



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**

**CRISTIANE MARIA DA CONCEIÇÃO**

**ESTUDO SOBRE ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Ramalina usnea* LIQUEN**

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO  
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**  
**LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**NÚCLEO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CRISTIANE MARIA DA CONCEIÇÃO**

**ESTUDO SOBRE ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Ramalina usnea* LIQUEN**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Graduação em licenciatura em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>.Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

**Coorientador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Noêmia Pereira da Silva Santos

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO  
2015

Catálogo na Fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Ana Ligia Feliciano dos Santos, CRB4: 2005.

C744e Conceição, Cristiane Maria da.  
Estudo sobre atividade citotóxica de Ramalina úsnea, Líquen/ Cristiane Maria da Conceição. - Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.  
33 folhas; il., tab.

Orientador: Emerson Peter da Silva Falcão.  
Coorientadora: Noêmia Pereira da Silva Santos  
TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV. Licenciatura em Ciências Biológicas, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Líquens. 2. Citotoxicidade . 3. Antineoplásicos Fitogênicos. I. Falcão, Emerson Peter da Silva (Orientador). II. Santos, Noêmia Pereira da Silva (Coorientadora). III. Título.

579.7 CDD (23.ed.)

**BIBCAV/UFPE-094/2015**

**CRISTIANE MARIA DA CONCEIÇÃO**

**ESTUDO SOBRE ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *RAMALINA úsnea*, LÍQUEN**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 24/ 07/ 2015.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profº. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº. Dr. Cristiano Aparecido Chagas  
Universidade Federal de Pernambuco

---

MSc. Tamiris Alves Rocha  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho ao meu filho Luís Miguel, e a tia Gorete (*in memoria*) pelos conselhos de grande sabedoria.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por não desistir de mim e me amparar com seu amor extremo.

Ao professor Dr. Emerson Peter pela paciência e persistência, por ter acreditado no potencial que eu nem sabia que existia, por me estender a mão quando precisei.

A Dr<sup>a</sup>. Noêmia Pereira, por seu acolhimento e sua cooperação

A MSc. Tamiris Alves Rocha por toda assistência, paciência e dedicação durante a elaboração deste trabalho.

A Maria Aparecida Lira, Gerliny Oliveira, André Silva, José Laurentino Neto e Érima Amorin, pela força que me deram pra continuar e por todo auxílio durante a elaboração das atividades deste estudo.

A MSc. Marlllyn Marques da Silva, por toda ajuda durante o processo de elaboração e realização das atividades e obtenção de resultados desse estudo.

Agradeço a Maria José Oliveira da Silva (tia Bi) por ter dado possibilidade e condição para realização do meu sonho.

A Maria Gorete Oliveira dos Passos (*in memória*) por sempre dar-me conselhos sábios, que me fizeram seguir em frente sempre, por me fazer descobrir o meu valor e por saber criticar os meus defeitos sem que eu me sentisse humilhada.

A minha mãe Maria Tereza por ter me dado a chance de estar aqui presente.

A Maria Gabriela Ramos de Oliveira agradeço por cuidar muitas vezes do meu filho, para que eu pudesse fazer as minhas atividades, peço desculpas pelos meus estresses, e dedico o meu carinho materno.

Ao meu filho Luís Miguel da Silva Cavalcante por ser minha razão de lutar e de levantar a cada queda, apesar das muitas lágrimas derramadas de saudades foi tudo para construção de algo melhor para você.

E aos meus amigos que são presentes de Deus pra mim, que torcem por mim, que me dizem palavras de perseverança dedico os meus mais belos sentimentos.

## RESUMO

Os líquens são organismos simbiotes cosmopolitas, altamente adaptáveis. São amplamente mencionados na literatura devido às suas numerosas propriedades biológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, antineoplásica dentre outras. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos orgânicos de *Ramalina usnea*, os mesmos foram obtidos por meio de esgotamento em aparelho de Soxhlet à 40° C por uma hora, com os solventes, éter, clorofórmio e acetona. Depois de evaporar os solventes em rotaevaporador, os extratos foram acondicionados em dessecador até obter um peso constante, sendo posteriormente calculados os rendimentos. A análise da composição fenólica foi realizada análise cromatográfica de camada delgada (CCD). O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Foi avaliado o efeito antiproliferativo do extrato da *Ramalina usnea* frente às linhagens de células ascíticas dos tumores experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. Os resultados de CCD evidenciaram a presença de ácido divaricático (Rf. 0,6) no extrato etéreo e sequicáico (Rf. 0,47) nos extratos acetônico e clorofórmico, além de compostos não identificados (Rfs 0,32 e 0,54) respectivamente. O efeito citotóxico dos extratos orgânicos demonstrou que o extrato etéreo apresentou melhor atividade, com inibição de 42,15% frente à linhagem celular sarcoma 180 e 56,30% frente ao carcinoma de ehrlich na concentração de 200µg/mL. Os extratos clorofórmico e acetônico apresentaram baixa atividade. Uma vez que o ácido divaricático é o principal componente do extrato etéreo sugere-se que este composto é o princípio ativo da espécie estudada.

**Palavras chave:** Citotoxicidade. Depsideos Antineoplásicos. Líquens.

## ABSTRACT

Lichens are symbiotic organisms, highly adaptable and cosmopolitan. They are widely mentioned in the literature due to its numerous biological properties such as antimicrobial, anti-inflammatory, healing, antineoplastic among others. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antineoplastic activity of the crude extract obtained from *Ramalina usnea*, they were obtained through the hot exhaustion with ether, chloroform and acetone solvents following the elutropic sequence. The solvents were evaporated in a rotary evaporator, the extracts were placed in a desiccator until constant weight. The yields were so calculated. The analysis of the phenolic composition was performed in thin layer chromatographic analysis (TLC). The cytotoxicity tests was performed using the method of 3- [4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). It was evaluated the antiproliferative effect of *Ramalina usnea* front extract the ascites cell lines of experimental tumors Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma. The TLC results showed the presence of divaricatic acid (Rf.0,6) In ether extract and sekikaik (Rf.0,47) In acetone and chloroform extracts, there was also observed unidentified compounds (Rfs 0,32 and 0,54). The cytotoxic effect of organic extracts showed that the ether extract had a better activity, with inhibition of 56,30% compared to sarcoma cell line 180 and 42,15% front of the Ehrlich carcinoma in the concentration of 200µg / mL The chloroform and acetone extracts showed low activity. Once the divaricatic acid is the main component of the ether extract we may suggest that this compound is the active principle of the studied species.

