

SCREENING DE ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS LIQUÊNICOS: CLADONIACEAE

Silene C. Nascimento ¹

Eugênia C. Pereira ^{2,3}

Antonio Fernando M. Oliveira ²

Nicácio Henrique da Silva ⁴

Michele Boitard ⁵

Hélène Beriel ⁵

Recebido em 16.09.91. Aceito em 11.07.94

RESUMO - (Screening de atividade citotóxica de extratos liquênicos: Cladoniaceae) Extratos etéreos, acetônicos, metanólicos e aquosos de *Cladonia substellata*, *C. crispatula* e *Cladina dendroides* ocorrentes em solos arenosos de tabuleiros (cerrado) no Estado da Paraíba (Brasil), foram testados contra células PC3 e MDA-MB231 obtidas de adenocarcinoma prostático e mamário (humanos), bem como células P388 e L1210 provenientes de leucemia murina. Os resultados demonstraram uma maior eficácia dos extratos de *C. substellata* frente às quatro células testadas. Esta espécie e a *Cladina dendroides*, exceto seu extrato metanólico, apresentaram IC₅₀ inferiores a 50µg/ml, o que indica atividade satisfatória. Os extratos de *C. crispatula* não exerceram inibição relevante frente às células estudadas. Testes cromatográficos revelaram, em maior quantidade, a presença dos ácidos úsnico e estíptico em *C. substellata*; ácido tamnólico em *C. crispatula*; atranorina e os ácidos protocetrário e fumarprotocetrário em *C. dendroides*, o que se supõe ser o princípio ativo dessas espécies.

Palavras-chave: atividade citotóxica, líquen, Cladoniaceae.

ABSTRACT - (Screening of cytotoxic activity of lichen crude extracts: Cladoniaceae) Ethereous, acetic and methanolic crude extracts from *Cladonia substellata*, *C. Crispatula* and *Cladina dendroides* occurred on sandy soil of Paraíba State - Brazil, were tested against PC3 and MDA-MB231 cells from prostatic and breast human adenocarcinoma, and P388 and L1210 cells from murine leukemia. The results showed the highest inhibition of *Cladonia substellata* extracts against the four tested cells. This specie and *Cladina dendroides*, except its methanolic extract, presented IC₅₀ lower than 50µg/ml that indicates a satisfactory activity. *Cladonia crispatula* extracts did not

Departamentos de Antibióticos ¹, Botânica ², Bioquímica ⁴, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, 50.739, Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil. Laboratório de Farmacologia e Fisiologia ⁵, U.F.R. Farmácia, Université Joseph Fourier, 38.000 La Tronche, França.

exert inhibition on the studied cells. Chromatographic tests revealed the presence, in highest content, of usnic and stictic acids in *C. substellata*; thamnolic acid in *C. crispatula* protocetraric and fumarprotocetraric acids and atranorin in *C. dendroides*, what one may suppose to be the active principles of the studied species.

Key words: activity cytotoxic, lichen, Cladoniaceae.

Introdução

Os líquens, seres simbiotes compostos de alga e fungo, produzem metabólitos secundários de comprovada atividade biológica.

As substâncias liquênicas são eficientes contra bactérias e fungos (Bustinsa 1951, Pereira 1989, Pereira *et al.* 1991), impedem o desenvolvimento de tumores e células cancerígenas (Fukuoka *et al.* 1968, Lima *et al.* 1990, Pereira *et al.* no prelo), além de possuírem atividade farmacológica (Appa-Rao & Prabhakar 1987, Correia da Silva 1979), antigerminativa (Ravinskaya & Vainhstein 1975, Lawrey 1977), dentre outras.

As culturas de células humanas e animais são essenciais aos estudos *in vitro* de atividade citotóxica de substâncias sintéticas ou naturais. Esses testes, incorporados ao programa do National Cancer Institute, objetivam a pré-seleção de agentes antitumorais. O estudo de atividade citotóxica permite estabelecer correlação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, fornecendo informações suplementares aos estudos das neoplasias.

Com base na bibliografia que refere a atividade antitumoral dos polissacarídeos e fenóis liquênicos obtidos de diferentes espécies de líquens, foram iniciados estudos por Lima *et al.* (1990), com extratos de Cladoniaceae ocorrentes em tabuleiros arenosos do Estado da Paraíba, Brasil. Os resultados demonstraram que espécies com alto teor de ácido úsnico inibiram, *in vitro*, o crescimento de células da linha contínua KB (carcinoma nasofaríngeo), bem como impediram o desenvolvimento de tumores sólidos experimentais do tipo sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich, em até 80%.

