



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

JONATAS FERNANDES DA SILVA

Avaliação toxicogenética da antraquinona marinha hirsutatina A

JUNHO – 2018

TERESINA PI

Avaliação toxicogenética da antraquinona marinha hirsutatina A

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. Dr. Felipe Cavalcanti
Carneiro da Silva

JUNHO – 2018

Teresina PI

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processamento Técnico

S586a Silva, Jonatas Fernandes da.
Avaliação toxicogenética da antraquinona marinha hirsutatina a / Jonatas Fernandes da Silva. -- 2018.
102 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

“Orientação : Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva.”

Bibliografia

1. Hirsutatina a. 2. Ciclohexadepsipeptídeos. 3. Citotoxicidade, Toxicogenética. 4. Genotoxicidade. 5. Mutagenicidade I. Carvalho, Fernando Aécio de Amorim. II. Título.

CDD 615.1

JONATAS FERNANDES DA SILVA

Avaliação toxicogenética da antraquinona marinha hirsutatina A

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

Prof. Dr. Felipe Cavalcante Carneiro (Orientador)

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

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

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

Profa. Dr. Anderson Nogueira Mendes (Examinador Externo)

Departamento de Biofísica – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof.^a. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof.^a. 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. Luciano da Silva Lopes

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

AGRADECIMENTOS

A **meus pais** que sempre acreditaram no meu potencial, e nunca deixaram faltar nada em relação aos meus estudos, mesmo que isso representasse um esforço monumental para eles, é por causa deles e também por eles que cheguei até aqui.

A **minha mulher**, razão de todo o meu esforço e trabalho, porque sei que juntos podemos construir um futuro e realizar todos os nossos sonhos.

Ao **meu filho**, que nasceu junto com este projeto, é também por ele que todo o esforço que realizei valeu apenas.

Aos **meus amigos**, pelo apoio, incentivo e ajuda durante todo o decorrer deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva**, pela orientação, apoio e confiança.

Aos professores e parceiros de trabalho **João Marcelo de Castro e Felipe Mesquita**, pelo apoio na elaboração deste trabalho.

Meus agradecimentos aos amigos **José Victor, Ag-Anne Melo, Nárcia Mariana**, dentre outros companheiros que foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

... Muito Obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CBMN	Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese
A .Cepa	<i>Allium cepa</i>
IDN	Índice de divisão nuclear
IDNC	Índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade
PNP	Pontes nucleoplasmática
PTK	Proteína tirosina quinase
Hir-a	hirsutatina a
Bcl-2	Célula-B de linfoma
Bcl-xL	Linfoma de células B - extragrande
RMN	Ressonância magnética
EM-IES	Espectrofotometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
gHMBC	Coerência Quantum Heteronuclear Múltipla
DMSO	Dimetil sulfóxido
COSY	Espectroscopia de Correlação homonuclear
D.P.M	Desvio padrão da média
DOX	Doxorrubicina
SP	Sangue periférico

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Divisão esquemática do corpo da dissertação

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Estrutura química da hirsutatina a (JESUS, 2014).

CAPITULO 1

Figura 1: Sobrevivência dos náuplios de artemia tratados 24 e 48h com hirsutatina a. 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.

Figura 2: Avaliação citotóxica da hirsutatina a pelo índice mitótico em meristemas de raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9 μ M/mL); hirsutatina a (0,5; 1,0 e 2,0 μ a/mL). 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, ^a $p < 0,05$, comparado com o grupo CN, ^b $p < 0,05$, quando comparado ao grupo CP, ^c $p < 0,05$, quando comparado ao grupo hir-a 0,5 e ^d $p < 0,05$, quando comparado ao grupo hir-a 1,0. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

Figura 3: Avaliação genotóxica da hirsutatina a por aberrações cromossômicas em raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9 μ M/mL); hirsutatina a (0,5; 1,0 e 2,0 μ g/mL). 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, ^a $p < 0,05$, comparado com o grupo CN, ^b $p < 0,05$, quando comparado ao grupo CP e ^c $p < 0,05$, quando comparado ao grupo ω -hi 0,5. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

Figura 4: Avaliação mutagênica da hirsutatina a por micronúcleos em raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9 μ M/mL); **hirsutatina a** (0,5; 1,0 e 2,0 μ g/mL). 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, ^a p<0,05, comparado com o grupo CN e ^b p<0,05, quando comparado ao grupo CP. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

Figura 5: Efeito citotóxico de hirsutatina a pelo teste MTT em células S180. Os dados foram normalizados (porcentagem) para o grupo controle negativo. Cada concentração em 3 poços com 1×10^6 células por replicata. CN: controle negativo; CP: doxorubicina (6,9 $\mu\text{M}/\text{mL}$); hirsutatina a (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 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, ^a p<0,05, comparado com o grupo (CN) e ^b p<0,05, quando comparado ao grupo (CP).

Figura 6. Genotoxicidade do peptídeo, por mecanismos associados a danos oxidativos, em cultura primária de S180 e SP co-tratados com peróxido de hidrogênio. Valores representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. H_2O_2 : peróxido de hidrogênio (10 mM). Hirsutatina a (0,5-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao grupo CN ^b p<0,05 comparado ao grupo CN(H_2O_2 10).

Figura 7. Avaliação da citotoxicidade da hirsutatina a pelo índice de divisão nuclear (IDN), índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade (IDNC) em culturas de célula S180, Os valores representam a média \pm D.P.M de 3 experimentos independentes. CN: Células não tratadas; CP: Doxorubicina 6,9 $\mu\text{M}/\text{mL}$; ω -hi= ω -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, ^a p<0,05, comparado com o grupo CN, ^b p<0,05, quando comparado ao grupo CP e ^c p<0,05, quando comparado com o grupo hir-a 0,5.

Tabela 1: Danos citogenéticos induzidos por hirsutatina a em células de S180 por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

Sumário

RESUMO	24
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos.....	29
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	30
3.1 Câncer.....	30
3.2 Estresse Oxidativo	31
3.3 Fungos endofíticos de algas marinhas e potencial produção de moléculas bioativas para formulações farmacêuticas	33
3.4 Biomarcadores toxicogenéticos	34
3.4.1 Ensaio para estudos de viabilidade celular	34
3.4.2 Toxicidade/citotoxicidade em <i>Artemia salina</i>	35
3.4.3 Teste de <i>Allium cepa</i>	35
3.4.4 Teste cometa	36
3.4.5 Linhagens de células cancerígenas de Sarcoma 180.....	37
3.4.7 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)	38
3.4.8 Hirsutatina a	39
Referências	42
Capítulo I.....	53
RESUMO	54
ABSTRACT	55
1 Introdução.....	56
2 Materiais e métodos.....	57
2.1 Solventes gerais e equipamentos básicos do isolamento da hirsutatina a	57
2.2 Coleta da macroalga <i>Dichotomaria marginata</i>	57
2.3 Isolamento e identificação do fungo endofítico	57
2.4 Obtenção do extrato acetonitrila do fungo <i>P. citrinum</i> (FMeCNDm) e isolamento da hirsutatina a por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	58
2.5 Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	58
2.6 Teste de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade em <i>Allium cepa</i>	59
2.7 Cultivo <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> de S180.....	59
2.7.1 MTT	60
2.8 Avaliação genotóxica e mutagênica.....	60

2.8.1 Ensaio cometa	60
2.8.2 Teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN).....	61
2.9 Análise estatística	62
3 Resultados	64
3.1 Avaliação tóxica da hirsutatina a em <i>Artemia salina</i>	64
3.2 Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e em meristemas de raízes de <i>Allium cepa</i>	64
3.3 Avaliação genotóxica e mutagênica da hirsutatinaia a, em raízes de <i>Allium cepa</i>	65
3.4 Viabilidade celular de hirsustatina a	67
3.4.1 Ensaio de citotoxicidade MTT	67
3.5 Avaliação genotóxica de hirsustatin a em células de S180, com o teste cometa	68
3.6 Avaliação de alterações nucleares, apoptoses e necroses de hirsustatin a em células de S180.....	69
3.6.1 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)	69
4 Discussão.....	71
5 Conclusão	74
Referências	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
ANEXO A.....	79



Avaliação toxicogenética da antraquinona marinha hirsutatina a. JONATAS

FERNANFES DA SILVA. Orientador: **Prof. Dr. Felipe Cavalcante Carneiro** 102p.

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF,
Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2018.

RESUMO

O grupo de substâncias Hirsutatina foi isolado inicialmente em 2005, juntamente com outros compostos, inicialmente os estudos com estas substâncias mostraram que algumas delas apresentavam função antiparasitária no tratamento contra a malária, diversos estudos hoje vêm mostrando a correlação de vários agentes antiparasitários, incluindo substâncias que assim como grupos de hirsutatina, agem contra o *Plasmodium falciparum*, causador da malária, apresentam ação anticancerígena. Baseado nisso o presente estudo se dispõe a avaliar os efeitos tóxicos, citotóxicos e o potencial mutagênico da hirsutatina a através de ensaios *in vitro*. Dentro do estudo foram realizados os ensaios de *Artemia salina*, *Allium cepa*, MTT, cometa e CBMN, SARCOMA 180. Os resultados obtidos a partir da exposição dos náuplios de artêmias à ação da hirsutatina a nos períodos de 24 e 48 horas, demonstram que a mesma possui elevada toxicidade. O tratamento com hirsutatina a apresentou mudanças significativas no índice mitótico das raízes no teste de *Allium cepa*, quanto maior a dose testada maior foi a inibição da divisão celular. Demonstrando atividade diretamente dependente da concentração utilizada. Além disso, o presente estudo também demonstrou que todas as concentrações da hirsutatina a apresentaram efeito citotóxico nas células de S180 conforme revelado pelo ensaio MTT. Através do ensaio de cometa. Observou-se que a genotoxicidade causada pela da hirsutatina a pode estar associada a processos de estresse oxidativo. O teste de CBMN, nos permitiu levantar a hipótese de que os possíveis mecanismos de morte celular correlacionados com a hirsutatina a são provocados por danos ao material genético das células. A hirsutatina a apresentou alta atividade citotóxica e genotóxica com grande potencial como substância antitumoral. Diante disso, novos estudos complementares ainda são necessários para melhor elucidação da toxicidade e aplicação clínica da hirsutatina A.