**Keywords:** Antineoplastic depsides. Cytotoxic activity. Lichens.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Líquén fruticoso do género <i>Usnea</i> sobre córtex de árvore.	<b>16</b>
<b>Figura 2</b>	<i>Ramalina usnea</i> (L.) (talo verde e pendente)	<b>16</b>
<b>Figura 3</b>	Modelo esquemático da microestrutura do talo liquênico. Modelo esquemático da microestrutura do talo liquênico. (A) Fotobionte, ou camada gonodial; (B) Hifas medulares ou medula; (C) Hifas corticais ou córtex superior	<b>17</b>
<b>Figura 4</b>	Estrutura química de alguns ácidos encontrados nos líquens.	<b>18</b>
<b>Figura 5</b>	Estrutura química dos ácidos encontrados em <i>Ramalina usnea</i> .	<b>19</b>
<b>Figura 6</b>	CCD dos extratos da <i>Ramalina usnea</i> : E- extrato etéreo; C- extrato clorofórmico; A- extrato acetónico	<b>24</b>
<b>Figura 7</b>	Porcentagem de inibição do extrato etéreo frente à linhagem celular Carcinoma de Ehrlich em várias concentrações	<b>28</b>
<b>Figura 8</b>	Porcentagem de inibição do extrato etéreo frente à linhagem celular Sarcoma 180 em várias concentrações.	<b>29</b>
<b>Tabela 1</b>	Determinação da porcentagem de inibição celular dos extratos orgânicos de <i>Ramalina usnea</i> frente às linhagens de células tumorais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich	<b>27</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

INCA – Instituto Nacional do Câncer

HCB – Hospital do Câncer de Barretos

OMS – Organização Mundial Da Saúde

AU – Ácido Úsnico

MTT - Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

Fem X – Melanoma Humano

LS 174 – Carcinoma do Cólon Humano

Rf - Fator de Retenção

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

DMEM - Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco

P/V – Por Volume

DMSO - Dimetilsulfóxido

NCI – National Câncer Institute

D.P. – Desvio Padrão

IC<sub>50</sub> - Concentração Necessária Para Inibir 50% Da Proliferação Celular

## SUMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
2.1 Aspectos gerais dos Líquens	15
2.2 Metabolitos secundários liquênicos	17
2.3 Atividade antineoplásica em líquens ou seus metabólitos	19
2.4 Hipótese	20
<b>3 OBJETIVOS</b>	21
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	22
4.1 Obtenção do Material liquênico	22
4.2 Preparação dos Extratos	22
4.3 Análise Cromatográfica	22
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	24
5.1 Análises cromatográficas dos extratos orgânicos de <i>ramalina usnea</i>	24
5.2 Atividade Citotóxica	25
<b>6 CONCLUSÕES</b>	30
<b>REFERÊNCIAS</b>	31

## 1 INTRODUÇÃO

Os líquens são seres oriundos do processo simbiótico onde participam um fungo, micobionte, e uma alga ou cianobactéria, fotobionte (HARKSWORTH & HILL 1984). Esta associação lhes confere grande capacidade adaptativa além de metabólitos secundários únicos com propriedades biológicas notáveis tais como bioindicadores, antimicrobianos (FALCÃO, 2004), ação analgésica (OKUYAMA *Et al.*, 1995), antineoplásica (SHRESTHA, 2014), mutagênica (GULLUCE, 2011) e citotóxica (ARAÚJO, 2014), esta última bastante relevante como triagem ao descobrimento de +6875 novos antitumorais. Neste trabalho foi avaliada a atividade citotóxica de *Ramalina usnea* um líquen pouco apresentado à literatura e cujos metabólitos secundários ainda são pouco estudados.

As pesquisas para obtenção de novos compostos antineoplásicos e sua avaliação em vários sistemas tumorais e cultura de tecidos, objetivando selecionar compostos mais efetivos para o tratamento e controle das neoplasias está em contínua expansão (HUSSAR, 2000; ASLANI *et al.*, 2000).

Os metabólitos secundários liquênicos são classificados em grupos químicos bioenergeticamente relacionados, tais como: depsídeos, depsídonas, dibenzofuranos e ácidos úsnicos (NASH III, 2008).

Esses organismos apresentam uma grande importância como Bioindicadores e biomonitores de qualidade do ar (FERRY *et al.*, 1973; WOLTERBEEK, 2001).

A atividade antineoplásica é amplamente descrita, Cain (1961, 1963, 1964, 1966) estudou a ação do ácido polipórico e seus derivados como agentes antitumor, e Hirayama *et al.* (1980) testaram, ácidos liquênicos e seus produtos de degradação, quanto à atividade antitumor frente aos carcinomas ascítico e de Erlich. Verificaram que os ácidos nefrosterínico e protoliquesterínico foram efetivos contra o carcinoma de Erlich. Silva (2014) avaliou a atividade antitumoral significativa, *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata*.

A mutagenicidade é também descrita, Shibamoto *et al.* (1984) testaram fisodálico quanto à mutagenicidade no teste de Ames: o qual exibiu mutagenicidade dose dependente.

Os ácidos úsnico e difractáico apresentam também atividade analgésica e antipirética quando testados em ratos (OKUYAMA *et al.*, 1995).

Na atividade antineoplásica, Bogo (2008) mostra que modificações estruturais feitas no ácido lecanórico isolado do líquem *Parmotrema tinctorum*, apresentaram aumento potencial na taxa antineoplásica.

Levando em consideração todas as informações descritas acima este trabalho tem a finalidade de estudar a atividade citotóxica da *Ramalina usnea*, frente às células tumorais acísticas do Sarcoma 180 e do Carcinoma de Erlich. Com o intuito de trazer uma nova perspectiva, com o vislumbre de possíveis novos compostos isolados de líquens, à descoberta de novos compostos protótipo com atividade citotóxica e eventualmente antineoplásica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LÍQUENS ASPECTOS GERAIS

Definem-se líquens como organismos simbióticos compostos por um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobionte) (NASHIII, 1996a). Embora possuam uma descrição simples, estes organismos são, na verdade, comunidades extremamente complexas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Calcula-se que existam 13.500 espécies (aproximadamente 630 gêneros) de fungos liquenizados, o que correspondem a 20% dos fungos conhecidos (HARKSWORTH *et al.*, 1984; Smith *et al.*, 1987). As algas mais comuns encontradas na associação são as clorofíceas e destas a mais frequente é um gênero de *Trebouxia*, em aproximadamente 70% dos gêneros de líquens. Além dessa, ocorrem também gêneros de *Coccomyxa* e *Trentepohlia*, entre as algas verde-azuladas (cianofíceas), as mais comuns são a *Nostoc* e *Scytonema*. (AHMADJIAN, 1967).

