de resposta do teste. Ao comparar os valores médios do  $\omega$ -hidroxiemodina com o tratamento com CP, observaram-se valores superiores de viabilidade (2,72-10,9  $\mu\text{M}$ ) e apenas as duas maiores concentrações (174,5-349  $\mu\text{M}$ ) obteve menor viabilidade significativa comparado ao CP ( $p < 0,05$ ).

**Figura 2:** Efeito do  $\omega$ -hidroxiemodina pelo teste de exclusão azul de tripan em células S180. Os dados foram normalizados (porcentagem) para o grupo controle negativo. Cada concentração em 3 poços com  $1 \times 10^6$  células por replicata. CN: controle negativo; CP: doxorubicina (6,9  $\mu\text{M}$ );  $\omega$ -hidroxiemodina (2,72; 5,45; 10,9; 21,8125; 43,625; 87,25; 174,5; 349  $\mu\text{M}$ ). Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN e <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP.



### 3.2.3 Ensaio de alamar blue

O  $\omega$ -hidroxiemodina foi avaliado no ensaio de alamar blue obtendo as CI50 expostas na (Tabela 2). O composto em todas as linhagens demonstrou elevada citotoxicidade incluindo a não tumoral.

**Tabela 2:** Efeito do  $\omega$ -hidroxiemodina pelo teste de alamar blue em diferentes linhagens tumorais e não tumorais humanas.

Linhagens	HL-60	AGP01	SKMEL-28	MRC5
CI50	16,55 $\mu$ M	2,93 $\mu$ M	4,517 $\mu$ M	12,99 $\mu$ M
Intervalo	9,41-29,10 $\mu$ M	1,28-6,7 $\mu$ M	1,4-14,48 $\mu$ M	5,65-29,84 $\mu$ M
R <sup>2</sup>	0,9229	0,8694	0,8303	0,8944

**Legenda:** Efeito do  $\omega$ -hidroxiemodina pelo teste de alamar blue em diferentes linhagens tumorais humanas. Os dados foram normalizados (porcentagem) para o grupo controle negativo. Cada concentração em 3 poços com  $1 \times 10^6$  células por replicata.

### 3.3 Avaliação genotóxica da $\omega$ -hidroxiemodina em células de S180, com o teste cometa

A versão alcalina ( $\text{pH} > 13$ ) do ensaio cometa foi realizada em células de S180 após 72 h de tratamento. A análise de frequência e índice de danos após a análise de 100 células em triplicata de cada tratamento assim como o controle demonstrou um aumento significativo para as concentrações testadas (1,7-3,4  $\mu$ M) em relação ao controle negativo (Tabela 3).

**Tabela 3:** Avaliação da genotoxicidade do  $\omega$ -hidroxiemodina pelo ensaio cometa em células de S180.

Grupos	Genotoxicidade	
	Índice de danos (0-400)	Frequência de danos (0-100 %)
CN	20 $\pm$ 3,6	9 $\pm$ 1
CP	348,7 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	96,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
$\omega$ -hi 1,7 $\mu$ M	214,7 $\pm$ 2,5 <sup>a,b</sup>	83 $\pm$ 9,5 <sup>a,b</sup>
$\omega$ -hi 3,4 $\mu$ M	250 $\pm$ 7 <sup>a,b,c</sup>	91,6 $\pm$ 1,528 <sup>a</sup>
$\omega$ -hi 6,9 $\mu$ M	318 $\pm$ 14 <sup>a,b,c,d</sup>	94 $\pm$ 1 <sup>a</sup>

**Legenda:** Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M de 3 experimentos independentes. CN: Células não tratadas; CP: Doxorubicina 6,9  $\mu$ M;  $\omega$ -hi=  $\omega$ -hidroxiemodina. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo CN, <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo CP, <sup>c</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo  $\omega$ -hi 1,7 e <sup>d</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo  $\omega$ -hi 3,4.



### 3.4 Avaliação de alterações nucleares, apoptoses e necroses $\omega$ -hidroxiemodina em células de S180

#### 3.4.1 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

O  $\omega$ -hidroxiemodina (1,7-6,9  $\mu$ M) induziu aumentos significativos no número ( $p < 0,05$ ) de células apoptóticas e da mesma forma em necróticas após o tratamento de 72 h em células de S180 em relação ao CN. Em relação ao CP a concentração de 1,7  $\mu$ M obteve um menor número significativo de células apoptóticas e necróticas. Em relação a porcentagem total de morte celular, todas as concentrações obtiveram uma maior porcentagem de células necróticas em comparação com o CP (**Figura 3**). No teste de mutagenicidade, as análises estatísticas mostraram que  $\omega$ -hidroxiemodina apenas as concentrações de 3,4 e 6,9  $\mu$ M induziram significante ( $p < 0,05$ ) formação de micronúcleos nas células de S180 após o tratamento de 72 h (**Tabela 4**). Quanto a outros danos citogenéticos, o  $\omega$ -hidroxiemodina induziu significativamente ( $p < 0,05$ ) formação de brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas em células S180 em todas as concentrações testadas em relação ao CN (**Tabela 4**). O CP também induziu significativamente ( $p < 0,05$ ) apoptose, necrose, micronúcleos, brotos nucleares em relação a linha de base das células não tratadas (**Tabela 4**).

Quanto a citotoxicidade o  $\omega$ -hidroxiemodina induziu redução significativa ( $p < 0,05$ ) do IDN (3,4-6,9  $\mu$ g/mL) e IDNC (1,7-6,9  $\mu$ M) e elevação da citostase de forma significante (1,7-6,9  $\mu$ g/mL) em células de S180 em relação ao CN (**Tabela 5**). Ao comparar os valores médios do  $\omega$ -hidroxiemodina com o tratamento com CP, observaram-se valores significativos ( $p < 0,05$ ) inferiores de IDN, IDNC e citostase para todas as concentrações (**Tabela 5**). Foi observada que houve uma forte correlação positiva entre o número de células apoptóticas e índice de danos ( $r = 0,9033$ ) e a frequência de danos ( $r = 0,7779$ ) nas células tratadas com  $\omega$ -hidroxiemodina.