Neste trabalho foi realizado o estudo da atividade citotóxica de extratos de *Cladonia substellata* Vainio, *Cladonia crispatula* (Nyl.) Ahti e *Cladonia dendroides* (des Abb.) Ahti, contra quatro diferentes tipos de células, como continuidade da investigação de compostos liquênicos com atividade antineoplásica.

Material e métodos

1. Coleta do líquen e preparo dos extratos

Para este trabalho foram selecionadas *Cladonia substellata* Vainio, *Cladonia crispatula* (Nyl.) Ahti, e *Cladonia dendroides* (des Abb.) Ahti, ocorrentes sobre solos arenosos de tabuleiros (cerrado), no Estado da Paraíba, Brasil.

Utilizando-se 10g de talo seco e solventes orgânicos, em série eluotrópica (éter, acetona e metanol), foram obtidos extratos, por sistema de esgotamento a frio, em agitador mecânico por 1h à temperatura ambiente (cerca de 28^o C). Do resíduo, se realizou extração aquosa a frio e a quente, esta última a 100^o C por 1h.

Os extratos orgânicos foram evaporados à temperatura ambiente, enquanto os aquosos foram congelados e liofilizados.

2. Cromatografia em camada delgada

Os extratos orgânicos foram aplicados em placas de 20x20cm, com 0,25mm de sílica Gel60 F²⁵⁴⁺³⁶⁶ Merck, desenvolvidas nos sistemas de solventes A (tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 v/v) e B (hexano/éter dietílico/ácido fórmico, 130:80:20 v/v), segundo Culberson (1972).

As bandas isoladas foram reveladas e demarcadas sob luz UV a 254 e 366nm. Em seguida, as placas foram pulverizadas com H₂SO₄ a 10%, e levadas à estufa a 100°C por 1h.

Os cromatogramas foram interpretados com base nos valores de Rf das bandas e padrões utilizados (ácido fumarprotocetrárico, protocetrárico, tamnólico, decarboxitamnólico, estítico e úsnico, além da atranorina), bem como pela coloração resultante da reação das bandas com o ácido sulfúrico.

3. Testes *in vitro*

Nos testes de citotoxicidade foram utilizadas quatro linhas contínuas de células. As linhas humanas (Furlay & Baguley 1984) PC₃ e MDA-MB231 foram obtidas de adenocarcinoma prostático e mamário, respectivamente (Kaighn et al. 1979, Cailleau et al., 1974), enquanto as P388 e L1210 eram provenientes de leucemia murina (De Bruyn 1955; Hutchison et al. 1966; Moore et al. 1966; Baguley & Nash 1981).

As células PC3 foram cultivadas em uma mistura contendo 25% do meio Eagle modificado (MEM - Modified Eagle Medium), 65% do meio F12 (Nutried Mixture), HAM Gibco enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 2µM/ml de L-glutamina e antibióticos (penicilina - 1000 UI/ml; estreptomomicina - 250µg/ml; anfotericina - 2,5µg/ml); as MDA-MB231 foram cultivadas no meio Eagle modificados com 10% de soro fetal bovino, 2 µM/ml de L-glutamina, antibióticos (penicilina - 1000 UI/ml e estreptomomicina - 250µg/ml) e 1 UI/ml de insulina; as células L₁₂₁₀ e P₃₈₈ foram cultivadas no RPMI (Roswell Park Memorial Institute) com 10% de soro fetal bovino, 2µM/ml de L-glutamina, 10µg/ml de 2-mercaptoetanol e antibióticos (penicilina - 1000 UI/ml; estreptomomicina - 250µg/ml).

Para todas as linhas celulares a viabilidade foi determinada pelo teste de exclusão do azul de tripano, e a suspensão celular ajustada para 10⁴ células/ml.

As suspensões celulares foram divididas em placas multipontos a uma razão de 135µl para as linhas MDA-MB231 e PC3, e 250µl no caso das L1210 e P388.

Os extratos liquênicos foram solubilizados pelo di-metil sulfoxido (DMSO), e colocados em três pontos por concentração para as linhas L1210 e P388, e quatro pontos para as MDA-MB231 e PC3. A média dos pontos por concentração foi feita com objetivo de calcular a percentagem de inibição do crescimento das células tratadas em relação ao grupo controle.

As células das linhas L1210 e P388 foram contadas pelo Coulter Counter (Modelo TA Contronc - France). O desenvolvimento das células tratadas foi compa-

rado ao das células controle, onde a percentagem de inibição foi calculada através da fórmula: $(C - T) / C \times 100$, onde C é a média das células controle, e T é a média das células tratadas.

