



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE -  
PPGSHMA

**Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL DE  
MICROESFERAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO  
ÚSNICO DE *Cladonia substellata* (AHTI) SOBRE A  
PROLE DE RATAS WISTAR DURANTE A  
ORGANOGENESE**

Vitória de Santo Antão

2016

**Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL DE  
MICROESFERAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO  
ÚSNICO DE *Cladonia substellata* (AHTI) SOBRE A  
PROLE DE RATAS WISTAR DURANTE A  
ORGANOGENESE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Noemia Pereira da Silva Santos

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katharine Raquel Pereira dos Santos

**Vitória de Santo Antão**

**2016**

Catálogo na Fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Roseane Souza de Mendonça, CRB4-1148

M338a Marinho, Ketsia Sabrina do Nascimento.

Avaliação da toxicidade oral de microesferas de PLGA contendo ácido úsnico de *Cladonia substellata* (AHTI) sobre a prole de ratas wistar durante a organogênese / Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho. Vitória de Santo Antão, 2016.

76f.

Orientador: Noemia Pereira da Silva Santos.

Coorientador: Katharine Raquel Pereira dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV. Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Líquens. 2. Ácido úsnico - *Cladonia substellata*. 3. Metabólito secundário. 4. Fetotoxicidade. I. Santos, Noemia Pereira da Silva (Orientador). II. Santos, Katharine Raquel Pereira dos (Coorientador). III. Título.

615.907 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-049/2016



Dissertação de Mestrado apresentada por **Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho** ao Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título “**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL DE MICROESFERAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO DE *CLADONIA SUBSTELLATA* (AHTI) SOBRE A PROLE DE RATAS WISTAR DURANTE A ORGANOGÊNESE**”, orientada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Noemia Pereira da Silva Santos e coorientada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Katharine Raquel Pereira dos Santos, aprovada no dia 26 de fevereiro de 2016 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

:

---

**Dr. Cristiano Aparecido Chagas**  
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

---

**Dr.<sup>a</sup> Eriane de Castro Lima Machado**  
Núcleo de Nutrição – CAV/UFPE

---

**Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior**  
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

Autora:

**Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho**

---

Dedico à minha família, em especial, a minha querida e amada mãe, e ao meu noivo, que tornaram esta caminhada mais leve.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu amado e digníssimo Deus, por sempre se fazer presente em minha vida, que nunca me deixou desistir nos momentos de dificuldade. Obrigada por me enviar pessoas tão maravilhosas que me ajudaram a conseguir chegar até onde cheguei.

Agradeço a minha mãe, Sueli Luiz do Nascimento, um exemplo de guerreira, que sempre se fez presente, ensinando-me, apoiando-me, amando-me incondicionalmente e acreditando em meu potencial. É por você que luto todos os dias. Amo você!

Ao meu noivo, Teone Pereira da Silva Filho, por toda a ajuda, por compreender meus momentos de ansiedade e ausência ao longo desses dois anos. Obrigada por me incentivar cada dia mais e mais.

Agradeço aos meus sogros, Teone Pereira da Silva e Maria Moreira do Amaral e Silva, pelo acolhimento, cuidado e momentos de boas risadas.

À minha orientadora, Noemia Pereira da Silva Santos, pela confiança, oportunidade e apoio durante a construção deste trabalho.

Ao professor, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, pela orientação e ajuda na realização da morfometria e estatística do presente trabalho.

Meu muitíssimo obrigada a minha Coorientadora, Professora Katharine Raquel Pereira dos Santos. Obrigada pelos ensinamentos, paciência, incentivos, e por sempre acreditar em mim, acolhendo-me ao longo de todos esses anos, desde a graduação. És um grande exemplo que sempre levarei comigo, como pessoa e como profissional.

Aos anjos que Deus colocou em meu caminho, Fabricya Roberta da Silva e Nivaldo Bernardo de Lima Junior, amigos/irmãos que sempre me ouviram, me auxiliaram e me cederam à mão amiga nos dias difíceis. Estaremos sempre juntos conquistando os maiores sonhos. Levarei vocês comigo para todo o sempre.

À minha grande amiga, Maria Juliana Gomes Arandas, pelo exemplo de competência, um verdadeiro anjo que Deus colocou em minha vida. Um exemplo de mulher guerreira e batalhadora, que não mede esforços para ajudar ao próximo. Não tenho palavras para descrever todo o meu carinho e gratidão por você. Obrigada pela sua amizade!

Agradeço a imensa ajuda que tive dos meus alunos de iniciação científica, Alziane Andrade Almeida, Keila Tamires da Silva, Maria Lavínia Tómas da Silva e Josemi José de Almeida Neto. Obrigada pela dedicação e momentos de descontração ao longo desses dois anos de pesquisa.

Agradeço a todos que fazem parte da família Biotecnologia e Fármacos, em especial, Eveline de Cássia Batista de Almeida Alves e Erivaldo Alves Antonio, pelas boas conversas e risadas.

À doutoranda do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Camilla Vila Nova Soares Silva, pela imensa ajuda na obtenção das microesferas, a qual sempre estava disposta a ajudar.

Agradeço a todos os profissionais da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente (PPGSHMA).

A todos os colegas de turma do PPGSHMA, pelos momentos de boas conversas e risadas.

Aos professores do PPGSHMA, pelos ensinamentos dentro e fora da sala de aula. Muito obrigada!

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Centro Acadêmico de Vitória (CAV) pela oportunidade de realização deste trabalho.

A todos os meus professores da UFPE/CAV que contribuíram para minha formação durante a graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>RESUMO</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvii
<b>CAPÍTULO 1</b>	1
<b>1.1 Introdução</b>	1
<b>1.2 Objetivos</b>	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
<b>1.3 Revisão da Literatura</b>	4
<b>1.3.1 Liquens</b>	4
<b>1.3.2 Ácido Úsnico</b>	12
1.3.2.1 Propriedades físico-químicas do ácido úsnico	12
1.3.2.2 Atividades biológicas atribuídas ao ácido úsnico	13
1.3.2.2.1 Atividade Antimicrobiana	14
1.3.2.2.2 Atividade Antitumoral	14
1.3.2.2.3 Atividade Antiviral	16
1.3.2.2.4 Atividade Anti-inflamatória	17
1.3.2.2.5 Atividade Antioxidante	17
1.3.2.2.6 Atividade Cicatrizante	18
1.3.2.2.7 Atividade Antifúngica	19
1.3.2.2.8 Atividade Moluscicida, Larvicida e Inseticida	19
1.3.2.3 Mecanismo de ação e toxicologia do ácido úsnico	20
<b>1.3.3 Sistemas de Liberação Controlada</b>	23
1.3.3.1 Microesferas	26
<b>1.3.4 Toxicologia Reprodutiva</b>	28

<b>CAPÍTULO 2</b>	32
<b>Efeito de microesferas de PLGA contendo ácido úsnico de <i>Cladonia substellata</i> (AHTI) sobre a prole de ratas wistar durante a organogênese</b>	
2.1. Resumo	33
2.2 Abstract	33
2.3 Introdução	34
2.4 Material e Métodos	35
2.5 Resultados	39
2.6 Discussão	41
2.7 Referências Bibliográficas	46
<b>CONCLUSÕES</b>	58
<b>REFERÊNCIAS</b>	59
<b>ANEXOS</b>	xix
Normas da Revista – Anais da Academia Brasileira de Ciências	xix
Comitê de Ética	xxiv

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura do talo líquênico. (Cs) Córtex superior; (M) Medula; (Ci) Córtex inferior.	5
Figura 1.2	Classificação dos líquens. (A) folioso ( <i>Parmotrema tinctorum</i> ), (B) crostoso ( <i>Haematomma fenzianum</i> ), (C) fruticoso ( <i>Ramalina melanothrix</i> ), (D) filamentoso ( <i>Dictyonema sericeum</i> ), (E) dimórfico ( <i>Cladonia didyma</i> ), (F) esquamuloso ( <i>Normandina pulchella</i> ).	6
Figura 1.3	Líquens utilizados no processo de mumificação.	8
Figura 1.4	Utilização dos líquens na indústria de perfumaria francesa. Perfumes franceses.	8
Figura 1.5	Prato asiático com a espécie de líquen <i>Umbilicaria esculenta</i> , utilizada na alimentação.	9
Figura 1.6	Remédio comercializado na Alemanha, tendo como princípio ativo a <i>Usnea barbata</i> .	10
Figura 1.7	Pastilhas Isla-Mint® comercializadas na Europa à base de <i>Cetraria islandic</i> .	10
Figura 1.8	Xarope à base de <i>Cetraria islandic</i> , de nome comercial Tannenblut N®.	11
Figura 1.9	Estrutura química do ácido úsnico.	13
Figura 1.10	Comparação das variações de concentrações do princípio ativo administrado em formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada. Administração convencional (a), administração por meio de sistemas liberação controlada (b), Aplicação do fármaco (A1, A2, A3, A4).	24
Figura 1.11	Representação esquemática dos sistemas de reservatórios e sistemas matriciais: (A) microcápsula (sistema reservatório) e (B)	26

microesfera (sistema matricial).

- Figura 1.12 Efeitos gerados em decorrência da exposição materna a agentes químicos 29

## ARTIGO

- Figura 1 Fetos obtidos do grupo controle (A) e grupo tratado com 25mg/kg de MS-AU durante o período da organogênese (B). Seta mostrando a presença de placenta reduzida com interrupção no desenvolvimento fetal. 52
- Figura 2 Fotomicrografia do fígado das ratas prenhes do grupo controle (A) e grupo tratado com 25mg/kg de MS-AU (B). Visualização dos hepatócitos (seta), os capilares sinusóides (asteriscos), células de Kupffer (cabeça da seta). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento 400X. Barras de escala = 100 µm. 53
- Figura 3 Fotomicrografia do fígado da prole do grupo controle (A) e grupo tratado com 25mg/kg de MS-AU (B). Visualização dos hepatócitos (seta), os capilares sinusóides (asteriscos), células da linhagem eritrocitária (cabeça da seta). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento 400X. Barras de escala = 100 µm. 54
- Figura 4 Fotomicrografia do fígado da prole do grupo controle (A) e grupo tratado com MS-AU (B). Visualização dos megacariócitos (seta). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento 400X. Barras de escala = 100 µm. 55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ganho de peso corporal durante a gestação e peso do fígado das ratas prenhes tratadas com o ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25mg/kg.	56
Tabela 2	Análise dos marcadores da função hepática das ratas prenhes após dez dias de administração de MS-AU na dose de 25mg/kg durante a prenhez.	56
Tabela 3	Efeito do ácido úsnico encapsulado em microesferas sobre os parâmetros fetais.	57
Tabela 4	Análise histomorfométrica do fígado das ratas prenhes expostas as MS-AU durante a prenhez.	57
Tabela 5	Análise histomorfométrica do fígado dos fetos provenientes das ratas prenhes tratadas com as MS-AU durante a organogênese.	57

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais/menos
°C	Graus Celsius
<	Menor que

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}$	Micrômetro
A/O	Água/óleo
A/O/A ou W/O/W	Água/óleo/água
AU	Ácido úsnico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
CL <sub>50</sub>	Concentração letal que mata 50% de uma dada população de organismos
CL <sub>90</sub>	Concentração letal que mata 90% de uma dada população de organismos
D0	Dia zero
dl	Decilitro
DL <sub>50</sub>	Dose letal que mata 50% dos indivíduos expostos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
g	Gramma
HE	Hematoxilina e eosina
I.T.	Índice terapêutico
kg	Quilograma
mg	Miligramma
m/v	Massa/volume
MIC	Concentração inibitória mínima
MS-AU	Microesferas contendo ácido úsnico
mL	Mililitro
nm	nanômetro
NBF	Formalina neutra tamponada
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	Copolímero de ácido láctico e glicólico
PVA	Álcool polivinílico

SPSS	Statistical package for the social sciences
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
U/l	Unidade de massa atômica/por litro de sangue
UV	Ultravioleta

## RESUMO

O ácido úsnico, composto resultante do metabolismo secundário liquênico apresenta relevantes atividades biológicas e diversos casos de hepatotoxicidade já relatados. O desenvolvimento de alternativas inovadoras, a exemplo da encapsulação do ácido úsnico em microesferas, permite aumentar a eficiência terapêutica e diminuir os seus efeitos tóxicos. Ensaio pré-clínicos sobre o ciclo reprodutivo são necessários para a incorporação de novas moléculas na indústria farmacêutica, determinando as condições de uso seguro para a saúde. Em vista disto, este trabalho objetivou a investigação do potencial teratogênico do ácido úsnico encapsulado em microesferas de copolímero de ácido láctico e glicólico, como uma maneira de minimizar os seus efeitos tóxicos no organismo em desenvolvimento. As microesferas contendo ácido úsnico foram preparadas utilizando a técnica de emulsão múltipla (A/O/A), seguida de evaporação do solvente, e caracterizadas através da eficiência de encapsulação. No estudo experimental de toxicidade foram utilizadas 12 ratas Wistar, que foram submetidas ao estudo do ciclo estral no intuito de se determinar o período fértil, e em seguida, pareadas com machos (2:1). Após a confirmação da gestação, as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em grupos, controle (n=6) e tratado (n=6). As fêmeas do grupo controle receberam 1,0 mL de solução fisiológica; e as do grupo tratado receberam doses orais de 25 mg/kg/dia de ácido úsnico encapsulado em microesferas (MS-AU) durante o período da organogênese, pela via oral de administração (gavagem). Ao 20º dia de gestação as fêmeas foram sacrificadas e seus fetos retirados, analisados e pesados juntamente com sua respectiva placenta. O efeito causado pelo tratamento com as MS-AU foi avaliado através da variação de peso corpóreo, peso do fígado, análises bioquímicas e análises histomorfométricas do fígado. As microesferas contendo ácido úsnico apresentaram-se com uma eficiência de encapsulação de  $99,0 \pm 0,82$  %. Foi observada uma redução ( $86,12 \pm 20,69$ ) de cerca de 22% no ganho de peso durante a gestação quando comparado às ratas prenhes não tratadas ( $110,85 \pm 10,03$ ). Não houve diferença no peso dos fígados em todos os grupos de animais. Não houve alterações significativas nas enzimas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase após o tratamento dos animais com o MS-UA. Os fetos provenientes dos animais tratados com MS-AU durante a prenhez, apresentou uma diminuição significativa no peso médio ( $4,65 \pm 0,41$ ) em relação aos não tratados ( $4,85 \pm 0,35$ ), no entanto, não foi observado nenhum tipo de malformação externa. A análise microanatomia do fígado das ratas prenhes do grupo controle e grupo experimental estavam dentro dos padrões de normalidade. Apesar disso, as análises histomorfométricas revelaram um aumento no número total de hepatócitos, com

médias celulares entre o grupo experimental e o controle ( $37,56 \pm 7,94$ ;  $35,48 \pm 6,00$ , respectivamente). Como também uma diminuição significativa no tamanho médio do núcleo destes hepatócitos ( $55,89 \pm 13,00 \mu\text{m}^2$ ), quanto aos demais animais do grupo controle ( $58,25 \pm 13,00 \mu\text{m}^2$ ). Porém, nenhuma alteração foi observada para as células de kupffer e área celular dos hepatócitos. Na análise histomorfométrica do fígado dos fetos obtidos das ratas prenhes expostas as MS-AU foi observado um aumento significativo ( $43,31 \pm 7,17$ ) de aproximadamente 13% na quantidade de hepatócitos em relação aos animais não tratados; e uma diminuição ( $0,04 \pm 0,26$ ) de cerca de 56% no número de megacariócitos, comparado ao grupo controle ( $0,09 \pm 0,37$ ). Os dados aqui apresentados demonstram que a administração de MS-AU na dose de 25 mg/kg é capaz de induzir fetotoxicidade no período da organogênese. Porém, não sendo suficiente ao ponto de causar efeitos teratogênicos como foi evidenciado para o composto na sua forma livre em estudos anteriores. Estes resultados sugerem que a encapsulação do ácido úsnico ajuda a diminuir os efeitos tóxicos causados pela sua exposição em um período tão suscetível ao aparecimento de efeitos teratogênicos.

**Palavras chaves:** metabólito secundário, líquen, encapsulação, fetotoxicidade, reprodução.

## ABSTRACT

The usnic acid it is a compound resulting from lichen secondary metabolism presents relevant biological activity and several cases of hepatotoxicity have been reported. The development of innovative alternatives, such as the encapsulation of usnic acid microspheres can increase the therapeutic efficiency and decrease its toxic effects. Pre-clinical trials of the reproductive cycle are required for the incorporation of new molecules in the pharmaceutical industry, determining the safe use of health conditions. In view of this, this study aimed to investigate the teratogenic potential of usnic acid encapsulated into poly(lactide-co-glicolide) microspheres as a way to minimize its toxic effects in the developing organism. Microspheres containing usnic acid was prepared using the technique of multiple emulsion (w/o/w), followed by evaporation of the solvent, and characterized by encapsulation efficiency. In experimental toxicity study we used 12 Wistar rats, which were subjected to the study of the estrous cycle in order to determine the fertile period, and then paired with males (2: 1). Upon confirmation of pregnancy, females were randomly assigned to groups: control (n = 6) and treated (n = 6). The control group of females received 1.0 mL of saline solution; and the treated group received oral doses of 25 mg/kg/day of usnic acid encapsulated in microspheres (MS-AU) during the period of organogenesis, by oral administration (gavage). The 20<sup>th</sup> day of gestation the females were sacrificed and their fetuses removed, analyzed and weighed along with their respective placenta. The effect caused by the treatment with MS-AU was evaluated by body weight variation, liver weight, biochemical analysis and histomorphometric liver analysis. Microspheres containing usnic acid presented with an encapsulation efficiency of  $99.0 \pm 0.82\%$ . Was observed a reduction ( $86.12 \pm 20.69$ ) of about 22% weight gain during pregnancy when compared to untreated pregnant rats ( $110.85 \pm 10.03$ ). There was no difference in liver weights in all groups of animals. There were no significant changes in enzymes aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase after treatment of the animals with MS-AU. Fetuses from animals treated with MS-AU during pregnancy showed a significant decrease in weight average ( $4.65 \pm 0.41$ ) compared to untreated ( $4.85 \pm 0.35$ ), however, it was not observed any external malformations. The microanatomy of the liver of pregnant rats in the control group and experimental group were within normal limits. Despite this, histomorphometric analyzes revealed an increase in the total number of hepatocytes, with cells average between the experimental group and the control group ( $37.56 \pm 7.94 \mu\text{m}^2$ ;  $35.48 \pm 6.00 \mu\text{m}^2$ , respectively). As well as a significant decrease in the average size of the nucleus of these hepatocytes ( $55.89 \pm 13.00$ ) how much the other control group ( $58,25 \pm 13,00$ ). However, no change was observed for cells and Kupffer cell area of hepatocytes. The histomorphometric analysis of

the liver of fetuses obtained from pregnant rats exposed the MS-AU was observed a significant increase ( $43.31 \pm 7.17$ ) of approximately 13% in the amount of hepatocytes compared to untreated animals; and a decrease ( $0.04 \pm 0.26$ ) of about 56% in the number of megakaryocytes, compared to the control group ( $0.09 \pm 0.37$ ). The data presented herein demonstrate that administration of MS-AU at the dose of 25 mg/kg is capable of inducing Fetotoxicity the period of organogenesis. However, it is not enough as to cause teratogenic effects as was evidenced for the compound in its free form in previous studies. These results suggest that the encapsulation of usnic acid helps to reduce the toxic effects caused by their exposure in a period as susceptible to the onset of teratogenic effects.

# CAPÍTULO 1

## 1.1 Introdução

Os líquens, seres resultantes da associação entre fungos (micobionte) e algas (fotobionte), são uma das mais importantes fontes naturais de compostos biologicamente ativos, os quais derivam de seu metabolismo primário e secundário (HONDA; VILEGAS, 1998; HUNECK, 1999). Entre os vários compostos de origem natural, resultantes do metabolismo secundário dos líquens, destaca-se o ácido úsnico, um composto extensivamente estudado nos dias atuais (MELO *et al.*, 2008).

A literatura descreve relevantes atividades biológicas para o ácido úsnico, tais como: antibiótica, tuberculostática, moluscicida, antineoplásica, antitumoral, antiproliferativa, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, larvicida (FOURNET *et al.*, 1997; COCCHIETTO *et al.*, 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; DE CARVALHO *et al.*, 2005; BOMFIM, 2009; MARTINS, 2013). No entanto, apesar das várias aplicações atribuídas ao composto, há algumas limitações para a sua aplicação terapêutica, devido às suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, como baixa solubilidade, difícil interação com as barreiras biológicas e diversos casos de hepatotoxicidade já relatados na literatura (FRAVEAU *et al.*, 2002; RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2004; PRAMYOTHIN *et al.*, 2004; SANCHEZ *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006).

Desta forma, a utilização terapêutica deste composto em forma farmacêutica convencional torna-se muitas vezes inviável, sendo necessárias formas farmacêuticas alternativas para modificar as suas características físico-químicas, minimizar os efeitos tóxicos e melhorar sua biodisponibilidade (RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2004; KRISTMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2005; RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2006). Tais limitações impulsionaram o desenvolvimento de alternativas inovadoras, a exemplo da encapsulação do ácido úsnico em sistemas de liberação controlada, que permitem diminuir os efeitos tóxicos do composto no organismo, mantendo de forma eficaz o seu princípio ativo, e potencializando a sua aplicação terapêutica. Uma notícia bastante promissora no que se diz respeito à incorporação de novos fármacos no mercado.

(RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2006; SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2009; GRUMEZESCU *et al.*, 2014; MARTINELLI *et al.*, 2014).

A encapsulação do ácido úsnico em microesferas poliméricas, a destacar, as microesferas constituídas de poliésteres dos ácidos láctico e glicólico (PLGA), está se tornando uma alternativa bastante promissora, uma vez que apresentam estabilidade físico-química e biológica, otimizando a liberação do princípio ativo e podendo ser administradas de maneira simples, além de não serem tóxicas ao organismo (RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2004; GRUMEZESCU *et al.*, 2014).

A ampla descoberta de atividades biológicas atribuídas às substâncias de origem líquênica, como o ácido úsnico, e alguns casos de toxicidade já relatados na literatura, levam à necessidade de estudos pré-clínicos para avaliar o potencial dessas substâncias em provocar efeitos adversos sobre os organismos expostos, em especial, os efeitos decorrentes da exposição no período gestacional. Pois, de acordo com a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico dependendo das condições e período de exposição, sendo capaz de causar danos graves aos indivíduos expostos, o que leva a necessidade de conhecer as condições de uso seguro dessas substâncias para a saúde, possibilitando dessa forma a sua utilização na terapêutica (BARROS; DAVINO, 2008).

Um dos raros estudos realizados a respeito da toxicidade do ácido úsnico na sua forma em suspensão durante o período embriofetal relatou relevantes sinais de toxicidade na prole das fêmeas prenhes tratadas. Nestes ensaios foram visualizados redução na massa corpórea das fêmeas prenhes tratadas, assim como a presença de malformações na prole (SILVA, 2011, 2014).