**Tabela 4:** Danos citogenéticos induzidos por  $\omega$ -hidroxiemodina em células de S180 por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

Danos citogenéticos					
Grupos	Apoptose	Necrose	Micronúcleos	Brotos nucleares	Pontes nucleares
CN	29,3 ± 2,3	16,33 ± 2,51	6 ± 2	7 ± 2	4,66 ± 2,51
CP	302 ± 17,4 <sup>a</sup>	109 ± 11,53 <sup>a</sup>	27,67 ± 1,15 <sup>a</sup>	26,67 ± 1,15 <sup>a</sup>	39,67 ± 2,08 <sup>a</sup>
$\omega$ -hi 1,7 $\mu$ M	71 ± 13,89 <sup>a,b</sup>	60,67 ± 17,93 <sup>a,b</sup>	8,33 ± 0,57 <sup>b</sup>	14,33 ± 4,5 <sup>a,b</sup>	15,33 ± 1,15 <sup>a,b</sup>
$\omega$ -hi 3,4 $\mu$ M	115,3 ± 5,5 <sup>a,b,c</sup>	89,67 ± 2,51 <sup>a,c</sup>	16,33 ± 2,08 <sup>a,b,c</sup>	18 ± 2 <sup>a,b</sup>	25 ± 2,64 <sup>a,b,c</sup>
$\omega$ -hi 6,9 $\mu$ M	177,7 ± 9,5 <sup>a,b,c,d</sup>	123,3 ± 6,11 <sup>a,c,d</sup>	21 ± 1 <sup>a,b,c,d</sup>	23,67 ± 2,51 <sup>a,c</sup>	32,67 ± 2,51 <sup>a,b,c,d</sup>

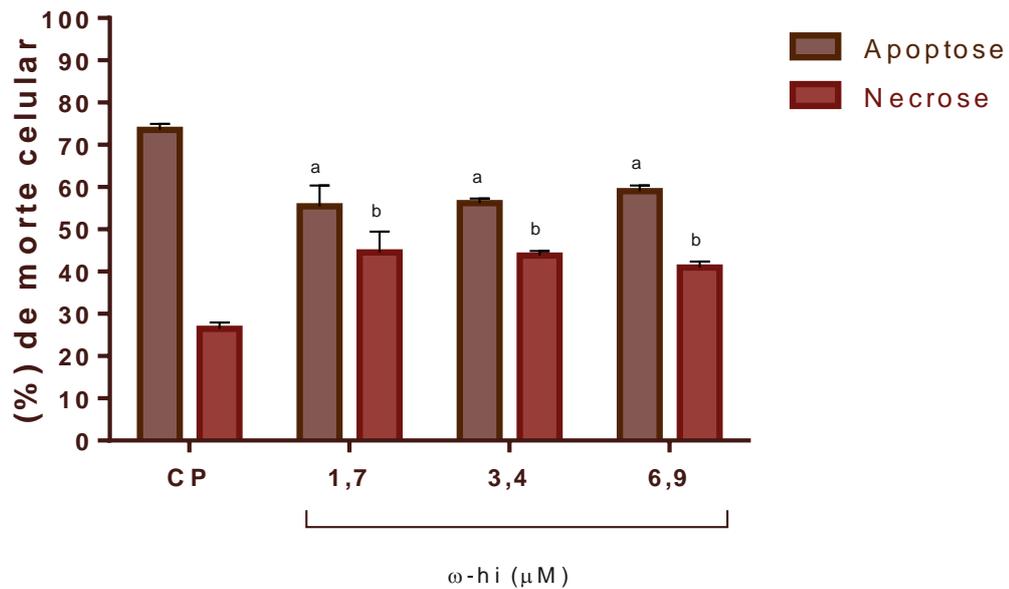
**Legenda:** Os valores representam a média ± D.P.M de 3 experimentos independentes. CN: Células não tratadas; CP: Doxorubicina 6,9  $\mu$ M;  $\omega$ -hi=  $\omega$ -hidroxiemodina. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup> p<0,05, comparado com o grupo CN, <sup>b</sup> p<0,05, quando comparado ao grupo CP, <sup>c</sup> p<0,05, quando comparado com o grupo  $\omega$ -hi 1,7 e <sup>d</sup> p<0,05, quando comparado com o grupo  $\omega$ -hi 3,4.

**Tabela 5:** Avaliação da citotoxicidade da  $\omega$ -hidroxiemodina pelo índice de divisão nuclear (IDN), índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade (IDNC) e citostase em culturas de célula S180,

Índices de divisão e citostase			
Grupos	IDN	IDNC	Citostase (%)
CN	1,64 ± 0,02	1,6 ± 0,01	-----
CP	1,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	71,11 ± 2,63 <sup>a</sup>
$\omega$ -hi 1,7 $\mu$ M	1,54 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,42 ± 0,07 <sup>a,b</sup>	16,65 ± 13,38 <sup>b</sup>
$\omega$ -hi 3,4 $\mu$ M	1,3 ± 0,01 <sup>a,c</sup>	1,28 ± 0,02 <sup>a,c</sup>	53,10 ± 1,375 <sup>a,c</sup>
$\omega$ -hi 6,9 $\mu$ M	1,33 ± 0,03 <sup>a,b,c</sup>	1,25 ± 0,04 <sup>a,c</sup>	48,85 ± 6,657 <sup>a,b,c</sup>

**Legenda:** Os valores representam a média ± D.P.M de 3 experimentos independentes. CN: Células não tratadas; CP: Doxorubicina 6,9  $\mu$ M;  $\omega$ -hi=  $\omega$ -hidroxiemodina; IDN: índice de divisão nuclear; IDNC: índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup> p<0,05, comparado com o grupo CN, <sup>b</sup> p<0,05, quando comparado ao grupo CP e <sup>c</sup> p<0,05, quando comparado com o grupo  $\omega$ -hi 1,7.

