



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

MARIA APARECIDA DA CONCEIÇÃO DE LIRA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICA DE EXTRATOS ORGÂNICOS DE *Ramalina aspera* RÄNSÄNEN E
DO ÁCIDO DIVARICÁTICO ISOLADO**

Vitória de Santo Antão

2016

MARIA APARECIDA DA CONCEIÇÃO DE LIRA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICA DE EXTRATOS ORGÂNICOS DE *Ramalina aspera* RÄNSÄNEN E
DO ÁCIDO DIVARICÁTICO ISOLADO**

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: Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Coorientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Vitória de Santo Antão

2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

L768a Lira, Maria Aparecida da Conceição.
Avaliação das atividades anti-inflamatória, antioxidante e citotóxica de extratos orgânicos de *Ramalina aspera* Räsänen e do ácido divaricático isolado. / Maria Aparecida da Conceição Lira. - Vitória de Santo Antão, 2016.
71 folhas: il.; color.

Orientador: Emerson Peter da Silva Falcão
Coorientadora: Teresinha Gonçalves da Silva
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Líquens. I. Falcão, Emerson Peter da Silva (Orientador). II. Silva, Teresinha Gonçalves da (Coorientadora). III. Título.

579.7 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-93/2017

MARIA APARECIDA DA CONCEIÇÃO DE LIRA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICA DE EXTRATOS ORGÂNICOS DE *Ramalina aspera* RÄNSÄNEN E
DO ÁCIDO DIVARICÁTICO ISOLADO**

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: Produtos Naturais.

Aprovado por:

Dr. René Duarte Martins
Núcleo de Saúde Coletiva – CAV/UFPE

Dr.^a Maria de Lourdes Lacerda Buril
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

Dr.^a Mônica Cristina Barroso Martins
Departamento de Bioquímica – UFPE

Data: 21/07/2016

A minha família, em especial a
minha mãe Tereza Severina de Lira e
ao meu pai Francisco Antônio de Lira
(*in memoriam*) por todo amor e
dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS pela minha vida e por estar sempre comigo frente as minhas dificuldades diárias e também pelas grandes bênçãos concedidas.

A minha família pelo companheirismo, pela força e incentivo, em especial a minha mãe Tereza Severina de Lira, pelo seu esforço diário, por ter me dado possibilidades de estudar e nunca deixar que eu desistisse dos meus objetivos e ao meu pai Francisco Antônio de Lira (*in memoriam*) por acreditar sempre no meu potencial.

Aos meus irmãos Raquel Lira e Ricardo Lira e ao meu sobrinho querido, Gabriel Francisco pelos abraços toda vez que chego em casa.

Ao Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão por ter aceitado ser meu orientador com extrema dedicação e paciência, por ter contribuído de maneira expressiva para os meus conhecimentos científico e pessoal, e por sempre me fazer acreditar no meu potencial.

A Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva por ter aceitado ser minha co-orientadora e ter me recebido em seu laboratório, por ter investido e acreditado no meu trabalho durante todo trajeto percorrido.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior (colaborador) pelas análises histológicas descrita neste trabalho.

A Profa. Dra. Lourdes Lacerda Buriel pela identificação da espécie liquênica e por suas colaborações em relação a escrita deste trabalho.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Mônica Martins e Prof. Dr. René Duarte pelos conselhos relacionados ao desenvolvimento deste estudo.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória, pela força e incentivo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Neves pelos conselhos e incentivo.

A Pós-Doutoranda Isla Basto, Doutorandos Tatiane Bezerra e Carlson Carvalho por toda ajuda prestada na realização desta pesquisa.

A Doutoranda Tamiris Alves Rocha, por todo apoio, companheirismo, por ter contribuído, com muita dedicação, para o desenvolvimento científico deste trabalho,

pelos concelhos, por sua amizade sincera, e por sempre está ao meu lado nos momentos bons e principalmente nos difíceis.

A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Cristiane Conceição, André Silva, Érima Amorim, Gerliny Oliveira e Laurentino Neto.

A mestrandia Bárbara Ramos pelos ensinamentos para o desenvolvimento das análises dos métodos antioxidante.

A todas as colegas de curso, pelo companheirismo e conselhos concedidos nas horas difíceis, Sebastiana Lidiêlda, Isabel Lima, Francielle Amorim, Lúcia Eleutério e Cátia Ferreira.

A meu companheiro de todos os momentos, meu noivo Jarderson Ferreira, por me fazer acreditar que tudo iria dar certo e por todas as orações e incentivo.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

Muito obrigada!

RESUMO

Líquens são notáveis organismos cujos metabólitos secundários são amplamente descritos pelo seu potencial biológico. Este trabalho descreve a avaliação da composição fenólica, através de técnicas cromatográficas em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE), dos extratos etéreo, clorofórmico, acetônico, metanólico e do ácido divaricático isolado, da espécie *Ramalina aspera* Räsänen e a avaliação das suas atividades citotóxica *in vivo* e *in vitro*, anti-inflamatória *in vivo* e antioxidante *in vitro*. A análise cromatográfica por CCD dos extratos demonstrou a presença do ácido divaricático. A análise em CLAE confirmou os resultados em CCD, sendo observados nos extratos etéreo e clorofórmico quatro ($Tr=2,94$; $4,93$; $10,87$ e $15,81$ min.) e três compostos principais ($Tr=4,56$; $20,27$ e $24,147$ min.), respectivamente, em ambos se observou a presença predominante de ácido divaricático ($Tr=15,97$ min.). No extrato acetônico foi observado apenas um pico, não identificado ($Tr=3,02$ min.). A pureza do isolado também foi aferida (99,3%). As substâncias liquênicas foram consideradas atóxicas nas doses mais baixas para linhagens de macrófagos, e também não apresentaram toxidez para os testes *in vivo*. Os ensaios de atividade anti-inflamatória foram realizados através do método de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Também foi determinada a atividade enzimática da mieloperoxidase e a permeabilidade vascular induzida por ácido acético. Para o teste de edema de pata, o ácido divaricático apresentou uma diminuição significativa no edema na segunda hora, ($0,046\pm0,005$ mL) em relação ao controle negativo ($0,070\pm0,013$ mL), os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico também apresentaram diminuição do edema, $0,050\pm0,008$; $0,062\pm0,004$ e $0,057\pm0,005$ mL, respectivamente. Tanto o ácido divaricático quanto os extratos orgânicos foram capazes de diminuir a atividade da mieloperoxidase, quando comparados com o controle negativo. O extrato etéreo e o ácido divaricático apresentaram diminuição na permeabilidade vascular no local da lesão, foram observados valores inferiores a 300 $\mu\text{g/mL}$ para as substâncias testadas, quando comparados ao controle negativo, o qual ultrapassou este valor. As substâncias liquênicas demonstraram ação antioxidante, quando analisados através das técnicas de Sequestro de Radicais Livres (DPPH), Capacidade Antioxidante Total (ATT) e Redução do Íon Férrico (FRAP), sendo o ácido divaricático, a substância que

apresentou um maior potencial de captura de radicais livres, o único que comprovou um índice de inibição >50% em relação aos extratos testados para o método de DPPH. O extrato clorofórmico apresentou os melhores resultados se comparados às outras substâncias liquênicas testadas, para o método de ATT e FRAP. Os compostos liquênicos derivados da espécie *R. aspera* comprovaram baixa toxicidade, uma boa ação anti-inflamatória e antioxidante.