Palavras-chave: Hirsutatina a, Ciclohexadepsipeptídeos, Citotoxicidade, Toxicogenética.

Genotoxicidade, Mutagenicidade



ABSTRACT

ABSTRACT:

The group of substances Hirsustatin was initially identified in 2005, where studies showed that some had antiparasitic function against malaria. Several parasitic agents have been described with potential anticancer activity due to their highly toxic effects. In this sense, the present study aimed to evaluate the toxic, cytotoxic and mutagenic potential of Hirsustatin A. The study tested different concentrations of Hirsutatin A through in vitro tests, including *Artemia salina*, *Allium cepa*, MTT, Comet test and CBMN. The results obtained from the exposure of nauplii to the action of Hirsustatin A in the periods of 24 and 48 hours, demonstrate that it has high toxicity. Hirsustatin A presented significant changes in mitotic index of *Allium cepa* meristematic cells in a dose dependent manner, where the higher the dose, greater the growth inhibition. The present study also demonstrated that all concentrations of Hirsustatin A had cytotoxic effect on Sarcoma 180 (S180) cells as revealed by the MTT assay. Genotoxicity through comet assay revealed damages associated with oxidative stress processes. Through the CBMN test, it can be assumed that the possible mechanisms of cellular death are caused by DNA damage. The results showed that Hirsustatin A is very cytotoxic and genotoxic, with potential antitumor activity, and further studies are necessary to better elucidate its toxicity and clinical application.

Keywords: Hirsustatin A, Cyclohexadepsipeptides, Cytotoxicity, Toxicogenetic.

Genotoxicity, Mutagenicity.



1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma patologia complexa e multifatorial, sua etiologia é assumida por 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), sendo também a principal causa de morte por câncer para mulheres (523 000 mortes) (FITZMAURICE et al., 2017).

Os mecanismos das drogas antitumorais são diversos, agindo diretamente sobre alguma vulnerabilidade celular, tais 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 (MÖHLER; PFIRMAN; FREI, 2014). No entanto, as atuais estratégias preventivas, clínicas e de pesquisa ainda não foram suficientes para enfrentar todos 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, chegou 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 de 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 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, imunossuppressores, 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 microorganismos marinhos atraíram uma atenção considerável como fontes importantes de metabólitos secundários estruturalmente diversos e com grande potencial para a descoberta de novas drogas (CHEN et al., 2011). O fungo *Penicillium citrinum* possui potenciais metabólitos secundários e 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 e geralmente limitados a estudos taxonômicos para esta alga. (ROZAS et al., 2008), porém frações hexânicas dessa alga revelaram substâncias com ótimo 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 câncer (BA-SANG et al., 2016). A hirsutatina a, substância isolada no presente estudo, é uma substância com poucos estudos desenvolvidos, mais substâncias extraídas da mesma classe de fungos já demonstraram efeitos promissores.

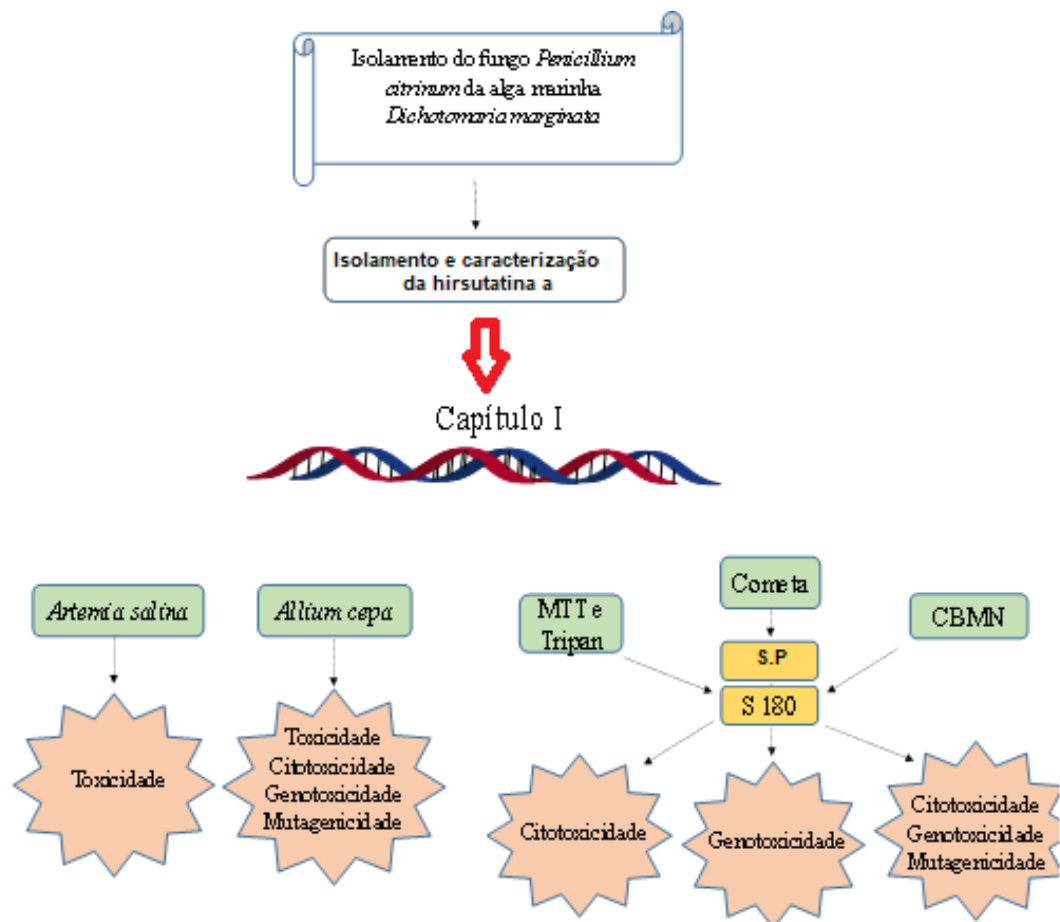
O principal problema do tratamento com antineoplásicos é a sua pouca seletividade a células tumorais, levando a indução de danos ao DNA, incluindo danos oxidativos, mutações genéticas e aberrações cromossômicas (NAITO et al., 2015), os quais geram uma alta toxicidade em tecidos normais e órgãos (ROY; 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 importante 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 da hirsutatina a, o presente trabalho objetivou valiar os efeitos tóxicos em *Artemia salina* e *Allium cepa*; citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos através do estudo em *Allium cepa* e culturas de células de Sarcoma 180 (S180).

A dissertação compreende um estudo não-clínico frente a ação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica por meio de tratamentos em náuplios de *Artemia salina* e raízes de *Allium cepa*; Assim como os efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico do hirsutatina a em linhagens tumorais de Sarcoma 180, avaliados pelos testes de MTT, cometa e CBMN.

Figura 1. Divisão esquemática do corpo da dissertação





2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar os efeitos toxicogénéticos e antitumorais da hirsutatina a, isolada do fungo endofítico *Penicillium citrinum*, extraído da alga *Dichotomaria marginata*.

2.2 Específicos

- Determinar a toxicidade aguda empregando o microcrustáceo *Artemia salina*;
- Avaliar a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da substância hirsutatina a isolada do fungo endofítico *Penicillium citrinum*, extraído da Alga *Dichotomaria marginata*) por meio do teste *Allium cepa*;
- Avaliar a viabilidade celular da hirsutatina a em células de Sarcoma 180.
- Avaliar a atividade antitumoral da hirsutatina a utilizando em células de Sarcoma 180 por mecanismos citogénéticos indicativas de genotoxicidade e de alterações nucleares (broto, pontes nucleoplasmáticas, micronúcleo), apoptose e necrose;
- COMETA, EXTRESS SANGUE PERIFERIFERICO



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 e 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, os quais 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 (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).

O câncer 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 e proteínas. Se este dano for irreparável, a célula vai sofrer morte celular, sob a forma de apoptose (morte celular programada), ou necrose, dependendo da extensão do dano.

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 descontrolado da produção destas espécies pode resultar em danos oxidativos de biomoléculas, tais como lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico, levando a interrupção da função celular (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 MASCIIO, 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 causa ou consequência (GILKA et al., 2007; POLJŠAK et al., 2011). Existem diversos mecanismos que podem levar à carcinogênese e 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 mutações em genes importantes no controle da divisão celular (BERTOLOZZO et al., 2010).

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, 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. 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 20.000 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 e a procura por metabólitos secundários de microrganismos isolados de ambientes ecológicos específicos, tais como ambientes marinhos, podem aumentar a chance de encontrar compostos com novos esqueletos e bioatividades variadas (WANG et al., 2013, 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). Metabólitos 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 e pode ser encontrado em uma variada gama de ambientes, na vegetação, no solo, ar, e até mesmo vários alimentos, 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 importante fonte de novos compostos. A espécie *Penicillium citrinum* é um fungo filamentosos de distribuição mundial e pode ser uma das formas de vida eucariontes mais comuns do planeta (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 Biomarcadores toxicogénicos

3.4.1 Ensaios para estudos de viabilidade celular

O ensaio com MTT é um dos testes mais populares para avaliar a atividade de potenciais compostos antitumorais, e ele também é o ensaio mais utilizado para examinar interações entre compostos e sinergismo. O teste foi criado e descrito por Mosmann em 1983 (ŚLIWKA et al., 2016). Este 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 atividade 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 e lisossoma) ou até 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).