A natureza da simbiose liquênica está sendo bastante discutida frente a conceitos mais recentes relativos às interações entre micobionte e fotobionte. Enquanto alguns consideram os líquens como um caso clássico de mutualismo, de modo que os organismos envolvidos (micobionte e fotobionte) (HARKSWORTH, 1984), se beneficiam da associação, outros os consideram como um exemplo de parasitismo controlado, pois o fungo parece ser mais beneficiado e o fotobionte pode crescer mais lentamente no estado liquenizado do que na condição de organismo de vida livre (AHMADJIAN, 1993).

Os líquens são encontrados desde o nível do mar até as montanhas mais altas. Porém, são relativamente raros em altitudes acima de 5.000 m e em matas excessivamente escuras (KAPPEN, 1973). Podem, também, ser encontrados em desertos onde a temperatura é bastante variável, e em regiões polares, com temperaturas extremamente baixas. Seu limite de tolerância às oscilações climáticas é superior a qualquer outro vegetal. (HONDA *et al.*, 1998)

Os líquens são classificados dentro de três formas de crescimento: crostosos, foliosos e fruticosos, cada forma de crescimento é caracterizada por

um arranjo particular de tecido - cortical, algal ou medular - e por diferentes formas de fixação (HALE, 1983).

A *Ramalina usnea* apresenta um crescimento fruticoso (Figura 1) que é espesso, arbustiforme, com râmulos distintamente formados, muito longos e pendentes, ou curtos e mais ou menos eretos, ou ainda finos filamentos formando um emaranhado semelhante à cabeleira. Fixam-se ao substrato por um grampo situado na base do eixo principal ou por vários pontos ao longo dos ramos (Hale, 1983)

**Figura 1** - Líquen fruticoso do gênero *Usnea* sobre córtex de árvore.



Fonte: Honda *et al.*, 1998

A *Ramalina usnea* foi descrita pela primeira vez, como *Lichen usnea*, por Linnaeus (1767) e é amplamente distribuída nas partes mais quentes do mundo (Figura 2).

**Figura 2** - *Ramalina usnea* (L.) (talo verde e pendente)



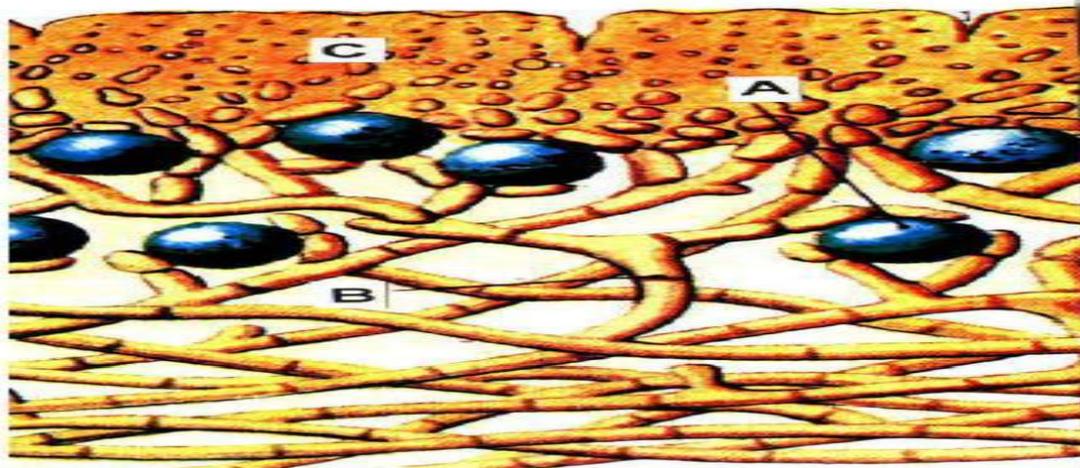
Fonte: (Gumboski, 2009)

## 2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS LIQUÊNICOS

Os líquens possuem diversas substâncias químicas que são agrupadas, de acordo com a localização no talo, em produtos intracelulares e extracelulares. Sendo o talo liquênico uma estrutura composta, alguns produtos são sintetizados pelo fungo, outros pela alga (Hale, 1983). A concentração destes compostos pode variar de 0,1 a 5% em relação ao peso seco do talo liquênico, (MARCANO, 1994; LAWREY, 1995; ELIX, 1996).

Os produtos intracelulares (carboidratos, carotenoides, vitaminas, aminoácidos e proteínas) estão ligados na parede celular e no protoplasto. São frequentemente solúveis em água e podem ser extraídos com água quente. Esses compostos ocorrem não somente em líquens, mas em fungos e algas de vida livre e em plantas superiores (HALE, 1983). Outros produtos que estão na medula ou no córtex, raramente nas duas camadas, são metabólitos secundários que apresentam cor, como a maior parte das antraquinonas, derivados do ácido pulvínico e ácido úsnico (NASH III, 1996), outras incolores como atranorina e liquexantona, são exemplos típicos de substâncias presentes no córtex (HONDA *et al.*, 1998). O esquema do talo de um líquen fruticoso é mostrado a seguir (Figura 3).

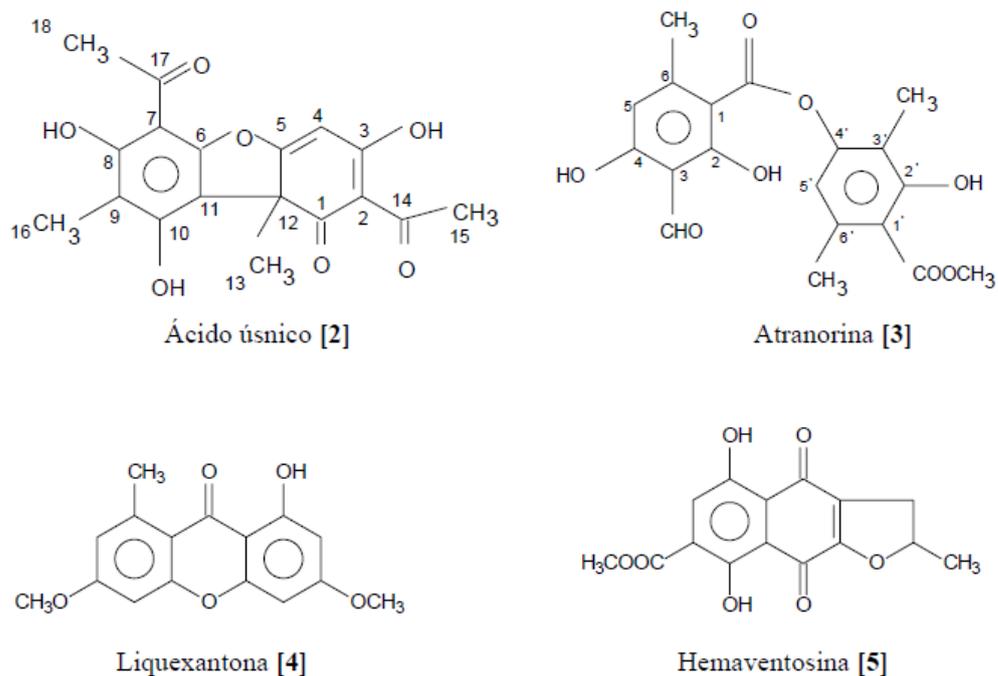
**Figura 3** – Modelo esquemático da microestrutura do talo liquênico. (A) Fotobionte, ou camada gonodial; (B) Hifas medulares ou medula; (C) Hifas corticais ou córtex superior



Fonte: Pereira, 2000.