Palavras chaves: Depsídeos. Inflamação. Líquens.

ABSTRACT

Lichens are notable organisms whose secondary metabolites are largely described by their biological potential. This work describes the evaluation of phenolic composition by means of thin layer (CCD) and high efficiency liquid chromatography (CLAE), ethereal, chloroform, acetone, methanol and isolated divaricatic acid extracts of *Ramalina aspera* Räsänen and Evaluation of their in vivo and in vitro cytotoxic activities, in vivo anti-inflammatory and antioxidant in vitro. CCD chromatographic analysis of the extracts demonstrated the presence of divaricatic acid. The analysis in CLAE confirmed the results in CCD, with four ethereal and chloroform extracts ($T_r = 2,94, 4,93, 10,87$ and $15,81$ min) and three main compounds ($T_r = 4,56; 20,27$ and $24,147$ min), respectively, in both cases the predominant presence of divaricatic acid ($T_r = 15.97$ min) was observed. In the acetone extract only one unidentified peak ($T_r = 3.02$ min) was observed. The purity of the isolate was also measured (99.3%). Lichen substances were considered non-toxic at the lower doses for macrophages and did not present toxicity for in vivo tests. Anti-inflammatory activity assays were performed using the carrageenan-induced paw edema method in mice. The enzymatic activity of myeloperoxidase and the vascular permeability induced by acetic acid were also determined. For the paw edema test, divaricatic acid showed a significant decrease in second-hour edema (0.046 ± 0.005 mL) relative to the negative control (0.070 ± 0.013 mL). Ethereal, chloroform and acetone extracts also showed a decrease in Edema, 0.050 ± 0.008 , 0.062 ± 0.004 and 0.057 ± 0.005 mL, respectively. Both divaricatic acid and organic extracts were able to decrease myeloperoxidase activity when compared to the negative control. Ethereal extract and divaricatic acid showed decreased vascular permeability at the lesion site, values below $300 \mu\text{g} / \text{mL}$ were observed for the substances tested, when compared to the negative control, which exceeded this value. The lichen substances showed antioxidant action when analyzed using the Free Radical Sequestration (DPPH), Total Antioxidant (ATT) and Ferric Ion Reduction (FRAP) techniques, with divaricatic acid being the substance with the greatest potential for capture Of free radicals, the only one that demonstrated a inhibition index > 50% in relation to the extracts tested for the DPPH method. The chloroform extract presented the best results when

compared to the other lichen substances tested, for the ATT and FRAP method. Lichen compounds derived from the *R. aspera* species showed low toxicity, a good anti-inflammatory and antioxidant action.

Key words: Depsides. Inflammation. Lichens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Corte longitudinal do talo liquênico	19
Figura 2 -	Grupos morfológicos dos talos liquênicos	21
Figura 3 -	Ácido criptoclorofeico	22
Figura 4 -	Ácido divaricático	22
Figura 5 -	Ácido polipórico	22
Figura 6 -	Ácido vulpínico	22
Figura 7 -	Ácido mevalônico	23
Figura 8 -	Exemplar da <i>Ramalina aspera</i>	24
Figura 9 -	Estrutura química do ácido divaricático	25
Figura 10 -	Migração dos leucócitos para o sítio inflamatório	30

Artigo

Figura 1 -	Análise em CCD	44
Figura 2 -	Análise em CLAE do ácido divaricático	45
Figura 3 -	Análise em CLAE do extrato etéreo	45
Figura 4 -	Análise em CLAE do extrato clorofórmico	46
Figura 5 -	Análise em CLAE do extrato acetônico	46
Figura 6 -	Efeito dos extratos de <i>R. aspera</i> e do ácido divaricático sobre a atividade enzimática da MPO	50
Figura 7 -	Efeito do extrato etéreo e do ácido divaricático sobre o aumento da permeabilidade induzida por ácido acético	50

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 -	Dosagem de fenóis totais e de flavonoides dos extratos de <i>R. aspera</i> e do ácido divaricático	<i>R.</i> 47
Tabela 2 -	Avaliação da atividade citotóxica das frações dos extratos de <i>R. aspera</i> e do ácido divaricático em células da linhagem Raw 264.7	47
Tabela 3 -	Atividade hemolítica dos extratos de <i>R. aspera</i> e do ácido divaricático em eritrócitos humanos	48
Tabela 4 -	Efeito dos extratos de <i>R. aspera</i> e do ácido divaricático sobre edema de pata induzido por Carragenina	49
Tabela 5 -	Atividade antioxidante dos extratos de <i>R. aspera</i> e do ácido divaricático	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATT	Atividade Antioxidante Total
CCD / TLC	Cromatografia de Camada Delgada
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente do Ácido Gálico
FRAP	Atividade Redutora do Íon Férrico
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
ICLAS	Conselho de Laboratório de Animais Experimentais
MTT	Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MPO	Mieloperoxidase
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
RF	Fator de Retenção
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SRL	Sequestro de Radicais Livres
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
Tr	Tempo de Retenção
TPTZ	2,4,6-Tris (2-piridil) -s-triazina

SUMÁRIO

1 Introdução	15
2 Objetivos	17
2.1 <i>Objetivo geral</i>	17
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	17
3 Revisão de Literatura	18
3.1 <i>Produtos Naturais</i>	18
3.2 <i>Características Gerais dos Líquens</i>	19
3.3 <i>Aspectos Químicos dos Líquens</i>	21
3.4 <i>Gênero Ramalina</i>	23
3.5 <i>Potencial Biológico dos Líquens</i>	25
3.6 <i>Processo Inflamatório</i>	28
3.7 <i>Mediadores da Resposta Inflamatória</i>	30
3.8 <i>Espécies Reativas de O₂</i>	31
ARTIGO	33
Avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e o efeito citotóxico dos extratos e do ácido divaricático de <i>Ramalina aspera</i> Räsänen (líquen)	34
4 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
Anexo A - Ficha de Identificação Botânica	67
Anexo B - Carta de Aprovação do Comitê de Ética Animal	68
Anexo C - Curva de Calibração - FRAP	69
Anexo D - Curva de Calibração – Fenóis Totais	70
Anexo E - Curva de Calibração - Flavonoides	71

1 Introdução

Nas últimas décadas as patologias crônicas e de caráter inflamatório têm se tornado um grande problema de saúde pública criando uma grande demanda pela pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios com baixa toxidez e efeitos adversos (VAN RYN et al., 2000). Neste sentido, vegetais superiores, fungos algas e líquens são organismos considerados fontes promissoras de novas moléculas protótipo (NEWMAN; CRAGG, 2007) para o tratamento de diversas patologias, inclusive processos inflamatórios agudos e crônicos.