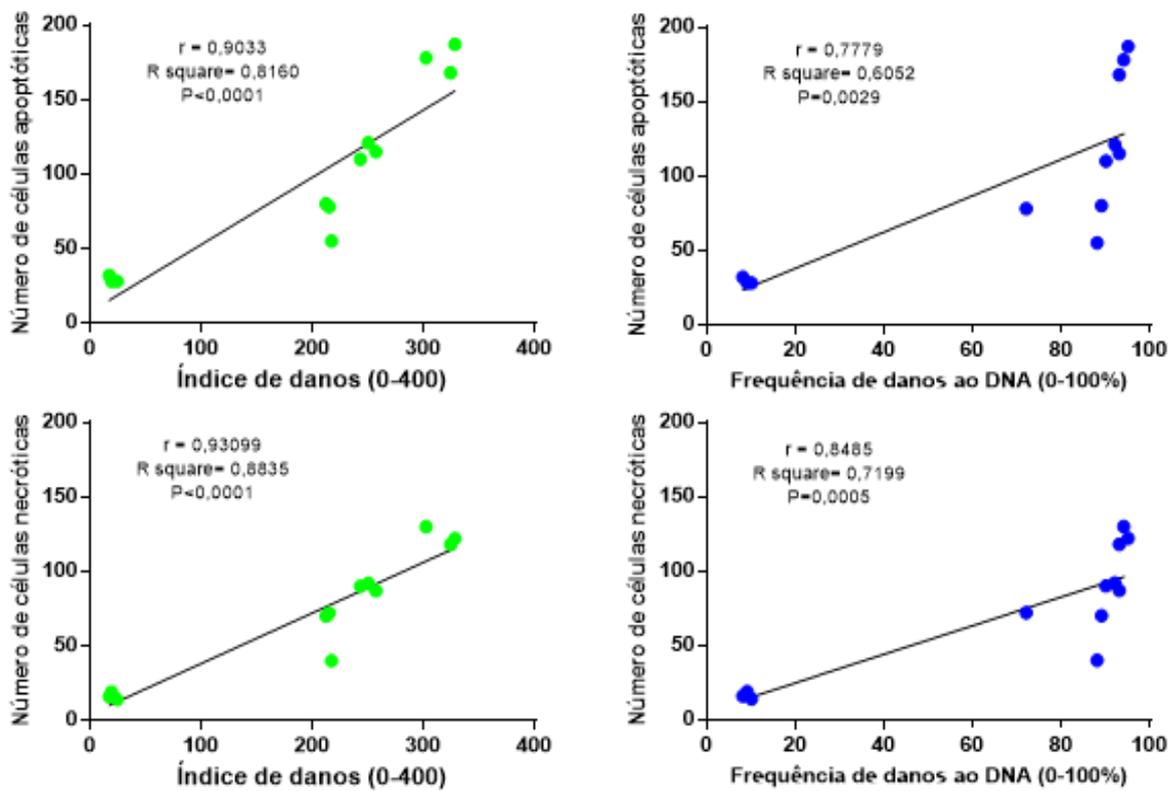
**Figura 3:** Avaliação da proporção de apoptose e necrose em células de S180 entre grupos. Os dados foram normalizados quanto a (%) morte celular total de cada replicata dentro grupo. Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M de 3 experimentos independentes. CP: Doxorrubicina 6,9  $\mu$ M;  $\omega$ -hi=  $\omega$ -hidroxiemodina. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância de duas vias (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com a apoptose do grupo CP e <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado com a necrose do grupo CP.



### 3.5 Correlação entre células apoptóticas e necróticas com índice e frequência de dano.

A correlação os dois tipos de morte celular observadas no ensaio de CMBN obtiveram uma correlação positiva tanto com o índice quanto a frequência de danos (**Figura 4**). No entanto, houve uma maior correlação entre o índice e frequência de danos com o número de células necróticas comparada com as apoptóticas.

**Figura 4:** Correlação de *Pearson r* entre o índice de danos e o número de células apoptóticas e necróticas em células de S180. Os valores representam o valor de *Pearson r* e de significância para  $P < 0,05$  e  $0,0001$ .





## 4 DISCUSSÃO

O  $\omega$ -hidroxiemodina (citreorseína) foi isolado pela primeira vez em 1940 do fungo *Penicillium cyclopium* (ANSLOW et al., 1940) e *Penicillium cytreoroseum* (POSTERNAK; JACOB, 1940) com posterior elaboração do seu processo de produção com rendimento de 29% a partir da antraquinanona emodina (RAJAGOPALAN; SESHADRI, 1956) e de forma posterior a 48% (HIROSE et al., 1982). No presente estudo a estrutura química da citreorseína foi elucidada pela comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com os obtidos por Liang et al (2012), Sanchez et al (2011) e Fujimoto et al (2004) (**Tabela 1**).

As hidroxiantraquinonas são utilizadas na farmácia como laxantes, na indústria como corantes têxteis ou alimentares (KOYAMA et al., 2001), no entanto diversos estudos descrevem a capacidade citotóxica das hidroxiantraquinonas (MÜLLER et al., 1996) usando linhagens celulares cancerígenas (CUI et al., 2008) e sua capacidade mutagênica (MIAN et al., 1991). O presente estudo demonstrou que todas as concentrações do  $\omega$ -hidroxiemodina apresentaram efeito citotóxico nas células de S180 conforme revelado pelo ensaio MTT (**Figura 1**), no ensaio de exclusão do Azul de Tripán (**Figura 2**) e em todas as linhagens tumorais e não tumorais avaliadas no teste de Alamar blue (**Tabela 2**). O  $\omega$ -hidroxiemodina já demonstrou atividade antitumoral contra linhagens cancerígenas de pulmão (A-549), mama (MCF-7), colorretal HT-29 além da inibição da proteína tirosina quinase (PTK), que pode desempenhar um papel importante na inibição do crescimento de células tumorais (KIM et al., 1997), como observado na piora do prognóstico de pacientes com câncer de mama que tinham o nível dessa proteína elevado (GÄRTNER et al., 2014).

A citotoxicidade do composto testado também foi demonstrada pela redução significativa do IDN e IDNC em todas as concentrações testadas nas células de S180 (**Tabela 5**). Diversos mecanismos potenciais da citotoxicidade das hidroxiantraquinonas já foram abordados como o estresse oxidativo (KAÓRGEDAL et al., 1999), inibição da topoisomerase II (MÜLLER et al., 1996; HWANGBO et al., 2012), inibição da glicólise e comprometimento da função mitocondrial (FLORIDI et al., 1990). Portanto, estas abordagens demonstram a importância relativa ao uso de antraquinonas e seus derivados (EL-READI et al., 2016) como uma importante fonte de possíveis compostos na terapia oncológica, bem como, a semelhança estrutural com outros compostos antineoplásicos como a antracenediona mitoxantrone (EL-READI et al., 2016), as antraciclina doxorubicina (NEMEIKAITĖ-ČĖNIENĖ et al., 2002) e daunorrubicina (NEMEIKAITĖ-ČĖNIENĖ et al., 2002; NEMEIKAITĖ-ČĖNIENĖ et al., 2002; EL-READI et al., 2016).