Diante de um elevado risco de interpretação errônea, 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. 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).

3.4.2 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). Além disso, os ovos 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, alguns exemplos podem ser encontrados em estudos que correlacionam o ensaio com atividades antifúngicas, antivirais e antimicrobianas (MACBAE *et al.*, 1988). Outros estudos também fizeram a mesma associação com atividades antiparasitárias (SAHPAZ *et al.*, 1994), antitripanossomas (ZANI *et al.*, 1995) e antitumorais (MEYER *et al.*, 1982; MCLAUGHLIN; ROGERS, 1988; NUNES *et al.*, 2009; ARCANJO *et al.*, 2012). O estudo de correlação entre o crescimento e a defesa química associada a biocompostos de plantas medicinais (ALMEIDA-CORTEZ *et al.*, 2004), também é uma alternativa bastante utilizada baseado neste ensaio. Outras possibilidades podem estar associadas a investigação da 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.

3.4.3 Teste de *Allium cepa*



O uso de *Allium cepa* como sistema de teste foi introduzido por Levan (1938) quando ele demonstrou distúrbios no fuso mitótico associados ao uso de colchicina. Posteriormente, a técnica sofreu adaptações por Fiskesjö (1985) com o objetivo de tornar este ensaio em um sistema teste de monitoramento, permitindo 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 (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. As células de *Allium cepa* possuem cromossomos metacêntricos permitindo uma fácil 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 pela 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).

3.4.4 Teste cometa

Diversos agentes endógenos e exógenos podem comprometer a integridade do DNA celular, resultando em quebras, modificação de bases, *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteína, gerando mutações ou levando a morte celular (DEUTSCHMANN et al., 2016). A maioria destes danos é induzida por radicais livres, tais como EROs e ERNs, os quais constituem fatores de risco para câncer, envelhecimento, doenças neurodegenerativas e outras indisposições (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATE, 2016).

Neste contexto, o Teste Cometa, é um teste simples, barato, rápido e sensível na caracterização de danos ao DNA. Por isso, é amplamente utilizado como um biomarcador genotóxico (DEUTSCHMANN et al., 2016). Esta técnica pode ser utilizada como uma técnica sensível para avaliar os danos de DNA induzidos por condições de estresse (SANTOS; POURRUT; OLIVEIRA, 2015). Além disto, este teste requer uma baixa

quantidade de células por amostras e apresenta uma alta sensibilidade para detectar níveis pequenos de danos ao DNA (GANAPATHY et al., 2016)

Por estes motivos, o teste cometa continua a ser uma técnica importante no campo da pesquisa para decifrar mecanismos genéticos relacionados a danos no DNA, o mesmo é bastante aplicado durante a análise genotóxica de novos químicos, monitoramento ambiental, biomonitoramento humano e epidemiologia molecular, além de diagnóstico de doenças genéticas e pesquisas em dano e reparo ao DNA. As diferentes variações desta técnica permitem a identificação de diferentes tipos de danos, tais como quebras de fita simples, quebra de fitas duplas e outras. Após realização do teste, as células são exibidas em forma de cometas, os quais são escorados quantitativamente e qualitativamente, e são mais exuberantes quanto maior o dano (GLEI; SCHNEIDER; SCHLÖRMANN, 2016).

O efeito genotóxico de diversas substâncias e drogas utilizadas na quimioterapia tem sido testado por meio do teste cometa. Logeshwaran et al. (2016) demonstraram o efeito genotóxico de produtos utilizados no combate a incêndios por meio do teste cometa em células meristemais das raízes de *Allium cepa*. Ghassemi-Barghi e colaboradores (2016) realizaram a análise da fragmentação de DNA em células HepG2 por meio do teste cometa. Dessa forma é de conhecimento geral a validade desta técnica em estudos correlacionados a citotoxicidade.

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).

3.4.5 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 (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, rabiomiossarcoma e lipossarcoma. Sarcoma de tecido ósseo e mole pode ocorrer em todas as faixas etárias, e a incidência tem aumentado nos últimos 30 anos (YOUN 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).

3.4.7 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

O teste do micronúcleo encontrou seu lugar em biomonitoramento, como um teste que oferece mais facilidade em relação a outros ensaios de aberrações cromossômicas, pois os micronúcleos são mais fáceis de observar e contar, desta forma essa técnica acaba necessitando de um menor tempo de treino e uma menor perícia, para sua execução. 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 fornecer uma medida de confiança da perda ou ruptura do cromossomo (FENECH et al., 2010).

O teste do Micronucleo foi descrito pela primeira vez por Schimidt em 1975 e a única exigência era a escolha de tipos de células com elevada atividade mitótica. Em 1985, o teste foi aprimorado e foi desenvolvida a técnica de bloqueio de citocinese (BOLOGNESI et al., 2002), utilizando um agente químico chamado citocalasina B. O uso da citocalasina B inibe a polimerização da actina, que é necessário para formação dos microfilamentos que constriem o citoplasma entre os nucléolos filhos durante a citocinese, isso faz com que as células não consigam realizar o processo de citocinese porem não impede a divisão celular. após a realização desse teste, é possível obsevar o acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por um ciclo de divisão nuclear (DUTTA; GUPTA, 2013).

A formação de micronucleos é resultado da perda de cromossomos inteiros ou apenas fragmentos de cromossomos que não migraram para o núcleo principal após a divisão mitótica, estes fragmentos não são incluídos nos núcleos das células filhas originando assim a



formação de um micronúcleo, sendo este morfológicamente igual ao núcleo com tamanho reduzido, porém também 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. Assim esse teste detecta mutagênese cromossômica, como clastogênese e aneugênese.

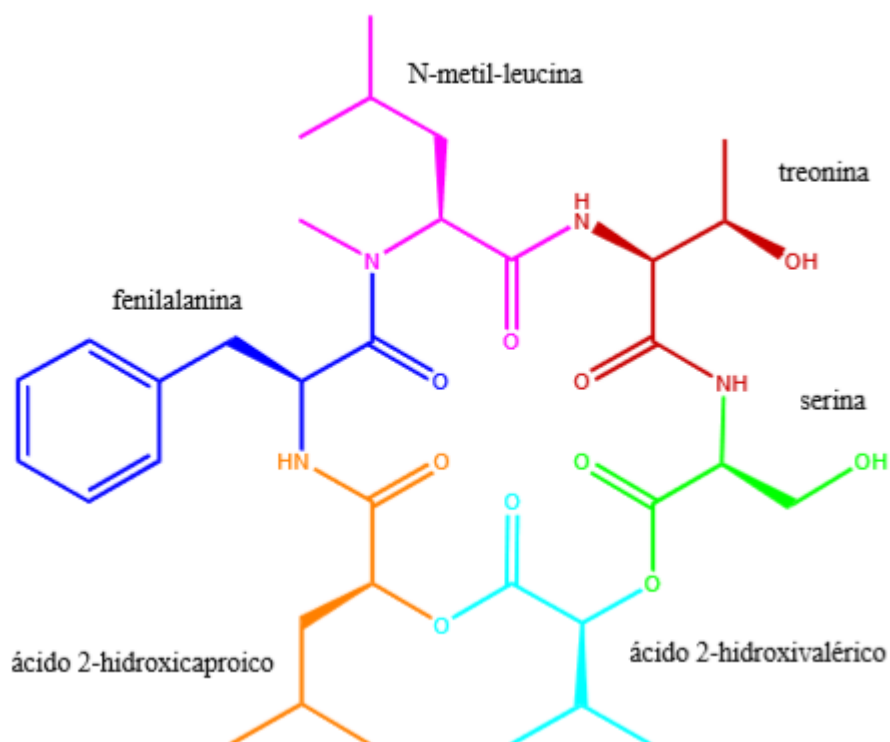
O Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN) é um dos métodos mais utilizados para medir a frequência de micronúcleos em cultura de linfócitos humanos, indicam, portanto, a ocorrência de danos aneugênicos e clastogênicos (CHANG; LI; LI, 2010). É realizado em mamíferos, *in vivo*, e detecta 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).

Esse ensaio foi desenvolvido para medir micronúcleos MN com cromossomos totais ou fragmentos de cromossomo acêntricos que são deixados para trás durante a anáfase 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 e 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) 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). É técnica amplamente utilizada para avaliar os danos citogenéticos em células de mamíferos. Sua popularidade se deve ao fato de ser um procedimento não invasivo e muito econômico, além de poder ser executado com menos conhecimentos técnicos relativos à análise de aberração cromossômica (PRADEEP, 2014).

3.4.8 Hirsutatina a

Figura 1 – Estrutura química da hirsutatina a (JESUS, 2014).



A substância hirsutatina a é um ciclohexadepsipeptídeo. Estudos realizados por espectro de massas de alta resolução EM-IES (+) apresentaram picos da molécula protonada em m/z 677,3753 $[M+H]^+$, além de m/z 699,3568 $[M+Na]^+$ e m/z 1353,7444 $[2M+H]^+$, que juntamente com dados do espectro de RMN ^{13}C permitem sugerir a fórmula molecular da hirsutatina como $C_{34}H_{52}N_4O_{10}$ (JESUS, 2014).