A inflamação é definida como uma reação local dos tecidos vascularizados a um agente agressor. Promove uma resposta inespecífica caracterizada por uma sequência de alterações que tendem a limitar os efeitos danosos (BOGLIOLO, 2009; FRANCO et al., 2010) erradicando os agentes químicos ou físicos que estimulam o processo e potencializam o reparo tecidual (FLOWER; PERRETTI, 2005). As doenças inflamatórias crônicas se caracterizam por longos períodos de latência e, na maioria dos casos, com danos severos aos tecidos (FARIA et al., 2003).

Nos últimos anos pôde-se verificar um aumento das pesquisas em relação aos produtos de origem natural, importantes fontes de moléculas bioativas aplicáveis a diversas doenças, incluindo o controle do processo inflamatório (ROUHI; WASHINGTON, 2003), o que é corroborado por Newman e Cragg (2007), que relatam o papel dos compostos de origem natural como fontes promissoras de novas drogas. Costa-Lotufo et al. (2010) ressaltam neste sentido, o papel altamente significativo do Brasil, com uma enorme biodiversidade, oferecendo as melhores possibilidades para a busca de substâncias de interesse terapêutico.

Os líquens são definidos como organismos simbióticos, compostos por uma associação entre um fungo e uma alga (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; XAVIER-FILHO et al., 2006). Produzem substâncias que podem ser classificadas em metabólitos primários (produtos intracelulares) e metabólitos secundários (produtos extracelulares) (HALE-JR, 1983; COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002). Os metabólitos primários compreendem carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas, enquanto que os metabólitos secundários

são divididos em quatro grupos bioenergeticamente relacionados: depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos e ácidos úsnicos (CULBERSON, 1972; HALE-JR, 1983; NASH III, 1996).

Estudos comprovam uma gama de atividades biológicas de compostos liquênicos, como atividade antimicrobiana (FALCÃO et al., 2004; MOURA, 2008; KOSANIĆ et al., 2010), citotóxica (BRANDÃO et al., 2013), antioxidante (HIDALGO et al., 1994; LUO et al., 2010; PAUDEL et al., 2012; SAHIN et al., 2015), antitumoral (SILVA, 2014; ZUGIC et al., 2016), anti-inflamatória, antinociceptiva (SILVA, 2009) e expectorante (ALVES et al., 2014).

Diante da necessidade de encontrar novas substâncias capazes de limitar o processo inflamatório, diminuindo ou eliminando os efeitos colaterais no organismo, e tendo em vista que os compostos liquênicos têm se mostrado agentes promissores para este fim, este trabalho descreve uma análise química e a avaliação das atividades anti-inflamatória *in vivo* dos extratos orgânicos de *R. aspera* e do seu composto principal, o ácido divaricático, além de avaliar a possível toxidez celular e ação antioxidante.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades citotóxica *in vivo* e *in vitro*, anti-inflamatória *in vivo* e antioxidante *in vitro* dos extratos orgânicos do líquen *Ramalina aspera* Räsänen e do ácido divaricático.

2.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos orgânicos etéreo, clorofórmico, acetônico e metanólico do talo *in natura* da *Ramalina aspera*;
- Isolar o ácido divaricático a partir dos extratos de *R. aspera*;
- Analisar a composição fenólica dos compostos de *R. aspera*;
- Avaliar a toxicidade dos extratos orgânicos e do ácido divaricático em células de macrófagos e eritrócitos humanos;
- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos orgânicos e do ácido divaricático;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* dos extratos orgânicos e do ácido divaricático;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e o isolado da *R. aspera*.

3 Revisão de Literatura

3.1 *Produtos Naturais*

A natureza sempre despertou no olhar humano um grande fascínio, não só por oferecer sua alimentação, mas por ser a principal fonte de inspiração e aprendizado (VIEGAS JR et al., 2006). Desde as civilizações mais antigas, as substâncias naturais vêm sendo usadas pelo homem em seu cotidiano. A partir do momento em que ele começou a compreender e utilizar os recursos naturais, começou então a história do desenvolvimento científico e tecnológico das áreas mais diversas, inclusive a indústria farmacêutica (EMERY; SANTOS; BIANCHI, 2010).

A incessante busca por alívio da dor e da cura de diversas patologias pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras maneiras de utilização dos produtos naturais pela humanidade (VIEGAS JR et al., 2006).

A natureza sempre forneceu muitos modelos moleculares que fundamentam estudos biológicos e inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica (VIEGAS JR et al., 2006). Muitas moléculas promissoras a grandes potenciais farmacológicos são oriundas da natureza, principal fonte desses metabólitos, servindo de inspiração para a síntese orgânica, a qual pode selecionar tais estruturas químicas elaboradas ao longo da evolução para produzir novos compostos com maiores chances de sucesso (PUPO et al., 2007).

Compostos de origem natural desempenham um papel altamente significativo nas descobertas de drogas com um alto potencial biológico. A descoberta de novos medicamentos de origem natural ou com uma combinação sintética forneceria uma melhor solução para crise de produtividade enfrentada pela comunidade científica (NEWMAN; CRAGG, 2007).

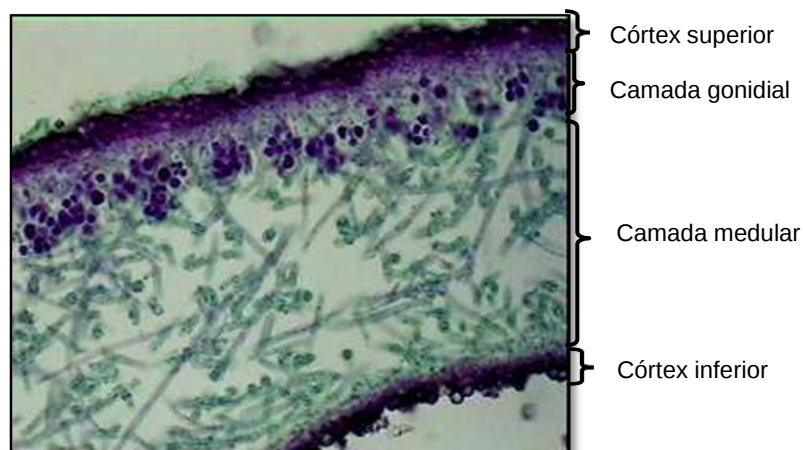
Neste sentido os produtos naturais vêm sendo considerados fontes promissoras de novas moléculas ativas com um forte potencial terapêutico. E os líquens constituem um grupo cujos estudos mostram serem fontes de numerosos compostos promissores para este fim.