Mais de 800 metabólitos secundários liquênicos foram descobertos. Alguns são exclusivos da micota liquenizada (HAUCK AND HUNECK, 2007). Dentre estas moléculas são identificados *meta* e *para* -depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos, ácidos úsnicos e derivados do ácido pulvínico (Figura 4) (HONDA *et al.*, 1998). Diversos destes compostos são exclusivos da micota liquenizada (ELIX 1996), não sendo encontrados em fungos de vida livre (GALUN 1988). Muitos deles desempenham importantes papéis ecológicos, o que inclui a manutenção do equilíbrio entre os simbioses (M. BAC̃KOROVÁ *et al.* 2012).

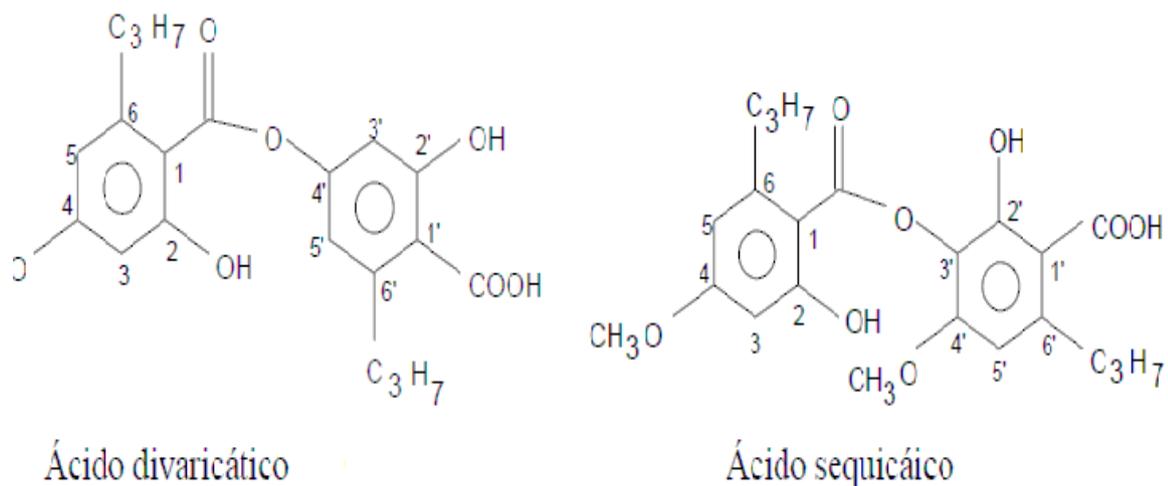
**Figura 4.** Estrutura química de alguns ácidos encontrados nos líquens.



FONTE (Honda et al.,1997)

A *Ramalina usnea* apresenta fenóis liquênicos distintos dependendo da região de origem (HOWE, 1972). Os ácidos ramalinólico e sequicáico (Figura 4), estas são as únicas substâncias relatadas por Follmann & Huneck (1969) e Culberson (1969,1970) encontradas em *Ramalina usnea*. É comum a ocorrência do ácido divaricático e sequicáico no gênero das *Ramalina*.

**Figura 5** - Estrutura química dos ácidos encontrados em *Ramalina usnea*.



Fonte: Honda et al.,1997

### 2.3 ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA EM LÍQUENS OU SEUS METABÓLITOS

Os líquens de um modo geral ou seus derivados isolados são utilizados em diversos trabalhos que avaliam sua atividade frente às células tumorais Sarcoma 180 e Ehrlich.

Silva (2014) trás em seu trabalho que o ácido salazínico purificado apresentou inibição da divisão celular de 29,45% para o Carcinoma de Ehrlich e 29,37% para Sarcoma 180. antitumoral promissor frente aos tumores experimentais de Sarcoma- 180 e Carcinoma de Ehrlich.

Lacerda (2012) demonstrou que o extrato etéreo da *Pseudociphellaria aurata*, apresentou relevante atividade antitumoral com redução 67% do crescimento tumoral do Sarcoma 180 e 56% do Carcinoma Ehrlich, e ainda atividade antineoplásica com inibição do processo mitótico.

Rabelo *et al.* (2011) avaliaram a ação redox e citotóxica do ácido úsnico em células neuronais humanas, os ensaios *In vitro*, mostram que a lipoperoxidação foi reforçada por UA e mudou a viabilidade celular na concentração mais elevada de 20 µg / mL para 1 e 4 h, bem como 2 e 20 µg / mL durante 24 h de tratamento, de acordo com o ensaio de redução de MTT.

Manojlović (2012) mostrou que o ácido salazínico e o ácido protocetrárico encontrados nos extratos acetônicos do líquen *Parmelia* mostraram que ambos os compostos foram altamente ativos com valores de concentração inibitória mínima variando 0,015-1 mg/mL. A atividade antineoplásica foi avaliada frente linhagens de células tumorais como, FemX (melanoma humano) e LS174 (carcinoma do cólon humano) utilizando o método de MTT, e apresentou forte atividade em ambas as linhagens celulares, com valores de CI<sub>50</sub> variando entre 35,67-60,18 µg/mL 35,67-60,18 µg/mL, respectivamente.

Esses resultados se mostraram bastante promissores, principalmente na linha de pesquisa de novos fármacos que buscam tratamentos menos agressivos para pacientes com câncer, considerada uma das principais causas de morte no mundo. No Brasil a incidência de novos casos de câncer é crescente, como mostra pesquisa do INCA (2015), a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência

de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2015).

Verweij & Jonge (2009) sugeriram que as substâncias químicas produzidas por esses simbiontes possam fornecer uma promissora fonte de futuras terapias no tratamento de patologias.

Diante do exposto fica clara a importância dos compostos liquênicos como fonte de novos compostos protótipo para o tratamento de doenças neoplásicas de maneira geral e a relevância do presente trabalho, especialmente diante do impacto do crescente número de casos de doenças neoplásicas, no mundo e no Brasil.

## 2. 4 HIPÓTESE

Extratos de *Ramalina usnea* apresentam atividade citotóxica. O que pode ser evidenciado em modelo experimental que utilize células de tumores ascíticos.