Sabendo a importância da compreensão do comportamento de uma determinada droga em um sistema biológico, e considerando a toxicidade do ácido úsnico durante o ciclo reprodutivo, em especial, durante o período embriofetal, torna-se necessário uma investigação do seu potencial teratogênico na sua forma encapsulada em microesferas durante o período da organogênese. Uma maneira de neutralizar os seus possíveis efeitos tóxicos em um organismo em desenvolvimento.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial toxicológico de microesferas biodegradáveis de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) contendo ácido úsnico sobre a prole de ratas wistar durante o período da organogênese.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

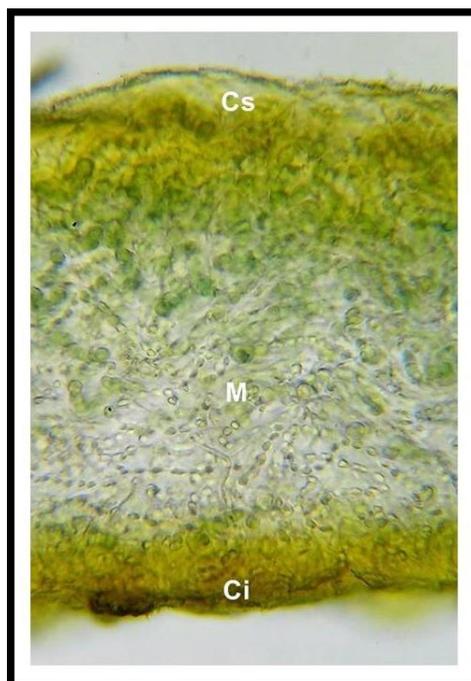
- ❖ Preparar microesferas biodegradáveis de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) contendo ácido úsnico, utilizando a técnica de emulsão múltipla A/O/A seguida de evaporação do solvente;
- ❖ Analisar o efeito do ácido úsnico encapsulado em microesferas sobre os parâmetros atribuídos às ratas prenhes (peso corporal, peso do fígado);
- ❖ Investigar o efeito do ácido úsnico encapsulado em microesferas sobre os parâmetros atribuídos à prole (peso corporal com a placenta, peso do fígado, malformações);
- ❖ Analisar alterações hepáticas nas ratas prenhes através da quantificação sorológica das enzimas transaminases, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase;
- ❖ Analisar alterações histopatológicas no fígado das ratas prenhes e dos fetos tratados com o ácido úsnico encapsulado em microesferas.

## 1.3 Revisão da Literatura

### 1.3.1 Líquens

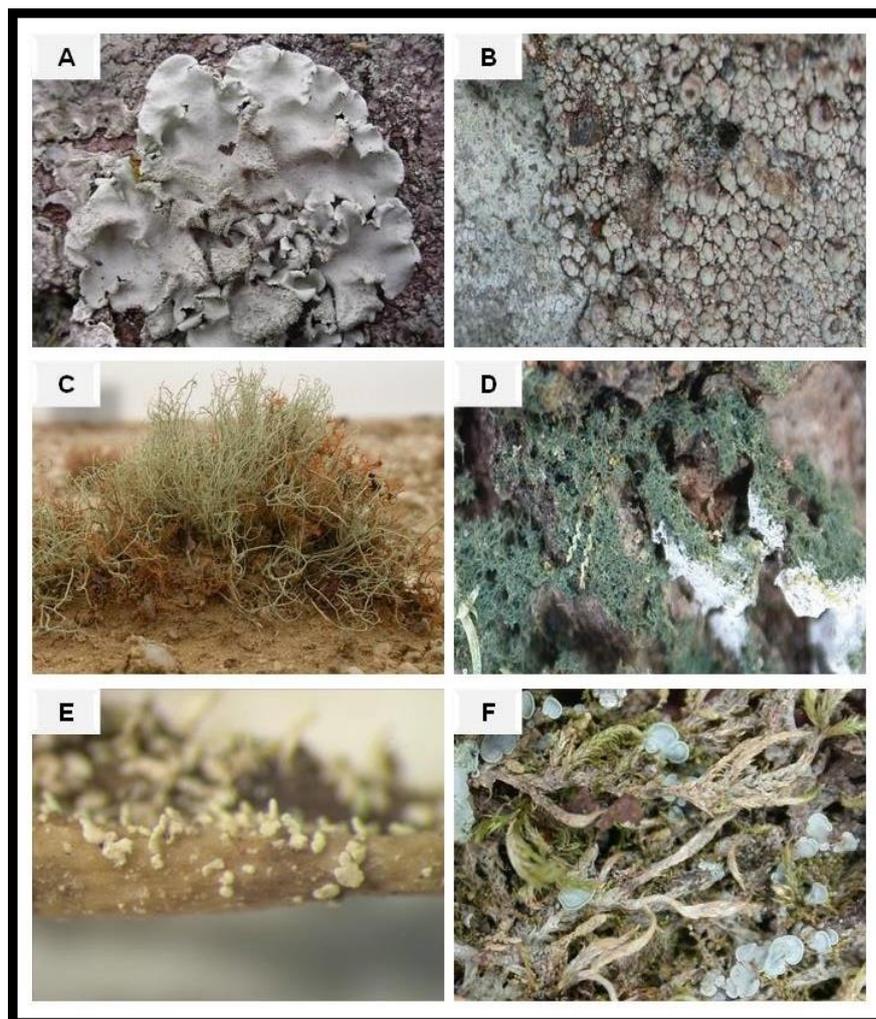
Os líquens são seres vivos muito simples resultantes de associações simbióticas entre um fungo, pertencente ao reino fungi, e uma alga ou cianobactéria, pertencentes às divisões Chlorophyta e Cyanophyta, as quais fazem parte dos reinos protista e monera, respectivamente (CARRAZONI, 2003). Estes organismos possuem características morfológicas e adaptações bastante distintas que os diferenciam dos organismos que lhes deram origem, tornando-os capazes de suportar e viver em quase todos os ambientes terrestres, habitando dos trópicos aos polos (OKSANEN, 2006; MULLER, 2001).

Nessa associação ocorre a formação de uma estrutura específica, denominada de talo liquênico (Figura 1.1), que difere da estrutura encontrada em cada um dos biontes quando se desenvolvem isoladamente. O talo liquênico é constituído principalmente pelo ser micobionte, que se distribui por meio de filamentos fúngicos (hifas), encontradas nas extremidades do córtex e medula, protegendo o fotobionte do ressecamento e luz intensa, permitindo sua sobrevivência em locais com alta incidência de luz. Já o fotobionte, é muito menos numeroso que o micobionte, e fornece vitaminas, nitrogênio e substâncias orgânicas necessárias ao desenvolvimento do fungo (COCCHIETTO *et al.*, 2002; PEREIRA, 2002; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2010).



**Figura 1.1** - Estrutura do talo líquênico. (Cs) Córtex superior; (M) Medula; (Ci) Córtex inferior. Fonte: <http://trepariscosfieldnotebook.blogspot.com.br/2014/02/anatomia-y-estructura-del-talo-liquenico.html>. Acesso em 17.12.2015

É comum classificar o talo líquênico de acordo com seu aspecto morfológico. Sendo classificados em foliosos (Figura 1.2A), crostosos (Figura 1.2B), fruticosos (Figura 1.2C), filamentosos (Figura 1.2D), dimórficos (Figura 1.2E), esquamulosos (Figura 1.2F). Os líquens do tipo foliosos, apresentam-se com talos parecidos com folhas. Os crostosos, o seu talo é semelhante a uma crosta, que se encontra fortemente aderida ao substrato. Os fruticosos têm um talo que lembra a estrutura de pequenos galhos. Os filamentosos apresentam um dos tipos mais simples de talo, formados por filamentos entrelaçados. Os dimórficos têm seus tamanhos e formatos variados, sendo encontrados em diversos tipos de substratos. Já os esquamulosos apresentam um talo parecido com minúsculas escamas (PEREIRA, 2002; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2010).



**Figura 1.2** - Classificação dos líquens. (A) folioso (*Parmotrema tinctorum*), (B) crostoso (*Haematomma fenzianum*), (C) fruticoso (*Ramalina melanothrix*), (D) filamentoso (*Dictyonema sericeum*), (E) dimórfico (*Cladonia didyma*), (F) esquamuloso (*Normandina pulchella*). Fonte: [www.tropicallichens.net](http://www.tropicallichens.net). Acesso em 17.12.2015

Os líquens são considerados importantes fontes naturais de compostos biologicamente ativos, os quais derivam de seu metabolismo primário e secundário. As substâncias produzidas pelos líquens são classificadas de acordo com sua localização no talo, em substâncias intracelulares e extracelulares. Os produtos acelulares são denominados metabólitos primários, responsáveis pela produção de aminoácidos, proteínas, glicolípídeos, carboidratos e pigmentos (clorofila, xantofila e carotenos). Os extracelulares são chamados de metabólitos secundários, ou substâncias liquênicas. Podem ser encontrados tanto na medula quanto no córtex, na forma de cristais. No talo liquênico, estas substâncias resultantes do metabolismo secundário dos líquens são responsáveis por mecanismos adaptativos no ambiente que estão inseridos,

apresentando uma infinidade de atividades biológicas quando isoladas (HONDA; VILEGAS, 1998; HUNECK, 1999; ELIX, 1996; MULLER, 2001).

As substâncias liquênicas pertencem a uma vasta gama de compostos, tais como, ácidos alifáticos, meta- e para-depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico. Até o ano de 2008, já havia cerca de 700 metabólitos secundários descritos para os líquens, e a maioria deles é exclusiva desta classe de organismos (HONDA; VILEGAS, 1998; MOLNÁR; FARKAS, 2010).

Muitos líquens possuem importância econômica, sendo utilizadas no tingimento de tecidos, produção de perfumes e cosméticos, biomonitoramento e recuperação de ambientes, e alimentação, além das diversas propriedades medicinais (HUNECK, 1999; BATTS; CALDER; BATTS, 2004).

Há séculos, desde a mesopotâmia, a *Roccella tinctoria*, uma espécie de líquen, encontrada nas Ilhas Canárias e em outros lugares, era utilizada para colorir tecidos e alimentos. Esta espécie produz um corante de cor púrpura, denominado orceína, e constituiu uma importante fonte econômica para o setor têxtil, principalmente no século XVI (BEECKEN *et al.*, 2003). Nos dias atuais, a orceína é utilizada em associação com o ácido acético para fins químicos e bioquímicos, com ampla aplicação na citogenética animal e vegetal, como um corante natural (COUTINHO, 2008).

Na antiguidade, existiram alguns usos e costumes interessantes com os líquens. No Egito antigo, por exemplo, há aproximadamente 5.000 anos atrás, a espécie *Pseudevernia furfuracea* era amplamente utilizada no processo de embalsamento de múmias (Figura 1.3), devido as suas propriedades aromáticas e conservantes (LLANO, 1951).

Espécies como *Evernia prunastri* (musgo de carvalho), *Furfuracea pseudoevernia* e *Usnea barbata* são bastante valiosas para a perfumaria francesa, comumente utilizadas como fixadores na produção de perfumes (Figura 1.4). A aplicação dos líquens na perfumaria é atualmente uma das formas mais importantes de sua utilização econômica. Além da produção de perfumes, as substâncias liquênicas também estão sendo utilizadas na fabricação de produtos cosméticos (PODTEROB, 2008; JOULAIN; TABACCHI, 2009).



**Figura 1.3** - Liquens utilizados no processo de mumificação. Fonte: [http://www.solarnavigator.net/egyptian\\_cat\\_mummies.htm](http://www.solarnavigator.net/egyptian_cat_mummies.htm). Acesso em 18.12.2015



**Figura 1.4** - Utilização dos liquens na indústria de perfumaria francesa. Perfumes franceses. Fonte: <http://www.sniffapaloozamazazine.com/ROSE.html>. Acesso em 18.12.2015

Os liquens são usados como bioindicadores de poluição, pois são capazes de absorver e acumular metais pesados e outros elementos químicos, desaparecendo em ambientes com níveis de poluição elevada (HONDA; VILEGAS, 1998; SOARES *et al.*, 2014). No Brasil, diversos estudos fazem uso destes organismos para avaliar a qualidade do ar em áreas urbanas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; MOTA FILHO *et al.*, 2007; KÄFFER; MARTINS; VARGAS, 2012). Espécies como a *Canoparmelia texana* são utilizadas para auxiliar no mapeamento de metais pesados no Brasil (SAIKI *et al.*, 2007).

Alguns povos, como os japoneses utilizam determinados liquens para alimentação; no entanto, este não é um hábito que ocorre nos demais países devido ao seu baixo conteúdo proteico, e seu sabor geralmente amargo. Durante o século XIX, os

habitantes de países como Grã-Bretanha e Rússia usavam extensivamente uma espécie de líquen, a *Cetraria islandica* (L.), para o preparo do pão. Outra espécie de líquen, conhecida por *Umbilicaria esculenta*, também é comumente utilizada como alimento na cozinha asiática (Figura 1.5) (IVANOVA; IVANOV, 2009).



**Figura 1.5** - Prato asiático com a espécie de líquen *Umbilicaria esculenta*, utilizada na alimentação. Fonte: [https://ca.wikipedia.org/wiki/Umbilicaria\\_esculenta](https://ca.wikipedia.org/wiki/Umbilicaria_esculenta). Acesso em 18.12.2015

Na medicina popular, os líquens sempre foram utilizados no tratamento de diversas doenças em várias partes do mundo. Na antiguidade, recomendava-se o uso de *Usnea barbata* como uma opção de tratamento para diversas desordens uterinas (XAVIER-FILHO *et al.*, 2006).

Alguns líquens do gênero *Parmelia* têm sido utilizados para o tratamento de diversas enfermidades na Índia. Dentre essas enfermidades, pode-se destacar: dores de cabeça, doenças de pele, infecção urinária, vômito, diarreia e lepra (TIWARI *et al.*, 2011).

A espécie *Thamnolia vermicularis* é comumente usada na China na forma medicinal para obtenção de chás, conhecido por “snow tea”, indicado para tratar hipertensão e inflamações no sistema respiratório. Sua utilização é bastante antiga entre os povos asiáticos, desde a antiguidade da medicina tradicional chinesa (WANG *et al.*, 2001; MANOJLOVIC *et al.*, 2010).

Atualmente, além da ampla utilização do uso dos líquens na medicina popular, a indústria farmacêutica, principalmente da Europa, comercializa alguns medicamentos que têm como princípio ativo substâncias extraídas de líquens. Extratos da *Usnea barbata* são comercializados na Alemanha com o nome comercial de Granobil® para dores de garganta (Figura 1.6) (FRANKOS, 2005).



**Figura 1.6** - Remédio comercializado na Alemanha, tendo como princípio ativo a *Usnea barbata*. Fonte: <http://www.dietpharm.hr/en/granobil-p419>. Acesso 19.12.2015

Outra aplicação na indústria farmacêutica europeia é a comercialização de pastilhas, denominadas Isla-Mint® (Figura 1.7) e Isla-Moos®, preparadas a partir de extratos obtidos da *Cetraria islandica*. Usadas para tratar doenças do trato respiratório superior (HECKER; VOLP, 2004). Além dessas pastilhas, outros medicamentos são feitos a partir da *Cetraria islandica*, como por exemplo, os xaropes expectorantes de nomes comerciais Pulmobronquiol Plus® e Tannenblut N® (Figura 1.8).



**Figura 1.7** - Pastilhas Isla-Mint® comercializadas na Europa à base de *Cetraria islandica*. Fonte: <http://alpenpharma.ua/en/products/isla-mint-isla-moos-21>. Acesso em 19.12.2015



**Figura 1.8** - Xarope à base de *Cetraria islandica*, de nome comercial Tannenblut N®.

Fonte: <http://www.vitalsil.pt/?goods=tannenblut-n>. Acesso em 19.12.2015

Importantes propriedades biológicas são atribuídas às substâncias liquênicas. Diversos estudos relatam ação analgésica (BUGNI *et al.*, 2009), antibacteriana (SEGATORE *et al.*, 2012), antiviral (SOKOLOV *et al.*, 2012), antiproliferativa (CAMPANELLA *et al.*, 2000), anti-inflamatória (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2000), antitumoral (EINARSDÓTTIR *et al.*, 2010), antifúngica (SOKOLOV *et al.*, 2012), e antioxidante (RANKOVIC; KOSANIC; STANOJKOVIC, 2011) de vários extratos obtidos de líquens.

Algumas substâncias liquênicas são consideradas completamente livres de toxicidade, como é o caso da atranorina que apresenta excelente atividade anti-inflamatória (MAIA *et al.*, 2002). Já outras, como o ácido fumarprotocetrárico, apresentam uma média toxicidade, e grande eficácia contra células tumorais (SANTOS *et al.*, 1997). E existem ainda aquelas que apresentam excelente atividade biológica, mas são insolúveis em água e consideradas tóxicas para a sua aplicação na terapêutica, como o ácido úsnico (CARVALHO *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito antitumoral de alguns compostos extraídos de várias espécies de líquens. Backorová *et al.* (2011) avaliaram o efeito de quatro tipos de metabólitos secundários liquênicos, (parietina, ácido úsnico, ácido girofórico e atranorina) contra diversas linhagens de células cancerígenas. Todos os compostos tiveram um efeito positivo nas linhagens analisadas; no entanto, o ácido úsnico, bem como a atranorina, foram os compostos mais efetivos contra as células cancerígenas.

O ácido barbático, extraído da espécie *Cladia aggregata*, foi testado frente a quatro linhagens multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Os resultados

demonstraram uma excelente eficácia antibacteriana, capaz de inibir a proliferação das quatro linhagens estudadas (MARTINS *et al.*, 2010).

Estudos realizados por Vijayakumar *et al.* (2000), a respeito da ação anti-inflamatória do ácido úsnico em ratos wistar com edema de pata, revelaram uma redução significativa no edema utilizando uma dosagem de 100 mg/kg de peso corpóreo, quando comparado com o fármaco padrão (ibuprofeno), referência no mercado.

Ari *et al.* (2014) testaram a ação antiproliferativa do extrato metanólico, obtido da espécie *Hypogymnia physodes*, durante 72 horas, frente a duas linhas celulares de câncer de mama humano: (MCF-7) e (MDA-MB-231). O extrato obtido foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular das linhagens analisadas nas concentrações (25-100 µg/mL). Esta citotoxicidade induzida em uma dosagem relativamente baixa é uma propriedade bastante favorável para um agente anticancerígeno.

O extrato bruto, metanólico e acetônico de algumas espécies de líquens, tais como: (*Cladonia furcata*, *Physodes Hypogymnia*, *Lasallia pustulata*, *Parmelia caperata* e *Parmelia sulcata*) foram testados por Kosanić, Ranković e Vukojević (2011) para avaliar sua atividade antioxidante. Os extratos dos líquens testados demonstraram uma forte atividade antioxidante contra vários sistemas de oxidação *in vitro* a depender do método de extração utilizado. Dentre as espécies testadas, a *Lasallia pustulata* teve uma poderosa atividade antioxidante, sendo considerada uma ótima fonte de antioxidante natural.

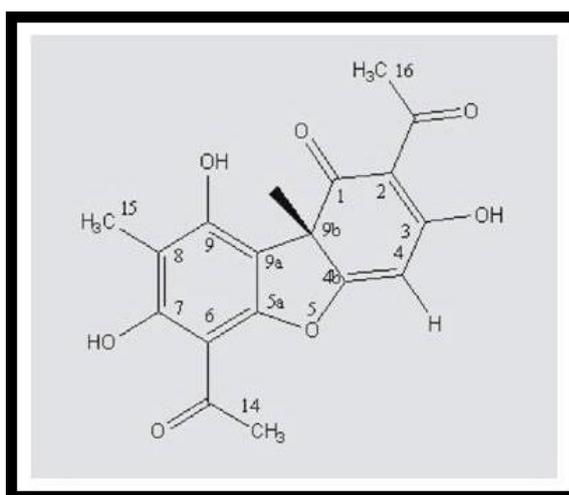
Recente ensaio realizado por Basile *et al.* (2015) com o parietin, metabólito secundário extraído do líquen *Xanthoria parietina*, avaliou sua atividade antimicrobiana contra três espécies fúngicas (*Candida albicans*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*). O metabólito secundário avaliado se mostrou ativo contra as três espécies analisadas; no entanto, a espécie *Rhizoctonia solani* foi a mais sensível, com uma concentração mínima inibitória de 31,3 µg/mL.

## 1.3.2 Ácido Úsnico

### 1.3.2.1 Propriedades físico-químicas do ácido úsnico

O ácido úsnico é uma substância química de origem natural resultante do metabolismo secundário de diversas espécies de líquens. Pode ser isolado de vários gêneros, tais como, *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae), *Parmelia* (Parmeliaceae) e outros gêneros de líquens (INGLÓLFSDÓTTIR, 2002). Foi isolado pela primeira vez da espécie *Cetraria islandica* (L) Ach, pelo pesquisador Pfaff, no ano de 1826. É um composto cristalino de cor amarela, um derivado do dibenzofurano que possui o seguinte nome químico: [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9 $\alpha$ / $\beta$ H)-dibenzofurandiona; C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>] (Figura 1), (COCCHIETTO *et al.*, 2002). Caracteriza-se por ser uma substância de baixa solubilidade em água (10 mg/100 mL a 25 °C) e solúvel em solventes orgânicos, tais como: dimetilsulfóxido, acetona, clorofórmio, metanol, acetato de etila e diclorometano, com um ponto de fusão em torno de 204 °C, peso molecular de 344,32, e uma DL<sub>50</sub> em camundongos de inoculação intravenosa de 25mg/kg (BUSTINZA, 1951; MERCK INDEX, 1989; INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Ocorre na natureza em duas formas enantioméricas (-) e (+), que indica uma projeção angular do grupamento metil localizado na posição 9b, apresentando diversas atividades biológicas e mecanismos de ação distintos a depender da forma enantiomérica (INGÓLFSDÓTTIR, 2002; COCCHIETTO *et al.*, 2002; SOKOLOV; LUZINA; SALAKHUTDINOV, 2012).



**Figura 1.9** - Estrutura química do ácido úsnico. Fonte: (SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2008).

### 1.3.2.2 Atividades biológicas atribuídas ao ácido úsnico

### 1.3.2.2.1 Atividade Antimicrobiana

O ácido úsnico foi inicialmente utilizado para o tratamento de tuberculose pulmonar (PLICHET, 1955). As primeiras avaliações sobre sua ação antibacteriana datam da década de 1950. Nestes últimos anos, inúmeras investigações têm ampliado o conhecimento desse metabólito liquênico como antibiótico, provavelmente devido ao aumento da incidência de resistência causada pelo uso intensivo de antibióticos (COCCHIETTO *et al.*, 2002).

De acordo com o trabalho de Francolini *et al.* (2004), o isômero (+) do ácido úsnico modificou e inibiu a formação de biofilmes constituídos por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em superfícies poliméricas.