Os grupos hidroxil presentes nos anéis aromáticos e radicais da estrutura permitem que o  $\omega$ -hidroxiemodina tenha a capacidade de interação com proteínas formando pontes de hidrogênio e ligações iônicas como observado em moléculas com estrutura similar como a emodina (SRINIVAS et al., 2007), tornando-se um composto multifuncional pela capacidade de acesso a múltiplos alvos como enzimas, canais e receptores. A presença dos grupos hidroxil nas posições 1, 3 e 8 da molécula pode levar a uma forte ligação de hidrogênio intramolecular (RAHIMIPOUR et al., 2001). A transferência de elétrons da  $\omega$ -hidroxiemodina para o oxigênio molecular tem a capacidade de gerar ânions superóxido ( $O^{2-}$ ), podendo levar a formação de uma variedade de outras espécies reativas do oxigênio (SRINIVAS et al., 2007), estas uma vez produzidos podem suprimir os importantes fatores de transcrição necessários para a sobrevivência celular como proteínas e material genético na célula neoplásica (YI et al., 2004). A capacidade genotóxica do  $\omega$ -hidroxiemodina foi pouco abordada até o momento, no entanto, os mecanismos anteriormente citados podem ser propostos para os resultados obtidos na avaliação feita pelo ensaio cometa nas células de S180 onde foi observado um aumento na frequência e índice de danos ao material genético em relação à linha de base celular (**Tabela 3**).

A elevação significativa da citostase em todas as concentrações testadas com o  $\omega$ -hidroxiemodina (**Tabela 5**) podem ser devido, ao resultado já observado da ação citotóxica inicial das antraquinonas, com o direcionamento aos outros locais que não apenas o DNA, como a capacidade de inibir fortemente a incorporação de timidina ao DNA (KIM et al., 1997) reduzindo a sua replicação e transcrição. O efeito anterior foi observado por outra via pelo qual o  $\omega$ -hidroxiemodina inibiu as enzimas topoisomerase I e II (HWANGBO et al., 2012; HAQUE et al., 2016), portanto, interferindo no processo de replicação e transcrição pela inibição do processo de religação da fita dupla de DNA quebrada com o aumento de complexos cliváveis do DNA (SRIVIDYA et al., 2013), o que pode explicar os danos citogenéticos observados pelo aumento de brotos e pontes nucleoplasmáticas nas células de S180 avaliadas no presente estudo (**Tabela 4**), em adição aos efeitos do estresse oxidativo sobre o material genético abordados anteriormente na avaliação do índice e frequência de danos pelo ensaio cometa, induzindo efeitos clastogênicos.

A avaliação mutagênica do  $\omega$ -hidroxiemodina tem sido pouco explorada, apenas em presença de ativação hepática em *Salmonella typhimurium* (MURAKAMI et al., 1987) e por indução da formação de micronúcleos em linhagem de linfoma murino (L5178Y) (MUELLER; STOPPER; DEKANT, 1998). Na avaliação das concentrações do  $\omega$ -hidroxiemodina pelo teste CBMN os resultados demonstraram um potencial mutagênico pelo aumento significativo de

micronúcleos, podendo interagir com o material genético, causando rupturas na dupla fita DNA ou desregulação da aparelhagem mitótica, resultando na formação de micronúcleos.

No ensaio de CBMN, as células também podem ser marcadas para o estado de viabilidade (apoptose e necrose) (GAJSKI et al., 2018). O  $\omega$ -hidroxiemodina mostrou que um dos possíveis mecanismos de morte celular dessa substância pode decorrer dos danos ao material genético visto que houve uma forte correlação entre o índice de danos com o número de células apoptóticas e necróticas (**Figura 4**). O aumento significativo tanto na apoptose quanto em necrose em relação as células não tratadas (**Tabela 4**), no entanto ao relacionar esses dados com valores relativos, o tratamento com a substância teve em média 54, 56 e 59 % de células apoptóticas em relação ao número total de mortes celulares, enquanto que o CP (Dox) obteve em média 73 % de apoptose (**Figura 5**). Porém vale ressaltar que mesmo a Dox sendo incluída em uma ampla variedade de protocolos de tratamento de câncer para crianças e adultos (KRISCHKE et al., 2016), em conjunto com o aumento da taxa de sobrevivência dos pacientes com câncer, foi observado um aumento na incidência de insuficiência cardíaca (OCTAVIA et al., 2012) o que confirmado por vários estudos observacionais, que mostraram que as antraciclinas como a Dox causam efeitos colaterais cardiovasculares a longo prazo, diminuindo a qualidade de vida dos sobreviventes de câncer (LIPSHULTZ et al., 2012; LIPSHULTZ; ADAMS, 2010) limitando a sua utilização, nesse sentido é válida a procura por novos compostos com capacidade antitumoral.

A apoptose pode ser desencadeada por estímulos extrínsecos ou intrínsecos em que a ativação de caspases resulta em características morfológicas como arredondamentos de células, condensação de cromatina, fragmentação de núcleos e corpos apoptóticos o que a torna um processo mais organizado e menos danoso (WALSH, 2014). Em contraste a necrose se caracteriza como uma morte celular não ordenada e passiva em resposta ao estresse agudo tipicamente seguido por reações inflamatórias, no entanto, novos dados sugerem que a necrose também pode ser um processo bem regulado ativado por estímulos bastante específicos (GOLSTEIN; KROEMER, 2007; WALSH, 2014). A necrose programada (necroptose) desempenha um papel indispensável durante o desenvolvimento normal (SU et al., 2015) e tem sido implicada na patogênese do câncer (FULDA, 2013). Existe uma lista cada vez maior de compostos e agentes anticancerígenos que demonstraram indução de necroptose em células cancerosas resistentes a processos apoptóticos mediados por Bcl-2, Bcl-xL, dessa forma apresentando a capacidade de contornar esses mecanismos de resistência (XUAN; HU, 2009; WADA et al., 2015). No presente estudo não foi possível fazer a avaliação da necroptose, nesse sentido a atividade antitumoral do  $\omega$ -hidroxiemodina ainda pode ser melhor elucidada via este



tipo de morte celular, o que aumentaria a possibilidade do seu uso na terapia oncológica frente a tipos de câncer resistentes a morte por apoptose, abordagem já discutida em relação a substâncias como a shikonina (FU et al., 2013).