### 3 OBJETIVOS

**Geral:** Estudar a atividade citotóxica do líquen *Ramalina usnea*

**Específicos:**

- Obter os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico do talo *in natura* de *R. usnea*.
- Investigar a ação citotóxica *in vitro* dos extratos orgânicos da *R. usnea* frente às células tumorais sarcoma 180 e carcinoma de ehrlich.
- Determinar a dose mínima dos extratos orgânicos de *R. usnea* com maior eficácia na atividade citotóxica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL LIQUÊNICO

O material botânico foi coletado no estado de Santa Catarina, identificado através das características morfológicas e químicas do talo pelo Dr. Emerson Gumboski.

### 4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Para se obter os extratos orgânicos de *Ramalina usnea*, o material liquênico foi limpo, seco e pesado (3 g). Os extratos foram preparados através do método de esgotamento à quente, em aparelho de Soxhlet, seguindo-se a série eluotrópica dos solventes, éter, clorofórmio e acetona. Foram adicionados 80 mL de éter dietílico em aparelho de Soxhlet a 40°C por 72 h. Posteriormente, o extrato foi concentrado até a secura em rotaevaporador acoplado a banho-maria a 40 °C. O extrato foi mantido em dissecador, sob vácuo, até peso constante para posterior cálculo de seu rendimento. O mesmo processo foi repetido para obtenção dos extratos clorofórmico e acetônico.

### 4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Depois do peso estável atingido, os extratos foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD). Amostras foram dissolvidas em metanol e aplicadas sobre as placas de sílica Gel F254 Merck, e eluídas no sistema de solventes (tolueno/dioxano/ácido acético, 180: 45: 5 v/v/v) (Culberson 1964). Após a evaporação dos solventes, as placas foram observadas sob a luz UV curta e longa (254nm e 366nm). Posteriormente, foram reveladas com uma solução de ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 60 °C por 10 min para reação de coloração. Os resultados foram avaliados mediante comparação dos valores dos fatores de retenção (Rf) das bandas visualizadas e os padrões de ácido úsnico e divaricático.

#### 4.4 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células do Centro Acadêmico de Vitória/ UFPE utilizando as células carcinoma de Erhlich e Sarcoma 180, em fase exponencial de crescimento. As células foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 80% de umidade em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/ml) e 1% de L-glutamina 200Mm (Santos *et al.*, 2005). Uma suspensão celular (10<sup>5</sup> células/ml) foi distribuída em placa de cultura com 96 poços (220 µl/ poço). As placas foram incubadas a 37°C em estufa (Sedas, Milão-Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>. Os extratos orgânicos foram dissolvidos em DMSO e, e adicionados à placa de cultura (22 µl/poço) obtendo-se as concentrações finais no poço de 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/mL. Foram realizados controles com DMSO 48h após o tratamento, os efeitos citotóxicos das amostras testes foram avaliados de acordo com o protocolo do National Câncer Institute (NCI) (GERAN *et al.*, 1972), utilizando o método colorimétrico de MTT (Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).

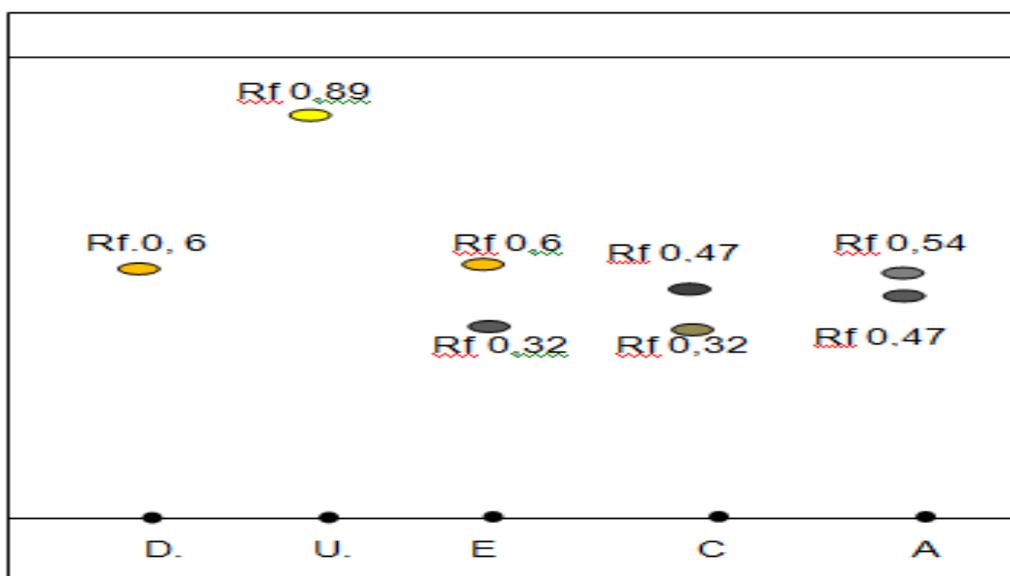
A leitura da absorbância foi realizada em leitor de Elisa, utilizando comprimento de onda de 630 nm. A média das absorbâncias do grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade. Com isso, os resultados foram avaliados pela determinação da inibição da proliferação celular em relação ao controle. Os resultados foram apresentados pela média ± D.P.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DE *RAMALINA USNEA*

Os extratos orgânicos (etéreo, clorofórmico e acetônico) de *Ramalina usnea* apresentaram rendimentos de 6,9%, 1,51% e 1,32%, respectivamente. A cromatografia em camada delgada (CCD) demonstrou um padrão distinto de bandas para os três extratos o que reforça o poder seletivo de extração dos solventes utilizados. O extrato etéreo apresentou duas bandas (Rf. 0,32 e 0,6), uma delas com Rf equivalente ao do padrão de ácido divaricático (0,6). O extrato clorofórmico apresentou duas bandas não identificadas (Rf. 0,47 e 0,32) o extrato acetônico também apresentou duas bandas não identificadas (Rf. 0,54 e 0,47). Não foi identificada a presença de ácido úsnico (Rf. 0,89) na amostra analisada (Figura. 6). Os dados obtidos estão de acordo com Follmann & Huneck (1969) e Culberson (1969,1970) que identificaram a presença de ácido divaricático e sequicáico em co-ocorrência com ácido ramalinólico na espécie.

**Figura 6** - CCD dos extratos da *Ramalina usnea*: Padrões de ácido divaricático (D) e úsnico (U); E- extrato etéreo; C- extrato clorofórmico; A- extrato acetônico.