Para as linhas PC3 e MDA-MB231, a avaliação foi feita pelo método colorimétrico do MTT, (3-(4-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide), segundo COLE (1986). Após cinco dias de incubação das células com os extratos liquênicos, foram adicionados 15 μ l da solução de MTT (5mg/ml PBS), e as placas recolocadas na estufa. Após 2h, a reação enzimática foi interrompida por aspiração do meio de cultura, e adição de 100 μ l de DMSO. As placas foram agitadas por 10min e a leitura espectrocolorimétrica dos cristais formados foi realizada a um comprimento de onda de 540nm, através do Titerk Multiscan (Flow), acoplado a um computador Macintosh Plus.

Resultados e discussão

Os testes cromatográficos (Figura 1) revelaram a presença do ácido úsnico nos extratos etéreo, acetônico e metanólico de *Cladonia substellata*. Foi detectada uma banda no extrato etéreo de Rf semelhante ao do ácido estítico padrão. As outras bandas não identificadas, podem ser dos ácidos constítico e criptoestítico, além de um diterpeno. Ahti (1973) constata a presença dessas substâncias em *C. substellata* e refere o ácido úsnico como seu principal componente (98,1%). Estes dados foram confirmados por Pereira et al.(1991).

Cladonia crispatula, antes confundida com *C. gorgonia*, notadamente as espécies coletadas no Brasil, tem como principal componente o ácido tamnólico (Ahti, 1977). Pereira (1989) também detectou a presença deste ácido, além de quatro frações não identificadas, uma delas provavelmente o ácido decarboxitamnólico. Os dados obtidos por Pereira (1989) são ratificados nos testes cromatográficos aqui realizados (Figura 1).

Ainda na Figura 1, pode ser observado o desenvolvimento dos extratos de *Cladonia dendroides*. Huovinen & Ahti (1986) atribuem para esta espécie a atranorina como principal componente, assim como a presença dos ácidos protocetrário e fumarprotocetrário, além da substância CPh₂. Por outro lado, Legaz et al.(1987) referem a presença do ácido úsnico em *C. dendroides*. Estes dados foram confirmados por Pereira (1989), entretanto nos testes aqui realizados, este composto não foi detectado.

Em relação à atividade citotóxica, *Cladonia substellata* foi a espécie cujos extratos exerceram maior poder inibidor frente às células testadas. Na Tabela 1 é possível observar a IC₅₀* dos extratos testados. Quando o extrato bruto tem IC₅₀ menor que 50 μ g/ml, o resultado é considerado satisfatório para o prosseguimento nos estudos antineoplásicos. Portanto, quanto menor a concentração da substância para

* Concentração que inibe 50% do crescimento celular.