3.2 Características Gerais dos Líquens

Os líquens são definidos como organismos simbióticos, composto por uma associação entre um fungo e uma alga verde ou clorófita (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; XAVIER-FILHO et al., 2006). Uma característica única desta simbiose é que o talo liquênico é tão bem desenvolvido que se comporta como um organismo único, uma nova entidade morfológica com nenhuma semelhança óbvia para qualquer um dos indivíduos (HALE-JR, 1983).

A maior porção do talo liquênico é constituído pelas hifas do fungo e uma menor porção por alga (Figura 1). Na região mais externa, encontra-se a camada cortical, formada apenas pelas hifas do micobionte, no interior do organismo são observadas as algas entremeadas pelas hifas e na região basal, que está diretamente em contato com o substrato, não se encontram algas, apenas as hifas e em líquen folhoso, as rizinas (JOLY, 2002).

Figura 1- Corte longitudinal do talo liquênico (coloração – corante)



Fonte: adaptado de Simbiotica, acesso em 20/01/2016

O talo liquênico é determinado principalmente pelo micobionte. Apenas alguns casos são conhecidos, onde o fotobionte determina o hábito de todo o talo, por exemplo, no gênero *Coenogonium*. No entanto, o conhecimento da influência do fotobionte na morfogênese do líquen é importante, porque é após o estabelecimento da simbiose que o talo é desenvolvido, sendo uma característica primordial de cada espécie (NASH III, 1996).

Esses organismos são capazes de colonizar um enorme número de substratos diferentes, como rochas, cascas de árvores, capim e solo

desprotegido. São capazes de resistir a condições ambientais extremas e sua resistência deve-se principalmente, à sua capacidade de sobreviver em um estado metabólico basal por meses e à produção de muitos metabólitos secundários que oferecem proteção química (COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002).

Os fungos que podem fazer parte dessa associação são formados pelos grupos dos basidiomicetos, fungos imperfeitos e o mais abundante são os ascomicetos. E os fotobiontes, até onde se sabe, são as clorófitas ou cianobactérias (JOLY, 2002).

Todos os dois organismos se beneficiam com essa associação, as algas por exemplo, ganham proteção mecânica por serem firmemente envoltas por hifas do fungo e também se beneficiam com um equilíbrio hídrico, melhorando sua resistência à dessecação. As hifas ainda as protegem contra as altas radiações solares, uma vez que existe uma redução considerável de luz dentro do talo. E o fotobionte, por sua vez, oferece recursos energéticos provindos de sua fotossíntese para nutrir o fungo (HALE-JR, 1983).

Com base no seu hábito, os líquens são classificados em três grupos morfológicos básicos: crostoso, folioso e fruticoso. (NASH III, 1996). Cada forma é caracterizada por um arranjo particular dos tecidos cortical e medular e por diferentes meios de ligação ao substrato (HALE-JR, 1983).

O tipo crostoso é fortemente ligado ao substrato, como visto na Figura 2a, e são muito difíceis de serem removidos. Esse grupo não apresenta córtex inferior, são as hifas da medula que prendem o líquen ao substrato (NASH III, 1996; XAVIER-FILHO et al., 2006).

Líquens do tipo folioso (Figura 2b) possuem uma estrutura laminar e dorsiventral com superfícies superior e inferior distintas, diferentemente do crostoso. Sua aderência ao substrato se dá por projeções ou partes especializadas do córtex inferior, como rizinas ou tomento. (HALE-JR, 1983; XAVIER-FILHO et al., 2006). Muitas vezes, o talo é dividido em lobos, que mostram vários graus de ramificação. Esse grupo desenvolve uma grande variedade de formas do talo, sendo descritos numerosos tipos morfológicos (NASH III, 1996).

Líquens fruticulosos crescem em forma de filamentos ou alças muito finas com uma vasta diferenciação de comprimento. O talo pode ser arredondado ou

achatado e muitas vezes ricamente ramificado (Figura 2c). Seus ramos podem ser ancorados por apressórios ou apenas enrola-se ao substrato. (HALE-JR, 1983).

Figura 2- Grupos morfológicos dos talos liquênicos.



(a) Crostoso, gênero *Caloplaca*; **(b)** Folioso, *Parmotrema tinctorum*; **(c)** Fruticoso, gênero *Teloschistes*.

Fonte: adaptado de Biodiversidade, acesso em 20/01/2016

3.3 Aspectos Químicos dos Líquens

O talo liquênico é formado por uma simbiose composta, pois seus produtos metabólicos são produzidos pelo fotobionte e pelo micobionte, porém, nem sempre pode-se distinguir a contribuição de cada organismo. (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996). Os produtos resultantes da biossíntese liquênica são agrupados de acordo com a localização de seu talo e são definidos como produtos intracelulares e extracelulares (HALE-JR, 1983).

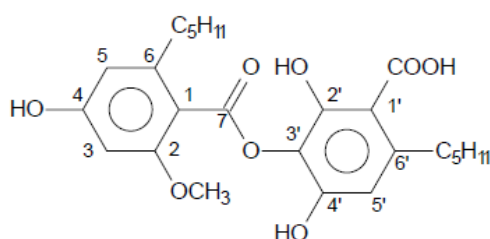
As substâncias produzidas no interior das células também são denominadas de metabólitos primários, são carboidratos, carotenoides, aminoácidos livres e vitaminas. São muitas vezes solúveis em água, e podem ser extraídos em água fervente (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996).

Produtos extracelulares, também chamados de metabólitos secundários, são sintetizados inicialmente nas células das hifas, mas acabarão por se tornar depositados no córtex ou na medula, como cristais amorfos ou acréscimos. Estes produtos são insolúveis em água e são geralmente extraídos com solventes orgânicos (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996).