Espectros de RMN de ^{13}C e 1H revelaram seis sinais de carbono de carbonila em δC 173,5; 172,7; 172,7; 171,8; 171,7 e 169,6 e seis sinais de hidrogênios α em δH 5,23 (dd; 10; 4,17), 5,17 (dd; 9,2; 4,6); 4,84 (m); 4,62 (d; 5,0); 4,19 (d; 1,2) e 3,61 (m) demonstram a estrutura da hirsutatina a como de um peptídeo com seis subunidades. A substância possui 34 carbonos (incluindo dois C com sinais equivalentes do anel benzênico), duas unidades de ácidos hidrocarboxílicos e quatro resíduos de aminoácidos. Dois hidrogênios oximetínicos em δH 4,63 (d; 5,0; H₂) e 5,23 (dd; 10; 5,0; H₂) ligados respectivamente aos grupos isopropila (δC 80,3; C₂) e isobutílica (δC 74,7; C₂) indicaram a presença dos resíduos de ácido 2-hidroxisovalérico e ácido 2-hidroxisocaproico. (JESUS, 2014)

Análise do experimento de gHMBC associado ao experimento de COSY permitiu propor as estruturas parciais dos dois ácidos hidrocarboxílicos: ácido 2-hidroxisovalérico e ácido 2-hidroxisocaproico e bem como dos quatro resíduos de aminoácidos: fenilalanina, serina, N-metil leucina e treonina. Existe apenas um relato na literatura (ISAKA et al., 2005) para essa



substância, obtida a partir do fungo patogênico de inseto *Hirsutella nivea*, o estudo mostrou que a substância apresentava função antiparasitária no tratamento contra a malária. A hirsutatina A é um exemplo de substância natural pouco explorada e de grande potencial para desenvolvimento de novas drogas antitumorais (ISAKA, 2005; JESUS, 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.
- 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. **Nat. Prod. Rep.**, 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.
- BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; LANDINI, E. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis*, n. 17, p. 391-397, 2002.
- BONADONNA, G.; MONFARDINI, S.; DE LENA, M.; FOSSATI-BELLANI, F. Clinical evaluation of adriamycin, a new antitumour antibiotic. **Br Med J**, v. 3, n. 5669, p. 503-506, 1969.
- CAO, S.; CLARDY, J. New naphthoquinones and a new δ -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.

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.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.

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.

DEUTSCHMANN, B.; KOLAREVIC, S.; BRACK, W.; KAISAREVIC, S.; KOSTIC, J.; KRACUN-KOLAREVIC, M. Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*). **Science of The Total Environment**, 2016.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G. Economics of new oncology drug development. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 2, p. 209-216, 2007.

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.

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.

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.

FLAJS, D.; PERAICA, M. Toxicological properties of citrinin. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 457-464, 2009.

GANAPATHY, S.; MURALEEDHARAN, A.; SATHIDEVI, P. S.; CHAND, P.; RAJKUMAR, R. P. Comet: An automated tool for the detection and quantification of DNA damage using comet assay image analysis. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 133, p. 143-154, 2016.

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.

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

GHASSEMI-BARGHI, N.; VARSHOSAZ, J.; ETEBARI, M.; JAFARIAN-DEHKORDI, A. Role of recombinant human erythropoietin loading chitosan-tripolyphosphate nanoparticles in busulfan-induced genotoxicity: Analysis of DNA fragmentation via comet assay in cultured HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 36, p. 46-52 2016.

GLEI, M.; SCHNEIDER, T.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**, 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.

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

<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 10 maio 2017.

ISAKA, M; PALASARN, A; SRIKLUNG, K. Cyclohexadepsipeptides from the Insect Pathogenic Fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594. **J. Nat. Prod.** V.68, p. 1680-1682, 2005.

JESUS, T. **Investigação Química e Biológica dos Metabólitos Secundários Derivados de Macroalgas Marinhas e Microrganismos Associados**. Tese (Doutorado em química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, p. 297-320.

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.

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.

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.
- 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.
- LOGESHWARAN, P.; SIVARAM, A. K.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Evaluation of cyto- and genotoxic effects of Class B firefighting foam products: Tridol-S 3% AFFF and Tridol-S 6% AFFF to *Allium cepa*. **Environmental Technology & Innovation**, v. 6, p. 185–194, 2016.
- LOURO, I.D. Oncogenética. *Rev Soc Bras Canc*, 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.



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.

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.

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.

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.

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, ω -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.

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.
- REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016.
- 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.

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

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.

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

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.



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.



Capítulo I

Avaliação toxicogenética da antraquinona marinha hirsutatina a



Avaliação da capacidade toxicogénica da antraquinona marinha hirsutatina a

Jonatas Fernandes da Silva, José Victor de Oliveira Santos^{1,2} Ag-Anne Pereira Melo de Menezes,^{1,2} Antonielly Campinho dos Reis², Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar^{2,4}, João Marcelo de Castro e Sousa¹, Felipe Cavalcante^{2,4}

¹ Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

² Núcleo de Tecnologia farmacêutica, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

³ Pós-graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

⁴ RENORBIO Rede de Biotecnologia do Nordeste

⁵ 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 grupo de substâncias Hirsutatina foi isolado inicialmente em 2005, juntamente com outros compostos, inicialmente os estudos com estas substâncias mostraram que algumas delas apresentavam função antiparasitária no tratamento contra a malária, diversos estudos hoje vêm mostrando a correlação de vários agentes antiparasitários, incluindo substâncias que assim como grupos de hirsutatina, agem contra o *Plasmodium falciparum*, causador da malária, apresentam ação anticancerígena. Baseado nisso o presente estudo se dispõe a avaliar os efeitos tóxicos, citotóxicos e o potencial mutagênico da hirsutatina a através de ensaios *in vitro*. Dentro do estudo foram realizados os ensaios de *Artemia salina*, *Allium cepa*, MTT, cometa e CBMN, todos testes já reconhecidos pelo seu padrão de qualidade e reprodutibilidade. Os resultados obtidos a partir da exposição dos náuplios de artêmias à ação da hirsutatina a nos períodos de 24 e 48 horas, demonstram que a mesma possui elevada toxicidade. O tratamento com hirsutatina a apresentou mudanças significativas no índice mitótico das raízes no teste de *Allium cepa*, quanto maior a dose testada maior foi a inibição da divisão celular. Demonstrando atividade diretamente dependente da concentração utilizada. Além disso, o presente estudo também demonstrou que todas as concentrações da hirsutatina a apresentaram efeito citotóxico nas células de S180 conforme revelado pelo ensaio MTT.

Através do ensaio de cometa. Observou-se que a genotoxicidade causada pela da hirsutatina a pode estar associada a processos de estresse oxidativo. O teste de CBMN, nos permitiu levantar a hipótese de que os possíveis mecanismos de morte celular correlacionados com a hirsutatina a são provocados por danos ao material genético das células. A hirsutatina a apresentou alta atividade citotóxica e genotóxica com grande potencial como substância antitumoral. Diante disso, novos estudos complementares ainda são necessários para melhor elucidação da toxicidade e aplicação clínica da hirsutatina A.

Palavras-chave: Hirsutatina a, Ciclohexadepsipeptídeos, Citotoxicidade, Toxicogenética.

Genotoxicidade, Mutagenicidade.

ABSTRACT

ABSTRACT:

The group of substances Hirsustatin was initially identified in 2005, where studies showed that some had antiparasitic function against malaria. Several parasitic agents have been described with potential anticancer activity due to their highly toxic effects. In this sense, the present study aimed to evaluate the toxic, cytotoxic and mutagenic potential of Hirsustatin A. The study tested different concentrations of Hirsustatin A through in vitro tests, including *Artemia salina*, *Allium cepa*, MTT, Comet test and CBMN. The results obtained from the exposure of nauplii to the action of Hirsustatin A in the periods of 24 and 48 hours, demonstrate that it has high toxicity. Hirsustatin A presented significant changes in mitotic index of *Allium cepa* meristematic cells in a dose dependent manner, where the higher the dose, greater the growth inhibition. The present study also demonstrated that all concentrations of Hirsustatin A had cytotoxic effect on Sarcoma 180 (S180) cells as revealed by the MTT assay. Genotoxicity through comet assay revealed damages associated with oxidative stress processes. Through the CBMN test, it can be assumed that the possible mechanisms of cellular death are caused by DNA damage. The results showed that Hirsustatin A is very cytotoxic and genotoxic, with potential antitumor activity, and further studies are necessary to better elucidate its toxicity and clinical application.

Keywords: Hirsustatin A, Ciclohexadepsipeptídeos, Cytotoxicity, Toxicogenetic.

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). Hoje boa parte das pesquisas realizadas tem como objetivo descobrir mecanismos de combater o câncer ou atenuar seus efeitos, porem em boa parte dos casos diagnosticados de câncer a cirurgia se faz necessária. A quimioterapia é a terapia sistêmica de grande impacto e após a ressecção cirúrgica é empregada no manejo clínico do câncer cujo objetivo primário é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. (ZENG; MORGENSTERN; NYSTRÖM, 2014).

O mecanismo de ação de drogas citotóxicas é, principalmente, causar danos ao DNA, levando as células tumorais à morte (SWIFT; GOLSTEYN, 2014). No entanto, a grande dificuldade no tratamento de câncer por agentes quimioterápicos se deve a grande semelhança existente entre as células neoplásicas e células normais, o que compromete a ação seletiva dos antineoplásicos, levando ao surgimento de efeitos adversos (DE ALMEIDA et al., 2005), incluindo aumento da morbidade e à redução da qualidade de vida (TAMBURINI; CASALI; MICCINESI, 2000). . O desenvolvimento de novos fármacos que agem, principalmente, por meio da interferência da síntese de DNA e na mitose, levando à inibição de reprodução de células e induzindo as mesmas a parada do crescimento ou a morte são excelentes alternativas para o tratamento dos mais variados tipos de câncer (FREEDMAN; PATRIDGE, 2011).