## 5 CONCLUSÃO

A  $\omega$ -hidroxiemodina induziu citotoxicidade em células de S180, bem como em linhagens celulares tumorais de leucemia (HL-60), adenocarcinoma gástrico (AGP01), melanoma (SKMEL-28) e linhagem normal de fibroblastos de pulmão (MRC5). O estudo também indica que a  $\omega$ -hidroxiemodina induziu genotoxicidade, apoptose, necrose e outros danos citogenéticos como micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares em relação a linha de base das células de S180. Esses mecanismos são importantes para agentes antitumorais. Os resultados dessa avaliação demonstram a necessidade de uma avaliação mais ampla da capacidade antitumoral dessa substância natural promissora para formulações antitumorais dessa substância.



## REFERÊNCIAS

- ANSLOW, W. K.; BREEN, J.; RAISTRICK, H. Studies in the biochemistry of micro-organisms: Emodic acid (4: 5: 7-trihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid) and  $\omega$ -hydroxyemodin (4: 5: 7-trihydroxy-2-(hydroxymethyl)-anthraquinone), metabolic products of a strain of *Penicillium cyclopium* Westling. **Biochemical Journal**, v. 34, n. 2, p. 159, 1940.
- CAVALCANTE, F. M. L.; ALMEIDA, I. V.; DÜSMAN, E.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Cytotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of the gentisic acid on HTC cells. **Drug and chemical toxicology**, p. 1-7, 2017
- CHAN, Francis Ka-Ming. Programmed necrosis/necroptosis: an inflammatory form of cell death. In: **Cell Death**. Springer New York, 2014. p. 211-228.
- CUI, X. R.; TSUKADA, M.; SUZUKI, N.; SHIMAMURA, T.; GAO, L.; KOYANAGI, J.; KOMADA, F.; SAITO, S. Comparison of the cytotoxic activities of naturally occurring hydroxyanthraquinones and hydroxynaphthoquinones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 6, p. 1206-1215, 2008.
- DALY, S. M.; ELMORE, B. O.; KAVANAUGH, J. S.; TRIPLETT, K. D.; FIGUEROA, M.; RAJA, H. A.; EL-ELIMAT, T.; CROSBY, H. A.; FEMLING, J. K.; CECH, N. B.; HORSWILL, A. R.; OBERLIES, N. H.; HALL, P. R.  $\omega$ -Hydroxyemodin limits staphylococcus aureus quorum sensing-mediated pathogenesis and inflammation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2223-2235, 2015.
- EL-READI, M. Z.; EID, S. Y.; AL-AMOUDI, H. S.; WINK, M. Fallopia japonica: Bioactive Secondary Metabolites and Molecular Mode of Anticancer. **Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy**, v. 5, n. 193, p. 2, 2016.
- FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.
- FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M., SOARES, B. M. et al. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1045–1058, 2011.
- FLORIDI, A.; CASTIGLIONE, S.; BIANCHI, C.; MANCINI, A. Effect of rhein on the glucose metabolism of Ehrlich ascites tumor cells. **Biochemical pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 217-222, 1990.
- FU, Z., DENG, B., LIAO, Y., SHAN, L., YIN, F., WANG, Z.; ZENG, H.; ZUO, D.; HUA, Y.; CAI, Z. The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 580, 2013.
- FUJIMOTO, H.; NAKAMURA, E.; OKUYAMA, E.; ISHIBASHI, M. Six immunosuppressive features from an ascomycete, *Zopfiella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 52, n. 8, p. 1005-1008, 2004.



FULDA, S. The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells. **Cancer biology & therapy**, v. 14, n. 11, p. 999-1004, 2013.

GAJSKI, G.; GERIĆ, M.; OREŠČANIN, V.; GARAJ-VRHOVAC, V. Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay parameters in peripheral blood lymphocytes of the general population: Contribution of age, sex, seasonal variations and lifestyle factors. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 148, p. 561-570, 2018

GÄRTNER, S.; GUNESCH, A.; KNYAZEVA, T.; WOLF, P.; HÖGEL, B.; EIERMANN, W.; ULLRICH, A.; KNYAZEVA, P.; ATASEVEN, B. PTK 7 is a transforming gene and prognostic marker for breast cancer and nodal metastasis involvement. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e84472, 2014.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in biochemical sciences**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.

GONZÁLEZ-ANDRADE, M.; DEL VALLE, P.; MACÍAS-RUBALCAVA, M.; SOSA-PEINADO, A.; DEL CARMEN GONZÁLEZ, M.; MATA, R. Calmodulin inhibitors from *Aspergillus stromatoides*. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 3, p. 328-337, 2013.

HAQUE, M.; BHAKAT, R. K.; BHATTACHARJEE, A.; TALAPATRA, S. N. Computational predictive mutagenicity of similar chemicals for anthraquinone, [Beta]-sitosterol and quercetin found in *Alternanthera tenella* by using QSAR modeling software. **World Scientific News**, v. 49, n. 2, p. 162, 2016.

HAWAS, U. W.; AL-FARAWATI, R.; ABOU EL-KASSEM, L. T.; TURKI, A. J. Different Culture Metabolites of the Red Sea Fungus *Fusarium equiseti* Optimize the Inhibition of Hepatitis C Virus NS3/4A Protease (HCV PR). **Marine drugs**, v. 14, n. 10, p. 190, 2016.

HIROSE, Y.; SUEHIRO, Y.; FURUKAWA, Y.; MURAKAMI, T. Chemische Studien Über natürliche Anthrachinone. II. Synthese von Citreoseine, Fallacinol und Fallacinal. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 11, p. 4186-4188, 1982.

HWANGBO, K.; ZHENG, M. S.; KIM, Y. J.; IM, J. Y.; LEE, C. S.; WOO, M. H.; JAHNG, Y.; CHANG, H. W.; SON, J. K.; Inhibition of DNA topoisomerases I and II of compounds from *Reynoutria japonica*. *Archives of pharmacal research*, v. 35, n. 9, p. 1583-1589, 2012.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253, 2004.

KÅGEDAL, K.; BIRONAITE, D.; ÖLLINGER, K. Anthraquinone cytotoxicity and apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. **Free radical research**, v. 31, n. 5, p. 419-428, 1999.

KIM, D. S.; KOONCHANOK, N. M.; GEAHLEN, R. L.; ASHENDEL, C. L.; CHANG, C. J. Structure activity relationship study of emodin derivatives based on the protein-tyrosine kinase and protein kinase C inhibitory activities and cytotoxicity. **Natural Product Letters**, v. 10, n. 3, p. 173-180, 1997.

KOYAMA, J.; MORITA, I.; TAGAHARA, K.; OGATA, M.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Inhibitory effects of anthraquinones and bianthraquinones on Epstein-Barr virus activation. **Cancer letters**, v. 170, n. 1, p. 15-18, 2001.