Os compostos liquênicos são produzidos através de três rotas de produção de metabólitos secundários:

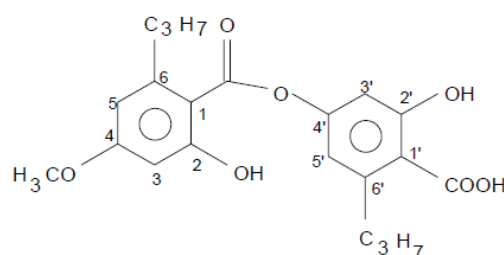
I: Rota acetato-polimalonato, em que ocorre a produção da maior parte dos metabolitos secundários. Nesta via são produzidos compostos alifáticos, como os ácidos graxos de cadeia longa e as substâncias aromáticas do tipo ácidos fenólicos. As Figuras 3 e 4 trazem representantes de ácidos oriundos desta via biossintéticas.

Figura 3- Ácido criptoclorofeico



Fonte: Honda e Vilegas, 1998

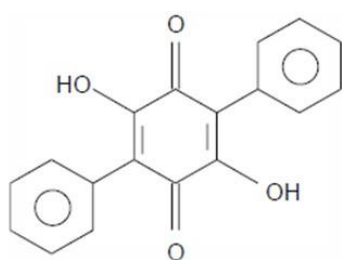
Figura 4- Ácido divaricático



Fonte: Honda e Vilegas, 1998

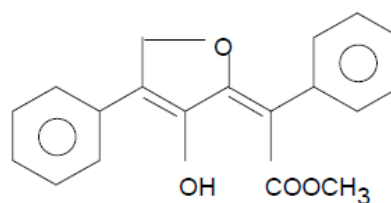
II: Rota do ácido xiquímico, responsável por produzir derivados do ácido pulvínico e pigmentos amarelos. Nas Figuras 5 e 6 estão alguns exemplos de compostos provindos desta via.

Figura 5- Ácido polipórico



Fonte: Honda e Vilegas, 1998

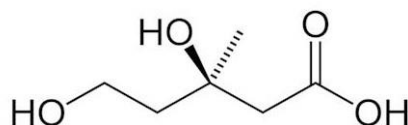
Figura 6- Ácido vulpínico



Fonte: Honda e Vilegas, 1998

III: Rota do mevalonato, onde ocorre a formação dos terpenoides e esteróis. Na Figura 7 está um composto representante do grupo (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; HONDA, 1997; XAVIER-FILHO et al., 2006).

Figura 7- Ácido mevalônico



Fonte: Junior, 2002.

3.4 Gênero *Ramalina*

As *Ramalina* são pertencentes ao Filo Ascomycota e à Família *Ramalinaceae*. A primeira espécie de *Ramalina* descrita no Brasil foi a *R. denticulata* (Eschw.) (KASHIWADANI; KALB, 1993).

O grupo das *Ramalinas* apresentam um talo fruticoso, composto por ramos que crescem a partir de um suporte basal. São sólidos, bilaterais, planos, de superfície rugosa e com pseudocifelas tuberculadas, laminais e numerosas na sua região inferior. Seu talo é moderadamente ramificado, com aproximadamente 3cm de altura, são arbustivas, e em algumas espécies encontra-se soredios e isídios. Nos táxons brasileiros os ascósporos são incolores e unicelulares, muitas vezes com 2-4 septos adicionais, possui apotécios (ascomas abertos) subterminais, com um disco côncavo. A presença ou ausência de fissuras no tecido condroide são considerados características importantes para o gênero (KASHIWADANI; KALB, 1993).

Ramalina aspera Räsänen

A espécie *R. aspera* possui um talo fruticoso, corticícola, moderadamente ramificado, com um comprimento de até 3 cm. Seus ramos são sólidos, 1 - 3,5 mm de largura, rígidos, com superfície rugosa, reticulada a irregularmente estriada (Figura 8). Com tecido condroide íntegro e ausência de soréidio e isídio. Pseudocifelas tuberculadas distintas, laminais e marginais, muitas vezes formando lóbulos. Com apotécio comum, subterminal (com ou

sem pústulas sólidas) e com ascósporos curto-fusiformes (KASHIWADANI & KALB, 1993).

No Brasil *R. aspera* é muito confundida com *R. complanata*, o que difere morfológicamente é a superfície estriada mais achatada dos ramos (*R. complanata*) e o tecido condroide rachado na mesma. As duas espécies possuem em sua composição química os ácidos úsnico e divaricático, porém *R. aspera* pode apresentar também o ácido criptoclorofeico e a outra espécie pode possuir o ácido salazínico (APTROOT; BUNGARTZ, 2007).

Figura 8: Exemplar da *Ramalina aspera*



Fonte: Dados da pesquisa, 2014.

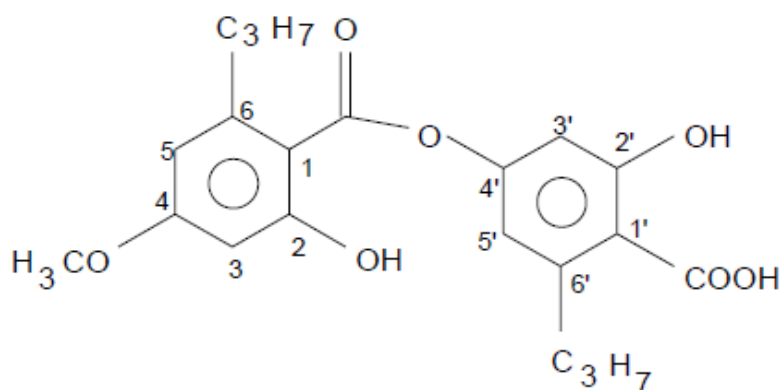
Ácido Divaricático

O ácido divaricático, principal componente da *R. aspera*, é um derivado fenólico e apresenta o orcinol como molécula precursora da sua biossíntese (HONDA e VILEGAS, 1998). A série do orcinol é responsável pela produção dos ácidos fenólicos nos líquens, através da esterificação intermolecular de duas ou três ou unidades idênticas. Por exemplo, o ácido carboxílico de uma unidade está ligado à hidroxila do outro ácido carboxílico da segunda unidade, formando assim, o grupo dos paradespsídeos (VICENTE, 1975; RANKOVIC´ & KOSANIC´, 2015).

Os paradespsídeos apresentam hidroxilas nas posições 2 e 4 do primeiro anel e na posição 2' do segundo, exceto no ácido planaico que é encontrado

metoxilas nas posições 2 e 2'. E no ácido divaricático a posição 4 encontra-se metoxilada (HONDA & VILEGAS, 1998) (Figura 9).