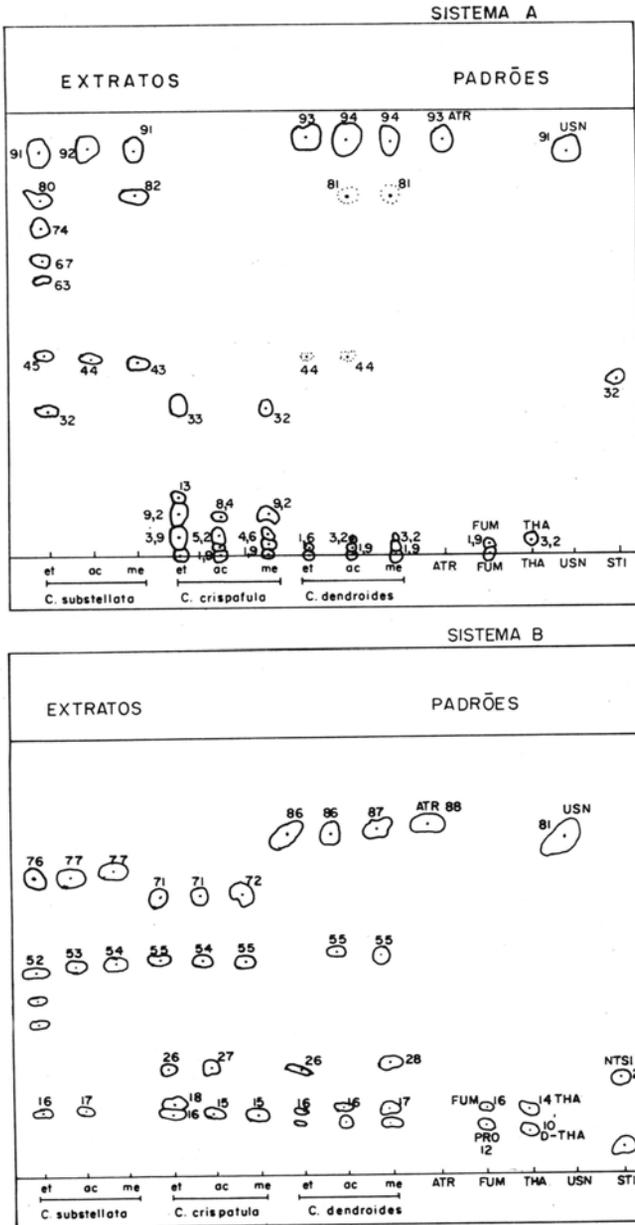


Figura 1. Cromatograma dos extratos etéreos, acetônicos e metanólicos obtidos de *Cladonia substellata*, *C. crispiflula* e *Cladonia dendroides*, desenvolvidos nos sistemas de solventes A (tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5, v/v) e B (hexano/éter dietílico/ácido fórmico, 130:80:20, v/v).

inibição de 50% do crescimento celular, provavelmente ela será menos tóxica ao organismo.

De acordo com a Tabela 1, pode-se observar que os extratos etéreo e metanólico de *Cladonia crispatula*, bem como o metanólico de *Cladina dendroides* tiveram IC_{50} maior que 50 μ g/ml, o que descarta esses extratos para estudos posteriores. Por outro lado, os extratos etéreo e acetônico de *Cladina dendroides* apresentaram IC_{50} bem inferiores contra as células PC3, L1210 e P388, e nenhum efeito frente às MDA-MB231.

Os dados sobre *C. substellata* foram os mais interessantes dentre os obtidos, visto que seu extrato acetônico testado contra as células PC3 apresentou IC_{50} de 0,7 μ g/ml, e para as leucêmicas L1210 e P388 uma inibição de 1,2 μ g/ml e 1,3 μ g/ml, respectivamente. No que se refere a esta espécie, todos os seus extratos apresentaram inibição relevante, devendo ainda ser levado em consideração que está se trabalhando a nível de extrato bruto.

Os produtos de referência foram utilizados para verificar sensibilidade das células em estudo. Para as linhas L1210 e P388 foi utilizada a Adriamicina com IC_{50} de 0,054 e 0,018 μ g/ml, respectivamente, e Taxol com IC_{50} igual a 27 μ g/ml para a linha PC₃ e 30 μ g/ml para as MDA-MB231.

Tabela 1: IC_{50} * (μ g/ml) de diferentes extratos celulares de Cladoniaceae sobre células cancerígenas

Linha Celular Espécies	Extratos	PC3	MDA/ MB231	L1210	P388
<i>Cladonia substellata</i>	etéreo	10,4	19,8	6,8	5,9
	acetônico	0,7	18,3	1,2	1,3
	metanólico	6,7	5,9	4,9	3,7
	aquosos	> 50	> 50	> 50	> 50
<i>Cladonia crispatula</i>	etéreo	50,0	50,0	50,0	50,0
	acetônico	-	-	-	-
	metanólico	50,0	50,0	50,0	50,0
	aquosos	> 50	> 50	> 50	> 50
<i>Cladina dendroides</i>	etéreo	16,8	50,0	11,1	8,3
	acetônico	15,9	50,0	13,9	13,5
	metanólico	50,0	50,0	50,0	50,0
	aquosos	> 50	> 50	> 50	> 50

* Concentração que inibe 50% do crescimento celular.

Quanto ao princípio ativo, o que se pode atribuir à inibição sempre mais acentuada do extrato acetônico, é o alto poder extrator da acetona.

Os líquens produzem metabólitos secundários alifáticos e fenólicos, na maioria extracelulares e insolúveis na água, sendo intracelulares as proteínas, carotenóides e vitaminas, estes encontrados na maioria das plantas superiores (Hale, 1983).

Os fenóis líquênicos, extraídos com solventes orgânicos, estão localizados na medula ou no córtex, raramente em ambas as camadas. As substâncias corticais são, na maioria, antraquinonas, derivados do ácido tetrônico, ácido úsnico, atranorina e liquexantona; os medulares são os depsídeos e depsidonas, não influenciando, em ambos os casos, sua ocorrência e quantidade em relação à idade do talo líquênico (Hale, 1983; Xavier-Filho et al., 1985).

Segundo Vicente (comunicação pessoal) e Hale (1983), diferentes solventes extraem diferentes substâncias em distintas partes do talo, algumas localizadas a nível medular, outras no córtex. A acetona retira os fenóis totais (medulares e corticais), enquanto o metanol separa principalmente os corticais.

Face a estas considerações, pode-se concluir que o maior poder inibidor dos extratos acetônicos se deve à maior capacidade extratora da acetona, dentre os solventes utilizados.