KRISCHKE, M.; HEMPEL, G.; VÖLLER, S.; ANDRÉ, S.; D'INCALCI, M.; BISOGNO, G.; KÖPCKE, W.; BOROWSKI, M.; HEROLD, R.; BODDY, A. V.; BOOS, J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a “European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium” trial. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 1175-1184, 2016.

LEAL, M. F.; MARTINS DO NASCIMENTO, J. L.; DA SILVA, C. E.; VITA LAMARÃO, M. F.; CALCAGNO, D. Q.; KHAYAT, A. S.; ASSUMPCÃO, P. P.; CABRAL, I. R.; DE ARRUDA, C. S. M.; BURBANO, R. R. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 195, n. 1, p. 85-91, 2009.

LIANG, J. L.; CHA, H. C.; LEE, S. H.; SON, J. K.; CHANG, H. W.; EOM, J. E.; KWON, Y.; JAHNG, Y. A facile synthesis of emodin derivatives, emodin carbaldehyde, citreorosein, and their 10-deoxygenated derivatives and their inhibitory activities on  $\mu$ -calpain. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 3, p. 447-454, 2012.

LIPSHULTZ, S. E.; ADAMS, M. J. Cardiotoxicity after childhood cancer: beginning with the end in mind. **Journal of Clinical Oncology**, n. 28, p. 1276-1281, 2010.

LIPSHULTZ, S. E.; LANDY, D. C.; LOPEZ-MITNIK, G.; LIPSITZ, S. R.; HINKLE, A. S.; CONSTINE, L. S.; FRENCH, C. A.; ROVITELLI, A. M.; PROUKOU, C.; ADAMS, M. J.; MILLER, T. L. Cardiovascular status of childhood cancer survivors exposed and unexposed to cardiotoxic therapy. **Journal of clinical oncology**, v. 30, n. 10, p. 1050-1057, 2012.

LU, Y.; LI, Y.; JAHNG, Y.; SON, J. K.; CHANG, H. W. Citreorosein inhibits degranulation and leukotriene C4 generation through suppression of Syk pathway in mast cells. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 365, n. 1-2, p. 333-341, 2012a.

LU, Y.; SUH, S. J.; LI, X.; HWANG, S. L.; LI, Y.; HWANGBO, K.; PARK, S. J.; MURAKAMI, M.; LEE, S. H.; JAHNG, Y.; SON, J. K.; KIM, C. H.; CHANG, H. W. Citreorosein, a naturally occurring anthraquinone derivative isolated from *Polygoni cuspidati* radix, attenuates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin D2 generation by blocking Akt and JNK pathways in mouse bone marrow-derived mast cells. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 3, p. 913-919, 2012b.

MARINHO, A. M.; MARINHO, P. S.; SANTOS, L. S.; RODRIGUES FILHO, E.; FERREIRA, I. C. Active polyketides isolated from *Penicillium herquei*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 909-912, 2013.

MARZO, I.; NAVAL, J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 6, p. 703-710, 2013.

MENDELSON, J.; RINGBORG, U.; SCHILSKY, R. L. Personalized cancer medicine—A strategy to counteract an increasing cancer challenge. **Molecular oncology**, v. 6, n. 2, p. 109-110, 2012.

MIAN, M.; FRATTA, D.; RAINALDI, G.; SIMI, S.; MARIANI, T.; BENETTI, D.; GERVASI, P. G. Superoxide anion production and toxicity in V79 cells of six hydroxy-anthraquinones. **Anticancer research**, v. 11, n. 3, p. 1071-1076, 1991.



- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MUELLER, S. O.; STOPPER, H; DEKANT, W. Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes. **Drug metabolism and disposition**, v. 26, n. 6, p. 540-546, 1998
- MÜLLER, S. O.; ECKERT, I.; LUTZ, W. K.; STOPPER, H. Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: topoisomerase II mediated?. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 371, n. 3, p. 165-173, 1996
- MURAKAMI, H.; KOBAYASHI, J.; MASUDA, T.; MOROOKA, N.; UENO, Y.  $\omega$ -Hydroxymodin, a major hepatic metabolite of emodin in various animals and its mutagenic activity. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 180, n. 2, p. 147-153, 1987.
- NAKAYAMA, G. R., CATON, M. C., NOVA, M. P., & PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of immunological methods**, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.
- NEMEIKAITĖ-ČĖNIENĖ, A.; SERGEDIENĖ, E.; NIVINSKAS, H.; ČĖNAS, N. Cytotoxicity of natural hydroxyanthraquinones: Role of oxidative stress. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 57, n. 9-10, p. 822-827, 2002.
- NOINART, J.; BUTTACHON, S.; DETHOUP, T.; GALES, L.; PEREIRA, J. A.; URBATZKA, R.; FREITAS, S.; LEE, M.; SILVA, A. M. S.; PINTO, M. M. M.; VASCONCELOS, V.; KIJJOA, A. A New Ergosterol Analog, a New Bis-Anthraquinone and Anti-Obesity Activity of Anthraquinones from the Marine Sponge-Associated Fungus *Talaromyces stipitatus* KUFA 0207. **Marine drugs**, v. 15, n. 5, p. 139, 2017.
- OCTAVIA, Y.; TOCCHETTI, C. G.; GABRIELSON, K. L.; JANSSENS, S.; CRIJNS, H. J.; MOENS, A. L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 52, n. 6, p. 1213-1225, 2012.
- POSTERNAK, T.; JACOB, J. P. Biochemistry of the lower fungi. III. Pigment of *Penicillium citreoroseum* Dierckx. **Helv. chim. acta**, v. 23, p. 237-242, 1940.
- RAHIMIPOUR, S.; BILKIS, I.; PÉRON, V.; GESCHEIDT, G.; BARBOSA, F.; MAZUR, Y.; KOCH, Y.; WEINER, L.; FRIDKIN, M. Generation of Free Radicals by Emodic Acid and its [d-Lys6] GnRH-conjugate. **Photochemistry and photobiology**, v. 74, n. 2, p. 226-236, 2001.
- RAJAGOPALAN, T. R.; SESHADRI, T. R. Synthesis of citreorosein and aloe-emodin. In: **Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section A**. Springer India. p. 418-422, 1956.
- SEALES, E. C.; MICOLI, Keith J.; MCDONALD, Jay M. Calmodulin is a critical regulator of osteoclastic differentiation, function, and survival. *Journal of cellular biochemistry*, v. 97, n. 1, p. 45-55, 2006.