Figura 9 - Estrutura química do ácido divaricático



Fonte: Honda e Vilegas, 1998

3.5 Potencial Biológico dos Líquens

Há décadas os metabólicos liquênicos vêm sendo estudados quanto ao seu potencial biológico (RANKOVIC'; KOSANIĆ, 2015). O ácido divaricático, isolado de diferentes espécies de líquens teve comprovado seu potencial em algumas atividades. A atividade antimicrobiana foi relatada por Moura (2008), isolado da espécie *Canoparmelia texana* e Kosanić et al. (2010) isolou de *Lecanora frustulosa*. A atividade citotóxica foi descrita por Brandão et al., (2013) utilizando o líquen *Dirinaria aspera* para o isolamento do composto. Hidalgo et al., (1994) confirmou o potencial antioxidante *in vivo* do ácido divaricático isolado da *Prostunea malacea*.

Moreira et al. (2015) em um estudo de revisão, relatam que existem cerca de 246 espécies do gênero *Ramalina* distribuídas em todo o planeta, destas, descrevem 118 espécies possuintes de atividade biológicas mencionadas na literatura. Sendo que 153 compostos foram extraídos e isolados, porém apenas 27 foram testados quanto ao seu potencial biológico.

Para o gênero *Ramalina* foram descritas atividades antitumoral da espécie *R. complanata* (SILVA, 2014) e *R. cuspidata* (BÉZIVIN et al., 2003); antimicrobiana e antioxidante (FALCÃO et al., 2004; LUO et al., 2010; PAUDEL

et al., 2012; SAHIN et al., 2015). O gênero *Ramalina* tem apresentado um forte potencial biológico, em especial para as atividades antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, citotóxica, antiviral e anti-inflamatória, e seus metabólitos podem servir de modelos para novos compostos com propriedades terapêuticas (MOREIRA et al., 2015).

Cansaran et al. (2007) avaliaram cinco espécies de *Ramalina* para ação antimicrobiana, *R. fastigiata*, *R. capitata*, *R. polymorpha*, *R. polinaria* e *R. fraxinea*; foi isolado o ácido úsnico de todas as espécies. Os autores concluíram que quanto maior a concentração do ácido úsnico maior seu poder inibidor do crescimento bacteriano. Foi feita a avaliação antifúngica do ácido úsnico por Pires et al. (2012) e confirmaram o seu potencial inibidor do crescimento das espécies fúngica *Candida orthopsilosis* e *C. parapsilosis*. Resultados comprovam o forte potencial antimicrobiano do ácido úsnico.

Outras espécies liquênicas também tem demonstrado uma gama de atividades biológicas, tais como *Cladonia clathrata* com ações anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante (SILVA, 2009); *Usnea barbata* com potencial anticâncer e antioxidante (ZUGIC et al., 2016); *Umbilicaria cylindrica* com atividades antimicrobiana e antioxidante (MANOJLOVIĆ et al., 2012a); *Xanthoria parietina* com atividades antiproliferativa, antibacteriana e antifúngica (BASILE et al., 2015); *Parmelia arseneana* e *Acarospora fuscata* com ação antioxidante (KOSANIĆ et al., 2014); *Cladonia verticillaris* com ações antioxidante e expectorante (ALVES et al., 2014).

Rocha (2015) comprovou a ação antitumoral dos extratos orgânicos de *Cladonia substellata* e do ácido úsnico frente às linhagens de células neoplásicas NCI-H292 e HEP-2; no mesmo estudo ressaltou que as substâncias testadas não se mostraram genotóxicas e nem mutagênicas para as análises *in vivo*. Braga et al. (2015) avaliaram a ação carrapaticida do líquen *Parmotrema sp.* e obteve resultados eficazes para o controle da praga. Falcão et al. (2002) concluíram que a espécie *Heterodermia leucomela* apresentou ação antibacteriana contra micro-organismos Gram positivos.

Bézivin et al., (2003) avaliaram 24 espécies liquênicas quanto a toxicidade para células tumorais e constatou que as espécies *Cladonia convoluta*, *C. rangiformis*, *Parmelia caperata*, *Platismatia glauca* e *Ramalina cuspiadata* mostraram-se com um forte potencial antitumoral. Bankorova et al. (2011)

comprovou a ação dos compostos atranorina e ácido úsnico na indução a apoptose e a inibição da proliferação de células cancerígenas.

Fernández-Moriano et al. (2015) avaliaram o extrato metanólico de *Cetraria islandica* e *Vulpicida canadensis* para as atividades anticâncer *in vitro*, neuroprotetor e antioxidante e confirmaram um potencial citotóxico promissor para as células humanas HepG2 e MCF-7, e pela primeira vez comprovaram a ação neuroprotetora desta espécie, os extratos foram capazes de reverter o dano oxidativo do peróxido de hidrogênio, promovendo a sobrevivência dos astrócitos.

Vijayakumar et al. (2000) comprovaram o potencial anti-inflamatório do ácido úsnico, extraído do líquen *Roccella montagnei*, Oliveira (2003) também evidenciou ação no controle da inflamação para o extrato da espécie *Cladonia verticillaris*, Choudhary et al. (2005) comprovaram ações de isolados liquênicos acelerando o processo inflamatório. Oetl et al. (2013) descrevem o forte efeito da atividade anti-inflamatória para compostos liquênicos, dando destaque para os compostos depsídeos, sendo mais ativos do que as depsídonas.

Diversos autores relatam a atividade antioxidante para diferentes espécies liquênicas. Luo et al. (2010) afirmaram a atividade de captura de radicais livres para *Ramalina conduplicans*, Paudel et al. (2011; 2012) comprovaram essa ação para quatro espécies de *Ramalina*, Sahin et al. (2015), evidenciaram o potencial antioxidante para três espécies do mesmo gênero. Outros gêneros liquênicos também foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante, como descrevem os autores Behera et al. (2005; 2008), Paz et al. (2010), Manojlovic et al. (2012a; 2012b), Perico-Franco et al. (2015).

Odabasoghu et al. (2006) isolaram o ácido úsnico da espécie *Usnea longissima* e avaliaram a atividade gastroprotetora, e evidenciaram a ação do ácido úsnico reduzindo significativamente a lesão gástrica nos tecidos dos estômagos dos animais tratados. Luz et al. (2015) confirmaram o potencial do ácido úsnico leishmanicida, provocando alterações morfológicas contra a forma promastigota de *Leishmania infantum chagasi*. Recentemente Moreira et al. (2016) afirmaram que o extrato metanólico de *Ramalina usnea* apresentou 100 % de atividade contra a larva *Aedes aegypti*.

Vu et al. (2015) avaliaram compostos sintetizados a partir de metabolitos liquênicos e comprovaram um forte potencial contra o vírus da Hepatite C.

Sokolov et al. (2012) avaliaram pela primeira vez a atividade antiviral do ácido úsnico e de seus derivados, sendo que o ácido úsnico apresentou um maior valor de inibição ao vírus influenza H1N1 em relação aos seus derivados. Lai et al. (2013) isolaram compostos de *Ramalina farinacea* e comprovaram a ação antiviral do ácido sequicaico para o vírus sincicial respiratório.