Nas Figuras que seguem, é possível observar a percentagem de inibição do crescimento celular, bem como a relação dose-efeito. Estes dados dão uma idéia geral do comportamento dos extratos diante das linhas celulares estudadas.

Na Figura 2 é possível observar que as células PC3 podem ser inibidas acima de 85,1%, 89,2% e 87,2% pelos extratos etéreo, acetônico e metanólico de *Cladonia substellata*, na concentração de 50µg/ml; as células MDA-MB231 foram inibidas em 86,1%, 88,7% e 89,4% pelos mesmos extratos; as L1210 em 98,6%, 98,2% e 99,0%, enquanto as P388 tiveram inibição de 98,7%, 98,6% e 99,2% na seqüência dos extratos supra referidos.

Tomando-se como base a concentração de 50µg/ml, não foi constatada inibição relevante dos extratos acetônico e metanólico de *Cladonia crispatula*, sendo registrada para o extrato acetônico a maior inibição, frente às células MDA-MB231 com 50,2% (Figura 3).

A mesma situação se repete para o extrato metanólico de *Cladonia dendroides* na concentração de 50µg/ml (Figura 4). Este inibiu em 53,3% as células MDA-MB231, entretanto o extrato etéreo desta espécie, que inibiu fortemente as demais células testadas, só antagonizou em 39,5% estas células. Isto torna possível supor que o princípio ativo deste extrato, é a atranorina, com provável associação ao complexo do ácido fumarprotocetrárico, detectados por CCD (Figura 1).

Ainda na Figura 4, pode-se atribuir para o extrato acetônico de *C. dendroides* a, 50µg/ml, uma inibição de 87,6%, 53,5% e 98,8% frente às células PC3, MDA-MB231, L1210 e P388; o extrato etéreo desta espécie inibiu as mesmas células em 86,4%, 39,5%, 96,5% e 98,2%, respectivamente.

Os extratos aquosos das três espécies testadas não demonstraram atividade relevante, tendo sido detectado, em todos os casos, $IC_{50} > 50\mu\text{g/ml}$.