- SHIA, C. S.; HOU, Y. C.; TSAI, S. Y.; HUIEH, P. H.; LEU, Y. L.; CHAO, P. D. L. Differences in pharmacokinetics and ex vivo antioxidant activity following intravenous and oral administrations of emodin to rats. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 4, p. 2185-2195, 2010.
- SILVA, M. T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. **FEBS letters**, v. 584, n. 22, p. 4491-4499, 2010.
- SRINIVAS, G.; BABYKUTTY, S.; SATHIADEVAN, P. P.; SRINIVAS, P. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. **Medicinal research reviews**, v. 27, n. 5, p. 591-608, 2007.
- SRIVIDYA, A. R.; DHANABAL, S. P.; SATHISH KUMAR, M. N.; VISHNUVARTHAN, V. J. Genoprotective activity of hydro alcoholic extract of *Curcuma aromatica* and *Curcuma zedoaria* rhizomes and their comparison with Curcumin. **The Journal of Ethnobiology and Traditional medicine**, v. 118, p. 306-321, 2013.
- STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2001.
- SU, Z.; YANG, Z.; XU, Y.; CHEN, Y.; YU, Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular cancer**, v. 14, n. 1, p. 48, 2015.
- UNO, Y.; KOJIMAB, H.; OMORIC, T.; CORVID, R.; HONMAB, M.; SCHECHTMA, L. M. et al. JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 786-788, p. 45-76, 2015.
- WADA, N.; KAWANO, Y.; FUJIWARA, S.; KIKUKAWA, Y.; OKUNO, Y.; TASAKI, M.; UEDA, M.; ANDO, Y.; YOSHINAGA, K.; RI, M.; IIDA, S.; TAKAYUKI NAKASHIMA,<sup>7</sup> YUKIMASA SHIOTSU,<sup>8</sup> HIROAKI MITSUYA,<sup>1</sup> AND HIROYUKI HATA. Shikonin, dually functions as a proteasome inhibitor and a necroptosis inducer in multiple myeloma cells. **International journal of oncology**, v. 46, n. 3, p. 963-972, 2015
- WALSH, C. M. Grand challenges in cell death and survival: apoptosis vs. necroptosis. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 2, 2014
- WANG, Y.; BRIZ, V.; CHISHTI, A.; BI, X.; BAUDRY, M. Distinct roles for  $\mu$ -calpain and m-calpain in synaptic NMDAR-mediated neuroprotection and extrasynaptic NMDAR-mediated neurodegeneration. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 48, p. 18880-18892, 2013.
- XUAN, Y.; HU, X. Naturally-occurring shikonin analogues—a class of necroptotic inducers that circumvent cancer drug resistance. **Cancer letters**, v. 274, n. 2, p. 233-242, 2009.
- YI, J.; YANG, J.; HE, R.; GAO, F.; SANG, H.; TANG, X.; RICHARD, D. Y. Emodin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis via generation of reactive oxygen species and inhibition of survival signaling. **Cancer Research**, v. 64, n. 1, p. 108-116, 2004.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

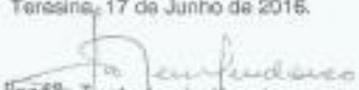
---

O fungo *Penicillium citrinum* isolado a partir da alga marinha *Dichotomaria marginata* demonstrou ser uma fonte de compostos com potencial antitumoral. O composto isolado por cromatografia e caracterizado estruturalmente por RMN demonstrou um perfil tóxico elevado em *A. salina* e *A. cepa* onde também foram observados mecanismos citogenéticos de indução de aberrações cromossômicas, especialmente do tipo cromossomos soltos, no entanto em poucas anáfases devido aos seus efeitos citotóxicos. Este composto também induziu citotoxicidade em células de Sarcoma 180, bem como em linhagens celulares tumorais de leucemia (HL-60), adenocarcinoma gástrico (AGP01), melanoma (SKMEL-28) e linhagem normal de fibroblastos de pulmão (MRC5). O estudo também indica que a  $\omega$ -hidroxiemodina induziu genotoxicidade, apoptose, necrose e outros danos citogenéticos como micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares em relação a linha de base das células de S180. Portanto os resultados dessa avaliação demonstram a necessidade de uma avaliação mais ampla da capacidade antitumoral dessa substância natural promissora para formulações farmacêuticas.



## ANEXO A

## Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFPI

	<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p> <p><small>Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. CEP: 64209-690 Telefone (86) 3215-6734_e-mail: ceeap@ufpi.edu.br</small></p>	
<b>CERTIFICADO</b>		
<p>Certificamos que o Projeto intitulado "Toxicogenética do Rizoma de Gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe) e Gingerol frente às suas possíveis ações antitumorais", protocolo nº 167/16, sob a responsabilidade da Profa. Dra. ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE– Núcleo de Tecnologia Farmacêutica-NTF/ UFPI que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.898, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 17/06/2016.</p>		
Vigência do Projeto	Julho/ 2016 a Janeiro/ 2018	
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico/ swiss	
Nº de Animais	80	
Peso/ Idade	25-30gf 2 meses	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central no CCA/UFPI.	
Teresina, 17 de Junho de 2016.		
 Prof <sup>ª</sup> . Ivete L. de Mendonça Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI Coordenadora		



## ANEXO B

Carta de submissão para a Revista: Elsevier Editorial System (tm) for Chemosphere

Elsevier Editorial System(tm) for  
Chemosphere  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Evaluation of the toxic, genotoxic and antimitotic capacity of  $\omega$ -hydroxyemodin in the test system *Artemia salina* and *Allium cepa*

Article Type: Research paper

Section/Category: Toxicology and Risk Assessment

Keywords: Toxicogenetics; *Penicillium citrinum*; Genotoxicity; Mutagenicity.