Honda et al (2010) avaliaram as espécies *Parmotrema dilatatum*, *P. tinctorum*, *P. lichexanthonicum*, *Pseudoparmelia sphaerospora*, *Usnea subcavata*, *Ramalina* sp, seus isolados e derivados frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Verificaram que o ácido difractáico, isolado da *U. subcavata* apresentou um forte potencial inibidor desta bactéria.

Com isso os extratos de *Ramalina aspera* e o ácido divaricático apresentam-se com um forte potencial biológico, com moléculas bioativas inovadoras para a produção de novos análogos potencialmente ativos. Em adição, a espécie liquênica em estudo é pouco estudada em relação ao seu potencial biológico e não há registro na literatura sobre o isolamento do ácido divaricático desta espécie. Portanto, esse estudo consiste em uma adição valiosa para o conhecimento desta espécie de líquen e de seu potencial citotóxico, anti-inflamatório e antioxidante.

3.6 Processo Inflamatório

A inflamação é definida como uma reação local dos tecidos vascularizados a um agente agressor. Promove uma resposta inespecífica caracterizada por uma sequência de alterações que tendem a limitar os efeitos danosos (BOGLIOLO, 2009).

A ação inflamatória é caracterizada clinicamente por sinais cardinais, descrito inicialmente por Cornelius Celsius (mais de 2.000 anos atrás), sendo, o calor, rubor, edema e a dor; o último sinal cardinal é a perda da função, descrito posteriormente por Virchow no século XIX (FRANCO et al., 2010).

O calor e o rubor resultam de um aumento da permeabilidade vascular no local atingido. O edema é consequência do aumento do exsudato na área da lesão. A dor resulta de substâncias biológicas que atuam sobre as terminações nervosas. E a perda da função ocorre em decorrência de diversos fatores, em especial do edema e da dor (FARIA et al., 2003).

Dependendo de sua duração, a ação inflamatória é classificada em fase aguda e fase crônica. A fase aguda é a resposta inicial à lesão celular e do tecido, caracterizando-se por uma série de eventos inter-relacionados, entre os quais, o aumento no fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular na região afetada e migração de leucócitos. Tem duração de poucos minutos a alguns dias (GOMES-LEAL, 2002).

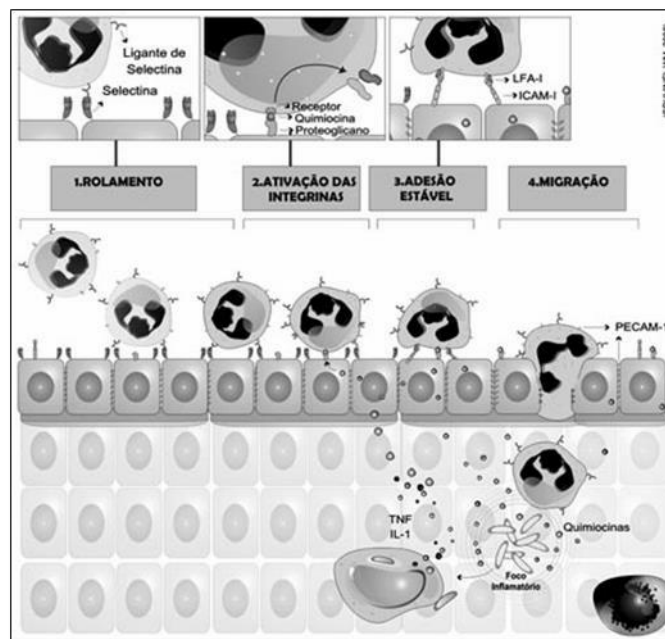
A fase crônica é caracterizada por um período maior de duração em relação a fase aguda. Além de promover todas as ações geradas na inflamação aguda, ocorre o fenômeno de proliferação de vasos, com consequente depósito de colágeno, e também proliferação de monócitos e linfócitos (FRANCO et al., 2010).

Durante o processo inflamatório ocorre alteração no fluxo sanguíneo e no calibre vascular, como a vasoconstrição transitória das arteríolas, assim como a vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo, o extravasamento de líquidos proteicos para os tecidos extravasculares, a marginação leucocitária e sua migração para o tecido intersticial (ROBBINS et al., 1991).

O aumento da permeabilidade vascular é muito importante na contenção e limitação do agente agressor, pois dilui o mesmo, facilitando sua retirada da área afetada e traz para o interstício celular anticorpos e outras moléculas envolvidas na inibição ou destruição do agente inflamatório, na modulação da resposta inflamatória e na iniciação da resposta imune adaptativa (FRANCO et al., 2010).

A marginação leucocitária (Figura 10) ocorre através da saída dos leucócitos do centro do vaso para a parede vascular, aderindo assim à superfície do endotélio. Essa adesão é feita através de mediadores químicos. A próxima etapa se dá com a migração dos leucócitos em direção aos estímulos quimiotáticos para posterior emigração para os tecidos extracelulares (ROBBINS et al., 1991).

Figura 10- Migração dos leucócitos para o sítio inflamatório



Fonte: adaptado de Moreira Jr, acesso em 20/01/2016

Uma etapa muito importante do processo inflamatório é a fagocitose e a degradação intracelular dos agentes agressores. Estes por vez são ingeridos pelas células fagocitárias. Esse fenômeno requer um reconhecimento das células que fazem a fagocitose. Há uma formação de um vacúolo fagocitário, para então ocorrer a morte ou degranulação do agente agressor, e posteriormente a sua liberação extracelular (FRANCO, et al., 2010).

O processo inflamatório está inteiramente relacionado com o processo de reparo do tecido lesionado. O reparo tem início durante as primeiras etapas da inflamação. Durante o reparo, o tecido lesionado pelo agente agressor é substituído através da regeneração de células parenquimatosas preenchendo a lesão com tecido cicatricial fibroblástico (ROBBINS et al., 1991).

3.7 Mediadores da Resposta Inflamatória

O controle da intensidade da resposta inflamatória, assim como seu desencadeamento, é realizado à custa de substâncias químicas, chamadas de mediadores, provenientes do plasma sanguíneo, sob a forma de pró-enzimas, armazenadas no interior de células ou produzidas durante o processo inflamatório (FARIA et al., 2003).

Durante o desencadeamento da resposta a inflamação, surgem vários mecanismos de ação anti-inflamatória no local, que neutralizam os efeitos dos fatores pró-inflamatórios, por meio de antiproteases e sequestradores de radicais livres, de glicorticóides e mediadores do sistema nervoso autônomo (BOGLIOLO, 2009).