Pesquisas realizadas por Honda *et al.* (2010) com 26 compostos liquênicos demonstraram que o ácido úsnico apresentou atividade antimicrobiana frente a *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, e os resultados foram bastantes significativos com uma concentração inibitória mínima (MIC) de 62.5 µg mL-182 µM mL, quando comparado com o padrão (HONDA *et al.*, 2010).

A atividade antimicrobiana do ácido úsnico foi testada contra cepas de *Staphylococcus aureus* juntamente com cinco antibióticos referências em tratamento (gentamicina, levofloxacina, oxacilina, clindamicina e eritromicina). A Combinação com a gentamicina, clindamicina, oxacilina e eritromicina desencadeou em uma ação sinérgica, em contrapartida, foi observado um efeito antagônico com a levofloxacina. Estes resultados confirmam mais uma vez a atividade antimicrobiana relatada para o ácido úsnico na literatura. Sugerindo ser um bom candidato para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos ou novas combinações de medicamentos para quimioterapia (SEGATORE *et.al.*, 2012).

Pompilio *et al.* (2013) avaliaram *in vitro* a atividade antiestafilocócica do ácido úsnico contra três cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina, isoladas de pacientes com fibrose cística. O ácido úsnico apresentou-se com uma alta atividade contra todos os isolados em uma MIC variando de (2-8 µg/mL). Sugerindo que o composto estudado é ativo em concentrações que são significativamente mais baixas do que aquelas que causam efeitos colaterais em animais, sendo considerado um potente agente terapêutico a ser utilizado com um antibiótico.

### 1.3.2.2.2 Atividade Antitumoral

Morris Kupchan e Kopperman (1975) foram os primeiros a investigar sua atividade antitumoral com o carcinoma pulmonar de Lewis em ratos. A partir daí, vários estudos com o ácido úsnico foram desenvolvidos. Recentemente Singl *et al.* (2013), estudaram a eficácia e os mecanismos do ácido úsnico em células A559 (NSCLC) humanas, demonstrando uma forte atividade contra as células cancerígenas do pulmão

Em estudos da atividade antitumoral *in vivo* frente ao tumor experimental sarcoma-180, observou-se uma inibição de 43% do tumor logo após sua administração em suspensão na região intraperitoneal, em camundongos Swiss (SANTOS *et al.*, 2006).

O ácido úsnico e seus derivados foram testados para citotoxicidade contra cinco linhagens diferentes de células cancerígenas humanas: leucemia linfocítica (L-1210), leucemia mieloide crônica (K-562), adenocarcinoma da mama (MCF-7), metástase cerebral do carcinoma da próstata (DU145) e glioblastoma (U251). O derivado 1,8-diaminooctano foi o mais ativo, exibindo atividades semelhantes em todas as linhas celulares estudados, induzindo apoptose. Quatro derivados de poliaminas mostram citotoxicidade significativa nas células L-1210, com uma concentração média inibitória significativamente menor do que o composto original. Este estudo demonstra que a citotoxicidade do ácido úsnico pode ser melhorada pela sua conjugação a uma cadeia de poliamina (BAZIN *et al.*, 2008).

Burlando *et al.* (2009) testaram cinco metabólitos liquênicos: ácido úsnico (*Xanthoparmelia somloensis*), ácido salazinico (*Xanthoparmelia somloensis*), ácido vulpinico (*Letharia vulpina*), ácido girofórico (*Lasallia pustulata*) e ácido evérnico (*Evernia prunastri*) contra as seguintes células cancerígenas: queratinócitos (HaCaT), carcinoma da vagina (A431) e células de mesotelioma maligno (MM98). O ácido úsnico apresentou uma alta citotoxicidade para todas as três linhas celulares, enquanto que os ácidos salzinico, girofórico e evérnico apresentaram-se com uma baixa citotoxicidade.

Sua ação sobre a formação e/ou estabilização dos microtúbulos, que são alvos nos tratamentos quimioterápicos devido ao seu importante papel na divisão celular, foi verificada por O'Neill *et al.* (2010). Células cancerígenas de mama (MCF-7) e de câncer de pulmão (H1299) foram tratadas por 24 horas com 29  $\mu$ M de ácido úsnico, e comparadas com fármacos de referência no tratamento de câncer, a vincristina (que impede a formação de microtúbulos) e o taxol (que estabiliza microtúbulos). Os resultados obtidos sugerem que o mecanismo anticâncer desencadeada pela ação do ácido úsnico, não está relacionada a alterações na formação e/ou estabilização de

microtúbulos nas células MCF-7 e H1299. São necessários mais estudos que avaliem os mecanismos envolvidos na sua atividade anticancerígena.

No ano de 2012 foi estudada a capacidade do ácido úsnico em inibir a angiogênese tumoral *in vivo*, em um modelo de membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM). Neste mesmo estudo também avaliou o tumor de mama humano, BCAP-3, em que mais uma vez foi possível constatar a sua atividade antitumoral (SONG *et al.*, 2012).

Brisdelli *et al.* (2013) avaliaram o efeito de seis metabólitos (ácidos difractáico, lobárico, úsnico, vicanicina, variolárico e ácido protoliquesterínico) sobre a proliferação celular, viabilidade e espécies reativas de oxigênio para três linhagens diferentes de células cancerígenas humanas, MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HeLa (adenocarcinoma colo do útero) e HCT-116 (carcinoma do cólon). Neste estudo comparativo, os metabólitos liquênicos mostraram vários efeitos citotóxicos dependentes da concentração, tendo o ácido úsnico como o mais potente agente citotóxico em menor concentração.

#### 1.3.2.2.3 Atividade Antiviral

Os efeitos citopáticos do Vírus Herpes simples foram inibidos *in vitro* quando células de rins de macaco infectadas foram tratadas com ácido úsnico nas concentrações de 1 a 5 µg por disco (PERRY *et al.*, 1999).

Em um estudo clínico, realizado por Scirpa *et al.* (1999) observaram o efeito de uma formulação vaginal contendo ácido úsnico e o sulfato de zinco em 100 pacientes do sexo feminino infectadas com o vírus do papiloma humano (HPV). As pacientes tratadas com a formulação vaginal apresentaram resultados favoráveis, tanto na re-epitelização das lesões, quanto na recorrência de infecção ao longo de um período de seis meses.

O ácido úsnico foi testado para avaliar o seu efeito na inibição da replicação do DNA do poliomavírus em ratos. O qual foi capaz de inibir a replicação do DNA, tanto após a transfecção, quanto na infecção, mesmo em uma concentração de 5 µg/mL, inibindo severamente na presença de 10 µg/mL de ácido úsnico (CAMPANELLA *et al.*, 2002).

O ácido úsnico e seus derivados foram analisados contra o vírus da pandemia de gripe A (H1N1) para determinação da citotoxicidade e atividade antiviral. Foram testados um total de 26 compostos que representaram os isômeros (+) e (-) do ácido úsnico. De acordo com os resultados, onze derivados do ácido úsnico apresentaram atividade

antiviral, e o isômero (-) foi mais ativo em comparação com o isômero (+) (SOKOLOV, *et al.*, 2012).

Shtro *et al.* (2014) demonstraram mais uma vez que os derivados do ácido úsnico são eficientes contra o vírus da gripe (H1N1). A atividade antiviral pode ser aumentada por introdução de porções laterais na molécula de ácido úsnico. Neste estudo o isômero (-) foi quatro vezes mais eficiente do que o seu isômero (+), o que corrobora para a sua eficiência como substância antigripe.

#### 1.3.2.2.4 Atividade Anti-inflamatória

Os seus efeitos analgésicos foram avaliadas oralmente em ratos wistar com edema de cauda. Levando a uma diminuição do edema de cauda dos animais tratados com o ácido úsnico em comparação com os do grupo controle (OKUYAMA *et al.*, 1995).

Vijayakumar *et al.* (2002) verificaram que o ácido úsnico isolado do líquen *Roccella montagnei* apresenta atividade anti-inflamatória em dose dependente quando testado em modelos animais na forma aguda e crônica. Essa ação do composto pode estar envolvida na inibição da síntese de prostaglandinas, de forma semelhante aos fármacos anti-inflamatórios não-esteroides.

Zheng e Tao (2011) descobriram que o ácido úsnico age contra a atividade de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, levando a uma redução da excreção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e interleucinas (IL-6 IL-1 $\beta$ ).

Su *et al.* (2014) estudaram sua ação anti-inflamatória por meio do edema pulmonar agudo. E evidenciaram uma diminuição no número de células inflamatórias do pulmão, causando uma inibição nos níveis de interleucinas (IL-6, IL-8) e (TNF $\alpha$ ), conhecidos como mediadores pró-inflamatórios. Enquanto isso foi observado um aumento do nível da interleucina (IL-10), um mediador anti-inflamatório.

#### 1.3.2.2.5 Atividade Antioxidante

Odabasoglu *et al.* (2006) observaram em seus estudos que o ácido úsnico exibe um efeito antioxidante, quando usado como terapia no tratamento de úlceras gástricas em modelo animal. Induzindo uma inibição significativa da formação de espécies reativas

de oxigênio e peroxidação lipídica, como também um aumento da atividade das enzimas antioxidantes: glutathione peroxidase e superóxido dismutase.

Kohlhardt-Floehr *et al.* (2010) investigaram o potencial antioxidante do ácido úsnico utilizando linfócitos humano submetidos à radiação ultravioleta, e constataram que as células tiveram uma sobrevivência superior, mantendo suas atividades metabólicas no padrão da normalidade em comparação com as do grupo controle.

O ácido úsnico extraído do líquen *Toninia candida* mostrou ter uma atividade antioxidante *in vitro* bastante elevada contra o radical ânion superóxido em uma concentração de 197.28 µg/mL (RANKOVIĆ *et al.*, 2012).

Recentes ensaios realizados indicam que o ácido úsnico apresenta um potencial redox ativo variável, podendo atuar como um agente antioxidante ou pro-oxidante, de acordo com as diferentes condições de sistema e/ou de ambiente celular a qual é submetido (RABELO *et al.*, 2012).

O potencial antioxidante do ácido úsnico extraído de *Ramalina roesleri* foi avaliado utilizando o método do sequestro do radical livre estável: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os resultados demonstraram que o composto foi capaz de reduzir os radicais livres na concentração de 396.47 µg mL<sup>-1</sup> (SISODIA; VERMA; RANI, 2013).

O mecanismo de interação molecular e ação antioxidante do ácido úsnico sobre as membranas celulares de eritrócitos humanos foram investigados por meio de fosfolípidios sintéticos: Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE) submetidos à ação oxidante do ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>). Os resultados mostraram que o ácido úsnico neutraliza a capacidade oxidativa do (HClO<sub>4</sub>) sobre DMPC e DMPE, protegendo os eritrócitos humanos dos efeitos deletérios causados em decorrência da oxidação induzida. (SUWALSKY *et al.*, 2015).

#### 1.3.2.2.6 Atividade Cicatrizante

Os efeitos do usnato de sódio (forma comercializada do ácido úsnico) sobre a proliferação de fibroblastos e cicatrização da pele foram estudados por Jin, Dong, He (2005). O usnato de sódio acelera o processo de cicatrização de feridas cutâneas em modelos animais, com uma taxa de cicatrização maior do que a do grupo de controle. No entanto, o processo cicatrizante não parece estar envolvido na estimulação e proliferação dos fibroblastos.

Biofilmes à base de colágeno contendo ácido úsnico incorporado em lipossomas foram identificados como uma ótima alternativa para o tratamento de queimaduras dérmicas de segundo grau. 21 dias após o tratamento observou-se uma rápida substituição dos colágenos (tipos III e I), demonstrando a eficiência do composto incorporado no processo de regeneração e cicatrização tecidual (NUNES *et al.*, 2011).

Ensaio *in vitro* e *in vivo* realizados por Bruno *et al.* (2013) avaliaram as propriedades cicatrizantes do ácido úsnico. Os compostos apresentaram um alto desempenho no tratamento de feridas, estimulando o fechamento das monocamadas de queratinócitos na região lesionada, sugerindo seu possível uso incorporado à fármacos cicatrizantes.

#### 1.3.2.2.7 Atividade Antifúngica

As propriedades antifúngicas do ácido úsnico e do usnato de sódio (derivado do ácido úsnico) foram descritas pela primeira vez por Lachiondo (1950).

Sua atividade antifúngica tem sido atribuída ao isômero (-) do ácido úsnico contra alguns frequentes gêneros de fitopatógenos, tais como: *Penicillium* e *Verticillium* (BROKSA *et al.*, 1996).

Os isômeros (-) e (+) do ácido úsnico foram investigados contra oito espécies de fungos fitopatogênicos: *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Stagonospora nodorum* e *Ustilago maydis*. A inibição do crescimento foi fortemente observada para as espécies, *Pythium ultimum* e *U. maydis* em exposição ao isômero (-) em comparação com isômero (+) (HALAMA; VAN HALUWIN, 2004).

Nithyanand *et al.* (2015) verificou a sensibilidade de biofilmes formados por *Candida albicans* frente ao ácido úsnico, o qual é a causa mais frequente de infecções associadas a cateteres, e apresenta grande resistência a antifúngicos. Os resultados revelaram uma redução significativa na viabilidade das células metabolicamente ativas formadoras dos biofilmes, com uma inibição de 65%.

#### 1.3.2.2.8 Atividade Moluscicida, Larvicida e Inseticida

Martins (2013) investigou a atividade moluscicida do usnato de potássio, o qual é sintetizado a partir do ácido úsnico, em *Biomphalaria glabrata* e seus embriões. O usnato de potássio matou 100% dos embriões dos caracóis em uma concentração de 10 ppm. A substância estudada também foi ativa contra os indivíduos adultos de *B. glabrata*.

Os efeitos inseticidas dos enantiômeros (-) e (+) do ácido úsnico contra as larvas de *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) foram testados por Cetin *et al.* (2008). Os bioensaios com os enantiômeros (-) e (+) revelaram que os valores de CL<sub>50</sub> foram iguais a 0,8 e 0,9 ppm, respectivamente. Os resultados sugerem que esses compostos poderiam ser utilizados na procura de novos inseticidas.

*Xyleborus fornicatus* (eichh) é considerado uma das maiores pragas da espécie *Camellia sinensis*, popularmente conhecida como chá da Índia. A atividade inseticida do ácido úsnico foi testada frente a vários estágios do ciclo de vida do *X. fornicatus* (ovos, larvas, indivíduos imaturos e indivíduos adultos). O número de indivíduos adultos (machos e fêmeas) que sobreviveram a exposição de 75 e 100 ppm de ácido úsnico foram de 16 e 7, respectivamente. Números relativamente baixos em comparação com o controle. Aos 75 e 100 ppm, apenas 10 e 4 animais adultos, respectivamente, conseguiram produzir descendentes (SAHIB *et al.*, 2008).

O ácido úsnico foi avaliado contra o mosquito da dengue, o *Aedes aegypti*, exibindo uma CL<sub>50</sub> de 6.61 (6.16-7.06 ppm) após 24 horas, demonstrando sua eficácia contra o mosquito transmissor. No entanto, nesta concentração avaliada, o mesmo mostrou-se ser tóxico para outros animais invertebrados nos ecossistemas (BOMFIM *et al.*, 2009).

Quatro metabólitos secundários foram estudados (ácido úsnico, atranorina, ácido 3-hydroxyphysodic e ácido girofórico) contra larvas do mosquito *Culiseta longiareolata*. Todos os metabólitos tiveram uma alta atividade larvicida. Os valores da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> para o ácido úsnico foram iguais a 0,48 ppm e 1,54 ppm, respectivamente (CETIN *et al.*, 2012).

Pela primeira vez, *Alabama argillacea* e o seu predador, *Podisus nigrispinus* foram tratados topicamente com 0,5 µL de ácido úsnico purificado. Os resultados mostraram uma redução na sobrevivência do *A. argillacea* a valores inferiores a 50% (MARTINS, 2013).

### 1.3.2.3 Mecanismo de ação e toxicologia do ácido úsnico

Apesar das variadas atividades biológicas atribuídas ao ácido úsnico, a sua aplicação terapêutica é bastante limitada devido as suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, como baixa solubilidade em água e nos líquidos biológicos, toxicidade e difícil interação com as barreiras biológicas (KRISTMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação do ácido úsnico não está completamente elucidado na literatura. Alguns estudos relacionam o seu mecanismo de ação envolvido como um desacoplador da cadeia transportadora de elétrons, afetando a função mitocondrial e a respiração celular. Pramyothin *et al.* (2004) constataram que o enantiômero (+) do ácido úsnico age alterando a integridade da membrana celular, liberando enzimas hepatoespecíficas, principalmente as transaminases (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase), causando uma destruição da função mitocondrial, e perda no controle da respiração celular e síntese de ATP. Um efeito similar ao que acontece com o tetracloreto de carbono, envolvendo a geração aumentada de radicais livres, que resulta na injúria da membrana celular, mitocondrial, peroxidação lipídica e morte celular.

O desacoplamento da fosforilação oxidativa pode ser avaliado através da diminuição na quantidade de difosfato de adenosina (ADP). Em um estudo utilizando mitocôndrias do fígado de ratos foi relatado que o ácido úsnico a uma concentração tão baixa, quanto 0,75  $\mu\text{M}$ , é capaz de inibir 50% da proporção de difosfato de adenosina (ADP). Em concentrações mais elevadas observou-se o completo desacoplamento da fosforilação oxidativa (ABO-KHATWA *et al.*, 1996).

Os estudos de Han *et al.* (2004) corroboram que o ácido úsnico inibe a função mitocondrial, levando ao aumento da produção de oxigênio reativo e estresse oxidativo nas células, causando redução nos níveis de ATP e morte celular. Culturas de hepatócitos tratadas com 5  $\mu\text{M}$  de ácido úsnico resultou em efeitos hepatotóxicos severos, com 98% de necrose em um período de 16 horas.

Nos Estados Unidos o ácido úsnico foi comercializado fazendo parte de um dos ingredientes de suplementos alimentares para a redução de peso (Lipokinetix®). O Lipokinetix® era um produto de multicomponentes. A cápsula continha 25 mg de cloridrato de norefedrina, 100 mg de ácido úsnico, 100 mg de 3,5 Diiodo-L-Tironina, 3 mg de cloridrato de ioimbina, e 100 mg de cafeína. Existem evidências de que o composto atua como um desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial. O consumo da droga leva a hepatotoxicidade grave dependendo da quantidade de cápsulas ingeridas. Algumas pessoas que consumiram este suplemento alimentar desenvolveram insuficiência hepática, sendo necessário o transplante do órgão (FAVREAU *et al.*, 2002).

O UCP-1 (BDC Nutrição, Richmond, KY) também foi comercializado para induzir a perda de peso. A dosagem recomendada era de três cápsulas, três vezes ao dia, contendo 150 mg de ácido úsnico, 525 mg de carnitina e 1050 mg de piruvato de cálcio. O consumo levou ao desenvolvimento de graves relatos de insuficiência hepática em dois pacientes (SANCHEZ *et al.*, 2006).

As lesões hepáticas decorrentes da exposição ao ácido úsnico estão relacionadas com o desacoplamento e inibição da fosforilação oxidativa, aumento do estresse oxidativo, peroxidação lipídica e depleção de glutathiona (GSH) (JOSEPH *et al.*, 2009).

Sahu *et al.* (2012) demonstram a toxicidade do ácido úsnico em células HepG2 (hepatoblastoma), sugerindo um mecanismo oxidativo de ação. A exposição ao ácido úsnico resultou em aumento do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial nas células tratadas. Também se observou uma significativa diminuição na regulação de dois genes (CYP7A1 e CYP2E1) associados com stress metabólico oxidativo, metabolismo e ativação de muitos substratos toxicológicos.

O seu mecanismo de ação em células humanas HepG2 aumentou a atividade da caspase-3/7, proteína que desempenha um papel central na fase de execução da apoptose celular (CHEN *et al.* 2014).

15 mg/kg de ácido úsnico administrado durante 15 dias em camundongos swiss machos, induziu um quadro de hepatotoxicidade nos animais expostos, o qual está diretamente relacionado a um aumento das espécies reativas de oxigênio e inibição da função mitocondrial. Uma queda nos níveis de ATP celular também foi detectada após tratamento com ácido úsnico, confirmando a perturbação na bioenergética mitocondrial (SANTOS *et al.*, 2006).

Recentes investigações do seu potencial toxicológico em neonatos expostos durante o período da organogênese revelaram alterações histológicas no fígado dos fetos expostos. Os animais tratados nas dosagens de 15mg/kg e 25mg/kg revelaram uma redução no número de megacariócitos, alterando o processo de formação dessas células, e conseqüentemente provocando uma deficiência na cascata da coagulação inicial do organismo. Um aumento no número de hepatócitos foi observado para a dose de 25mg/kg. Estes resultados demonstram a toxicidade induzida pelo ácido úsnico durante a organogênese, na qual a dose considerada mais tóxica foi a de 25 mg/kg (SILVA, 2014).

A expressão das proteínas (heatshock protein 60 (HSP60), peroxiredoxin-4 (prx4) e endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29) associadas com o stress oxidativo, metabolismo lipídico, e várias outras vias moleculares, apresentaram-se alteradas nos animais tratados com o ácido úsnico, de acordo com os estudos realizados por Liu *et al.*

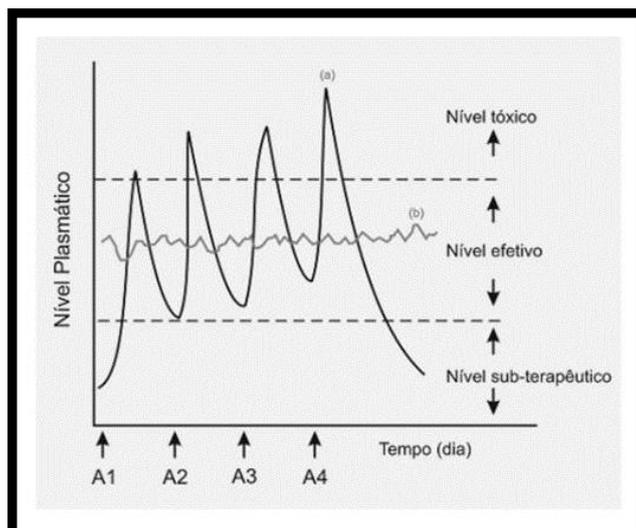
(2012). Estes resultados sugerem que os alvos primários da hepatotoxicidade causada pelo ácido úsnico sejam o retículo endoplasmático e as mitocôndrias.

### 1.3.3 Sistemas de Liberação Controlada

A toxicidade das substâncias liquênicas que apresentam comprovada eficiência terapêutica, é um dos problemas a serem resolvidos a partir do uso de novas formas de administração que possam melhorar a sua biodisponibilidade e diminuir os seus efeitos tóxicos (RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2004).

Os sistemas de liberação controlada são sistemas desenvolvidos para modificar a liberação de fármacos. São definidos como aqueles sistemas nos quais o agente ativo é liberado de forma contínua e prolongada. Apresentam inúmeras vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais, tais como: liberação progressiva do fármaco; direcionamento a alvos específicos; proteção do princípio ativo; aumento da biodisponibilidade; redução do número de doses e quantidade do fármaco administrado, assim como a manutenção da concentração constante do princípio ativo no plasma dentro de sua faixa terapêutica; diminuição de efeitos colaterais; e redução dos custos na saúde (BRANNON-PEPPAS, 1995; FREIBERG e ZHU, 2004; BARROCAS *et al.*, 2007; PEZINNI, 2007).