Corresponding Author: Dr. João Marcelo Castro Sousa,

Corresponding Author's Institution: Federal University of Piauí

First Author: José Victor de O Santos

Order of Authors: José Victor de O Santos; Ag-Anne Pereira M de Menezes; José Willians G de Oliveira Filho; Antonielly C dos Reis; Rai Aguiar; Marcus Vinícius Oliveira B de Alencar; Rosália Maria T de Lima; Muhammad T Islam; Teresinha de Jesus Aguiar dos S Andrade; Felipe Cavalcanti C Da Silva; João Marcelo Castro Sousa; Ana Amélia de Carvalho M Cavalcante

Abstract: Annually, millions of new cancer cases are diagnosed. Chemotherapy is one of the bases of cancer treatment, which includes cytotoxic drugs that cause DNA damage and cytostatic drugs, which interfere with the synthesis of DNA and mitosis, disrupting cell reproduction and cell death. *Penicillium citrinum* has been suggested to generate cytotoxic secondary metabolites, which increases its interest for discovering new antitumor compounds. Therefore, the aim of this study was to isolate and characterize the  $\omega$ -hydroxyemodin substance of the fungus *Penicillium citrinum* isolated from the seaweed *Dichotomaria marginata*, as well as to evaluate its toxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects in the *Artemia salina* and *Allium cepa* tests.  $\omega$ -hydroxyemodin was tested at concentrations of 1.7, 3.4, 6.9  $\mu\text{M}$  / mL. Copper sulphate at the concentration of 3.7  $\mu\text{M}$  / mL and dechlorinated water were used as positive and negative controls, respectively. The  $\omega$ -hydroxyemodin in *Artemia salina* presented a lethal concentration that kills 50% of individuals (LC50) in 24h of 4.6  $\mu\text{M}$  / mL and in 48h of 3,6  $\mu\text{M}$  / mL. In the *Allium cepa* test,  $\omega$ -hydroxyemodin induced toxicity and cytotoxicity by the inhibition of cell division, and the data regarding chromosomal aberrations were significant only for the lowest

concentration tested. There was no significant micronucleus formation. The data indicate that  $\omega$ -hydroxyemodin at low concentrations induces toxicity and cytotoxicity in the test systems used, and further studies are needed, since these activities are important for new antitumor agents.

Suggested Reviewers: Paulo Michel P Ferreira  
Physiology, Federal University of Piauí  
pmpf@ufpi.edu.br  
Expert and may help to review this MS.

José Pelaez  
Fisicoquímica, Universidad Nacional de Córdoba Córdoba, Argentina  
walwalwal32@hotmail.com  
Expert and may help to review this MS.

João Laranjinha  
Centro de Neurociências e Biologia de Celular, Universidade de Coimbra,  
Portugal laranjin@ci.uc.pt  
Expert and may help to review this MS.

Joaquín Jordan  
Departamento Ciencias Médicas - Farmacología, Universidad de Castilla-La  
Mancha, Spain.  
joaquin.jordan@uclm.es  
Expert and may help to review this MS.

Francisco Lima  
Department of Bioinformatics, USEPI fdcalima@gmail.com  
Expert and may help to review this MS.

Jand Medeiros  
Immunologia, Federal University of Piauí jandvenes@ufpi.edu.br  
Expert and may help to review this MS.

## **Cover Letter**

15/2/2018 -Teresina, Piauí, Brazil

## **The Editor-in-Chief**

Chemosphere

Dear Sir,

We would be grateful if your Editorial Board would consider for publication in the CHEM the manuscript (MS) entitled "Evaluation of the toxic, genotoxic and antimitotic capacity of  $\omega$ -hydroxyemodin in the test system *Artemia salina* and *Allium cepa*" by José Victor de Oliveira Santos, Ag-Anne Pereira Melo de Menezes, José Williams Gomes de Oliveira Filho, Antonielly Campinho dos Reis, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Rosália Maria Torres de Lima, Muhammad Torequl Islam, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva, João Marcelo de Castro and Sousa and Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante. Briefly, this is a Masters task conducted at UFPI, Brazil. Again, it should be mentioned that, this article has not been submitted anywhere, nor considered for publication by any journal and before its decision we shall not proceed to others.

The authors of the manuscript have no conflict of interests or commercial relationships in relation to this research.

Sincerely,

(Co-author & Correspondence)

**Dr. João Marcelo de Castro e Sousa** Dr. of

Environmental Sciences

j.marcelo@ufpi.edu.br

**\*Highlights (3 to 5 bullet points (maximum 85 characters including spaces per bullet point))**

- $\omega$ -hydroxyemodin induced toxic effects in *Artemia salina* and *Allium cepa*.
- $\omega$ -hydroxyemodin induced genotoxicity effects.
- $\omega$ -hydroxyemodin not induced mutagenicity effects.

**\*Manuscript (double-spaced and continuously LINE and PAGE numbered)**

[Click here to view linked References](#)

**1 Evaluation of the toxic, genotoxic and antimitotic capacity of  $\omega$ -hydroxyemodin in the  
2 test system *Artemia salina* and *Allium cepa***

3 José Victor de Oliveira Santos<sup>1,2</sup> Ag-Anne Pereira Melo de Menezes, <sup>1,2</sup>, José Williams 4 Gomes  
Oliveira Filho<sup>2,4</sup>, Antonielly Campinho dos Reis<sup>2</sup>, Rai Pablo de Sousa Aguiar<sup>3</sup>,

5 Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar<sup>2,4</sup>, Rosália Maria Torres de Lima<sup>2,4</sup>, Muhammad 6  
Torequl Islam<sup>4</sup>, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade<sup>5</sup>, Felipe Cavalcanti Carneiro

7 da Silva<sup>1,2</sup> João Marcelo de Castro e Sousa<sup>1,2</sup>, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante<sup>1,2,4</sup>

8 <sup>1</sup>Post-graduation in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí,  
9 Brazil

10 <sup>2</sup>Nucleus of Pharmaceutical Technology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

11 <sup>3</sup>Post-graduation in Biomedical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

12 <sup>4</sup>RENORBIO Northeast Biotechnology Network

13 <sup>5</sup>NIAC-Applied Research Nucleus-IFMA-Federal Institute of Education, Science and  
14 Technology of Maranhão (São Raimundo das Mangabeiras Campus), Brazil

15 ABSTRACT

16 Annually, millions of new cancer cases are diagnosed. Chemotherapy is one of the bases of  
17 cancer treatment, which includes cytotoxic drugs that cause DNA damage and cytostatic  
18 drugs, which interfere with the synthesis of DNA and mitosis, disrupting cell reproduction  
19 and cell death. *Penicillium citrinum* has been suggested to generate cytotoxic secondary  
20 metabolites, which increases its interest for discovering new antitumor compounds.  
Therefore,

21 the aim of this study was to isolate and characterize the  $\omega$ -hydroxyemodin substance of the  
22 fungus *Penicillium citrinum* isolated from the seaweed *Dichotomaria marginata*, as well as  
23 to evaluate its toxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects in the *Artemia salina* and