Fonte: Conceição, 2015

## 5.2 Atividade Citotóxica

Os dados dos ensaios de atividade citotóxica são apresentados na tabela 1. Os resultados mostraram que apenas o extrato etéreo de *R. usnea* mostrou-se ativo frente às duas linhagens celulares estudadas, sendo mais efetivo contra as células de carcinoma de Ehrlich, ( 56,30% ). Os dados demonstram claramente (Figuras 7 e 8) que existe uma relação dose / resposta o que caracteriza um fármaco específico (FRAGA 2014). Pode – se verificar ainda que os extratos acetônico e clorofórmico não apresentaram atividade, uma vez que este composto não apresenta a mesma composição química do extrato etéreo sugere-se que o princípio ativo da espécie corresponda ao ácido divaricático, ausente nestes extratos e presente no extrato etéreo como composto majoritário (Figura 5). Dentre os componentes descritos à espécie encontra-se o ácido sequicáico (FOLLMANN & HUNECK 1969), este composto provavelmente corresponde à banda Rf. 0,47 e não existe qualquer menção a este composto quanto à atividade antineoplásica ou citotóxica. Estes resultados estão de acordo com, (GONÇALVES 2013) que verificou a atividade antineoplásica *in vitro* do ácido divaricático em extratos etéreos de *Ramalina aspera*. A autora em seu trabalho obteve relevantes resultados citotóxicos com o extrato acetônico, sugerindo que a atividade do extrato acetônico, estaria relacionada aos dois componentes majoritários, os ácidos homosequicáico e sequicáico. Entretanto não pôde atribuir, com certeza a atividade a este último, uma vez que não o isolou.

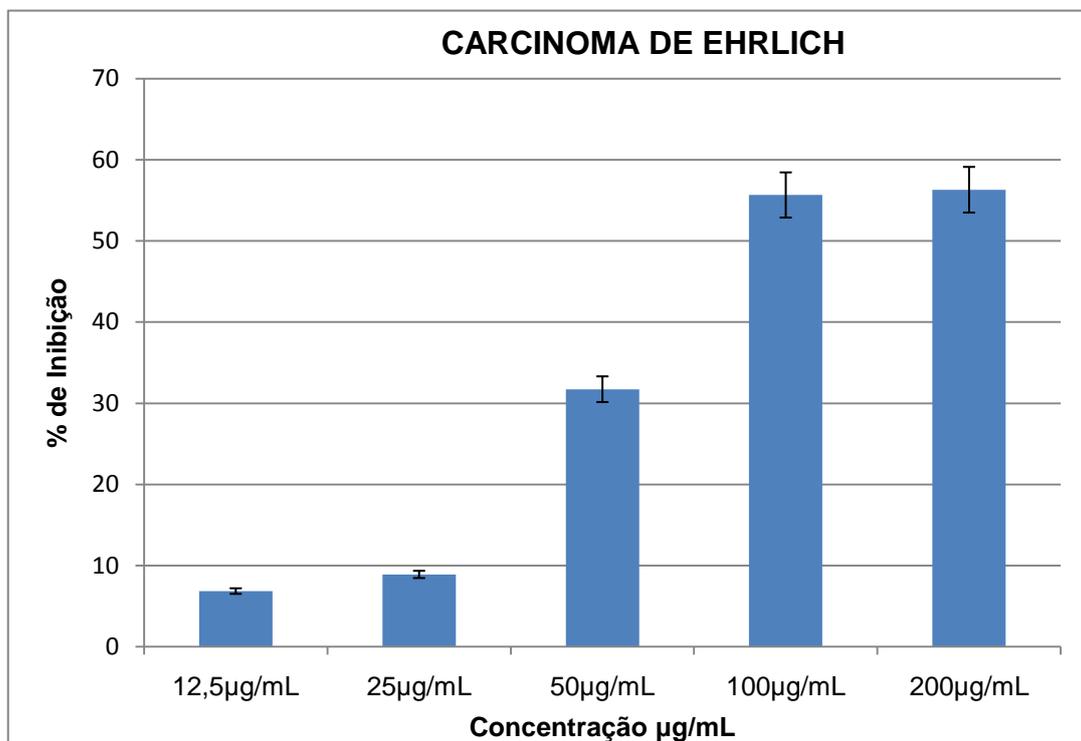
**Tabela 1-** Determinação da porcentagem de inibição celular dos extratos orgânicos de Ramalina usnea frente às linhagens de células tumorais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich.

Percentual de Inibição $\pm$ SEM						
CONC. ( $\mu$ g/mL)	SARCOMA 180			CARCINOMA DE EHRLICH		
	Extrato etéreo	Extrato clorofórmico	Extrato acetônico	Extrato etéreo	Extrato clorofórmico	Extrato acetônico
0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
12,5	0,73 $\pm$ 0,021	2,48 $\pm$ 0,130	11,38 $\pm$ 0,037	6,84 $\pm$ 0,031	2,75 $\pm$ 0,087	4,46 $\pm$ 0,093
25	9,87 $\pm$ 0,039	23,46 $\pm$ 0,036	21,83 $\pm$ 0,021	8,89 $\pm$ 0,061	3,32 $\pm$ 0,124	-3,67 $\pm$ 0,102
50	35,09 $\pm$ 0,061	18,18 $\pm$ 0,029	1,90 $\pm$ 0,057	31,72 $\pm$ 0,062	3,97 $\pm$ 0,132	-3,87 $\pm$ 0,028
100	41,46 $\pm$ 0,068	13,76 $\pm$ 0,165	8,46 $\pm$ 0,113	55,65 $\pm$ 0,012	-2,50 $\pm$ 0,113	11,41 $\pm$ 0,126
200	42,15 $\pm$ 0,058	18,03 $\pm$ 0,054	7,63 $\pm$ 0,037	56,30 $\pm$ 0,036	10,62 $\pm$ 0,017	19,35 $\pm$ 0,054

Fonte: Conceição, 2015

As células do Carcinoma de Ehrlich quando incubadas com diferentes concentrações dos extratos orgânicos (12,5, 25, 50, 100 e 200 ( $\mu$ g/ mL)), se mostraram sensíveis com uma expressiva inibição de 55,65% e 56,30% sobre a proliferação celular na concentração de 100 e 200  $\mu$ g/mL, respectivamente (Figura 6). Enquanto nas concentrações de 12,5  $\mu$ g/mL, 24  $\mu$ g/mL e 50  $\mu$ g/mL apresentou inibição no crescimento de 6,84%, 8,89% e 31,72%, respectivamente. Portanto, o extrato etéreo mostrou ser mais ativo contra essa linhagem celular.