Em um sistema de liberação convencional, os níveis plasmáticos do princípio ativo podem aumentar além do necessário atingindo níveis tóxicos, e diminuir rapidamente à medida que o fármaco é metabolizado, caindo em um rápido período de tempo para níveis abaixo do terapêutico (Figura 1.10). O controle da concentração terapêutica é um mecanismo importante, pois diminui significativamente a toxicidade (PETITTI *et al.*, 2008).



**Figura 1.10** - Comparação das variações de concentrações do princípio ativo administrado em formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada. Administração convencional (a), administração por meio de sistemas liberação controlada (b), Aplicação do fármaco (A1, A2, A3, A4). Fonte: (LYRA *et al.*, 2007).

Para proporcionar uma liberação lenta e dentro da faixa terapêutica, o princípio ativo encontra-se ligado a um transportador, ou seja, um carreador, o qual é o grande responsável por controlar as características físico-químicas desfavoráveis do fármaco. A composição dos carreadores é de natureza muito variada (lipídica, inorgânica e polimérica), dentre estes, o de natureza polimérica são os mais investigados e utilizados. Os carreadores devem ser escolhidos com base nas características físico-químicas do fármaco e via de administração. Entre os principais carreadores utilizados atualmente, destacam-se os lipossomas, as ciclodextrinas e as microesferas (LOPES; LOBO; COSTA, 2003; PETITTI *et al.*, 2008).

A eficiência dos sistemas de liberação controlada depende da escolha do material a ser utilizado na confecção dos carreadores. Entre as várias opções, os materiais poliméricos são a classe de materiais mais investigados para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, devido a sua boa estabilidade físico-química e biológica, e a ampla variedade de polímeros existentes: naturais, sintéticos ou semi-sintéticos (VILANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Os polímeros são amplamente utilizados na indústria farmacêutica para a entrega de agentes terapêuticos, tais como, proteínas macromoleculares, peptídeos, vacinas, genes, antígenos, fatores de crescimento, dentre outros, pelo fato de permitirem uma

liberação lenta e gradual do agente ativo, direcionando a alvos específicos no organismo (tecido ou órgão) (LOPES; LOBO; COSTA, 2003; MUNDARGI *et al.*, 2008).

Existe uma grande quantidade de polímeros naturais, os quais são biodegradáveis, que podem ser utilizados como carreadores, destacando-se a albumina, os alginatos, a celulose, o amido e a quitosana. No entanto, existe um problema acerca do uso de polímeros naturais devido ao fato deles frequentemente levarem muito tempo para serem degradados, retardando a liberação do fármaco no organismo, além de incompatibilidade com alguns constituintes das formulações (HANS; LOWMAN, 2002; SEVERINO *et al.*, 2011).

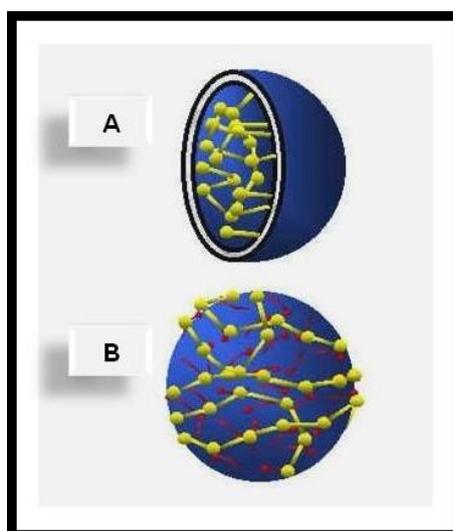
Atualmente, preferem-se o uso de polímeros sintéticos biodegradáveis pela facilidade de modificação de sua característica química, biocompatibilidade e diminuição dos efeitos tóxicos. Dentre os polímeros sintéticos mais comumente utilizados, destacam-se: os ácidos poliamino, poliamidas, poliacrilamidas, poliésteres, poliortoésteres e poliuretanos (JAIN, 2000).

Por sofrerem biodegradação em meio biológico, os poliésteres alifáticos são os polímeros sintéticos mais explorados nos sistemas de liberação controlada. Representados pelos poli(ácido láctico) PLA, poli(ácido glicólico) PGA, poli(caprolactona) (PCL) e copolímeros dos ácidos láctico e glicólico (PLGA). Os copolímeros dos ácidos láctico e glicólico (PLGA) merecem uma atenção especial, levam um reduzido tempo para a sua completa degradação *in vivo* a subprodutos atóxicos (ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água), diminuindo as reações adversas decorrentes de fragmentos de degradação de longo período, desaparecendo logo depois de cumprir sua função, sem a necessidade de intervenções cirúrgicas para sua retirada (KOTWA *et al.*, 2007; VILANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; SEVERINO *et al.*, 2011). A utilização desse polímero em sistemas de liberação controlada já é aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) com comprovada segurança para uso em humanos (SOARES *et al.*, 2005).

Os sistemas de liberação controlada preparados a partir de materiais poliméricos são classificados de acordo com o mecanismo de ação envolvido na liberação do fármaco. Os sistemas controlados por difusão são os mais comumente utilizados. Encontram-se divididos em dois tipos: sistemas reservatórios: no qual o princípio ativo encontra-se aprisionado no interior de uma barreira de difusão inerte, como exemplo: os lipossomas, nanocápsulas, fibras ocas e microcápsulas (Figura 1.11A); e sistemas matriciais ou monolíticos: o princípio ativo encontra-se homoganeamente disperso ou dissolvido na matriz polimérica inerte, tais como: nanosferas e microesferas (Figura

1.11B). A quantidade de fármaco liberado dependerá da solubilidade, área, espessura e porosidade da membrana polimérica utilizada. (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; VILANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; COIMBRA, 2010).

Os sistemas matriciais é uma opção bastante empregada na liberação controlada de fármacos, oferecendo várias vantagens em relação aos demais sistemas: baixo custo, eficácia na administração, versatilidade, e ainda permite a incorporação de quantidades relativamente elevadas de fármacos. (CHIEN; LIN, 2002; FIALHO *et al.*, 2003; LOPES; LOBO; COSTA, 2003).



**Figura 1.11** - Representação esquemática dos sistemas de reservatórios e sistemas matriciais: (A) microcápsula (sistema reservatório) e (B) microesfera (sistema matricial).

Fonte: <http://www.nanoparticles.org/links/Nanosphere.jpg>. Acesso em 30.12.2015

### 1.3.3.1 Microesferas

Microesferas são pequenas partículas sólidas e esféricas com tamanhos micrométricos, designadas como micropartículas porosas que promovem a liberação controlada do agente ativo (fármaco). São constituídas de um sistema de matriz polimérica (natural ou sintética) contendo o fármaco uniformemente distribuído. (JAIN *et al.*, 2000).

A utilização de microesferas poliméricas biodegradáveis estão se tornando um importante meio de liberação de agentes terapêuticos, já que as microesferas oferecem uma administração fácil e não invasiva, protegendo o princípio ativo encapsulado

(FREIBERG e ZHU, 2004; BERKLAND *et al.*, 2004; RIBEIRO-COSTA *et al.* 2009). Segundo Ribeiro-Costa *et al.* (2004) o uso de microesferas é um recurso importante para aumentar a eficácia terapêutica de fármacos.

A literatura recente mostra que microesferas biodegradáveis podem ser empregadas para a libertação da droga em doses desejadas e por implantação sem procedimentos cirúrgicos. Sendo a biocompatibilidade alcançada através da utilização de polímeros naturais como a celulose, quitina e quitosano, ou pelo emprego de polímeros sintéticos feitos a partir de monômeros que ocorrem naturalmente, tais como, ácidos láctico e glicólico (FREIBERG e ZHU, 2004).

Uma grande variedade de compostos bioativos tem sido incorporados em microesferas (BARBATO *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2005; TANAKA *et al.*, 2008; RIBEIRO-COSTA *et al.* 2009; SINGTHONG *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015).

Microesferas de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) contendo o fármaco Huperzine A, utilizado no tratamento de pacientes com a doença de Alzheimer, foram preparadas por Liu *et al.* (2005). Os testes *in vivo* demonstraram a capacidade das microesferas de PLGA em liberar o fármaco encapsulado durante duas semanas seguidas, conseguindo manter a concentração plasmática do Huperzine A em um nível constante.

Em 2004, foi descrita pela primeira vez a encapsulação do ácido úsnico em microesferas de PLGA. Os autores avaliaram a atividade antitumoral *in vivo* do ácido úsnico em sua forma livre e microencapsulada. Observou-se que o grupo tratado com o ácido na sua forma livre apresentou uma inibição de 42%, em relação ao grupo controle, enquanto que uma inibição de 63% para o grupo tratado com o ácido encapsulado nas microesferas (RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2004), resultando em um ganho significativo de 21%. Dessa maneira, a potencialização da atividade antitumoral do ácido úsnico na sua forma encapsulada, impulsionou novos estudos, a fim de explorar as suas diversas atividades biológicas.

Superfícies revestidas de microesferas de PLGA carregadas com o ácido úsnico foram preparadas por Grumezescu *et al.* (2014) e avaliadas quantitativamente quanto a capacidade dessas superfícies modificadas em controlar a formação de biofilmes constituídos por *Staphylococcus aureus*. Testes *in vitro* revelaram uma excelente biocompatibilidade, sugerindo-os como uma alternativa para o desenvolvimento de melhores superfícies atóxicas resistentes a *S. aureus* a serem utilizadas em materiais hospitalares.

Em 2008, foi realizado um estudo avaliando a toxicidade oral do ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA com uma dosagem terapêutica de 25 mg/kg durante 28 dias. Os resultados demonstraram alterações estatisticamente significativas nos níveis séricos das transaminases hepáticas nos animais tratados com ácido úsnico em sua forma livre. Enquanto que, nos animais tratados com ácido úsnico encapsulado não foram visualizadas alterações, indicando que a microencapsulação protegeu o órgão de possíveis lesões provocadas. Estes resultados confirmam a hepatotoxicidade do ácido úsnico após administração oral, porém esta toxicidade foi remediada com a utilização de microesferas de PLGA. Em suma, os sistemas de liberação controlada continuam sendo uma alternativa capaz de minimizar os efeitos colaterais promovidos pelos fármacos (FERRAZ, 2008).

### 1.3.4 Toxicologia Reprodutiva

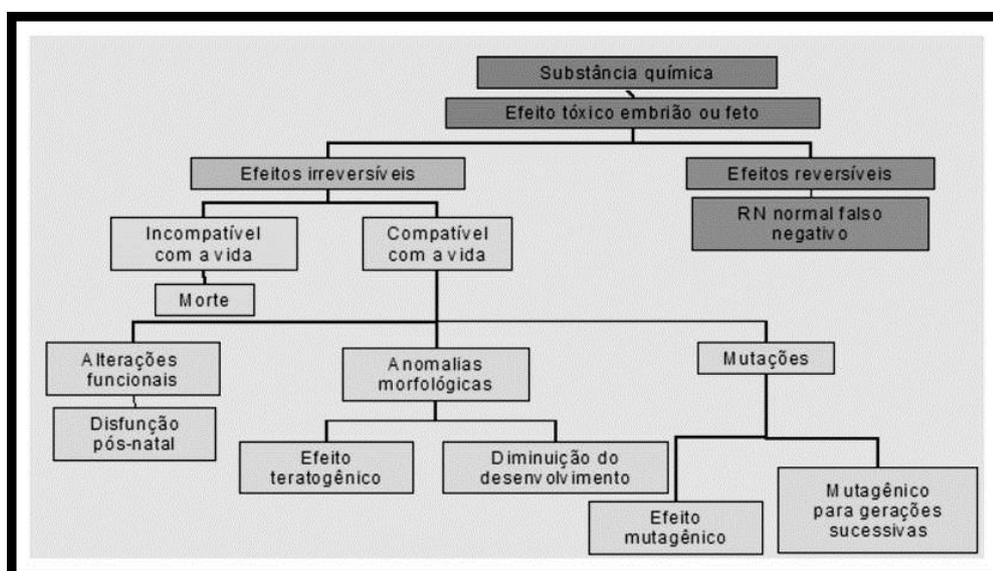
A toxicologia reprodutiva tem por objetivo esclarecer os efeitos prejudiciais produzidos em decorrência da exposição de drogas, sejam elas naturais ou sintéticas, no organismo em desenvolvimento. Indicando o grau de segurança a ser depositado em um medicamento a ser administrado à espécie humana (LEMONICA *et. al.*, 2008).

Todas as substâncias químicas são tóxicas em certas condições de exposição, no entanto, para toda substância deve haver alguma condição de exposição que seja segura no que se refere à saúde humana (MOTA, 2014). Segundo Schüller-Faccini (2002) somente a partir da segunda metade do século XX foi que se instalou uma preocupação crescente quanto ao possível efeito dessas substâncias sobre o embrião ou feto em desenvolvimento. Tal preocupação foi em decorrência de um trágico incidente na Alemanha Oriental, por volta do início da década de 60, que causou deformidades congênitas em mais de 10.000 crianças nascidas após a exposição das mães a um fármaco conhecido como talidomida, para tratar o mal estar de náuseas (KAWANO *et al.*, 2006).

Os estudos pré-clínicos de toxicologia reprodutiva de fármacos em modelos animais são essenciais para verificar o potencial de uma substância química nova em provocar efeitos adversos sobre qualquer uma das fases do processo reprodutivo, incluindo a fertilidade, o acasalamento, o desenvolvimento embrionário e fetal, o parto, e o desenvolvimento pós-natal dos descendentes até a maturidade reprodutiva. (SIMÕES; COL, 2000).

O período de desenvolvimento embrionário e fetal nos mamíferos é marcado por três fases: implantação, organogênese e desenvolvimento fetal. Os efeitos gerados na fase pré-natal podem levar a distúrbios irreversíveis, principalmente a exposição no período da organogênese, que é uma das fases mais suscetíveis ao aparecimento de anormalidades no desenvolvimento, pois as alterações são produzidas durante a formação e/ou diferenciação dos órgãos (LO; FRIENDMAN, 2002; BERNADI, 2003).

A maioria dos agentes químicos atravessa facilmente a placenta durante o período gestacional e, dessa maneira, pode-se considerar que a exposição materna a agentes externos, entre esses os agentes químicos, podem resultar em efeitos importantes sobre um organismo passivo, alvo secundário desses agentes, que é o organismo a se desenvolver (embrião e/ou feto) (Figura 1.12). A exposição a estes agentes pode desencadear em diferentes respostas que podem variar desde um efeito anti-implantação, alterações funcionais e/ou morfológicas, retardo geral no desenvolvimento, malformações e até mesmo morte. Todos os efeitos teratogênicos e embriofetotóxicos vão ser regulados por diversos fatores, tais como: genótipo do embrião e/ou feto, dosagem administrada, resposta ao agente teratogênico, e o estágio de desenvolvimento no qual o conceito se encontra durante o momento da exposição (WEBSTER; FREEMAN, 2001; LEMONICA *et. al.*, 2008).



**Figura 1.12** - Efeitos gerados em decorrência da exposição materna a agentes químicos. Fonte: (LEMONICA *et. al.*, 2008).

A teratologia é um ramo importante da ciência, que junto com a toxicologia reprodutiva estuda as anomalias e malformações que são provocados por perturbações

durante o desenvolvimento embrionário e/ou fetal. Esses defeitos podem ser deformidades, perturbações, displasias ou malformações. Malformações não estão limitadas a formação anormal dos tecidos e órgãos, mas também as anormalidades químicas. Estas alterações podem ser causadas pela ação direta de um agente tóxico sobre o embrião e/ou feto ou através de ação sobre o organismo materno (HANSEN e YANKOWITZ, 2002; BERNARDI, 2003).

Desde a antiguidade muitas pessoas faziam e fazem até o presente momento o uso de “produtos naturais” para tratar de diversas enfermidades, o que para muitos são substâncias isentas de compostos químicos, e passaram a ser sinônimo de produtos saudáveis, benéficos e seguros para a saúde humana, o que nem sempre é algo verdadeiro. Apesar da ampla utilização dessas substâncias de origem natural, as informações disponíveis em relação aos seus efeitos durante a gestação ainda são bastante escassos (MENGUE; MENTZ; SCHENKEL, 2001).

Alguns estudos *in vivo* têm demonstrado os efeitos teratogênicos, embriotóxicos e abortivos de algumas espécies de plantas amplamente utilizadas para fins medicinais, as quais são conhecidas popularmente como, arruda, espinheira santa e boldo, e que podem afetar tanto as genitoras, quanto os seus conceitos, dependendo do período de administração e dosagem durante a gravidez. 10mg/kg do extrato aquoso das folhas de Arruda (*Ruta chalepensis*) administradas durante o período de pós-implantação (9-17 pós-coito) em camundongos swiss, apresenta comprovado efeito embriotóxico e teratogênico, com o aparecimento de malformações ósseas e diminuição do peso fetal (GONZALES *et al.*, 2007). Extratos hidroalcoólicos da espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) causaram perda pós-implantação dos embriões, atuando como uma substância abortiva na dosagem de 1000mg/kg (MONTANARI; BELILACQUA, 2002). As folhas de boldo (*Vernonia condensata*) indicadas para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, enxaqueca e diarreia, possui baixa toxicidade, ocasionando um leve retardo no crescimento fetal na dose mais elevada (2000 mg/kg) (MONTEIRO *et al.*, 2001).

No entanto, estudos acerca do potencial toxicológico de substâncias de origem líquênicas durante o período embrionário e/ou fetal encontram-se bastante limitados, principalmente sobre o ácido úsnico. A grande maioria dos dados disponíveis na literatura estão relacionados apenas as atividades biológicas atribuídas ao ácido úsnico (GUO *et al.*, 2008; EINARSDÓTTIR *et al.*, 2010; PAUDEL *et al.*, 2010; KOHLHARDT-FLOEHR *et al.*, 2010; LUCARINI *et al.*, 2014).

Recentes investigações sobre o potencial toxicológico do ácido úsnico isolado de *Cladonia substellata* em ratas Wistar durante o período da organogênese, revelaram que

as fêmeas tratadas com o ácido úsnico na dose de 25 mg/kg demonstram um número de reabsorções maior ( $5 \pm 1$ ) quando comparada com o grupo controle ( $1,1 \pm 0,4$ ). Também foi observada uma redução no número de fetos viáveis ( $8 \pm 1,4$ ) nas fêmeas tratadas quando comparado com o grupo controle ( $12 \pm 0,51$ ). Os fetos apresentaram alterações morfológicas como exposição do globo ocular, presença de uma massa celular na região superior do feto e atrofia dos membros superiores e inferiores. As análises histológicas do fígado do grupo de fetos apresentaram uma redução significativa de megacariócitos, quando comparados ao grupo controle. Na histomorfometria do fígado da prole foi visualizado um aumento significativo no número médio de hepatócitos (SILVA, 2014).

## CAPÍTULO 2

### **Efeito de microesferas de PLGA contendo ácido úsnico de *Cladonia substellata* (AHTI) sobre a prole de ratas wistar durante a organogênese<sup>1</sup>**

Título abreviado:

#### **Toxicidade do ácido úsnico encapsulado em neonatos**

**KETSIA SABRINA DO NASCIMENTO MARINHO<sup>2</sup>; ERIVALDO ALVES ANTONIO<sup>2</sup>; CAMILA VILA NOVA SOARES SILVA<sup>3</sup>; FRANCISCO CARLOS AMANAJÁS DE AGUIAR JÚNIOR<sup>2</sup>; KATHARINE RAQUEL PEREIRA DOS SANTOS<sup>2</sup>; NOEMIA PEREIRA DA SILVA SANTOS<sup>2</sup>**

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Núcleo de Ciências Biológicas, R. Alto do Reservatório S/N Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil. CEP: 55.608-680.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, CEP: 50.670-901.

**Autor para correspondência:**

Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE), Centro Acadêmico de Vitória – CAV.

Laboratório de Biotecnologia e Fármacos

Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista, CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

E-mail: [ketsiasabrina@gmail.com](mailto:ketsiasabrina@gmail.com)

---

<sup>1</sup> **Artigo a ser submetido à Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências**

## 2.1 Resumo

Este estudo tem por objetivo avaliar a toxicidade oral do ácido úsnico encapsulado em microesferas de copolímero de ácido láctico e glicólico em ratos wistar durante a organogênese. Foram utilizadas 12 ratas prenhes distribuídas aleatoriamente em grupos controle (n=6) e tratado (n=6). Os animais do grupo controle receberam 1,0 mL de solução fisiológica; e os do grupo tratado 25 mg/kg/dia de ácido úsnico encapsulado pela via oral de administração. Ao 20º dia de gestação as fêmeas foram sacrificadas e seus fetos retirados e analisados. Foi observado uma redução no ganho de peso durante a gestação. Não houve diferença nos níveis séricos das transaminases analisadas e no peso médio dos fígados em todos os grupos de animais. Análises histomorfométricas do fígado das ratas prenhes tratadas revelaram um aumento no número total de hepatócitos e uma diminuição no tamanho médio do núcleo destes hepatócitos. Nenhuma alteração foi observada para área celular dos hepatócitos e número de células de kupffer. Os fetos apresentaram um aumento no número total de hepatócitos e uma diminuição no número de megacariócitos. Estes resultados sugerem que a encapsulação do ácido úsnico ajuda a minimizar os efeitos tóxicos causados pela exposição em um período tão sensível do desenvolvimento.

Palavras chaves: metabólito secundário, líquen, encapsulação, fetotoxicidade, reprodução.

## 2.2 Abstract

This study aims to evaluate the toxicity of usnic acid encapsulated into poly(lactide-co-glicolide) microspheres in rats during organogenesis. Were used 12 female rats pregnant randomly assigned to group control (n = 6) and treated (n = 6). The control animals received 1.0 ml of saline solution; and the treated group 25 mg / kg / day of usnic acid encapsulated by the oral route of administration. In the day gestation 20th the female rats were sacrificed and their fetuses were removed and analyzed. A reduction in weight gain during pregnancy was observed. There was no difference in serum levels of transaminases analyzed and in the weight of the livers of animals in all groups. Histomorphometric analyzes of the liver of the treated female rats showed an increase in total number of hepatocytes, and a decrease in the average core size of these hepatocytes. No changes were observed for cell area of hepatocytes and number of Kupffer cells. The fetuses showed a increase in total hepatocytes number, and a decrease

in the number of megakaryocytes. These results suggest that the encapsulation of usnic acid helps to minimize the toxic effects caused by exposure to a very sensitive period of development.

Keywords: secondary metabolite, lichen, encapsulation, fetotoxicity, reproduction.

## 2.3 Introdução

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9 $\alpha$ / $\beta$ H)-dibenzofurandiona; C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>] é um composto de origem natural, resultante do metabolismo secundário de líquens, considerado um dos mais importantes metabólitos líquênicos biologicamente ativos (Muller 2001, Cocchietto et al. 2002).