A o grupo de substancias hirsustatina foi isolado inicialmente em 2005, juntamente com outros compostos (ISAKA, 2005), análises posteriores mostraram que algumas delas apresentavam função antiparasitária no tratamento contra a malária. Diversos estudos hoje vêm mostrando que vários agentes antiparasitários têm potencial ação anticancerígena (BILSLAND, 2018). A hirsutatina A é um exemplo de substancia natural pouco explorada e de grande potencial para desenvolvimento de novas drogas antitumorais (ISAKA, 2005; JESUS, 2014).

Desta forma uma elucidação melhor do potencial de ação da Hirsutatina a se faz necessária, este estudo teve como objetivo analisar a potencial tóxico, citotóxico genotóxico, mutagênico e antitumoral da hirsustatina a através de diferentes ensaios *in vitro*.



2 Materiais e métodos

2.1 Solventes gerais e equipamentos básicos do isolamento da hirsutatina a

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[®]) e BDA (Batata Dextrose Agar-Sigma[®]).

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 **hirsutatina a** por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A substância hirsutatina a 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:H₂O (5-100% MeOH), 254 nm], permitiu seu agrupamento em 16 novos grupos de frações por similaridade dos cromatogramas (*FDm1Se-FDm16Se*). Destes 16 grupos, foi identificado o grupo correspondente a hirsutatina a (15 mg), e a substancia foi separada para análise.

2.5 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 (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 hirsutatina a, a serem testadas nas concentrações 0,5; 2,5; 5,0; 20; 40 µg/mL 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. Faixe toxicidade de meyr 1985 – 1000-5000 e etc.



2.6 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 hirsutatina foram de 0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$. Compuseram os grupos positivo e negativo, sulfato de cobre (CuSO_4) a 6,9 $\mu\text{M/ml}$ e água da torneira desclorificada, respectivamente. Após o tratamento de 48h, 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°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 microscópio óptico e foram contadas 5.000 células por concentração testada (1.000 células/lâmina). Parâmetro de comparação

2.7 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 1×10^6 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 20 μ L de suspensão celular de S180 (1.5×10^6 /mL).

2.8 Ensaio de viabilidade celular

2.7.1 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 1×10^6 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 μ L de DMEM, como controle negativo), o agente citotóxico doxorrubicina (6,9 μ M / mL, como controle positivo) e a hirsutatina a (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 μ g/mL). 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). Comparação

2.9 Avaliação genotóxica e mutagênica

2.9.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado segundo Uno et al (2015) com modificações. 10 μ L dos tratamentos foram misturados a 90 μ 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.

2.9.2 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 1×10^6 / 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 os grupos teste respectivos (CN: Células não tratadas; CP:



Doxorrubicina 6,9 $\mu\text{M}/\text{mL}$; hir -a (0,5; 1,0; 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As células foram incubadas durante 44 h a $37 \pm 1^\circ \text{C}$. Após a incubação, foram adicionados ao balão de cultura 6 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 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: $\text{IDNC} = (\text{Ap} + \text{Nec} + \text{M1} + 2 (\text{M2}) + 3 (\text{M3}) + 4 (\text{M4})) / \text{N}^*$, 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 $\text{IDN} = (\text{M1} + 2 (\text{M2}) + 3 (\text{M3}) + 4 (\text{M4})) / \text{N}^*$. O número total de células viáveis e não viáveis marcadas, de acordo com Fenech (2007). A citostase foi calculada conforme Cavalcante et al. (2017).

2.10 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 DP. 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.

Para este estudo, os dados de absorvância que foram obtidos a partir do ensaio MTT normalizados foram transformados em logaritmo e submetidos a uma regressão não linear a fim de ser encontrado a CI50. A normalidade das variáveis contínuas foi verificada pela prova Shapiro-Wilk. Os valores de apoptose, IDN e IDNC 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 (SD) e considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$, foi usado Graph Pad Prism 6.0 (Graph pad Inc., San Diego, CA).

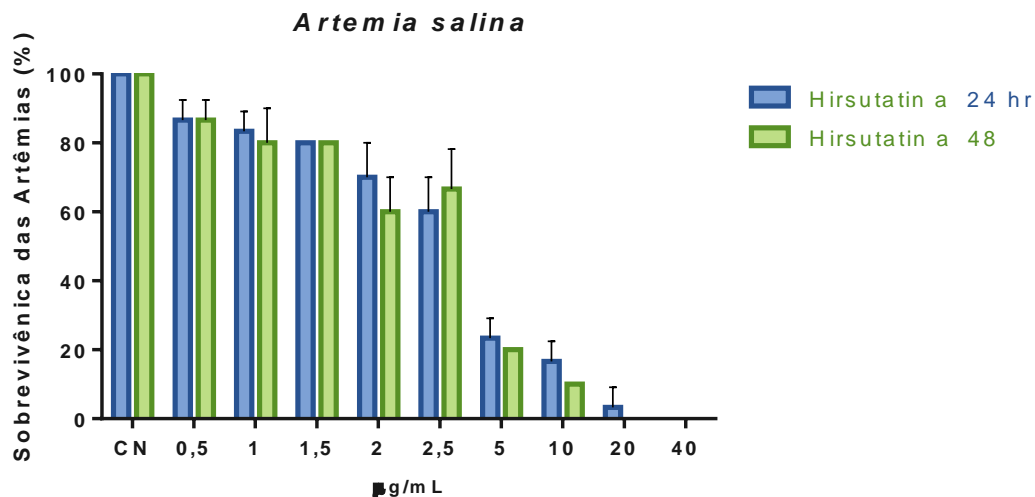


3 Resultados

3.1 Avaliação tóxica da hirsutatina a em *Artemia salina*.

Os valores de CL50 em *Artemia salina* obtidos da hirsutatina a 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 hirsutatina a em 24h foi de 3,04 $\mu\text{g/mL}$ e em 48h 2,83 $\mu\text{g/mL}$. Não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevivência das artemias nos tempos avaliados. Os dados apontam que a hirsutatina a induziu toxicidade em baixas concentrações.

Figura 1: Sobrevivência dos náuplios de artemia tratados 24 e 48h com hirsutatina a. 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. significância abc

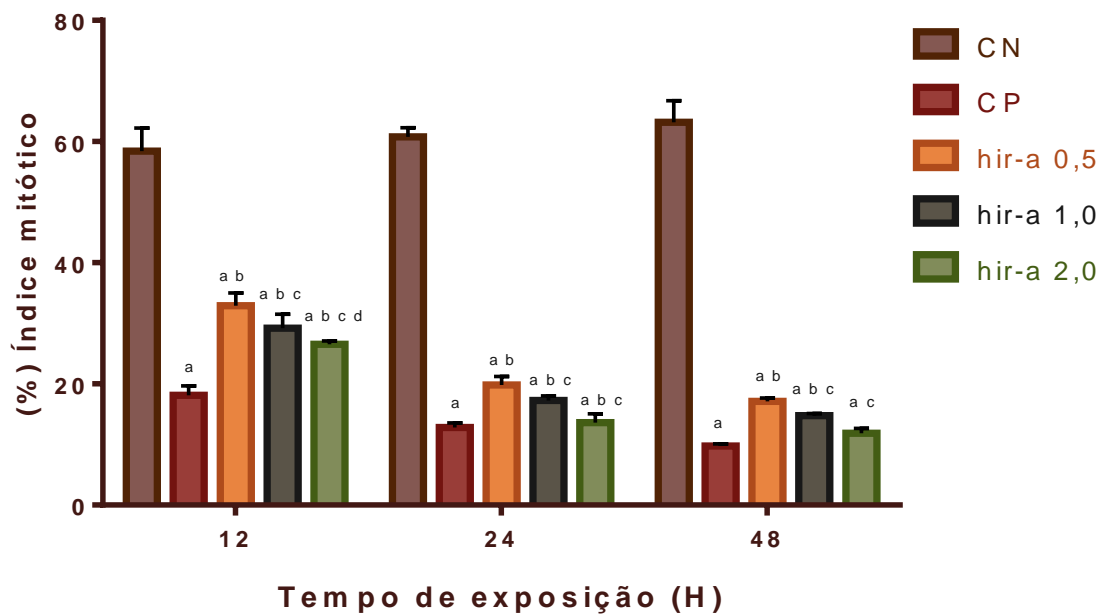


	Hir-a 24 hr	Hir-a 48
EC50	3.041	2.829

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

Os valores de índice mitótico em comparação com o controle negativo indicam toxicidade e citotoxicidade da hirsutatina a (**Figura 2**). Nessas análises, a redução foi parcial ou inteiramente dependente da concentração para o índice mitótico, respectivamente.

Figura 2: Avaliação citotóxica da hirsutatina a pelo índice mitótico em meristemas de raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9 µM/mL); hirsutatina a (0,5; 1,0 e 2,0 µa/mL). Os valores representam a média ± 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, ^a p<0,05, comparado com o grupo CN, ^b p<0,05, quando comparado ao grupo CP, ^c p<0,05, quando comparado ao grupo hir-a 0,5 e ^d p<0,05, quando comparado ao grupo hir-a 1,0. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.



3.3 Avaliação genotóxica e mutagênica da hirsutatina a, em raízes de *Allium cepa*

Com relação às aberrações cromossômicas os dados obtidos indicam que o hirsutatina a foi genotóxico em meristemas de raízes de *A. cepa* apenas na menor concentração testada quando comparado ao controle negativo (**Figura 3**), especialmente pela indução de

cromossomos em atrasos. Entretanto não foram significantes os dados para formação de micronúcleos (**Figura 4**).