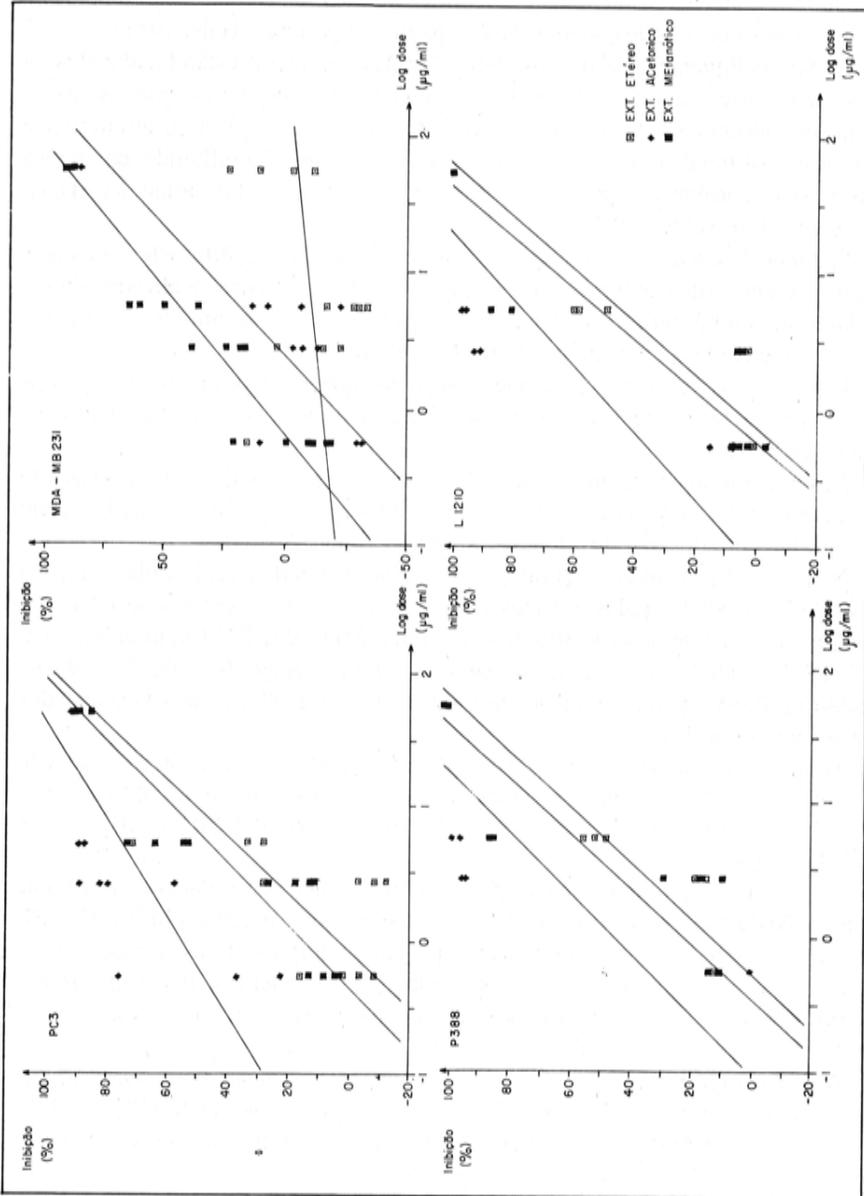


Figura 2. Percentual de inibição de diferentes células cancerígenas em relação à concentração dos extratos etéreo, acetônico e metanólico de *Cladonia substellata*.

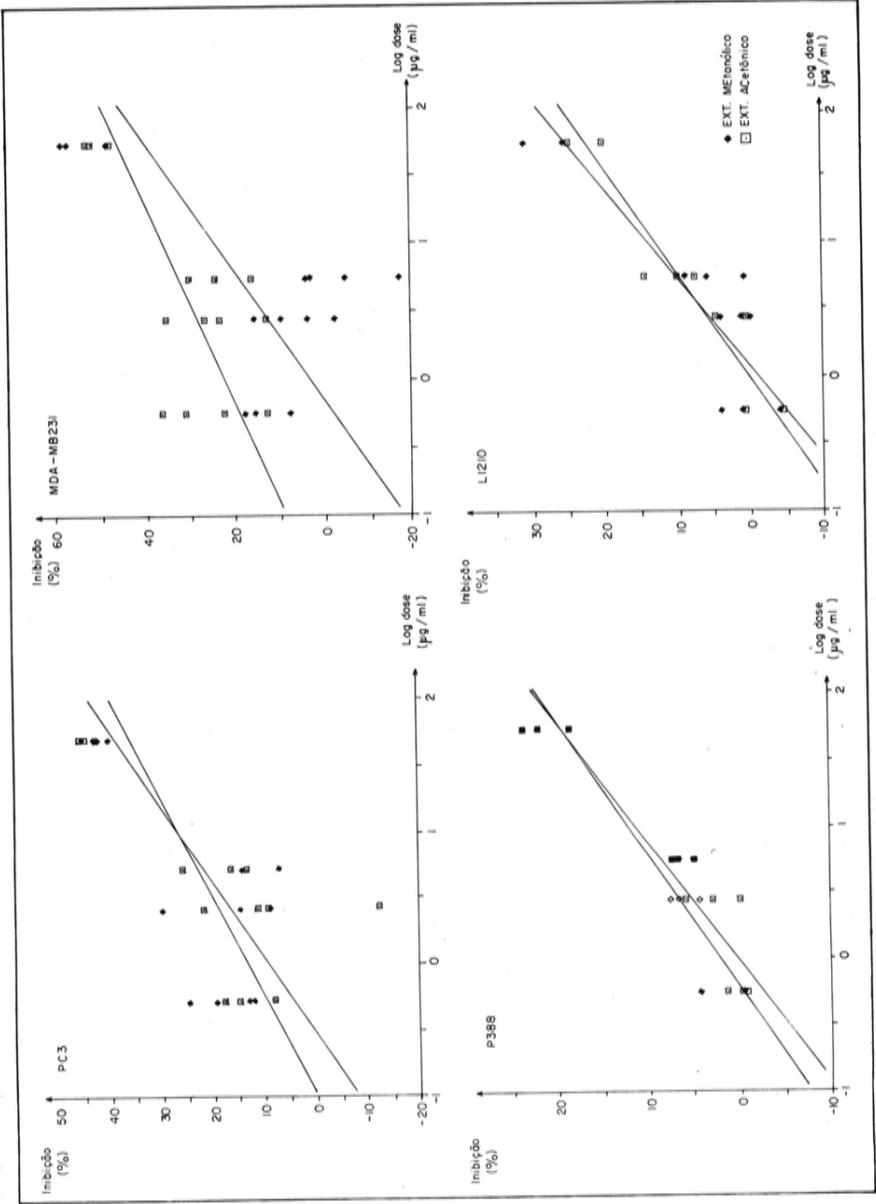


Figura 3. Percentual de inibição de diferentes células cancerígenas em relação à concentração dos extratos acetonico e metanolico de *Cladonia crispantula*.