A literatura descreve relevantes propriedades farmacológicas atribuídas ao ácido úsnico: antibiótica (Segatore et al. 2012, Pompilio et al. 2013), antitumoral (Santos et al. 2006, Burlando et al. 2009), antiviral (Sokolov et al. 2012, Shtro et al. 2014), anti-inflamatória (Vijayakumar et al. 2000, Su et al. 2014), antioxidante (Behera et al. 2012, Suwalsky et al. 2015), cicatrizante (Nunes et al. 2011, Bruno et al. 2013), antifúngica (Halama e Van 2004, Nithyanand et al. 2015), inseticida e larvicida (Sahib et al. 2008, Bomfim et al. 2009).

Embora o ácido úsnico apresente notáveis propriedades farmacológicas, a sua aplicação terapêutica é limitada pelas suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, baixa hidrossolubilidade, difícil interação com as barreiras biológicas, e diversos casos de hepatotoxicidade já relatados (Cocchietto et al. 2002, Fraveau et al. 2002, Han et al. 2004; Pramyothin et al. 2004, Sanchez et al. 2006).

Hoje em dia, apesar da investigação existente sobre a utilização farmacológica do ácido úsnico, dados relativos à toxicidade humana são limitados. O que leva à necessidade de estudos pré-clínicos, entre eles, ensaios sobre o ciclo reprodutivo, para avaliar o seu potencial em provocar efeitos adversos nos organismos expostos, em especial, os efeitos decorrentes da exposição no período gestacional. Pois, de acordo com a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições e período de exposição, capaz de causar danos graves e até morte aos indivíduos expostos. Fazendo-se necessário conhecer as condições de uso seguro dessa substância para a saúde (Barros e Davino 2008, Lemonica 2008).

Em 2014, pela primeira vez foi realizado um estudo a respeito da toxicidade do ácido úsnico na sua forma em suspensão durante o período gestacional. As ratas prenhes expostas a 25mg/kg do composto tiveram uma redução no ganho de peso durante a gestação. Na prole, foram visualizadas alterações morfológicas, além de exposição do globo ocular e atrofia dos membros, assim como, alterações histológicas no fígado, o que pode estar relacionando a um potencial teratogênico do composto (Silva 2014 dados não publicados). Em consequência, a sua utilização de forma segura e eficiente requer um sistema de suporte adequado para melhorar os seus efeitos tóxicos, bem como o seu índice terapêutico (Ribeiro-Costa et al. 2004, Santos et al. 2006).

Tais limitações impulsionaram o desenvolvimento de alternativas inovadoras, a exemplo da encapsulação do ácido úsnico em sistemas de liberação controlada, uma atrativa ferramenta da nanotecnologia farmacêutica, permitindo que o princípio ativo seja liberado com a velocidade de cedência otimizada, com redução no regime de dosagens, aumento da eficácia terapêutica e diminuição dos efeitos colaterais (Ribeiro-Costa et al. 2004, Santos et al. 2006, Grumezescu et al. 2014). A incorporação do ácido úsnico em microesferas poliméricas biodegradáveis de copolímero de ácido láctico e glicólico está se tornando um importante meio de liberação da droga, a fim de diminuir os seus efeitos hepatotóxicos (Ribeiro-Costa et al. 2004, Ferraz 2008 dados não publicados).

Tendo em vista, a importância de se conhecer os efeitos de uma determinada droga em um sistema biológico e considerando à toxicidade do ácido úsnico durante o ciclo reprodutivo, em especial, durante o período embriofetal, torna-se necessário uma investigação do seu potencial teratogênico na sua forma encapsulada em microesferas, durante o período da organogênese, como uma maneira de neutralizar os seus possíveis efeitos tóxicos em um organismo em desenvolvimento.

## **2.4 Material e Métodos**

### **2.4.1 Reagentes e amostras**

O copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) 50:50 (0.57 dl/g), álcool polivinílico (PVA) (PM 30.000-70.000), polietilenoglicol (PEG) (PM 4,000), e o ácido úsnico, juntamente com o crioprotetor trealose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis,

EUA). A acetonitrila, o metanol e o diclorometano foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), todos de grau analítico.

#### **2.4.2 Preparação de microesferas de PLGA contendo ácido úsnico**

As microesferas foram preparadas pelo método de emulsão múltipla com evaporação do solvente de acordo com Ribeiro-Costa et al. (2004), em parceria com o Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-LIKA/UFPE. Uma emulsão simples A/O foi preparada dissolvendo-se 450 mg de PLGA e 10 mg de ácido úsnico em 12 mL diclorometano. A solução orgânica foi emulsificada (Ultra-Turrax T25, IKA, Alemanha) com 400 mg de PEG em água por 60 segundos a 8.000 rpm utilizando banho de gelo. A emulsão formada foi adicionada a uma fase aquosa constituída por 50 mL de PVA 0,5% e emulsificada por 30 s a 8.000 rpm, resultando em uma emulsão múltipla A/O/A. A emulsão resultante foi mantida sob agitação mecânica em um agitador de palheta a 400 rpm por 4h para evaporação do solvente. As microesferas foram recuperadas através de centrifugação (centrífuga Kubota KN-70, Japão) a 3.000 rpm durante 10 min, lavadas três vezes com 25 mL de água destilada e dispersas no crioprotetor trealose 1% (m/v). Em seguida, as microesferas foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 48h para liofilização (EZ-DRY, FTS System, EUA). Após liofilização, as microesferas foram acondicionadas em dessecador a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.4.3 Eficiência de encapsulação das microesferas de PLGA**

A eficiência de encapsulação do ácido úsnico nas microesferas foi determinada por espectrofotometria (Ultrospec 3000 Pro, Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Amostras de microesferas liofilizadas (11,5 mg) foram diluídas em 25 mL de uma mistura de diclorometano e metanol (3:2) e submetidas à sonicação durante 10 min. Uma alíquota da solução foi diluída até a concentração teórica de  $6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O ácido úsnico foi determinado em 254 nm de comprimento de onda, utilizando-se curva padrão na faixa de concentração de  $2\text{-}14\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em acetonitrila. Microesferas da formulação placebo foram submetidas ao mesmo método de doseamento para demonstrar a ausência de interferência dos constituintes da formulação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 2.4.4 Animais experimentais

Foram utilizadas 12 ratas Wistar fornecidas pelo biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, pesando cerca de 200-250g, com 60 dias de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas enfileiradas com ambiente climatizado em fotoperíodo (12 horas claro/12 horas escuro) a uma temperatura controlada de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  com exaustão de ar, e livre acesso de alimento *ad libitum* e água durante os experimentos. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 23076.029828/2013-94).

#### 2.4.5 Procedimento experimental

Inicialmente, as fêmeas foram submetidas ao estudo do ciclo estral, no intuito de se determinar o período fértil. Foram coletadas células da parede vaginal e através da técnica de esfregaço foram preparadas lâminas, que posteriormente foram coradas com SHORR. Através de análises microscópicas (Olympus BH-2, Japan) foi identificado o período de ovulação, denominado estro.

Após a confirmação do período de ovulação, as fêmeas foram pareadas com machos (2:1) *overnight* e o acasalamento foi confirmado no dia seguinte com a presença do "*plug*" (massa esbranquiçada de espermatozoides na abertura vaginal) ou pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. As primeiras 24 horas após a confirmação do acasalamento foram consideradas como dia zero (D0) de gestação.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos controle (n=6) e tratado (n=6). As fêmeas do grupo controle receberam 1,0 mL de solução fisiológica, enquanto, as do grupo tratado receberam microesferas contendo ácido úsnico na dose de 25 mg/kg de peso corporal. Dose calculada com base no estudo da DL<sub>50</sub> (Dose Letal que mata 50% dos animais). A administração foi do 6º ao 15º dia de gestação por via oral, dose diária.

Durante a administração as fêmeas foram pesadas para avaliar o ganho de massa corporal no 0º, 6º, 10º, 14º e 20º dia de gestação. Após esse período as fêmeas foram anestesiadas por overdose dos anestésicos cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), por

via intramuscular, para a coleta de 3 ml de sangue, o qual foi acondicionado em tubos adequados. As amostras de soro foram obtidas após centrifugação do sangue a 3.500 rpm (centrífuga Kubota, Tóquio, Japão) durante 20 minutos, e subsequentemente sujeita a análises bioquímicas convencionais.

Em seguida, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico para a abertura do útero, e retirada dos fetos. Todos os fetos foram analisados no sentido crânio-caudal para avaliar a presença de malformações externas, e posteriormente pesados juntamente com sua placenta. Após o procedimento de cesárea, os fetos considerados vivos, ou seja, aqueles que apresentaram movimentos das patas traseiras, após estímulos mecânicos e sinais respiratórios, também foram eutanasiados.

#### **2.4.6 Análise Histomorfométrica**

Para registro de anomalias viscerais, foram analisados o fígado das ratas adultas e, dos fetos de cada ninhada. Após o sacrifício, os fígados foram dissecados e pesados, posteriormente submetidos a análises histopatológicas. Os tecidos foram mantidos em formaldeído a 10% neutro tamponado (NBF), processados utilizando a técnica histológica de rotina, e incluídos em parafina. Cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura de cada amostra de tecido foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), e analisados por microscopia óptica (Olympus BH-2, Japan).

Para a análise histomorfométrica do fígado das ratas e dos fetos, as lâminas histológicas foram fotografadas através do programa Motic® Imagens Plus 2.0, com uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico (Olympus BH-2, Japan), conectada ao computador. Foram obtidas 20 fotomicrografias por lâmina, em aumento total de 400X.

As fotomicrografias obtidas foram submetidas às devidas mensurações, utilizando o software *ImageJ* versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Para os fetos, foram considerados as seguintes mensurações: número de hepatócitos (NH) e número de megacariócitos (NM); enquanto que, para as ratas adultas prenhes foram considerados: número de hepatócitos (NH), número de células de Kupffer (NCK), área celular dos hepatócitos (ACH) e área nuclear dos hepatócitos (ANH). Foram contabilizados 50 hepatócitos por animal para a mensuração da ACH e ANH. As medidas de áreas foram mensuradas em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ).

### 2.4.7 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram conduzidas em todas as ratas adultas no final da gestação para avaliar possíveis alterações nas funções hepáticas. A atividade das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro foram realizadas por espectroscopia (Ultrospec<sup>®</sup> Pro 3000, Amersham Biosciences, Suécia) utilizando kits de análise bioquímica (Katal Biotecnológica, Brasil).

### 2.4.8 Estatística

Os valores obtidos com as devidas mensurações foram avaliados estatisticamente através do *teste-t de Student* (software SPSS, versão 15.0), com significância  $p < 0,05$ . Os resultados experimentais estão expressos no formato de média  $\pm$  DP.

## 2.5 Resultados

Os resultados referentes à eficiência de encapsulação do ácido úsnico (AU) nas microesferas, foi de  $99 \pm 0,82\%$  para um montante inicial de 10 mg de AU.

Durante o período de administração oral das microesferas contendo ácido úsnico (MS-AU) na dose de 25mg/kg não foi registrada nenhuma morte no decorrer do tratamento.

Analisando os parâmetros atribuídos as ratas prenhes tratadas com microesferas de ácido úsnico (MS-AU), os dados coletados em relação à massa corporal tiveram uma redução significativa no ganho de peso corpóreo ( $86,12 \pm 20,69$ ) durante a gestação, quando comparado ao grupo controle ( $110,85 \pm 10,03$ ), o que caracteriza uma diminuição de cerca de 22%. Em relação ao peso médio dos fígados não foi evidenciada nenhuma alteração entre ambos os grupos analisados (Tabela 2.1).

Nas dosagens bioquímicas avaliadas, quanto aos níveis séricos das enzimas transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), não houve quaisquer alterações significativas nos níveis das enzimas no soro (AST=  $122,00 \pm 44,10$  e ALT=  $68,83 \pm 11,96$ ) em relação ao grupo controle (AST=  $153,00 \pm 17,61$  e ALT=

75,17 ± 7,60). Todos os animais tratados com as MS-AU estavam dentro dos valores referenciais, de acordo com o trabalho de Lima et al. (2014) (Tabela 2.2).

No que se refere aos parâmetros atribuídos aos fetos provenientes dos animais tratados com MS-AU durante a prenhez, observou-se uma diminuição significativa no peso médio fetal (4,65 ± 0,41) em relação aos animais não tratados (4,85 ± 0,35). Sendo essa diminuição estatisticamente significativa ( $p= 0,005$ ). Não foi evidenciada nenhuma alteração quanto ao peso médio dos fígados fetais (0,33 ± 0,05) em comparação aos do controle (0,35 ± 0,05) (Tabela 2.3).

Quanto à morfologia externa em ambos os grupos, foi observado que 100% dos fetos apresentavam-se dentro da normalidade. Porém, percebeu-se que um dos úteros das ratas prenhes expostas as MS-AU apresentou redução em uma das placentas (Figura 2.1). No entanto, não foi observada nenhuma mudança na coloração da placenta, sem indicar alterações na circulação sanguínea e trocas materno-fetais.

A análise microanatômica do fígado das ratas prenhes do grupo controle e grupo experimental apresentaram lobos hepáticos constituídos por cordões de células hepáticas anastomosadas aos capilares sinusóides. Os capilares sinusóides encontravam-se revestidos por células endoteliais e células de Kupffer, localizadas na superfície luminal, características destes capilares. Também foram evidenciados limites bem definidos entre os lóbulos hepáticos, com a organização típica das estruturas dos espaços porta. Não foi possível a visualização do espaço de Disse, no qual se encontram presentes as células de Ito (Figura 2.2).

O fígado dos fetos obtidos das ratas prenhes do grupo controle estava dentro dos padrões de normalidade na análise microanatômica. As células hepáticas estavam pouco organizadas em cordões anastomosados aos capilares sinusóides, não sendo possível a identificação da organização lobular. Assim como não foi possível à visualização das células de Kupffer e células de Ito. As estruturas típicas dos espaços porta encontravam-se imaturos, o que é considerado normal nesta idade gestacional (20 dias) Entre as células hepáticas foi encontrado grande número de células hematopoiéticas em diferentes estágios de maturação, incluindo os megacariócitos (Figura 2.3).

O fígado fetal dos animais experimentais também apresentou células hepáticas pouco organizadas em cordões, as quais estavam anastomosadas aos capilares sinusóides, com elementos do espaço porta imaturos. No entanto, notou-se uma maior quantidade de hepatócitos, quando comparado com a microanatomia do grupo controle. Não foi possível a identificação das células de kupffer e células de Ito. Diversas células

da linhagem sanguínea foram visualizadas, dentre estas, a de fácil identificação foram os megacariócitos (Figura 2.3).

Os resultados encontrados a partir das análises histomorfométricas do fígado das ratas prenhes expostas as MS-AU demonstraram alterações significativas em relação à média do número total de hepatócitos por animal. Com médias celulares entre o grupo experimental e o controle ( $37,56 \pm 7,94$ ;  $35,48 \pm 6,00$  respectivamente). Não foi observada nenhuma alteração na média da área celular dos hepatócitos ( $392,42 \pm 79,98$ ) quando comparados com os não tratados ( $386,26 \pm 85,83$ ). Porém, ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa de aproximadamente 5% na área do núcleo desses hepatócitos ( $55,89 \pm 13,00$ ), quanto aos demais animais ( $58,25 \pm 13,00$ ) (Tabela 2.4) (Figura 2.2).

A contagem das células de Kupffer para os animais expostos as MS-AU, não demonstraram quaisquer alterações na quantidade total dessas células por animal ( $15,02 \pm 5,06$ ) quando comparadas com as do controle ( $13,97 \pm 3,97$ ) (Tabela 2.4) (Figura 2.2).

A histomorfometria do fígado dos fetos em relação ao número total de hepatócitos quando administrado as MS-AU, mostrou um aumento na média destas células ( $43,31 \pm 7,17$ ) quando comparado ao grupo controle, que obteve a média de ( $37,85 \pm 8,86$ ), representando um aumento significativo de aproximadamente 13%. Com relação à contagem dos megacariócitos, os animais tratados apresentaram-se com menores médias ( $0,04 \pm 0,26$ ), uma diminuição de cerca de 56%, quando comparado aos animais que não receberam as MS-AU ( $0,09 \pm 0,37$ ) (Tabela 2.5) (Figura 2.4).

## 2.6 Discussão

O período gestacional é uma das fases bastante sensíveis do ciclo reprodutivo, em que a exposição a algum tipo de composto pode resultar em retardo no desenvolvimento intrauterino, malformações congênitas, e até mesmo morte fetal. Os estudos avaliativos dos efeitos de um fármaco sobre um organismo incluem testes pré-clínicos como os investigados neste estudo, que analisem a sua toxicidade sobre o organismo materno e seus descendentes (Wanderley et al. 2013, Roman et al. 2014).

Segundo Louzada et al. (2008), indícios de toxicidade materna estão relacionados com a redução de peso corpóreo, seguido ou não de diminuição no consumo alimentar; assim como, por alterações no peso e/ou morfologia dos órgãos; e ocorrência de óbitos durante o período de tratamento. A redução de aproximadamente

22% na massa corpórea durante a gestação observada em nossos estudos pode representar um indicativo de toxicidade do composto na sua forma encapsulada. Embora, deva se levar em conta os registros na literatura da ação do ácido úsnico como um redutor de peso, já comercializado nos Estados Unidos como um suplemento dietético, tendo vários casos de hepatotoxicidade associadas à perda de peso (Fraveau et al. 2002, Durazo et al. 2004, Neff et al. 2004, Sanchez et al. 2006).

Apesar do composto na sua forma encapsulada ter causado uma diminuição na massa corpórea, esta, foi menor do que a observada com a administração do ácido úsnico na sua forma em suspensão (Silva 2014 dados não publicados). Os resultados demonstraram uma redução significativa no ganho de peso de aproximadamente 57% durante a gestação, em comparação aos animais que não receberam o ácido úsnico em suspensão.

Os níveis séricos das transaminases AST e ALT são muitas vezes considerados como excelentes marcadores químicos em estudos pré-clínicos e clínicos da função hepática. Danos no fígado podem ser mensurados quanto ao aumento dos níveis destas enzimas na corrente sanguínea, sendo este aumento quase proporcional ao número de hepatócitos afetados (Hall 2007, Ozer et al. 2008).

No presente estudo, a ausência de alteração nos níveis séricos das transaminases analisadas no soro, confirma uma diminuição da hepatotoxicidade do ácido úsnico, resultante do seu encapsulamento em microesferas de PLGA. Esses resultados corroboram os encontrados por Ferraz (2008) (dados não publicados), após a administração de 25mg/kg de ácido úsnico na sua forma em suspensão e encapsulado em microesferas de PLGA, durante 28 dias em ratos machos adultos. Foi registrado um aumento significativo de 37,5% e 30%, nos níveis séricos da ALT e AST, respectivamente, após tratamento com ácido úsnico em suspensão, em comparação ao controle. O que sugere que os animais desenvolveram lesões hepáticas, induzidas pela exposição ao composto. Contudo, essas alterações enzimáticas não foram encontradas após o tratamento dos animais com o composto encapsulado. Desse modo, confirmando a redução da hepatotoxicidade do ácido úsnico devido a sua encapsulação.

Em ensaios de toxicidade sub-crônica em camundongos swiss tratados com o ácido úsnico em suspensão e em nanocápsulas de PLGA na dose de 15mg/kg, durante sete dias, foi constatada uma redução significativa da hepatotoxicidade após a administração do composto na sua forma nanoencapsulada. Níveis plasmáticos elevados de aproximadamente 91% e 66% da ALT e AST, respectivamente, foram registrados para os animais tratados com o composto em suspensão, quando comparados aos do grupo

controle, sugerindo uma crônica disfunção hepática. Em contrapartida, os animais tratados com as nanocápsulas de PLGA apresentaram elevações de cerca de 36% e 25% nos níveis plasmáticos das enzimas hepáticas, ALT e AST, respectivamente. Confirmando que a encapsulação é capaz de reduzir os danos hepáticos causados por essa substância (Santos et al. 2006).

As muitas das alterações observadas durante o desenvolvimento dos conceptos são especialmente devido à exposição da genitora a agentes químicos, não havendo necessariamente um efeito direto sobre elas. A redução de peso corpóreo na prole das ratas prenhes expostas a MS-AU aponta para um efeito fetotóxico.

Uma das poucas investigações do potencial toxicológico do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* em ratas Wistar, durante o período da organogênese, mostraram relevantes sinais de fetotoxicidade. Os fetos das ratas prenhes tratadas com o ácido úsnico em suspensão nas doses de 15mg/kg e 25mg/kg, exibiram uma redução significativa na massa corpórea, equivalente a 20% e 39%, quando comparadas com o peso dos animais não tratados. No qual, a dose considerada mais tóxica foi a de 25 mg/kg (Silva 2014 dados não publicados). Já os nossos achados para essa mesma dosagem, com o composto na sua forma encapsulada, demonstraram uma redução de apenas 5% em relação ao peso do grupo controle.

Uma diminuição bastante expressiva no peso médio do fígado desses filhotes também foi constatada no estudo de Silva (2014) (dados não publicados), para a dose de 25mg/kg, exibindo uma média de 0,2g por animal. Em contrapartida, nenhuma alteração no peso do fígado foi encontrada em nosso estudo. Comprovando mais uma vez que as MS-AU conseguem proteger o organismo dos danos ocasionados pela exposição ao composto em períodos críticos do desenvolvimento.

Segundo Lemonica et al. (2008), durante a gestação as anomalias morfológicas nos fetos geralmente ocorrem no período da organogênese, que é a fase mais vulnerável ao aparecimento de efeitos teratogênicos no desenvolvimento embrio-fetal. Ainda assim, neste trabalho, não foi evidenciado nenhum tipo de anormalidade no desenvolvimento anatômico, mesmo o ácido úsnico sendo considerado um agente com potencial teratogênico, como foi visto para o composto na sua forma em suspensão.

O estudo de Silva (2014) (dados não publicados) visualizou nos fetos a presença de malformações, tais como atrofia dos membros superiores e inferiores e saliência do globo ocular, ambas, decorrentes das proles de fêmeas tratadas com ácido úsnico na dose de 25 mg/kg. Isso sugere uma ação teratogênica provocada pelo ácido úsnico,

capaz de promover anormalidades no desenvolvimento anatômico que podem ser incompatíveis com a vida.

Nas análises microanatômicas do fígado de todos os animais tratados com as MS-AU não foi constatado nenhum tipo de alteração no tecido, tais como lesões hepáticas. Porém, alguns estudos têm demonstrado extensas áreas necróticas no fígado de animais submetidos ao ácido úsnico em sua forma em suspensão. Mas esta anormalidade foi notavelmente reduzida em animais tratados com ácido úsnico encapsulado em nanocápsulas e/ou microesferas de PLGA (Ribeiro-Costa et al. 2004, Santos et al. 2006, Ferraz 2008 dados não publicados).