Figura 3: Avaliação genotóxica da hirsutatina a por aberrações cromossômicas em raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9 $\mu\text{M}/\text{mL}$); hirsutatina a (0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 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, ^a $p < 0,05$, comparado com o grupo CN, ^b $p < 0,05$, quando comparado ao grupo CP e ^c $p < 0,05$, quando comparado ao grupo ω -hi 0,5. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

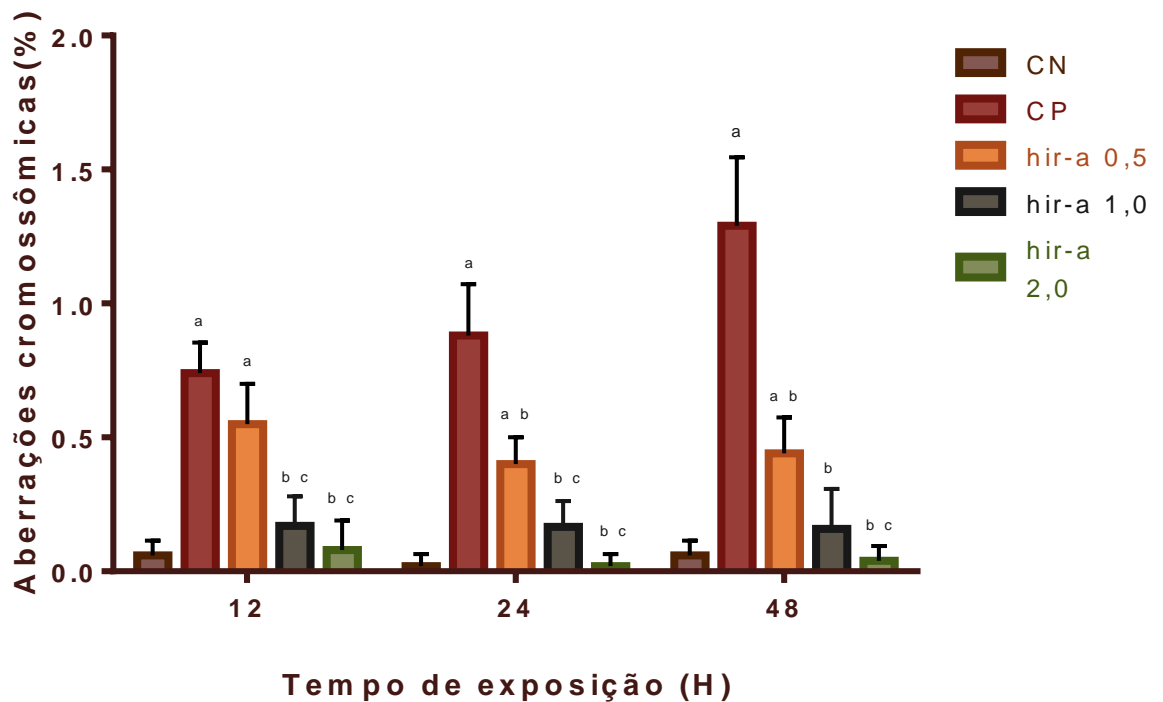
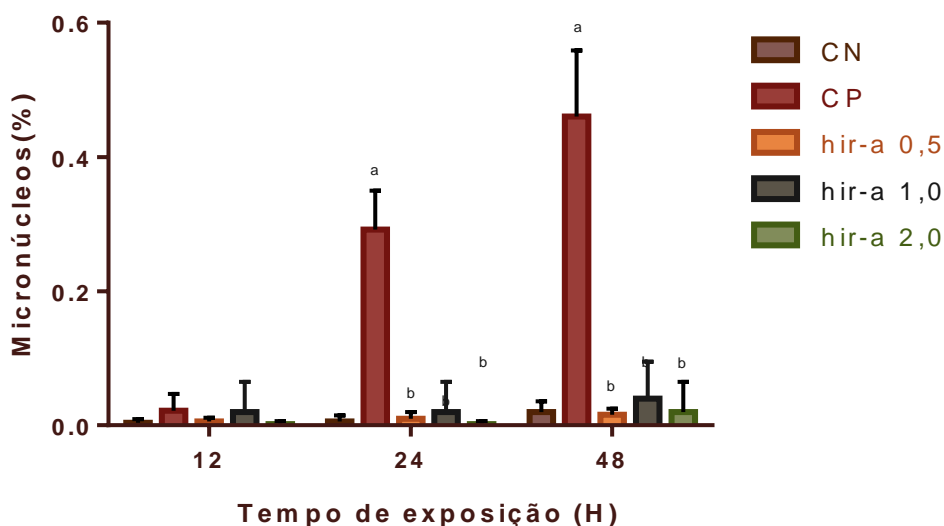


Figura 4: Avaliação mutagênica da hirsutatina a por micronúcleos em raízes de *Allium cepa*. CN: controle (água da torneira desclorificada); CP: Sulfato de cobre (6,9 $\mu\text{M}/\text{mL}$); hirsutatina a (0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os valores representam a média \pm D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA de dois caminhos), seguido de

Tukey como post hoc teste, ^a $p < 0,05$, comparado com o grupo CN e ^b $p < 0,05$, quando comparado ao grupo CP. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

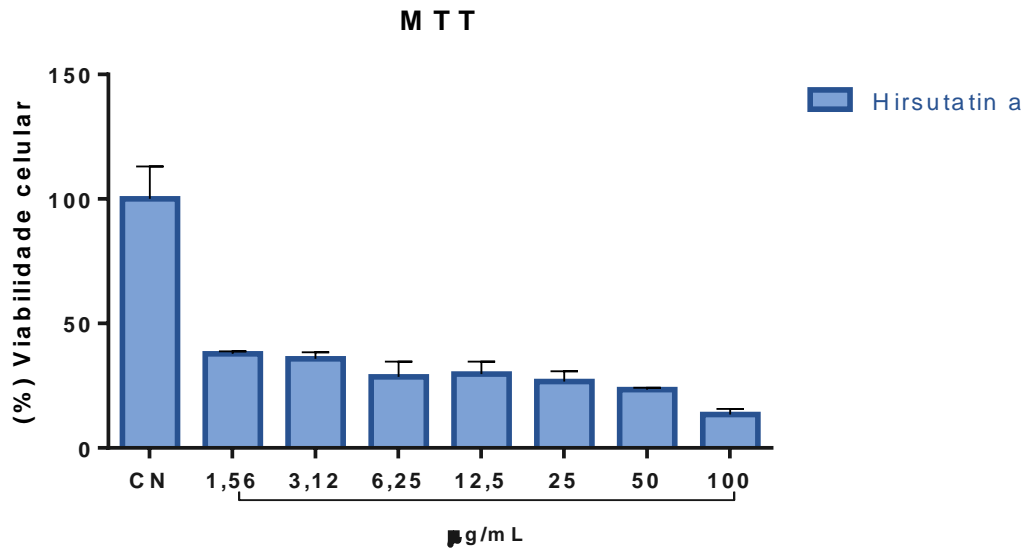


3.4 Viabilidade celular de hirsustatina a

3.4.1 Ensaio de citotoxicidade MTT

No ensaio de citotoxicidade MTT a CI₅₀ de hirsutatina a em células de S180 com 72 hr de tratamento foi de 0,484 µg/mL. Os dados de viabilidade obtidos das absorvâncias normalizadas (porcentagem), comparados entre si, demonstraram efeito citotóxico em todas as concentrações testadas, devido a todos os resultados serem estatisticamente significantes quando comparados ao controle negativo (**Figura 5**). Como esperado, o CP foi citotóxica ($p < 0,05$).

Figura 5: Efeito citotóxico de hirsutatina a pelo teste MTT em células S180. Os dados foram normalizados (porcentagem) para o grupo controle negativo. Cada concentração em 3 poços com 1×10^6 células por replicata. CN: controle negativo; CP: doxorrubicina (6,9 µM/mL); hirsutatina a (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µg/mL). 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, ^a $p < 0,05$, comparado com o grupo (CN) e ^b $p < 0,05$, quando comparado ao grupo (CP).



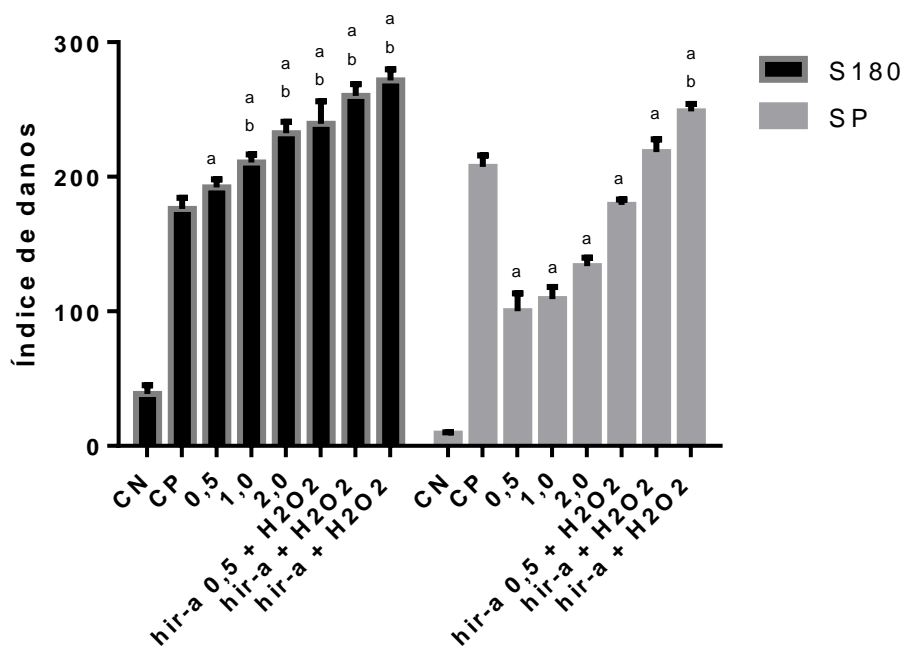
	hir-a
EC50	0.4844

Adicionar Dox e significância

3.5 Avaliação genotóxica de hirsustatin a em células de S180, com o teste cometa

A versão alcalina (pH > 13) do ensaio cometa foi realizada em células de S180 e sangue periférico 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 todas as concentrações testadas em relação ao controle negativo e nas concentrações de 1,0 e 2,0 µg/mL em relação ao controle positivo, quando comparados os tratamentos feitos em células normais de sangue periférico com as células de S180, notou-se que a substancia apresentou efeito mais relevante nos tratamentos feitos em S180 (**figura 6**).