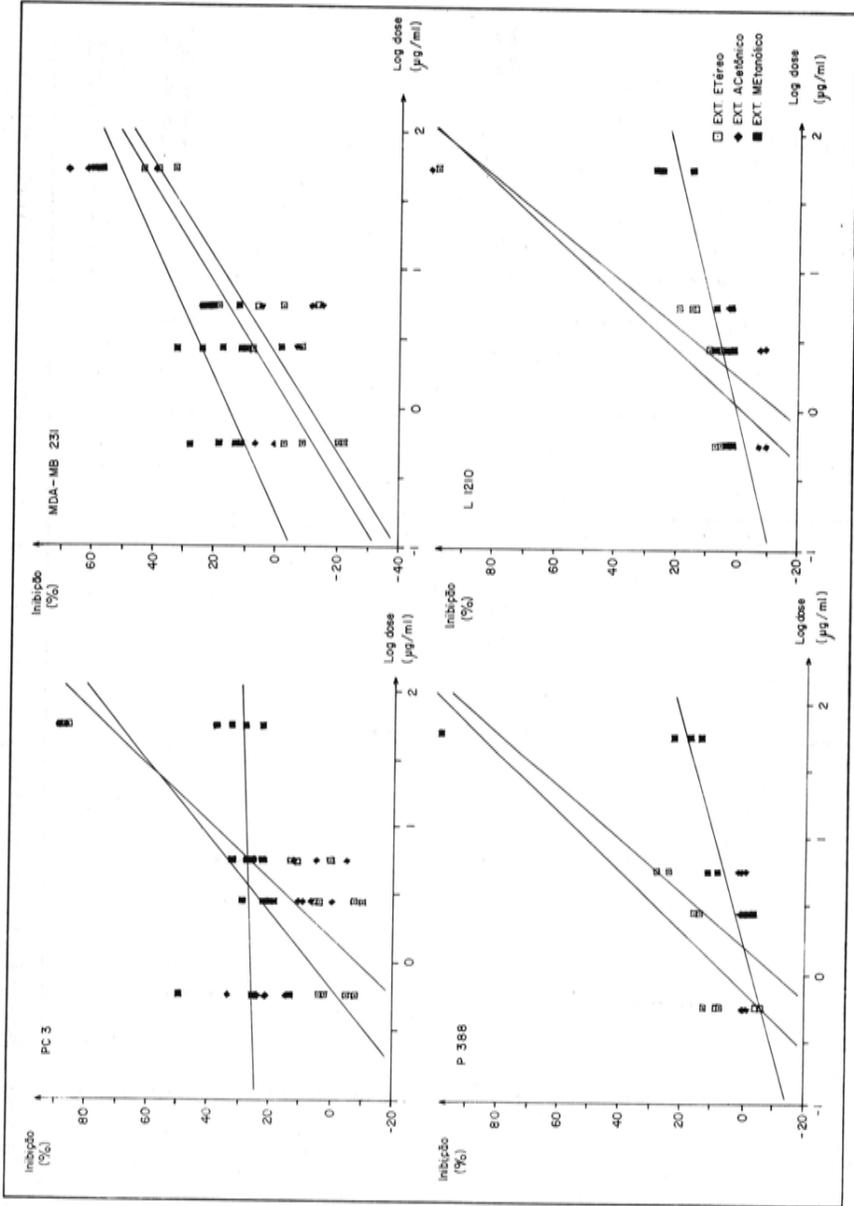


Figura 4. Percentual de inibição de diferentes células cancerígenas em relação à concentração dos extratos etéreo, acetônico e metanólico de *Cladonia dendroidea*.

Face aos dados obtidos, foi possível concluir que, dentre as espécies testadas, *Cladonia substellata* foi a mais eficaz frente às quatro linhas celulares estudadas, e aos seus extratos sendo atribuído como princípio ativo o ácido úsnico, e um possível sinergismo com o ácido estíptico; os extratos etéreo e acetônico foram os que extraíram maior quantidade de princípio ativo dos líquens, exceto no caso do extrato metanólico de *Cladonia dendroides* contra as células MDA-MB231; os extratos acetônico e metanólico de *Cladonia crispatula* não demonstraram inibição relevante frente às células teste, daí deduzir-se a ineficiência do ácido tamnólico, principal composto da espécie, frente as linhas celulares testadas.

Que os princípios ativos das espécies de *Cladoniaceae* aqui estudadas são de natureza fenólica, visto a baixa eficácia dos extratos aquosos frente às células teste.

Estudos subseqüentes serão realizados com as substâncias aqui referidas como princípios ativos, já purificadas, para uma indicação mais precisa, e detecção dos possíveis efeitos sinérgicos.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio do CNPq (bolsista/IC) e FACEPE (APQ).