A proliferação anormal dos hepatócitos ocorre em várias situações patológicas e/ou experimentais, influenciada por vários fatores. A administração de drogas hepatotóxicas induz a proliferação dos hepatócitos, os quais têm a capacidade de proliferar e regenerar a arquitetura normal do fígado em condições patológicas, sendo as primeiras células a proliferar frente a uma agressão no tecido hepático, e as de maior importância na regeneração parenquimal. Alguns estudos têm demonstrado o efeito de substâncias com potencial hepatotóxico e teratogênico sobre a organização e estrutura dos hepatócitos (Domingues et al. 2009, Da Paz et al. 2010, Dos Santos et al. 2010, Aravinthan et al. 2013).

Os resultados obtidos quanto à mensuração dos hepatócitos demonstraram que o ácido úsnico, mesmo em sua forma encapsulada, é capaz de provocar um efeito tóxico no fígado de todos os animais. Em contrapartida, para minimizar a hepatotoxicidade induzida, os hepatócitos entraram em proliferação celular para uma possível regeneração do tecido hepático, um mecanismo regenerativo envolvendo um aumento no número de hepatócitos. A administração de MS-AU pode até ter provocado um distúrbio no tecido, mas não ao ponto de ocasionar necroses. A falta de estudos histomorfométricos do fígado utilizando substâncias de origem natural, assim como o ácido úsnico, nos impede de fazer comparações mais precisas quanto às mensurações analisadas.

Um estudo de hepatotoxicidade da *Mikania hirsutissima*, uma planta que possui algumas propriedades farmacológicas semelhantes ao ácido úsnico, demonstraram diminuições significativas em relação à área nuclear dos hepatócitos nos animais tratados com as menores doses da planta (Da Paz et al. 2010). Esses resultados evidenciam o potencial hepatotóxico da planta, assim como foi visto para o ácido usnico, mesmo que encapsulado. Apesar das MS-AU ocasionar uma diminuição na área nuclear dos hepatócitos, nenhuma alteração foi observada no tamanho total destas células.

A histomorfometria das células de Kupffer para os animais expostos as MS-AU, indica ausência de processos inflamatórios e maiores danos hepáticos. Pois, de acordo com Arai e Imamura (2000), estas células desempenham um papel fundamental na manutenção da função hepática, em circunstâncias patológicas e fisiológicas, tendo como principais funções, a fagocitose de partículas estranhas; a remoção de substâncias nocivas; e a modulação da resposta imune, desempenhando um papel chave na resposta inflamatória, por meio do aumento da produção de mediadores inflamatórios. A ativação destas células em processos inflamatórios pode ser associada a sinais morfológicos de ativação, com um aumento na população de células (Eguchi et al. 1991).

Todavia, evidências derivadas principalmente de modelos animais indicam que o aumento das células de Kupffer está envolvido na patogênese de algumas lesões hepáticas, em decorrência da exposição às substâncias químicas, toxinas ou agentes farmacológicos. Estas células liberam substâncias biologicamente ativas, citocinas, que promovem o processo patogênico após a sua ativação (Luckey e Petersen 2001, Ito et al. 2003, Ono et al. 2004, Kolios et al. 2006). Essas informações podem explicar a ausência de lesões no tecido hepático, que pode estar relacionada com a normalidade da morfologia e número das células de Kupffer nos animais tratados com MS-AU.

Estudos de toxicidade reprodutiva no período da organogênese com a Betalapachona, composto de origem natural que possui algumas propriedades semelhantes ao ácido úsnico, como baixa solubilidade e diversas atividades biológicas atribuídas, demonstraram ausência de alterações histológicas no fígado de todos os fetos tratados nas doses 40 mg/kg, 60 mg/kg e 160 mg/kg. Em contrapartida, a administração do composto mostrou ação abortiva e teratogênica (Almeida et al. 2009). Comparando esses resultados com o ácido úsnico encapsulado em nosso trabalho, pode-se notar que a administração de MS-AU é capaz de causar toxicidade hepática nos fetos, embora não apresente nenhum tipo de efeito teratogênico, mesmo em doses menores que as utilizadas no estudo com a Betalapachona.

No estudo de Silva (2014) (dados não publicados), os resultados referentes à histomorfometria do fígado da prole demonstraram alterações em relação ao número total de hepatócitos e megacariócitos, quando expostos a 25 mg/kg de ácido úsnico em suspensão durante o período gestacional. Foi constatado um aumento significativo de aproximadamente 25% no número total hepatócitos, assim como, uma redução em cerca de 53% no número de megacariócitos quando comparado ao controle.

Os nossos achados comprovam que essas alterações no fígado da prole podem ser amenizadas com o tratamento do AU encapsulado em microesferas de PLGA,

principalmente os danos nos hepatócitos. Por outro lado, as MS-AU não mostraram ser eficientes contra os danos causados sobre as células polinucleadas, os megacariócitos. Mantendo assim, uma toxicidade sobre elas, o que pode provocar alterações no processo de formação dessas células, levando a uma deficiência na cascata de coagulação inicial do organismo; pois, são os megacariócitos os responsáveis por originar as plaquetas sanguíneas.

O modelo experimental utilizado no presente trabalho demonstrou que a administração do ácido úsnico na sua forma encapsulada em microesferas de PLGA é capaz de provocar alterações no tecido hepático, tanto nas ratas prenhes, quanto na sua prole. No entanto, essas alterações foram em proporções bem menores do que as já encontradas para o ácido úsnico na sua forma em suspensão. Demonstrando que a toxicidade do composto pode ser remediada por meio da sua encapsulação.

## **Agradecimentos**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor.

## **2.7 Referências Bibliográficas**

ALMEIDA ER, LUCENA FRS, SILVA CVNS, COSTA-JUNIOR WS, CAVALCANTI JB, COUTO GBL, SILVA LLS, MOTA DL, SILVEIRA AB, FILHO SDS AND SILVA ACP. 2009. Toxicological Assessment of Beta-lapachone on organs from pregnant and non-pregnant rat. *Phytother res* 23: 1276-1280.

ARAVINTHAN A, SCARPINI C, TACHTATZIS P, VERMA S, PENRHYN-LOWE S, HARVEY R AND ALEXANDER G. 2013. Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease. *J hepatol* 58: 549-556.

ARII S AND IMAMURA M. 2010. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 7: 40-48.

BARROS SBM AND DAVINO SC. 2008. Avaliação da toxicidade. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 3 ed., 59-71 p.

BEHERA BC, MAHADIK N, MOREY M. 2012. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. Pharm Biol 50: 968–979.

BOMFIM RR, ARAUJO AAS, CUADROS-ORELLANA S, MELO MGD, QUINTANS LJ AND CAVALCANTI SCH. 2009. Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. Lat Am J Pharm 28: 580-584.

BRUNO M, TRUCCHI B, BURLANDO B, RANZATO E, MARTINOTTI S, AKKOL EK, SUNTAR I, KELES H AND VEROTTA, L. 2013. (p)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. Bioorg Med Chem 21: 1834-1843.

BURLANDO B, RANZATO E, VOLANTE A, APPENDINO G, POLLASTRO F AND VEROTTA L. 2009. Antiproliferative Effects on Tumour Cells and Promotion of Keratinocyte Wound Healing by Different Lichen Compounds. Planta Med 75: 607-613.

COCCHIETTO M, SKERT N, NIMIS PL AND SAVA GA. 2002. review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften 89: 137-146.

DA PAZ K, LOPES RA, SALA MA, FRIEDRICH C, SEMPRINI M AND REGALO SCH. 2010. Hepatotoxicity of medicinal plants. XXI. action of *Mikania hirsutissima* D.C. infusion in rats. Rev Investigação. 5: 78-85.

DOMINGUES JA, TOLEDO MT AND MORAES SG. 2009. Análise histomorfológica do fígado materno e fetal de ratas prenhes desnutridas submetidas à exposição ao etanol. Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba 11: 9-17.

DOS SANTOS AMR, DE MORAES MOTTA C, DE SOUZA ECA AND DE MORAES SG. 2010. Análise histomorfológica do fígado de ratas e de seus fetos expostos ao álcool durante a gestação. Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba 12: 10-14.

DURAZO FA, LASSMAN C, HAN SH, SAAB S, LEE NP, KAWANO M, SAGGI B, GORDON S, FARMER DG AND YERSIZ H. 2004. Fulminant liver failure due to usnic acid for weight loss. *Am J Gastroenterol* 99: 950-952.

EGUCHI H, MCCUSKEY PA AND MCCUSKEY RS. 1991. Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. *Hepatology* 13: 751-757.

FRAVEAU JT, RYU T, BRAUNSTEIN MLG, ORSHANSKY G, PARK SS, COODY GL, LOVE LA AND FONG TL. 2002. Severe hepatotoxicity associated with the dietary supplement lipokinetix. *Ann Intern Med* 136: 590-595.

GRUMEZESCU V, HOLBAN AM, GRUMEZESCU AM, SOCOL G, FICAI A, VASILE BS AND MOGOSANU GD. 2014. Usnic acid-loaded biocompatible magnetic PLGA-PVA microsphere thin films fabricated by MAPLE with increased resistance to staphylococcal colonization. *Biofabrication* 6: 035002.

HALAMA P AND VAN HC. 2004. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl* 49: 95-107.

HALL RL. 2007. Clinical pathology of laboratory animals. In *Animal Models in Toxicology*. Estados Unidos: CRC Press, 2 ed., 789–828 p.

HAN D, MATSUMARU K, RETTORI D AND KAPLOWITZ N. 2004. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 67: 439-451.

ITO Y, BETHEA NW, ABRIL ER AND MCCUSKEY RS. 2003. Early hepatic microvascular injury in response to acetaminophen toxicity. *Microcirculation* 10: 391-400.

KOLIOS G, VALATAS V AND KOUROUMALIS E. 2006. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroentero* 12: 7413.

LEMONICA IP, OGA S, CAMARGO MMA AND BATISTUZZO JAO. 2008. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 3 ed., 59-71 p.

LIMA CM, LIMA AK, MELO MGD, DÓRIA GAA, SERAFINI MR, ALBUQUERQUE-JÚNIOR RLC AND ARAÚJO AAS. 2014. Valores de referência hematológicas e bioquímicas de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. Sci Plena 10: 1-9.

LOUZADA AF, RAMOS H, RODRIGUES JK AND SILVA LR. 2008. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com tacrolimus durante a fase de pré-implantação. Rev Bras Ginecol Obstet 30: 219-224.

LUCKEY SW AND PETERSEN DR. 2001. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. Exp Mol Pathol 71: 226-240.

MULLER K. 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. Appl Microbiol Biot 56: 9-16.

NEFF GW, REDDY KR, DURAZO FA, MEYER D, MARRERO R AND KAPLOWITZ N. 2004. Severe hepatotoxicity associated with the use of weight loss diet supplements containing ma huang or usnic acid. J Hepatol 41: 1062-1064.

NITHYANAND P, SHAFREEN RMB, MUTHAMIL S AND PANDIAN SK. 2015. Usnic acid inhibits biofilm formation and virulent morphological traits of *Candida albicans*. Microbiol Res 179: 20-28.

NUNES PS, ALBUQUERQUE-JUNIOR RL, CAVALCANTE DR, DANTAS MD, CARDOSO JC, BEZERRA MS AND ARAÚJO A. A. 2011. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. Biomed Res Int 2011: 1-9.

ONO M, YU B, HARDISON EG, MASTRANGELO MAA AND TWEARDY DJ. 2004. Increased susceptibility to liver injury after hemorrhagic shock in rats chronically fed ethanol: Role of nuclear factor- $\kappa$ B, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. Shock 21: 519-525.

OZER J, RATNER M, SHAW M, BAILEY W AND SCHOMAKER S. 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. Toxicology 245: 194-205.

POMPILIO A, POMPONIO S, DI VINCENZO V, CROCETTA V, NICOLETTI M, PIOVANO M, GARBARINO JA AND DI BONAVENTURA G. 2013. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. *Future Microbiol* 8: 281-292.

PRAMYOTHIN P, JANTHASOOT W, PONGNIMITPRASERT N, PHRUKUDOMC S AND RUANGRUNGSI N. 2004. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *J Ethnopharmacol* 90: 381-387.

RIBEIRO-COSTA RM, ALVES AJ, SANTOS NP, NASCIMENTO SC, GONÇALVES ECP, SILVA NH, HONDA NK AND SANTOS-MAGALHÃES NS. 2004. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J Microencapsul* 21: 371-384.

ROMAN S, DAMBROS A, ROSSET A, PISTORE M, SCHIMID A AND CANSIAN R. 2014. Toxicidade materna e reprodutiva de extrato hidroalcoólico de *Sonchus oleraceus* L. em ratos wistar. *Rev Perspect* 38: 69-77.

SAHIB K, KULARATNE NS, KUMAR S AND KARUNARATNE V. 2008. Effect of (+)-usnic acid on the shot-hole borer (*Xyleborus fornicatus* Eichh) of tea. *J Natl Sci Found Sri* 36: 335-336.

SANCHEZ W, MAPLE JT, BURGART LJ AND KAMATH PS. 2006. Severe hepatotoxicity associated with use of a dietary supplement containig usnic acid. *Mayo Clin Proc* 81: 541-544.

SANTOS NPS, NASCIMENTO SC, WANDERLEY MSO, PONTES-FILHO NT, DA SILVA JF, DE CASTRO CMMB, PEREIRA EC, DA SILVA NH, HONDA NK AND SANTOS-MAGALHÃES NS. 2006. Nanoencapsulation of usnic acid: Na attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 64: 154-160.

SEGATORE AB, BELLIO P, SETACCIA D, BRISDELLI F, PIOVANOB M, GARBARINOB JA, NICOLETTI M, AMICOSANTEA G, PERILLI M AND CELENZAA G. 2012. *In vitro*

interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and  $\Delta E$  model methods. *Phytomedicine* 19: 341-347.

SHTRO AA, ZARUBAEV VV, LUZINA OA, SOKOLOV DN, KISELEV OI AND SALAKHUTDINOV NF. 2014. Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus. *Bioorgan Med Chem* 22: 6826-6836.

SOKOLOV DN, ZARUBAEV VV, SHTRO AA, POLOVINKA MP, LUZINA OA, KOMAROVA NI, SALAKHUTDINOV NF AND KISELEV OI. 2012. Anti-viral activity of (-)/(+) usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1). *Bioorg Med Chem Lett* 22: 7060-7064.

SU ZQ MO ZZ, LIAO JB, FENG XX, LIANG YZ, ZHANG X AND LAI XP. 2014. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. *Int Immunopharmacol* 22: 371-378.

SUWALSKY M, JEMIOLA-RZEMINSKA M, ASTUDILLO C, GALLARDO MJ, STAFORELLI JP, VILLENA F AND STRZALKA K. 2015. An in vitro study on the antioxidant capacity of usnic acid on human erythrocytes and molecular models of its membrane. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes* 1848: 2829-2838.

VIJAYAKUMAR CS, VISWANATHAN S, KANNAPPA-REDDY M, PARVATHAVARTHINI S, KUNDU AB, SUKUMAR E. 2000. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia* 71: 564–566.

WANDERLEY AG, LYRA MMA, COSTA-SILVA JH, LIMA CR, ARRUDA VM, ARAÚJO AV, RIBEIRO E RIBEIRO A, ARRUDA AC, FRAGA MCCA AND LAFAYETTE SSL. Estudo toxicológico reprodutivo da *Azadirachta indica* A. Juss.(Neem) em ratas Wistar. *Rev. Fitos* 1: 53-57.

## FIGURAS

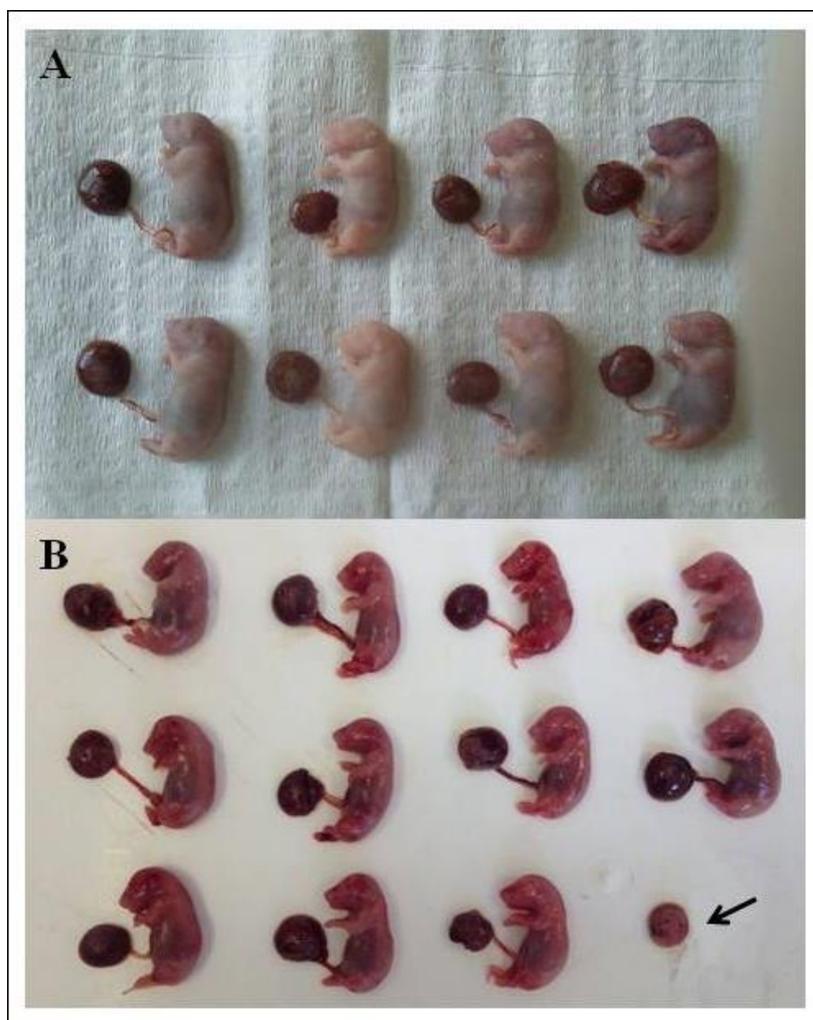


Figura 1. Fetos obtidos do grupo controle (A) e grupo tratado com 25mg/kg de MS-AU durante o período da organogênese (B). Seta mostrando a presença de placenta reduzida com interrupção no desenvolvimento fetal.

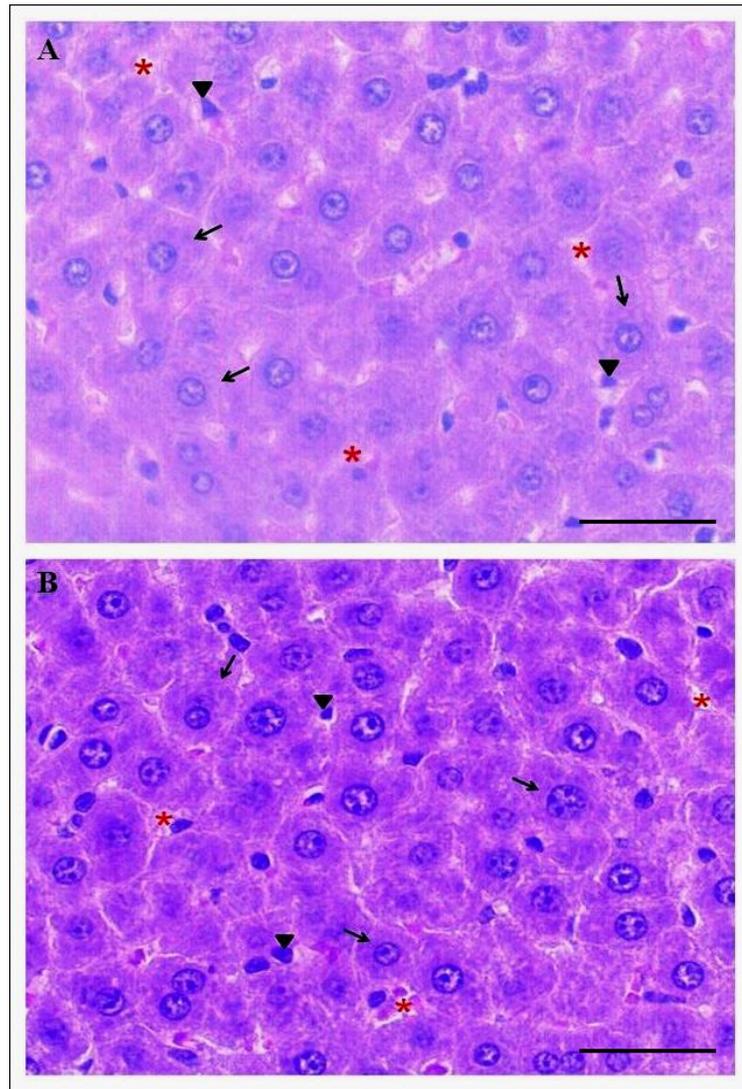


Figura 2. Fotomicrografia do fígado das ratas prenhes do grupo controle (A) e grupo tratado com 25mg/kg de MS-AU (B). Visualização dos hepatócitos (seta), os capilares sinusóides (asteriscos), células de Kupffer (cabeça da seta). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento 400X. Barras de escala = 100  $\mu$ m.

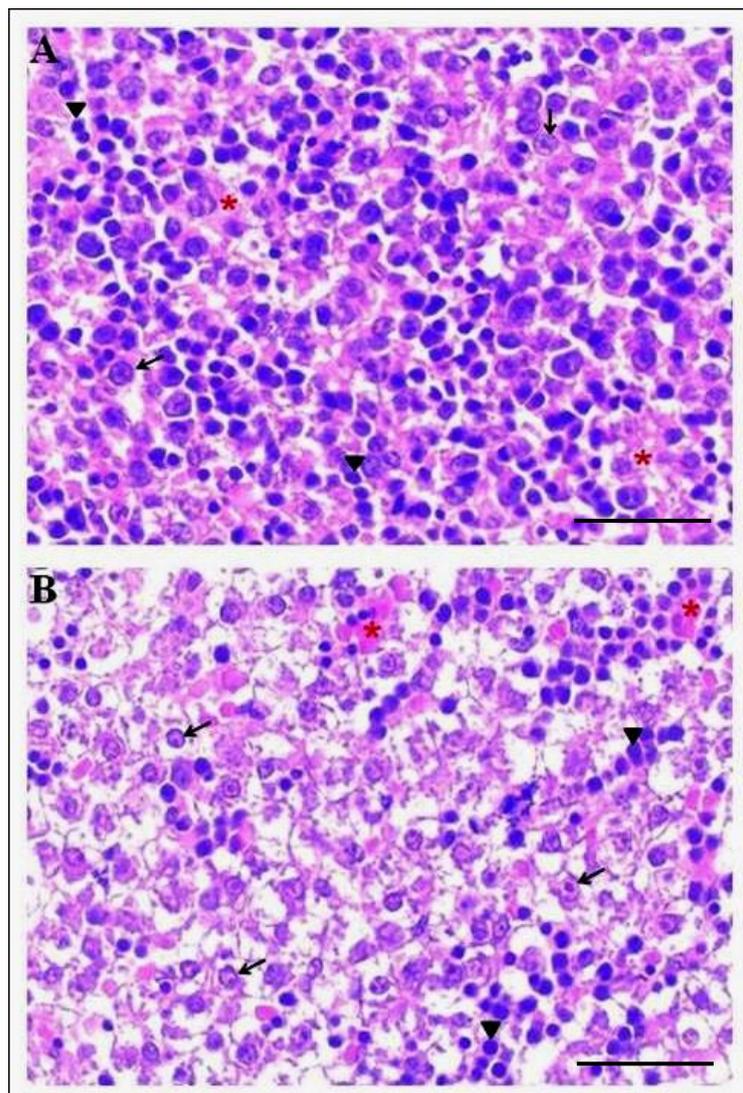


Figura 3. Fotomicrografia do fígado da prole do grupo controle (A) e grupo tratado com 25mg/kg de MS-AU (B). Visualização dos hepatócitos (seta), os capilares sinusóides (asteriscos), células da linhagem eritrocitária (cabeça da seta). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento 400X. Barras de escala = 100  $\mu$ m.