Figura 6. Genotoxicidade do peptídeo, por mecanismos associados a danos oxidativos, em cultura primária de S180 e SP co-tratados com peróxido de hidrogênio. Valores representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. H₂O₂: peróxido de hidrogênio (10 mM). Hirsutatina a (0,5-2 µg/mL). ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao grupo CN e ^b p<0,05 comparado ao grupo CN (H₂O₂ 10).



3.6 Avaliação de alterações nucleares, apoptoses e necroses de hirsutatina a em células de S180

3.6.1 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

O hirsutatina a (0,5-2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 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 (**Tabela 1**). No teste de mutagenicidade, as análises estatísticas mostraram que hirsurtatina a apenas nas concentrações de 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induziram significante ($p < 0,05$) formação de micronúcleos nas células de S180 após o tratamento de 72 h (**Tabela 1**). Quanto a outros danos citogenéticos, o hirsutatina a significativamente ($p < 0,05$) formação de brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas em células S180 em todas as concentrações testadas em relação ao CN (**Tabela 1**). O CP também induziu significativamente ($p < 0,05$) apoptose, necrose, micronúcleos, brotos nucleares em relação a linha de base das células não tratadas (**Tabela 1**).

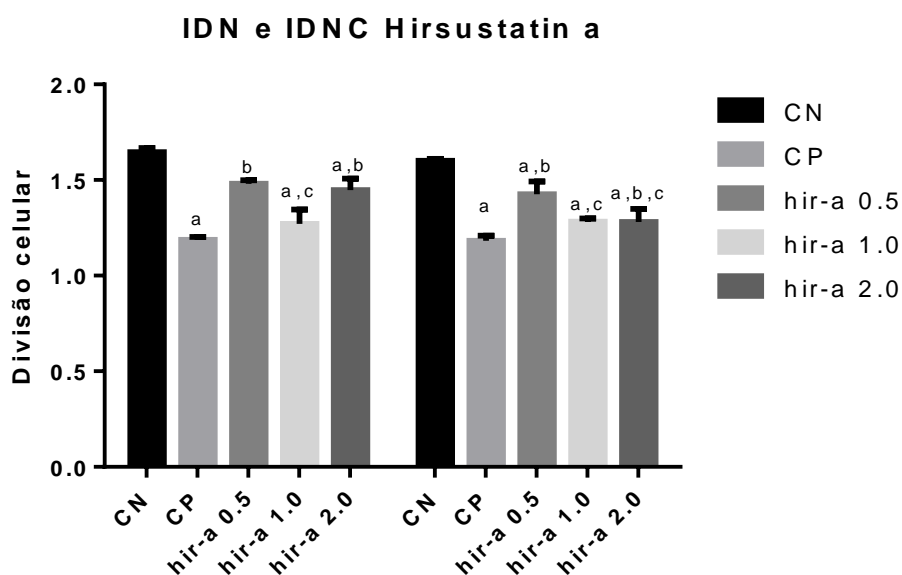
Quanto a citotoxicidade o hirsutatina a induziu redução significativa ($p < 0,05$) do IDN (1,0-2,0 $\mu\text{g/mL}$) e IDNC (1,0-2,0 $\mu\text{g/mL}$) Foi observada que houve uma forte correlação positiva entre o número de células apoptóticas e índice de danos e a frequência de danos nas células tratadas com hirsutatina a (figura 7)

Tabela 1: Danos citogenéticos induzidos por hirsutatina a 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 \pm 2,3	16,33 \pm 2,51	6 \pm 2	7 \pm 2	4,66 \pm 2,51
CP	302 \pm 17,4 ^a	109 \pm 11,53 ^a	27,67 \pm 1,15 ^a	26,67 \pm 1,15 ^a	39,67 \pm 2,08 ^a
Hir-a 0,5	54,7 \pm 2,517 ^{a,b}	39,3 \pm 3,05 ^{a,b}	7 \pm 6 ^a	15,7 \pm 4,5 ^{a,b}	13,3 \pm 1,5 ^{a,b}
Hir- a 1,0	81 \pm 12,2 ^{a,b,c}	55 \pm 12,5 ^{a,c}	9,3 \pm 2 ^{a,b,c}	24,7 \pm 4,2 ^{a,b,c}	15 \pm 1 ^{a,c}
Hir-a 2,0	121 \pm 17 ^{a,b,c,d}	81,7 \pm 20,3 ^{a,b,c,d}	16 \pm 4 ^{a,b,c,d}	37 \pm 5 ^{a,c}	19 \pm 1 ^{a,b,c,d}

Legenda: Os valores representam a média \pm D.P.M de 3 experimentos independentes. CN: Células não tratadas; CP: Doxorrubicina 6,9 $\mu\text{M/mL}$; hir-a = hirsutatina a. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, ^a $p < 0,05$, comparado com o grupo CN, ^b $p < 0,05$, quando comparado ao grupo CP, ^c $p < 0,05$, quando comparado com o grupo hir-a 1,0 e ^d $p < 0,05$, quando comparado com o grupo hir-a 2,0.

Figura 7. Avaliação da citotoxicidade da hirsutatina a pelo índice de divisão nuclear (IDN), índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade (IDNC) em culturas de célula S180, Os valores representam a média \pm D.P.M de 3 experimentos independentes. CN: Células não tratadas; CP: Doxorrubicina 6,9 $\mu\text{M/mL}$; ω -hi= ω -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, a $p < 0,05$, comparado com o grupo CN, b $p < 0,05$, quando comparado ao grupo CP e c $p < 0,05$, quando comparado com o grupo hir-a 0,5.



4 Discussão

A descoberta de drogas em produtos naturais tem sido objeto de pesquisas recentes no desenvolvimento de medicamentos contra o câncer (DALL'ACQUA, 2014). Nos últimos anos o ambiente marinho despertou o interesse dos pesquisadores pela descoberta de novos compostos bioativos (MONTASER; LUESCH, 2011), dentre eles metabólitos secundários de fungos marinhos como a hirsutatina a (EBEL; LIU, 2010). A hirsutatina a é um exemplo de substância natural pouco explorada.

Os resultados obtidos a partir da exposição dos náuplios das artêmias a ação da hirsutatina a nos períodos de 24 e 48 horas, demonstram que a mesma possui elevada toxicidade, vários estudos já mostraram que resultados que expressão alta toxicidade em *Artemia salina* podem estar correlacionados com atividade antitumoral. Estudos realizados com substâncias derivadas de outros tipos de fungos marinhos como o *Aspergillus wentii* (LI et al., 2015), e até mesmo estudos realizados com outros tipos de ciclodepsípeptídeos (DU et al., 2014) que usaram o teste de *Artemia salina* em sua metodologia, também conseguiram realizar a associação dos resultados de alta toxicidade em *Artemia salina* com a atividade antitumoral das substâncias analisadas. Mesmo sendo um teste relativamente barato e simples, a *Artemia salina* já mostrou ao longo do tempo ser uma ferramenta de grande valor em estudos preliminares que visam avaliar atividade citotóxica tanto de drogas naturais como sintéticas. (RUIZ, A.L.T.G; 2005).



Sangue periférico animal

O melhor entendimento sobre o câncer no decorrer dos anos, levou ao desenvolvimento de agentes quimioterápicos que agem, principalmente, por meio da interferência da síntese de DNA e da mitose, levando à inibição de reprodução de células e induzindo as mesmas a parada do crescimento (agentes citostáticos) ou a morte (agentes citotóxicos) (FREEDMAN; PATRIDGE, 2011). Baseado nesses aspectos é incessante a busca por novos agentes com potencial antimitótico, visto que substâncias com essa característica vem se apresentando com uma excelente ferramenta no combate as células cancerígenas. Dentro deste estudo em todos os testes realizados diretamente sobre a linhagem cancerígena de S180, foi observado que a hirsutatina a promoveu um efeito tóxico e conseqüentemente diminuição do processo de divisão celular nessa linhagem, no ensaio de cometa onde foi feita uma comparação da ação da substância na linhagem de S180, fica mais evidente ainda o potencial da hirsutatina a, visto que a mesma apresentou efeito tóxico muito mais elevado na linhagem cancerígena do que na linhagem de células normais. 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. Vários estudos de avaliação toxicogênicas realizados com substâncias obtidas de componentes marinhos assim como a hirsutatina já usaram a linhagem de S180 em seus experimentos (XIANJING et al., 2012; CANTY et al., 2009).

A atividade antimitótica também 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). O tratamento com hirsutatina a apresentou mudanças significativas no índice mitótico das raízes, quanto maior a dose testada maior foi a inibição ocasionada, demonstrando atividade dependente da concentração utilizada. Na concentração inicial de 0.5 ug/ml notou-se um aumento nas aberrações cromossômicas nas raízes tratadas com a hirsutatina a, porém em concentrações mais elevadas o mesmo não pode ser observado, mais esse fato pode ter corrido em correlação com o índice mitótico apresentado nas concentrações mais elevadas, visto que quando menor for o processo mitótico menores serão as alterações genotóxicas ocasionadas, o mesmo fato também pode explicar a baixa frequência de micronúcleos encontrada.