Agradecemos ao Prof. Carlos Vicente Córdoba, da Universidad Complutense de Madrid, pela revisão do manuscrito.

Referências bibliográficas

- Ahti, T. 1973. Taxonomic notes on some species of *Cladonia* subsect. *Unciales*. *Ann. Bot. Fenn.* 10:163-184.
- Ahti, T. 1977. The *Cladonia gorgonia* group and *C. gigantea* in East Africa. *Lichenol.* 9:1-15.
- Appa-Rao, A. V. N. & Prabhakar, M. C. 1987. Pharmacological actions of leprapinic acid, a lichen metabolite. *Fitoterapia* 58(4):221-228.
- Baguley, B. C. & Nash, R. 1981. Antitumor activity of substituted 9-aminoacridines. Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing systems. *Eur. J. Cancer* 17:671-679.
- Bustinza, F. 1951. Antibacterial substances from lichens. *Endeavour* 10(38):95-99.
- Cailleau, R.; Yong, R., Olive, J., Reeves, W. 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusion. *J. Nat. Inst.* 53:661-674.
- Cole, S. P. C. 1986. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cell using MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 17:259-263.
- Culbertson, C. F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. *J. Chromatogr.* 72:113-125.
- Correia da Silva, J. 1979. Action of usnic acid on smooth muscle organs. *Plant Med. Phytother.* 13:26-33.
- De Bruyn, W.M. 1955. The maintenance of leukemia cell and carcinoma cell in continuous culture in slightly modified erlenmayer flasks. *Jaarb. Kankeronderz Neder* 5:137-142.
- Fukuoka, F., Nakanishi, M., Shibata, S., Nishikawa, Y., Takeda, T.; Tanaka, M. 1968. Polysaccharides in lichens and fungi II. Antitumor activities on sarcoma-180 of the polysaccharide preparations from *G. esculenta*, *C. islandica*, and some other lichens. *Gann.* 59:421-432.
- Furlay, G. J. & Baguley, B. C. 1984. The use of human cancer cell lines as a primary screening system for antineoplastic compounds. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 20:947-954.
- Hale Jr., M. E. 1983. *The Biology of Lichens* 3ed. London: Edward Arnold Publ.

- Huovinen, K. & Ahti, T. 1986. The composition and contents of aromatic lichen substances in the genus *Cladonia*. *Ann. Bot. Fenn.*, 23:93-106.
- Kaighn, M. E., Shankar, K., Ohnuki, J., Lechner, F., Jones, W. 1979. Establishment of characterization of human prostatic carcinoma cell line (PC₃). *Investigative Urology* 17:16-23.
- Hutchinson, D. J., Itensohn, O. L., Bjerre-Gaad, M. R. 1966 Growth of L1210 mouse leukemia cells *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 42:157-170.
- Lawrey, M. 1977. Inhibition of moss spore germination by acetone extracts of terricolous *Cladonia* species. *Bull. Torrey Bot. Club.* 104(1):49-52.
- Legaz, M. E., Vicente, C., Gallo, M., Xavier-Filho, L. 1987. Lichen phenols from *Cladonia dendroides* thalli. *Lichen Physiol. Biochem.* 2:13-21.
- Lima, R. C., Nascimento, S. C., Pereira, E. C., Campos-Takaki, G. M. 1990. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. *Bol. Soc. Brot.* 63:339-348.
- Moore, G. E., Sanberg, A. A., Ulrich, H. 1966. Suspension cell culture and *in vivo* and *in vitro* chromosome constitution of mouse leukemia L1210. *J. Nat. Cancer Inst.* 36:405-421.
- Pereira, E. C. G. 1989. *Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de Cladonia e Cladina (líquen)*. Dissertação de mestrado.
- Pereira, E. C., Campos-Takaki, G. M., Silva, N. H., Vicente, C., Legaz, M.E., Xavier-Filho, L. 1991. Fractionation of *Cladonia substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. *Bol. Soc. Brot.* 64:173-186.
- Pereira, E. C. Nascimento, S.C., Lima, R. C., Silva, N. H., Oliveira, A. F. M., Bandeira, E., Boitard, M., Beriel, H., Vicente, C., Legaz, M. E. (no prelo) Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*.
- Ravinskaya, A. P. & Vainstein, E. A. 1975. Effect of some ecological factors on the content of lichen substances. *Ekologia* 6(3):82-85.
- Xavier-Filho, L., Paulo, M. Q., Vicente, C. Legaz, M. E. (1985) Phenols from *Cladonia sandstedei* analyzed by HPLC. *Cryptogam. Bryol. Lichenol.* 6(2):143-150.