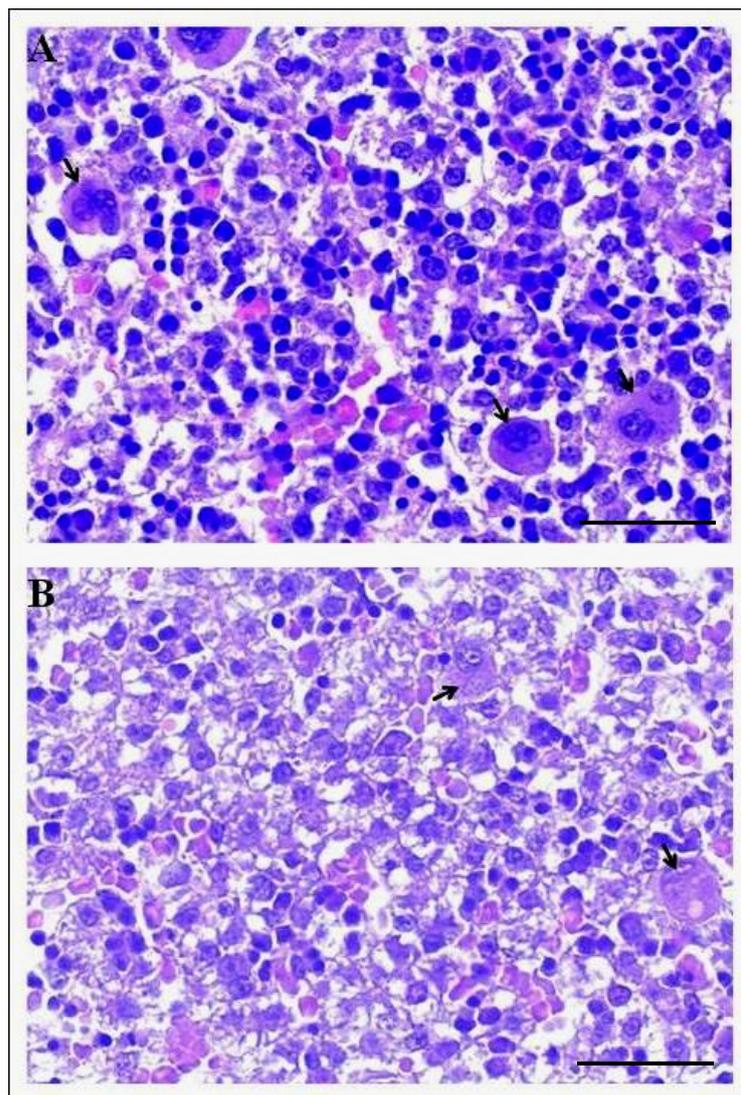


Figura 4. Fotomicrografia do fígado da prole do grupo controle (A) e grupo tratado com MS-AU (B). Visualização dos megacariócitos (seta). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento 400X. Barras de escala = 100  $\mu$ m.

## TABELAS

Tabela 1. Ganho de peso corporal durante a gestação e peso do fígado das ratas prenhes tratadas com o ácido úsnico encapsulado em microesferas de PLGA na dose de 25mg/kg.

Variáveis	Grupo controle (Média ± DP)	Grupo tratado (Média ± DP)	Significância do teste <i>t</i>
Peso corporal (g)	110,85 ± 10,03	86,12 ± 20,69*	0,025
Peso fígado (g)	12,36 ± 1,56	12,94 ± 1,35	0,504

\* diferem estatisticamente ao teste *t* a 5% ( $P < 0,05$ ). Dados expressos com média ± desvio padrão (DP).

Tabela 2. Análise dos marcadores da função hepática das ratas prenhes após dez dias de administração das MS-AU na dose de 25mg/kg durante a prenhez.

Variáveis	Grupo controle (Média ± DP)	Grupo tratado (Média ± DP)	Valores referenciais	Significância do teste <i>t</i>
AST (U/l)	153,00 ± 17,61	122,00 ± 44,10	61-210	0,141
ALT (U/l)	75,17 ± 7,60	68,83 ± 11,96	38-82	0,299

(AST): Aspartato Aminotransferase; (ALT): Alanina Aminotransferase. Dados expressos com média ± desvio padrão (DP).

Tabela 3. Efeito do ácido úsnico encapsulado em microesferas sobre os parâmetros fetais.

Variáveis	Grupo controle (Média ± DP)	Grupo tratado (Média ± DP)	Significância do teste <i>t</i>
Peso fetal (g)	4,85 ± 0,35	4,65 ± 0,41*	0,005
Peso fígado (g)	0,35 ± 0,06	0,33 ± 0,05	0,112

\* diferem estatisticamente ao teste *t* a 5% ( $P < 0,05$ ). Dados expressos com média ± desvio padrão (DP).

Tabela 4. Análise histomorfométrica do fígado das ratas prenhes expostas as MS-AU durante a prenhez.

Variáveis	Grupo controle (Média ± DP)	Grupo tratado (Média ± DP)	Significância do teste <i>t</i>
NH	35,48 ± 6,00	37,56 ± 7,94*	0,049
ACH	386,26 ± 85,83	392,42 ± 9,98	0,363
ANH	58,25 ± 13,00	55,89 ± 13,00*	0,026
NCK	13,97 ± 3,97	15,02 ± 5,06	0,121

(NH): Número de hepatócitos; (ACH): Área celular dos hepatócitos; (ANH): Área do núcleo dos hepatócitos; (NCK): Número de células de Kupffer. \* diferem estatisticamente ao teste *t* a 5% ( $P < 0,05$ ). Valores de área são expressos em  $\mu\text{m}^2$ . Dados expressos com média ± desvio padrão (DP).

Tabela 5. Análise histomorfométrica do fígado dos fetos provenientes das ratas prenhes tratadas com as MS-AU durante a organogênese.

Variáveis	Grupo controle (Média ± DP)	Grupo tratado (Média ± DP)	Significância do teste <i>t</i>
NH	37,85 ± 8,86	43,31 ± 7,17*	0,001
NM	0,09 ± 0,37	0,04 ± 0,26*	0,002

(NH): Número de hepatócitos; (NM): Número de megacariócitos. \* diferem estatisticamente ao teste *t* a 5% ( $P < 0,05$ ). Dados expressos com média ± desvio padrão (DP).

## CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos e o modelo experimental utilizado, é possível concluir que o ácido úsnico pode ser classificado como um agente teratogênico, como foi evidenciado em estudo anterior. No entanto, neste estudo a sua administração na forma encapsulada em microesferas de PLGA não gerou malformações fetais, como seria esperado para um teratogênico. Mas, foi capaz de causar um efeito fetotóxico em proporções menores do que a observada quando administrado na sua forma em suspensão durante o período da organogênese. Em suma, foi revelado que a liberação controlada do ácido úsnico a partir das microesferas de PLGA provocou pequenas alterações hepáticas, alterações essas, em proporções bem menores do que a constatada para o composto na sua forma em suspensão.

## REFERÊNCIAS

ABO-KHATWA, A. N.; AL-ROBAI, A. A.; AL-JAWHARI, D. A. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. **Natural toxins**, v. 4, n. 2, p. 96-102, 1996.

ARI, F.; CELIKLER, S.; ORAN, S.; BALIKCI, N.; OZTURK, S.; OZEL, M. Z.; OZYURT, D.; ULUKAYA, E. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on breast cancer cells. **Environmental toxicology**, v. 29, n. 7, p. 804-813, 2014.

BAČKOROVÁ, M.; BAČKOR, M.; MIKEŠ, J.; JENDŽELOVSKÝ, R.; FEDOROČKO, P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 37-44, 2011.

BARBATO, F.; LA ROTONDA, M. I.; MAGLIO, G.; PALUMBO, R.; & QUAGLIA, F. Biodegradable microspheres of novel segmented poly (ether-ester-amide) s based on poly ( $\epsilon$ -caprolactone) for the delivery of bioactive compounds. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1371-1378, 2001.

BARROCAS, P. M. C.; SANTOS, D. F. G.; FRREIRA, C. D.; COELHO, P. M. B. S.; OLIVEIRA, R. C. S.; VEIGA, F. J. B. Sistemas farmacêuticas gastrorretentivos flutuantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 325-334, 2007.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. **Fundamentos de Toxicologia**. Editora Atheneu, ed. 3, p. 59-71, 2008.

BASILE, A.; RIGANO, D.; LOPPI, S.; DI SANTI, A.; NEBBIOSO, A.; SORBO, S.; CONTE, B.; PAOLI, L.; DE RUBERTO, F.; MOLINARI, A. M.; ALTUCCI, L.; BONTEMPO, P. Antiproliferative, Antibacterial and Antifungal Activity of the Lichen *Xanthoria parietina* and Its Secondary Metabolite Parietin. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 4, p. 7861-7875, 2015.

BATTS, J. E.; CALDER, L. J.; BATTS, B. D. Utilizing stable isotope abundances of lichens to monitor environmental change. **Chemical Geology**, v. 204, n.3, p. 345-368, 2004.

BAZZO, C. G. Piroxicam e cetoprofeno utilizados como fármacos modelo em micropartículas de PHB e PHB/quitosana: preparação, caracterização e avaliação do perfil de liberação. Florianópolis. [Tese]. Santa Catarina: Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

BEECKEN, H.; GOTTSCHALK, E. M.; V GIZYCKI, U.; KRÄMER, H.; MAASSEN, D.; MATTHIES, H. G.; ZDHORSZKY, U. I. Orcein and litmus. **Biotechnic & histochemistry**, v. 78, n. 6, p. 289-302, 2003.

BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Editora Guanabara Koogan, ed. 2, p. 566-574, 2003.

BERKLAND, C.; KIPPER, M. J.; NARASIMHAN, B.; KYEKYON K. K.; PACK, D. W. Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 94, n. 1, p. 129-141, 2004.

BOMFIM, R. R.; ARAUJO, A. A. S.; CUADROS-ORELLANA, S.; MELO, M. G. D.; QUINTANS, L. J.; CAVALCANTI, S. C. H. Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 580-584, 2009.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, n. 1, p. 1-9, 1995.

BRISDELLI, F.; PERILLI, M.; SELITRI, D.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; NICOLETTI, M.; BOZZI, A.; AMICOSANTE, G.; CELENZA, G. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 3, p. 431-437, 2013.

BROKSA, B.; STURDIKOVA, M.; PRONAYOVA, N.; LIPTAJ, T. (-)-Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. **Pharmazie**, v. 51, n. 3, 195–196, 1996.

BRUNO, M.; TRUCCHI, B.; BURLANDO, B.; RANZATO, E.; MARTINOTTI, S.; AKKOL, E. K.; SUNTAR, I.; KELES, H.; VEROTTA, L. (b)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1834-1843, 2013.

BUGNI, T. S.; ANDJELIC, C. D.; POLE, A. R.; RAI, P.; IRELAND, C. M.; BARROWS, L. R. Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. **Fitoterapia**, v. 80, n. 5, p. 270-273, 2009.

BURLANDO, B.; RANZATO, E.; VOLANTE, A.; APPENDINO, G.; POLLASTRO, F.; VEROTTA, L. Antiproliferative Effects on Tumour Cells and Promotion of Keratinocyte Wound Healing by Different Lichen Compounds. **Planta medica**, v. 75, p. 607-613, 2009.

BUSTINZA, L. F. Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas y antifúngicas del ácido úsnico y de algunos de sus derivados. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 10, n. 1, p. 151-175, 1951.

CAMPANELLA, L., DELFINI, M., ERCOLE, P., IACOANGELI, A., & RISULEO, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. **Biochimie**, v. 84, n. 4, p. 329-334, 2002.

CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, P.; DE CICCO-NARDONE, F.; ALESIANI, O.; ROSSIELLO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, n. 8, p. 667-672, 1997.

CARRAZONI, E. D. Estudo químico de liquens VIII: isolamento dos constituintes da *Cladonia sprucey*. **Revista Química e Tecnologia**, v. 2, n. 1, p. 32-34, 2003.

CARVALHO, E. A.; PEREIRA, E. C. G.; SILVA, N. H.; FIGUEIREDO, R. Effects of usnic acid from *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: na ultrastructural study. **Micron, Estados Unidos**, v. 36, n. 1, p. 155-161, 2005.

CETIN, H.; TUFAN-CETIN, O.; TURK, A. O.; TAY, T.; CANDAN, M.; YANIKOGLU, A.; SUMBUL, H. Insecticidal activity of major lichen compounds,(-)-and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. **Parasitology research**, v. 102, n. 6, p. 1277-1279, 2008.

CETIN, H.; TUFAN-CETIN, O.; TURK, A. O.; TAY, T.; CANDAN, M.; YANIKOGLU, A.; SUMBUL, H. Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae). **Natural product research**, v. 26, n. 4, p. 350-355, 2012.

CHIEN, Y. W.; LIN, S. Optimisation of treatment by applying programmable rate-controlled drug delivery technology. **Clinical pharmacokinetics**, v.41, n.15, p. 1267-1300, 2002.

CHEN, S.; DOBROVOLSKY, V. N.; LIU, F.; WU, Y.; ZHANG, Z.; MEI, N.; GUO, L. The role of autophagy in usnic acid-induced toxicity in hepatic cells. **Toxicological Sciences**, v. 142, n. 1, p. 33-44, 2014.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G. A. review on usnic acid, an interesting natural compound, **Naturwissenschaften**. v. 89, n. 4, p.137-146, 2002.

COUTINHO, A.P. Métodos e Técnicas em Citologia e Fisiologia - algumas notas sobre diversas técnicas utilizadas nas aulas teórico-práticas - 4ª parte. Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2008.

DE CARVALHO, E. A. B.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Mícron**, v. 36, n. 2, p. 155-161, 2005.

DE OLIVEIRA, M. F. F.; PEREIRA, E. C.; DE LIMA, E. S.; DA SILVA, N. H.; FIGUEIREDO, R. C. B. Influência de poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE)

utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1072-1076, 2007.

EINARSDÓTTIR, E.; GROENEWEG, J.; BJÖRNSDÓTTIR, G. G.; HARETHARDOTTIR, G.; OMARSDÓTTIR, S.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; OGMUNSDOTTIR, H. M. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. **Planta medica**, v. 76, n. 10, p. 969-974, 2010.

ELIX, J. A. Biochemistry and secondary metabolites. **Lichen biology**, v. 1, p. 154-180, 1996.

FERRAZ, M. S. Avaliação da Toxicidade Oral do Ácido úsnico Microencapsulado [dissertação]. Recife: Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

FIALHO, S. L.; REGO, M. G. B.; CARDILLO, J. A.; SIQUEIRA, R.; JORGE, R.; CUNHA JÚNIOR, A. S. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 6, p. 891-6, 2003.

FOURNET, A; FERREIRA, M. E; ARIAS, A. R; ORTIZ, S. T; INCHAUSTI, A; YALUFF, G; QUILHOT, W; FERNANDEZ, E; HIDALGO, M. E. Activity of compounds isolated from chilean lichens against experimental cutaneous Leishmaniasis. **Comparative Biochemistry and Physiology, Elmsford**, v. 116, n. 1, p. 51-54, 1997.

FRANCOLINI, I.; NORRIS, P.; PIOZZI, A.; DONELLI, G.; STOODLEY, P. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4360-4365, 2004.

FRAVEAU, U. J.; RYU, T.; BRAUNSTEIN, M. L. G.; ORSHANSKY, G.; PARK, S. S.; CPPDY, G. L.; LOVE, L. A.; FONG, T. L., Severe hepatotoxicity associated with the dietary supplement lipokinetix, **Annals of Internal Medicine**. v. 136, n. 8, p. 590-595, 2002.

FRANKOS, V. N. T. P. nomination for usnic acid and *Usnea barbata* herb. Food and Drug Administration, Division of Dietary Supplement Programs. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/ChemBackground/ExSumPdf/UsnicAcid.pdf>. 2005.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International journal of pharmaceutics**, v. 282, n. 1, p. 1-18, 2004.

GONZALES, J.; BENAVIDES, V.; ROJAS, R.; PINO, J. Efecto embriotóxico y teratogénico de *Ruta chalepensis* L.«ruda», en ratón (*Mus musculus*). **Revista peruana de biología**, v. 13, n. 3, p. 223-226, 2007.

GRUMEZESCU, V.; HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M.; SOCOL, G.; FICAI, A.; VASILE, B. S.; MOGOSANU, G. D. Usnic acid-loaded biocompatible magnetic PLGA-PVA microsphere thin films fabricated by MAPLE with increased resistance to staphylococcal colonization. **Biofabrication**, v. 6, n. 3, p. 035002, 2014.

GUO, L.; SHI, Q.; FANG, J. L.; MEI, N.; ALI, A. A.; LEWIS, S. M.; FRANKOS, V. H. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 26, n. 4, p. 317-338, 2008.

HALAMA, P.; VAN, H. C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. **BioControl**, v. 49, n. 1, p. 95-107, 2004.

HALE, M. E. **The Biology of Lichens**. London: Edward Arnold Pub, ed. 3, p. 90, 1983.

HAN, D.; MATSUMARU, K.; RETTORI, D.; KAPLOWITZ, N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 439-451, 2004.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2002.

HANSEN, W. F.; YANKIWITZ, Therapy for medical discords during pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 45, n. 1, p. 136-152, 2002.

HECKER, M.; VOLP, A. Tolerability of icelandic moss lozenges in upper respiratory tract diseases-multicentric drug monitoring study with 2, 143 children. **Forschende Komplementarmedizin und Klassische Naturheilkund**, v. 11, n. 2, p. 76-82, 2004.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. Química dos líquens-Divulgação. **Química. Nova**, v. 21, n.1, p. 110-125, 1998.

HONDA, N. K.; PAVAN, F. R.; COELHO, R. G.; DE ANDRADE LEITE, S. R.; MICHELETTI, A. C.; LOPES, T. I. B.; LEITE, C. Q. F. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 328-332, 2010.

HUNECK, S. The significance of lichens and their metabolites. **Naturwissenschaften**, v. 86, n. 12, p. 559-570, 1999.

INGOLFSDOTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, n. 7, p. 729-736, 2002.

IVANOVA D.; D. IVANOV. Ethnobotanical use of Lichens: Lichens for Food Review. **Scripta Scientifica Medica**. v. 41, n. 1, p. 11-16, 2009.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v.21, n. 23, p.2475-2490, 2000.

JAIN, R. A.; RODEES, C. T.; RAILKAR, A.M.; WASEEM MALICK, A.; SHAH, N. H. Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres: effect of various formulation variables. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 2, p. 257-262, 2000.

JIN, J.; DONG, Y.; HE, L. The study on skin wound healing promoting action of sodium usnic acid. **Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials**, v. 28, n. 2, p. 109-111, 2005.

JOSEPH, A.; LEE, T.; MOLAND, C. L.; BRANHAM, W. S.; FUSCOE, J. C.; LEAKEY, J. E.; ALLABEN, W. T.; LEWIS, S. M.; ALI, A. A.; DESAI, V. G. Effect of (p)-usnic acid on mitochondrial functions as measured by mitochondria-specific oligonucleotide microarray in liver of B6C3F1 mice. **Mitochondrion**, v. 9, n. 2, p. 149-158, 2009.

JOULAIN, D.; TABACCHI, R. Lichen extracts as raw materials in perfumery. part 1: oakmoss. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, n. 2, p. 49-61. 2009.

KÄFFER, M. I.; MARTINS, S. D. A.; VARGAS, V. M. F. Air quality biomonitoring using lichen in the city of Porto Alegre, RS, Brazil. **FEPAM em Revista**, v. 6, n. 2, p. 4-12, 2012.

KAWANO, D. F.; PEREIRA, L. R. L.; UETA, J. M.; FREITAS, O. Acidentes com os medicamentos: como minimizá-los. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v. 4, n. 4, p. 487-95, 2006.

KOSANIĆ, M.; RANKOVIĆ, B.; VUKOJEVIĆ, J. Antioxidant properties of some lichen species. **Journal of food science and technology**, v. 48, n. 5, p. 584-590, 2011.

KOTWAL, V. B.; SAIFEE, M.; INAMDAR, N.; BHISE, K. Biodegradable polymers: Which, when and why?. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 5, p. 616, 2007.

RANKOVIĆ, B.; KOSANIĆ, M.; STANOJKOVIĆ, T.; VASILJEVIĆ, P.; MANOJLOVIĆ, N. Biological activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 11, p. 14707-14722, 2012.

KOHLHARDT-FLOEHR C.; BOEHM F.; TROPPE S.; LADEMANN J.; TRUSCOTT T. G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 101, n.1, p. 97–102, 2010.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; JÓNSDÓTTIR, E.; ÖGMUNDSDÓTTIR H. M.; INGÓLFSDÓTTIR, K. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 24, n. 5, p. 539-543, 2005.

LACHIONDO, F. B. Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas de la bacitracina. In: **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 9, n. 1, p. 583-590, 1990.

LEMONICA, I. P.; OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. **Editora Atheneu**, v. 3, p. 59-71, 2008.

LIU, X.; SUN, Q.; WANG, H.; ZHANG, L.; & WANG, J. Y. Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. **Biomaterials**, v. 26, n. 1, p. 109-115, 2005.

LIU, W. H.; SONG, J. L.; LIU, K.; CHU, D. F.; LI, Y. X. Preparation and in vitro and in vivo release studies of Huperzine A loaded microspheres for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Controlled Release**, v. 107, n. 3, p. 417-427, 2005.

LLANO, G. A. Economic uses of lichens. **Smithsonian Institution Publication**, v. 4040, n. 1, p. 385-422, 1951.

LO, W. Y.; FRIEDMAN, M. Teratogenicity of recently induced medication in human pregnancy. **Obstetrics e Gynecology**, v. 100, n. 3, p. 464-473, 2002.

LUCARINI, R.; TOZATTI, M. G.; DE OLIVEIRA SALLOUM, A. I.; CROTTI, A. E.; SILVA, M. L.; GIMENEZ, V. M.; CUNHA, W. R. Antimycobacterial activity of *Usnea steineri* and its major constituent (+)-usnic acid. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 20, p. 4636-4639, 2014.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; ROCA, M. F. L.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S. ROLIM-NETO, P. J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, vol. 26, n. 5, p. 784-793. 2007.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143, 2005.