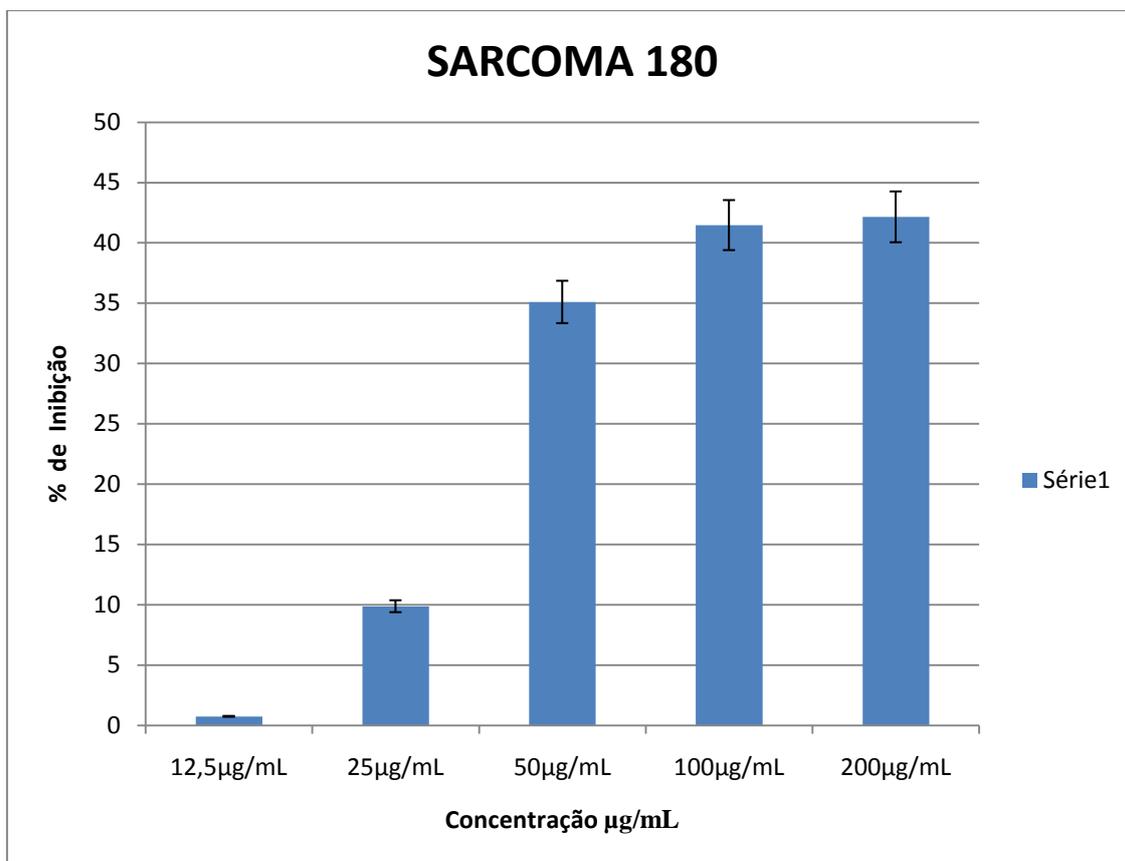
**Figura 7-** Porcentagem de inibição do extrato etéreo frente à linhagem celular Carcinoma de Ehrlich em várias concentrações



Fonte: Conceição, 2015

Por outro lado as células do Sarcoma 180 quando incubadas com diferentes concentrações dos extratos orgânicos (12,5, 25, 50, 100 e 200 (µg/mL), sofreram uma expressiva redução de 42,15% e 41,46% na proliferação celular na concentração de 100 e 200 µg/mL, respectivamente (Figura 7). Enquanto nas concentrações de 12,5 µg/mL, 24 µg/mL e 50 µg/mL a inibição do crescimento foi de 0,73%, 9,87% e 35,09%, respectivamente. Portanto, o extrato etéreo se mostrou mais ativo contra essa linhagem celular.

**Figura 8-** Porcentagem de inibição do extrato etéreo frente à linhagem celular Sarcoma 180 em várias concentrações.



Fonte: Conceição, 2015

É plenamente crível que a atividade citotóxica *in vitro* observada esteja relacionada ao ácido divaricático. Branislav *et al.* (2011) detectou atividade antineoplásica de extratos acetônicos de *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* e *Lecanora muralis* através do método do MTT em células FemX e Ls174. Os autores realizaram a determinação de fenóis totais nos extratos e atribuíram a atividade observada aos altos níveis de fenóis detectados. O ácido divaricático também é um composto fenólico, mais especificamente um meta - depsídeo (HONDA *et al.* 1998).

## 6 CONCLUSÕES

A análise em Cromatografia em camada delgada identificou a presença de ácido divaricático, no extrato etéreo (Rf 0,6), e sequicáico nos extratos clorofórmico e acetônico (Rf 0,47), além de outros dois compostos ainda não identificados. Dentre os três extratos da *R. usnea*, o etéreo demonstrou uma atividade citotóxica, frente as linhagens de células de Carcinoma de Erlich e Sarcoma 180, e apresentou uma atividade citotóxica dose dependente ou seja o resultado da atividade varia de acordo com a dose, com isso os resultados obtidos sugerem que o ácido divaricático corresponde ao princípio ativo da espécie estuda.

## REFERÊNCIAS

- AHMADJIAN, V. **A guide to the algae occurring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology and identification.** *Phycologia* 6: 127-160, 1967.
- AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**, Wiley & Sons, New York, 250p. 1993
- ARAÚJO, A.A. *et al.*, **Review of the biological properties and toxicity of usnic acid.** *Nat Prod Res.* 2015 Feb 24:1-14. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25707417/> Acesso em 29/07/2015
- ASLANI, A.; *et al.* **The predictive value of body protein for chemotherapy-induced toxicity.** *Cancer.* v. 88, 2000.
- BOGO, D.; **Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural.** Universidade Federal do Rio Grande Sul, 2009
- CAIN, B.F. Potential Anti-tumour Agents. Part I. Polyporic Acid Series. *J. Chem. Soc.* 936-940, 1961.
- CAIN, B.F. **Potential Anti-tumour Agents.** Part II. Polyporic Acid Series. *J. Chem. Soc.* 356-359, 1963.
- CAIN, B.F. **Potential Anti-tumour Agents.** Part III. Polyporic Acid Series. *J. Chem. Soc.* 5472-5473, 1964.
- CAIN, B.F. **Potential Anti-tumour Agents.** Part. IV. Polyporic Acid Series. *J. Chem. Soc.* 1041-1045, 1966.
- COP. Centro de Oncologia do Paraná, **Efeitos Colaterais do Radioterapia.** Disponível em <<http://centrodeoncologia.com/noticias/informacoes-para-pacientes/tratamentos/efeitos-colaterais-da-radioterapia/>> acesso em 10 de Julho de 2015
- CULBERSON, C.F. **Chemical and Botanical Guide to Lichen Products.** North Carolina, USA, University of North Carolina Press. Chapel Hill, 1969.
- EHRlich, P.; APOLANT, H. **Beobachtungen über maligne Mauseumoren.** *Berl. Klin. Wschr.* v.28, p.871-874. 1905.
- ELIX, J. A.; **Biochemistry and secondary metabolites; In Lichen Biology;** Nash III, T. H. Ed.; Cambridge University, Press, Cambridge, 1996, p 154.
- FALCÃO, E.P.S., *et al.* **Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron,** *Acta Bot. Bras.* vol.18 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2004