O presente estudo também demonstrou que todas as concentrações da hirsutatina a apresentaram efeito citotóxico nas células de S180 conforme revelado pelo ensaio MTT, a citotoxicidade da hirsutatina também foi demonstrada pela redução significativa do IDN e IDNC em todas as concentrações testadas nas células de S180 no teste de CBMN, embora

ciclohexadepsipeptídeos tenham demonstrado forte citotoxicidade contra linhagens de células cancerígenas, os mecanismos de ação desses metabolitos de fungo ainda são raramente estudados (TIANA, 2016). Alguns estudos realizados com outras espécies de ciclohexadepsipeptídeos já relataram que o efeito citotóxico causado pode estar relacionado com a indução de apoptose através da inibição de mecanismos que envolvem a inibição NFκB (ASOLKAR, 2009; TIANA, 2016). Porém fica clara a importância da hirsutatina a como alternativa a ser avaliada na terapia oncológica, embora estudos complementares ainda se façam necessárias para elucidar melhor o mecanismo de ação da molécula. Parágrafo com associação de

A genotoxicidade da hirsutatina a também foi avaliada no estudo através do ensaio de cometa, através dos resultados obtidos observou-se que a genotoxicidade da hirsutatina a pode estar associada a processos de estresse oxidativo, pois os resultados obtidos na linhagem cancerígena de S180 foram substancialmente mais elevados quando comparados aos de células do sangue periférico. É sabido que grande parte das células cancerígenas possuem menos peroxissomos que células saudáveis, peroxissomos desempenham importante função na manutenção do balanço oxidativo na célula e são reconhecidos como potenciais reguladores do estresse oxidativo (WU, 2018), baseado nisso sabemos que boa parte das substâncias anticancerígenas atualmente utilizadas, se baseiam na promoção do estresse oxidativo, visto que este pode ser considerado um ponto vulnerável em células cancerígenas, Também se observou que todas as concentrações testadas apresentaram resultados superiores de danos quando comparados ao peróxido de hidrogênio (CP), fato que foi potencializado quando os dois componentes foram testados em conjunto, o que indica mais ainda a correlação entre o estresse oxidativo e a ação da substância. Outros Cyclohexadepsipeptídeos como Destruixins também já demonstram efeitos oxidativos através do ensaio DHE (TIAN, 2016).

Através das avaliações realizadas no teste de CBMN, pode-se supor que os possíveis mecanismos de morte celular correlacionados com a hirsutatina a são provocados por danos ao material genético das células, pois houve forte correlação entre o índice de danos gerados com o número de células que foram induzidas a apoptose ou necrose (**Figura 7**). Fato este que pode comprometer a qualidade de vida do paciente pós tratamento. Dessa forma mesmo apresentando resultados menos eficazes na indução de células a apoptose, a hirsutatina a ainda pode ter potencial para ser utilizada em tratamentos alternativos aos quimioterápicos convencionais, visto que não se sabe ainda se a mesma apresenta algum efeito colateral relevante. Perspectivas futuras



5 Conclusão

A Hirsutatina A demonstrou alta toxicidade no EBPD com náuplios de *Artemia salina*, bem como efeitos tóxicos e citotóxicos, com base na redução da divisão MITOTICA no teste de *Allium cepa*. Este estudo também indica que a Hirsutatina A induz genotoxicidade, apoptose, necrose e outros danos citogenéticos, como micronúcleos, pontes nucleares e brotos nucleares em células S180. Todos esses mecanismos são importantes para potenciais agentes antitumorais, e os dados sugerem que as atividades observadas são compatíveis com candidatos a drogas antitumorais. Os resultados desta avaliação demonstram a necessidade de uma avaliação mais ampla da capacidade antitumoral desta substância, mas mostrou-se promissora para possíveis formulações antitumorais no futuro.

Referências

- ASOLKAR, R.; FREEL, C.; JENSEN, P.; FENICAL, W.; KONDRATYUK, T.; PARK, E AND PEZZUTO, J. Arenamides A-C, Cytotoxic NFκB Inhibitors from the Marine Actinomycete *Salinispora Arenicola*. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 396–402. 2009.
- BADRIA, F. A.; IBRAHIM, A. S. Evaluation of natural anthracene-derived compounds as antimetabolic 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.
- BILSLAND, E; TAVELLA, T; KROGH, R; STOKES, J; ROBERTS, A; AJIOKA, J; SPRING, D; ANDRICOPULO, A; COSTA, F; OLIVER, S. Antiplasmodial and trypanocidal activity of violacein and deoxyviolacein produced from synthetic operons. **BMC Biotechnology**, p. 18-22, 2018.
- BROWMAN, G. P.; HODSON, D. I.; MACKENZIE, R. J.; BESTIC, N.; ZURAW, L. Choosing a concomitant chemotherapy and radiotherapy regimen for squamous cell head and neck cancer: A systematic review of the published literature with subgroup analysis. **Head & Neck**, v. 23, n. 7, p. 579-589, 2001.
- 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
- DALL'ACQUA, S. Natural products as antimitotic agents. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 20, p. 2272-2285, 2014.
- DE ALMEIDA, V.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- 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.
- DRUKMAN, S.; KAVALLARIS, M. Microtubule alterations and resistance to tubulin-binding agents. **International journal of oncology**, v. 21, n. 3, p. 621-628, 2002.
- DU, F; LI X; ZHANG P; LI, C; WANG, B. Cyclodepsipeptides and Other O-Containing Heterocyclic Metabolites from *Beauveria felina* EN-135, a Marine-Derived Entomopathogenic Fungus. **Mar. Drugs.**, v.12(5), p. 2816-2826. 2014
- 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.
- FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.



- FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.
- FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environment monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.
- FREEDMAN, R. A.; PARTRIDGE, A. H. Adjuvant therapies for very young women with early stage breast cancer. **Breast**, v. 20, n. 3, p. 146-149, 2011.
- FREEDMAN, RACHEL A; PARTRIDGE, ANN H. Adjuvant therapies for very young women with early stage breast cancer. **Breast**. v. 20, p.146-9, 2011.
- GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in biochemical sciences**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-24042016.pdf> . Acessado em: 18 nov 2017.
- ISAKA, M; PALASARN, A; SRIKLUNG, K. Cyclohexadepsipeptides from the Insect Pathogenic Fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594. **J. Nat. Prod.** V.68, p. 1680-1682, 2005.
- JESUS, T. **Investigação Química e Biológica dos Metabólitos Secundários Derivados de Macroalgas Marinhas e Microrganismos Associados**. Tese (Doutorado em química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, p. 297-320.
- LI, X; LI, X; LI, X; XU, G; LIU, Y; WANG, B. Aspewentins D–H, 20-Nor-isopimarane Derivatives from the Deep Sea Sediment-Derived Fungus *Aspergillus wentii* SD-310. **J. Nat. Prod.**, v.10, p. 1021-1153, 2015.
- MERLO, M F; PEPPER, W; REID, J; MALEY, C. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*; v. 6 (12), p.924-35. 2006.
- 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.
- MONTASER, R.; L, H. Marine natural products: a new wave of drugs?. **Future**, v. 3, n. 12, p. 1475-1489, 2011.
- 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.



- Octavia, Y.; Tocchetti, G.; Gabrielson, L.; Janssens, S.; Crijns, J.; Moens, L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **J Mol Cell Cardiol.** V. 52(6), p.1213-25, 2012.
- RUIZ1, A.L.T.G.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; FARIA A.D.; AMARA, M.C.E.; SERRANO, D.R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** V. 15(2), p. 98-102, 2005.
- 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.
- TIANA, J.; HANB, J.; ZHANG, X.; HEB, L.; ZHANGC, Y.; BAOB, L.; LIU, H. New Cyclohexadepsipeptides from an Entomogenous Fungus *Fusarium proliferatum* and Their Cytotoxicity and Autophagy-Inducing Activity. **Chem. Biodiversity**, v.13, p.1-9. 2016.
- 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.
- WHO, 1 in 2 countries unprepared to prevent and manage cancers. 2017.
- WU, W; LIU, F;WU, K;CHEN, Y; WU, H; DAI, G; ZHANG, W. Lon Peptidase 2, Peroxisomal (LONP2) Contributes to Cervical Carcinogenesis via Oxidative Stress. **Med Sci Monit.**v. 24, p. 1310-1320, 2018
- 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.
- ZENG, X.; MORGENSTERN, R.; NYSTRÖM, A. M. Nanoparticle-directed sub cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells bycircumventing GST-mediated drug resistance. **Biomaterials**, v. 35, n. 4, p. 1227-1239, 2014.



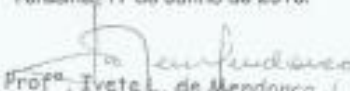
CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo *Penicillium citrinum* isolado a partir da alga marinha *Dichotomaria marginata* demonstrou ser uma fonte de compostos com potencial antitumoral. O composto isolado 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, O estudo também indica que a hirsutatina a 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 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. CEP: 64209-900 Telefone (86) 3215-6734, e-mail: ceape@ufpi.edu.br</p>	
CERTIFICADO		
<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 à Janeiro/ 2016	
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico/ swiss	
Nº de Animais	60	
Peso/ Idade	25-30g/ 2 meses	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central no CCA/UFPI.	
Teresina, 17 de Junho de 2016.		
 Prof ^a . Ivete L. de Mendonça Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI Coordenadora		