MAIA, M. B. S.; SILVA, N. H.; SILVA, E. F.; CATANHO, M. T. J.; SCHULER, A. R. P.; PEREIRA, E.C. Anticonceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from lichen *Cladina dendroides* (des. Abb) AHTI. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 259-264, 2002.

MANOJLOVIC, N. T.; VASELIJEVIC, P. J.; NIKOLIC, D.; DUŠANOVIC, G. B.; NAJMAN, S. HPLC analysis and cytotoxic potential of extracts from the lichen, *Thamnolia vermicularis var. subuliformis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 9, p. 817-823. 2010.

MARTINELLI, A.; BAKRY, A.; D'ILARIO, L.; FRANCOLINI, I.; PIOZZI, A.; TARESCO, V. Release behavior and antibiofilm activity of usnic acid-loaded carboxylated poly (l-lactide) microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 2, p. 415-423, 2014.

MARTINS, M. C. B.; LIMA, M. J. G. D.; SILVA, F. P.; AZEVEDO-XIMENES, E.; SILVA, N. H. D.; PEREIRA, E. C. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 53, n. 1, p. 115-122, 2010.

MARTINS, M. C. B. Aplicações Biotecnológicas de Compostos Obtidos dos Líquens. [Tese]. Recife: Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

MELO, M. G. D.; ARAUJO, A. A. S.; ROCHA, C. P. L.; ALMEIDA, E. M. S. A.; SIQUEIRA, R. S.; BONJARDIM, L. R.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Purification, Physicochemical Properties, Thermal Analysis and Antinociceptive Effect of Atranorin Extracted from *Cladonia Kalbii*. **Biological & Pharmaceutical**, v. 31, n. 10, p. 1977-1980, 2008.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1, p. 21-35, 2001.

MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemicals, drugs and biological**. 11th ed., RAHWAY MERCK & CO, p. 1606, 1989.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 65, n. 3-4, p. 157-173, 2010.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v. 65, n. 2, p. 171-5, 2002.

MONTEIRO, M. H. D.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; FELZENSZWALB, I.; CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 149-157, 2001.

MORRIS KUPCHAN, S.; KOPPERMAN, H. L. L-Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 31, n. 6, p. 625-625, 1975.

MOTA FILHO, F. D. O.; PEREIRA, E. C.; LIMA, E. S. D.; SILVA, N. H. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Influence of atmospheric pollutants in Belo Jardim (PE) using *Cladonia verticillaris* (lichen) as biomonitor. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1072-1076, 2007.

MOTTA, L. S. G. Toxicidade aguda, neurotoxicidade reprodutiva e embriotoxicidade do chá ayahuasca (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*) em ratas wistar. **[Dissertação]**. Brasília: Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, 2014.

MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 56, n. 1-2, p. 9-16, 2001.

MUNDARGI, R. C.; BABU, V. R.; RANGASWAMY, V.; PATEL, P.; AMINABHAVI, T. M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 193-209, 2008.

OKSANEN, L. Ecological and Biotechnological aspects of lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 723-734, 2006.

NITHYANAND, P.; SHAFREEN, R. M. B.; MUTHAMIL, S.; PANDIAN, S. K. Usnic acid inhibits biofilm formation and virulent morphological traits of *Candida albicans*. **Microbiological research**, v. 179, n. 1, p. 20-28, 2015.

NUNES, P. S.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L.; CAVALCANTE, D. R.; DANTAS, M. D.; CARDOSO, J. C.; BEZERRA, M. S.; ARAÚJO, A. A. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **BioMed Research International**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 59-65, 2006.

OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K.; YAMAZAKI, M.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. **Planta Medica**. v. 61, n. 2, p. 113-115, 1995.

O'NEILL, M. A., MAYER, M., MURRAY, K. E., ROLIM-SANTOS, H. M. L., SANTOS-MAGALHAES, N. S., THOMPSON, A. M., & APPLEYARD, V. C. L. Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells?. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 659-664, 2010.

PARAMERA, E. I.; KOMTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Microencapsulation of curcumim in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 892-902. 2011.

PAUDEL, B.; BHATTARAI, H. D.; LEE, H. K.; OH, H.; SHIN, H. W.; YIM, J. H. Antibacterial activities of Ramalin, usnic acid and its three derivatives isolated from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 65, n. 1-2, p. 34-38, 2010.

PEREIRA, E. C. Biologia de Líquens. Recife: **Departamento de Ciências Geográficas**, Núcleo de Estudos do Meio Ambiente (NEMA/UFPE), p. 31, 2002.

PERRY, N. B.; BENN, M. H.; BRENNAN, N. J.; BURGESS, E. J.; ELLISS, G.; GALLOWAY, D. J.; LORIMER, S. D.; TANGNEY, R. S. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of new zealand lichens. **Lichenologist**, v. 31, n. 6, p. 627-636, 1999.

PETITTI, M.; VANNI, M.; BARRESI, A.A. Controlled release of drug encapsulated as a solid core: Theoretical model and sensitivity analysis. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 86, n. 11, p. 1294-1300, 2008.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

PODTEROB P. Chemical Composition of Lichens and their Medical Applications. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 42, n.10, p. 32-38, 2008.

POMPILIO, A.; POMPONIO, S.; DI VINCENZO, V.; CROCETTA, V.; NICOLETTI, M.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.A.; Di Bonaventura, G. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. **Future microbiology**, v. 8, n. 2, p. 281-292, 2013.

PLICHET, A. Usnic acid from lichens in therapy of tuberculosis. **Presse Medica**, v. 63, n. 17, p. 350, 1995.

PRAMYOTHIN, P.; JANTHASOOT, W.; PONGNIMITPRASERT, N.; PHRUKUDOMC, S.; RUANGRUNGSI, N.; Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. **Journal Ethnopharmacol**. v.90, n. 2, p. 381-387, 2004.

RABELO, T. K.; ZEIDA´N-CHULIA, F.; VASQUES, L. M.; DOS SANTOS, J. P. A.; DA ROCHA, R. F.; PASQUALI, M. A. D. B.; RYBARCZYK-FILHO, J.L.; ARAÚJO, A. A. S.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Toxicologia In Vitro**. v. 26, n. 2, p. 304-314, 2012.

RANKOVIC, B. R.; KOSANIC, M. M.; STANOJKOVIC, T. P. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 97, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, E. S. **Biologia Vegetal**. Editora Guanabara Koogan LTDA. v. 7, p. 306, 2010.

RIBEIRO-COSTA, R. M.; ALVES, A. J.; SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; GONÇALVES, E. C. P.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 4, p. 371-384, 2004.

RIBEIRO-COSTA, R. M.; CUNHA, M. R.; GONGORA-RUBIO, M. R.; MICHALUART-JÚNIOR, P.; RÉ, M. I. Preparation of protein-loaded-PLGA microspheres by an emulsion/solvent evaporation process employing LTCC micromixers. **Powder Technology**, v.190, n. 1, p.107-111, 2009.

SAHIB, K.; KULARATNE, N. S.; KUMAR, S.; KARUNARATNE, V. Effect of (+)-usnic acid on the shot-hole borer (*Xyleborus fornicatus* Eichh) of tea. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 36, n. 4, p. 335-336, 2008.

SAHU, S. C.; AMANKWA-SAKYI, M.; O'DONNELL, M. W.; SPRANDO, R. L. Effects of usnic acid exposure on human hepatoblastoma HepG2 cells in culture. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 9, p. 722-730, 2012.

SAIKI, M.; FUGA, A.; ALVES, E. R.; VASCONCELLOS, M. B. A.; MARCELLI, M. P. Biomonitoring of the atmospheric pollution using lichens in the metropolitan area of São Paulo city, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v, 127, n. 1, p. 213-219, 2007.

SANCHEZ W.; MAPLE J. T.; BURGART L. J.; KAMATH P. S.; Severe hepatotoxicity associated with use of a dietary suplement containig usnic acid, **Mayo Clinic Proceedings**. v. 81, n. 4, p. 541-544, 2006.

SANTOS, N. P.; PEREIRA, E. C.; LIMA, R. M. C.; HONDA, N. K.; SILVA, M. P. C.; SILVA, N. H. Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *Cladonia verticillaris* (líquen). **Série Ciências Biológicas**, v. 1, n. 2, p. 23-43, 1997.

SANTOS, N. P. S.; NASCIMENTO, S. C.; WANDERLEY, M. S. O.; PONTES-FILHO, N. T.; DA SILVA, J. F.; DE CASTRO, C. M. M. B.; PEREIRA, E. C.; DA SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanoencapsulation of usnic acid: Na

attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 2, p. 154-160, 2006.

SCHULER-FACCINI, L.; SCHULER-FACCINI, L.; LEITE, J. C. L.; SANSERINO, M. T. V.; PERES, R. M. Avaliação de teratógenos na população brasileira. **Ciências Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 65-71, 2002.

SEGATORE, A. B.; BELLIO, P.; SETACCIA, D.; BRISDELLI, F.; PIOVANOB, M.; GARBARINOB, J. A.; NICOLETTI, M.; AMICOSANTEA, G.; PERILLI, M.; CELENZAA, G. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and  $\Delta E$  model methods. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3, p. 341-347, 2012.

SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; MALMONGE, S. M.; SOUTO, E. B. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 361-368, 2011.

SILVA, C. R. Avaliação da Embriotoxicidade de Ácido Úsnico Obtido de *Cladonia Substellata* frente às ratas prenhez Wistar [monografia]. Recife: **Centro de Ciências Biológicas**, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

SILVA, C. R. Toxicologia do Ácido Úsnico obtido da *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o ciclo reprodutivo das fêmeas Wistar. [dissertação]. Recife: Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; COL. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade Fderal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Catarina, ed. 2, 2000.

SINGTHONG, J.; OONSIVILAI, R.; OONMETTA-AREE, J.; NINGSANOND, S. Bioactive Compounds and Encapsulation of Yanang (*Tiliacora Triandra*) Leaves. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 11, n. 3, p. 76, 2014.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 1-8, 2008.

SHTRO, A. A.; ZARUBAEV, V. V.; LUZINA, O. A.; SOKOLOV, D. N.; KISELEV, O. I.; SALAKHUTDINOV, N. F. Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 24, p. 6826-6836, 2014.

SISODIA, R.; VERMA, S.; RANI, A.; DUREJA, P. Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. **Natural product research**, v. 27, n. 23, p. 2235-2239, 2013.

SOARES, A. Q.; OLIVEIRA, L. F.; RABELO, D.; SOUZA, A. R. Polímeros Biodegradáveis: Novas Perspectivas Para As Ciências Farmacêuticas. **Revista Eletrônica De Farmácia Suplemento**, v. 2, n. 2, p. 202-205, 2005.

SOARES, J. F.; ILHA, R.; ZAZYCKI, M. A.; BERNARDES, R. C. C.; MORTARI, S. R.; DE VASCONCELLOS, N. J. S. Absorção de chumbo antrópico por populações de líquens do gênero *Usnea* em área industrial. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 5, p. 3831-3836, 2014.

SOKOLOV D. N.; ZARUBAEV V. V.; SHTRO A. A.; POLOVINKA M. P.; LUZINA O. A.; KOMAROVA N. I. , SALAKHUTDINOV N. F., KISELEV O. I. Anti-viral activity of (-)/(+) usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 23, p. 7060-7064, 2012.

SONG, Y.; DAI, F.; ZHAI, D.; DONG, Y.; ZHANG, J.; LU, B.; LUO, J.; LIU, M.; YI, Z. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. **Angiogenesis**, v. 15, n. 3, p. 421-432, 2012.

SU, Z. Q.; MO, Z. Z.; LIAO, J. B.; FENG, X. X.; LIANG, Y. Z.; ZHANG, X.; LAI, X. P. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory

responses and oxidative stress. **International immunopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 371-378, 2014.

SUWALSKY, M.; JEMIOLA-RZEMINSKA, M.; ASTUDILLO, C.; GALLARDO, M. J.; STAFORELLI, J. P.; VILLENA, F.; STRZALKA, K. An in vitro study on the antioxidant capacity of usnic acid on human erythrocytes and molecular models of its membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 11, p. 2829-2838, 2015.

TANAKA, P. P.; ESTEBE, J. P.; CAMPOS, R.; CHEVANNE, F.; CORRE, P. L.; TENÓRIO, S. B.; TORRES, M. F. Preparação, caracterização e avaliação *in vitro* de microesferas de bupivacaina em excesso enantiomérico de 50% (S75-R25). **Revista Brasileira Anestesiologia**, v 58, n. 1, p. 15-22, 2008.

TIWARI, P.; RAI, H.; UPRETI, D. K. U.; TRIVEDI, S.; SHUKLA, P. Antifungal activity of a common Himalayan foliose lichen *Parmotrema tinctorum* Hale. **Natural Science**, v. 9, n. 9, p. 167-171. 2011.

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; KANNAPPA-REDDY, M.; PARVATHAVARTHINI, S., KUNDU, A. B., SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia** v. 71, n. 5, p. 564–566, 2000.

VILLANOVA, J. C.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WANG, L. S.; NARUI, T.; HARADA, H.; CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L. Ethnic uses of lichens in Yunnan, China. **Bryologist**, v. 104, n. 3, p. 345-349, 2001.

WEBSTER, W. S.; FREEMAN, J. A. Is this drug safe in pregnancy? **Reproductive toxicology**, v.15, n. 6, p. 619-629, 2001.

XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. **Biologia de líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p. 624, 2006.

YANG, H. Y.; VAN DIJK, M.; LICHT, R.; BEEKHUIZEN, M.; VAN RIJEN, M.; JANSTÅL, M. K.; CREEMERS, L. B. Applicability of a Newly Developed Bioassay for Determining Bioactivity of Anti-Inflammatory Compounds in Release Studies– Celecoxib and Triamcinolone Acetonide Released from Novel PLGA-Based Microspheres. **Pharmaceutical research**, v. 32, n. 2, p. 680-690, 2015.

ZHENG, G.; TAO, J. Anti-inflammatory effects and mechanisms of usnic acid. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater**, v. 26, n. 5, p. 955-959, 2011.

## ANEXOS



### Normas da revista:

Os **Anais da Academia Brasileira de Ciências** são a publicação oficial da Academia Brasileira de Ciências, sendo publicada de forma ininterrupta desde 1929, tornando-a a mais antiga revista científica brasileira. Antes dessa data, a revista era chamada Revista da Sociedade Brasileira de Ciências (1917/19), depois Revista de Ciências (1920/21/22/26/28), sempre com publicação irregular. Ainda nessa fase, vale destacar o artigo publicado, em 1926, por Einstein, sobre a teoria da luz.

A revista **ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS (ANNALS OF THE BRAZILIAN OF SCIENCES)** encoraja fortemente as submissões online. Os trabalhos para publicação deverão ser submetidos através do site de submissão online (<http://aabc.abc.org.br>).

As instruções devem ser lidas cuidadosamente e seguidas integralmente. Desta forma, a avaliação e publicação de seu artigo poderão ser feitas com mais eficiência e rapidez. Os editores reservam-se o direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Os artigos devem ser escritos em inglês claro e conciso.

### OBJETIVO E POLÍTICA EDITORIAL

Todos os artigos submetidos devem conter pesquisa original e ainda não publicada ou submetida para publicação. O primeiro critério para aceitação é a qualidade científica. O uso excessivo de abreviaturas ou jargões deve ser evitado, e os artigos devem ser compreensíveis para uma audiência tão vasta quanto possível. Atenção especial deve ser dada ao Abstract, Introdução e Discussão, que devem nitidamente chamar a atenção para a novidade e importância dos dados relatados. A não observância desta recomendação poderá resultar em demora na publicação ou na recusa do artigo.

Os textos podem ser publicados como uma revisão, um artigo ou como uma breve comunicação. A revista é trimestral, sendo publicada nos meses de março, junho, setembro e dezembro.

## **TIPOS DE TRABALHOS**

**Revisões.** Revisões são publicadas somente a convite. Entretanto, uma revisão pode ser submetida na forma de breve carta ao Editor a qualquer tempo. A carta deve informar os tópicos e autores da revisão proposta e declarar a razão do interesse particular do assunto para a área.

**Artigos.** Sempre que possível, os artigos devem ser subdivididos nas seguintes partes: 1. Página de rosto; 2. Abstract (escrito em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); 3. Introdução; 4. Materiais e Métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Agradecimentos quando necessário; 8. Resumo e palavras-chave (em português - os autores estrangeiros receberão assistência); 9. Referências. Artigos de algumas áreas, como Ciências Matemáticas, devem observar seu formato usual. Em certos casos pode ser aconselhável omitir a parte (4) e reunir as partes (5) e (6). Onde se aplicar, a parte de Materiais e Métodos deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em humanos ou as normas seguidas para a manutenção e os tratamentos experimentais em animais.

**Breves comunicações:** Breves comunicações devem ser enviadas em espaço duplo. Depois da aprovação não serão permitidas alterações no artigo, a fim de que somente correções de erros tipográficos sejam feitas nas provas. Os autores devem enviar seus artigos somente

em versão eletrônica.

## PREPARO DOS ARTIGOS

Os artigos devem ser preparados em espaço duplo. Depois de aceitos nenhuma modificação será realizada, para que nas provas haja somente correção de erros tipográficos.

Tamanho dos artigos. Embora os artigos possam ter o tamanho necessário para a apresentação concisa e discussão dos dados, artigos sucintos e cuidadosamente preparados têm preferência tanto em termos de impacto quando na sua facilidade de leitura.

Tabelas e ilustrações. Somente ilustrações de alta qualidade serão aceitas. Todas as ilustrações serão consideradas como figuras, inclusive desenhos, gráficos, mapas, fotografias e tabelas com mais de 12 colunas ou mais de 24 linhas (máximo de figuras gratuitas: cinco figuras). A localização provável das figuras no artigo deve ser indicada.

Figuras digitalizadas. As figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: 1. Desenhos e ilustrações devem ser em formato .PS/.EPS ou .CDR (Postscript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; 2. Imagens ou figuras em meio tom devem ser no formato .TIF e nunca inseridas no texto; 3. Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; 4. Em princípio, as figuras devem ser submetidas no tamanho em que devem aparecer na revista, i.e., largura de 8 cm (uma coluna) ou 12,6 cm (duas colunas) e com altura máxima para cada figura menor ou igual a 22 cm. As legendas das figuras devem ser enviadas em espaço duplo e em folha separada. Cada dimensão linear das menores letras e símbolos não deve ser menor que 2 mm depois da redução. Somente figuras em preto e branco serão aceitas. 5. Artigos de Matemática, Física ou Química podem ser digitados em Tex, AMS-Tex ou Latex; 6. Artigos sem fórmulas matemáticas podem ser enviados em .RTF ou em WORD para Windows.

Página de rosto. A página de rosto deve conter os seguintes itens: 1. Título do artigo (o título deve ser curto, específico e informativo); 2. Nome (s) completo (s) do (s) autor (es); 3. Endereço profissional de cada autor; 4. Palavras-chave (4 a 6 palavras, em ordem alfabética); 5. Título abreviado (até 50 letras); 6. Seção da Academia na qual se enquadra o artigo; 7. Indicação do nome, endereço, números de fax, telefone e endereço eletrônico do autor a quem deve ser endereçada toda correspondência e prova do artigo.

Agradecimentos. Devem ser inseridos no final do texto. Agradecimentos pessoais devem preceder os agradecimentos a instituições ou agências. Notas de rodapé devem ser evitadas; quando necessário, devem ser numeradas. Agradecimentos a auxílios ou bolsas, assim como agradecimentos à colaboração de colegas, bem como menção à origem de um artigo (e.g. teses) devem ser indicados nesta seção.

Abreviaturas. As abreviaturas devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto no caso de abreviaturas padrão e oficial. Unidades e seus símbolos devem estar de acordo com os aprovados pela ABNT ou pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

Referências. Os autores são responsáveis pela exatidão das referências. Artigos publicados e aceitos para publicação (no prelo) podem ser incluídos. Comunicações pessoais devem ser autorizadas por escrito pelas pessoas envolvidas. Referências a teses, abstracts de reuniões, simpósios (não publicados em revistas indexadas) e artigos em preparo ou submetidos mas ainda não aceitos, podem ser citados no texto como (Smith et al. unpublished data) e não devem ser incluídos na lista de referências.

As referências devem ser citadas no texto como, por exemplo, (Smith 2004), (Smith and Wesson 2005) ou, para três ou mais autores, (Smith et al. 2006). Dois ou mais artigos do mesmo autor no mesmo ano devem ser distinguidos por letras, e.g. (Smith 2004a), (Smith 2004b) etc. Artigos com três ou mais autores com o mesmo primeiro autor e ano de publicação também devem ser distinguidos por letras.

As referências devem ser listadas em ordem alfabética do primeiro autor sempre na ordem do sobrenome XY no qual X e Y são as iniciais. Se houver mais de 10 autores, use o primeiro seguido de et al. As referências devem ter o nome do artigo. Os nomes das revistas devem ser abreviados. Para as abreviações corretas, consultar a listagem de base de dados na qual a revista é indexada ou consulte a World List of Scientific Periodicals. A abreviatura para os Anais da Academia Brasileira de Ciências é An Acad Bras Cienc. Os seguintes exemplos são considerados como guia geral para as referências.

#### *Artigos*

ALBE-FESSARD D, CONDES-LARA M, SANDERSON P AND LEVANTE A. 1984a.  
Tentative explanation of the special role played by the áreas of paleospinothalamic

projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

ALBE-FESSARD D, SANDERSON P, CONDES-LARA M, DELANDSHEER E, GIUFFRIDA R AND CESARO P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

KNOWLES RG AND MONCADA S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

PINTO ID AND SANGUINETTI YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

#### *Livros e Capítulos de Livros*

DAVIES M. 1947. An outline of the development of Science, Athinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

PREHN RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5, Philadelphia Proceedings ....., Philadelphia: J.B. Lippincott, p. 97-104.

UYTENBOGAARDT W AND BURKE EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

WOODY RW. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of Polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

#### *Outras Publicações*

INTERNATIONAL KIMBERLITE CONFERENCE, 5, 1991. Araxá, Brazil. Proceedings ... Rio de Janeiro: CPRM, 1994, 495 p.

SIATYCKI J. 1985. Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 55 p. Preprint n. 600.

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 24 de outubro de 2013.

Ofício nº 641/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.º Nicacio Henrique da Silva**  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Bioquímica e Fisiologia  
Processo nº 23076.029828/2013-94

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Estudo da Embriotoxicidade de Ácido Úsnico Livre e Encapsulado em Ratos Wistar**".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério, Fazenda, Aviário, Biotério do Departamento de Nutrição; Animais: Ratos Wistar; Idade: 90 dias; Peso: 300g. Sexo: macho e fêmea; Nº total de Animais: 45.

Atenciosamente,

Prof.ª Tania Rieger  
Presidente do CEUA/CCS-UFPE  
SAPE 2308924