FERRY, B.W.; BADDELEY, M.S.; HARKSWORTH, D.L. **Air pollution and Lichens**, The Athone Press. London: 1973

FOLLMANN, G. i HUNECK, S. (1969) **Mitteilung uber Flechteninhaltsstoffe**. LXI. Zur Chemotaxonomie der Flechtenfamilie Ramalinaceae. *Willdenowia*, 5: 181-216.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. v.1. 590p .

GONÇALVES, J. P. **Avaliação da Atividade Citotóxica de *Ramalina áspera* (Liquen)**. Monografia de conclusão de Curso, Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

GLOBOCAN. **Estimativa de novos casos de Cancer e de mortes por cancer**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>> acesso em 10 de Julho de 2015

GALUN, M.; SHOMER-ILAN, A.; **Secondary metabolic products; In CRC Handbook of Lichenology**, V. III, M. Galun; Ed.; CRC Press Inc. Boca Raton, Flórida 1988, p 3.

GULLUCE, M., **Protective effects of methanol extracts from *Cladonia rangiformis* and *Umbilicaria vellea* against known mutagens sodium azide and 9-aminoacridine**. *Toxicol Ind Health*. 2011 Sep;27(8):675-82. doi: 10.1177/0748233710395343. Epub 2011 Mar 22. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21427134>> Acesso em: 29/07/2015

HALLE JR. M.E. **The Biology of Lichens**. 3ed, London Edwaed Arnold Pub, 1983.

HARKSWORTH, D. L.; HILL, D.J. **The lichen forming fungi**, New York, Chapman & Hall, p 158, 1984.

HCB. Hospital do Câncer de Barretos. **Quimioterapia e os efeitos colaterais**. Disponível em: <<http://www.hcancerbarretos.com.br/quimioterapia-2/33-paciente/opcoes-de-tratamento/quimioterapia/108-quimioterapia-e-os-efeitos-colaterais>> acesso em: 10 de Julho de 2015

HCB. Hospital do Câncer de Barretos. **Radioterapia**. Disponível em: <<http://www.hcancerbarretos.com.br/radioterapia-2>> acesso em 10 de Julho de 2015

HIRAYAMA, T., FUJIKAWA, F., KASAHARA, T., OTSUKA, M., NISHIDA, N., & MIZUNO, D. Anti-tumor Activities of Some Products and Their Degradation Products. *Yakugaku Zasshi* 100 (7): 755-759, 1980.

HONDA, N.K. AND VILEGAS, W., **A Química de Liquens**. Quimica Nova 1998

- HONDA, N.K., **Líquens De Mato Grosso Do Sul Estudo Químico E Avaliação Da Atividade Biológica**. Unesp, 1999
- HOWE, R. H. (1972) **Typification Of *Ramalina Usnea* (L.)** Lickenologist, 5: 317-318 (1972)
- HUSSAR, D. A. **New drugs** 2000. Part I. Nursing. v. 30, 2000a.
- KAPPEN, L. **Response to Extreme Environments** . In . *The Lichens* .Ahmadjian, V., & Hale, M. E. Academic Press, New York, 1973.
- LACERDA,S.D.L., **Avaliação da Atividade Antineoplásica *in vitro* e *in vivo* de Extratos Orgânicos de *Pseudociphalaria aurata* (Liquen)**, UFPE-2012
- LOEWENTHAL, H.; JAHN, G. **Übertragungversuche mit carcinomatoser Mause Ascites flüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und Chemische Einwirkungen**. Ztschr F Krebsforsch, v.12, p.37-439. 1932.
- NASCIMENTO,A.C., **Neoplasias**, Disponível em: <http://www.ufjf.br/deptopatologia/files/2011/08/Neoplasias-1.pdf>, acesso em 10 de Julho de 2015.
- NASH III, T.H. **Lichen Biology**. Ed.; Cambridge University Press, Cambridge: 2008
- Nash III, T.H.; **Lichen Biology - Introduction; In Lichen Biology**; Nash III, T. H.; Ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
- OKUYAMA, E., UMEYAMA, K., YAMAZAKI, M., KINOSHITA, Y. & YAMAMOTO, Y. Usnic and Diffractaic Acid as Analgesic and Antipyretic components of *Usnea diffracta*. **Planta Med.** 61: 113-115, 1995
- PEREIRA, E.C., **Biologia de Líquens. Apostila Do Curso Oferecido Pelo Departamento De Ciências Geográficas, Centro De Ciências Humanas da UFPE**, Recife. 2000
- RABELO, T.K., **Caracterização Redox-ativa do Acido Usnico e Seu Efeito Citotóxico em Celulas SH-SY5Y**, Aracajú.2012
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal** 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2007
- RANKOVIĆ. B. R. *et al.* **Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis***. BMC Complementary and Alternative Medicine 2011, p. 1472-6882
- RICHARDSON, D.S.H. Medicinal an other economic aspects of lichens. In. *CRC Handbook of Lichenology*, V.III. Galun, M. (ed.) CRC Press, Boca Raton, 1988

SANTOS JR, A.R.; WADA, M.L.F. **Diferenciação celular**. In: **A célula**. São Paulo: Editora Manole Ltda. 20

SHIBAMOTO, T., & WEI, C. I. Mutagenicity of lichen constituents.  
**Environment  
Mutagenesis** 6: 757-762, 1984

SHRESTHA, G., EL-NAGGAR, A.M., *et al.*; **Anticancer activities of selected species of North American lichen extracts**. *Phytother Res.* 2015 Jan; 29(1):100-7. doi: 10.1002/ptr.5233. Epub 2014 Sep 24. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257119> Acesso em: 29/07/2015

SILVA, T.D.S. "**Atividade Antitumoral In Vitro e In Vivo Do Ácido Salazínico**, UFPE , 2014

VERWEIJ, J.; JONGE, M.J.A. Achievements and future of Chemotherapy.  
**European Journal of Cancer**. v. 36 p. 1479-1487. 2009. /CAV-2014

WOLTERBEEK, B. Biomonitoring of trace elements: principles, possibilities and perspectives. **Environmental pollution**, V.120, p. 11-21, 2002