Os mediadores da inflamação podem ser de origem celular ou plasmática (FARIA et al., 2003). Os produzidos pelas células são as aminas vasoativas (histamina e serotonina), as prostaglandinas, leucotrienos, proteínas catiônicas e proteases ácidas e neutras. Os derivados do plasma são os sistemas complemento, de coagulação, de cininas e as quimiocinas (ROBBINS et al., 1991; FARIA et al., 2003).

As aminas vasoativas (histaminas e serotonina) são responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, decorrente da fase imediata da ação inflamatória. Essas moléculas estão armazenadas no interior dos lisossomos e só são liberadas decorrente a estímulos exteriores (FRANCO et al., 2010).

3.8 Espécies Reativas de O₂

Durante o processo inflamatório os radicais livres exercem um papel fundamental para o combate de agentes causadores da inflamação. Os linfócitos liberam enzimas que produzem radicais livres no local da lesão, o oxigênio então é oxidado, gerando radicais livres que promovem a destruição da bactéria (FRANCO et al., 2010).

Radicais livres ou Espécies Reativas de O₂ são formados por átomos ou moléculas que contém elétrons desemparelhados, ocasionando alteração da reatividade química dos mesmos (HALLIWELL, 1994; ANDERSON, 1995). São altamente reativos e instáveis, possuindo um período de meia vida curta e sua produção ocorre naturalmente no organismo vivo, devido à exposição ao oxigênio molecular (VASCONCELOS et al., 2014).

São produzidos a nível celular através de modificações químicas de proteínas, lipídios, carboidratos e nucleotídeos, ocasionando uma variedade de consequências biológicas, incluindo lesão no tecido, mutação, carcinogênese,

comprometimento do sistema imunológico e morte celular (VASCONCELOS et al., 2014).

Desenvolvem diferentes funções no organismo como, o envolvimento na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas (ALVES et al., 2010). Porém, em excesso no organismo, podem gerar o estresse oxidativo, causando grandes danos teciduais (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SALVADOR e HENRIQUES, 2004; NASCIMENTO et al., 2011).

Os radicais livres podem ser adquiridos no organismo de forma endógena, através da respiração aeróbica, inflamações, mitocôndria, peroxissomos, enzimas do citocromo P450 (BIANCHI e ANTUNES, 1999; SALVADOR e HENRIQUES, 2004) ou de forma exógena, adquiridos através da radiação solar, causando separação da molécula da água, formando assim o radical, o qual é muito reativo no local de formação, também por ingestão de medicamentos, solventes orgânicos, da dieta e do cigarro (ANDERSON, 1995).

Manuscrito a ser submetido à revista:

Phytomedicine

International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology



Avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e o efeito citotóxico dos extratos e do ácido divaricático de *Ramalina aspera* Räsänen (líquen)

Maria Aparecida da Conceição de Lira^a, Tamiris Alves Rocha^b, Isla Bastos^c, Tatiane Bezerra de Oliveira^c, André Severino da Silva^a, Carlson Helder Reis de Carvalho Junior^c, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior^d, Maria de Lourdes Lacerda Buril^e, Teresinha Gonçalves da Silva^c e Emerson Peter da Silva Falcão^{a*}

a Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n - Bela Vista, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, 55608-680, Brasil.

b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, Cidade Universitária, Recife – Pernambuco, 50670-420, Brasil.

c Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida dos Economistas, Cidade Universitária, Recife - Pernambuco, 52171-011, Brasil.

d Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n - Bela Vista, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, 55608-680, Brasil.

e Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, Cidade Universitária, Recife – Pernambuco, 50670-420, Brasil.

*Autor para correspondência

Emerson Peter da Silva Falcão, Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n - Bela Vista, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, 55608-680, Brasil. Tel.: 55 81 996049584. Endereço de E-mail: emerson_falco@yahoo.com.br

Resumo

Líquens são notáveis organismos cujos metabólitos secundários são amplamente descritos pelo seu potencial biológico. Este trabalho descreve a avaliação da composição fenólica, através de técnicas cromatográficas em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE), dos extratos etéreo, clorofórmico, acetônico, metanólico e isolamento do ácido divaricático, da espécie *Ramalina aspera* Räsänen e a avaliação das suas atividades citotóxica *in vivo* e *in vitro*, anti-inflamatória *in vivo* e antioxidante. A análise cromatográfica por CCD dos extratos demonstrou a presença do ácido divaricático, por comparação com o padrão. A análise em CLAE comprovou a presença do ácido divaricático nos extratos etéreo e clorofórmico, em maior concentração no primeiro. O processo de purificação mostrou-se bastante eficiente levando a um produto com 99,3% de pureza. As substâncias liquênicas mostraram-se atóxicas para as doses baixas em linhagens de macrófagos e para os testes *in vivo*. Os ensaios de atividade anti-inflamatória foram realizados através do método de Edema de pata Induzido por carragenina em camundongos. Também foi determinada a Atividade Enzimática da Mieloperoxidase e a Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético. O ácido divaricático apresentou uma diminuição significativa no edema de pata na segunda hora, ($0,046 \pm 0,005$ mL) em relação ao controle negativo ($0,070 \pm 0,013$ mL), os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico também apresentaram diminuição de, $0,050 \pm 0,008$; $0,062 \pm 0,004$ e $0,057 \pm 0,005$ mL, respectivamente. Os efeitos dos compostos liquênicos sobre a mieloperoxidase demonstraram uma significativa diminuição da atividade enzimática, em comparação ao controle negativo. Foi verificado o efeito do extrato etéreo e do ácido divaricático sobre a permeabilidade vascular, os quais apresentaram um valor inferior a 300 $\mu\text{g/mL}$ em comparação com o controle negativo, o qual ultrapassou este valor, diminuindo assim, a vascularização local. As substâncias liquênicas demonstraram ação antioxidante, quando analisados através das técnicas de Sequestros de Radicais Livres (DPPH), Capacidade Antioxidante Total (ATT) e Redução do Íon Férrico (FRAP), sendo o ácido divaricático, a substância que apresentou um maior potencial de captura radicais livres, o único que comprovou um índice de inibição $>50\%$ em relação aos extratos testados para o método de DPPH. O extrato clorofórmico apresentou os melhores resultados se comparados as outras substâncias liquênicas testadas, para o método de ATT e FRAP. Os compostos liquênicos derivados da espécie *R. aspera* comprovaram baixa toxicidade, um bom anti-inflamatório e antioxidante.

Palavras chaves: Depsídeos. Inflamação. Líquens.

Introdução

Com aumento das doenças crônicas de caráter inflamatório, nas últimas décadas tem ocorrido uma busca incessante, no meio científico, para o desenvolvimento de novas drogas com potencial anti-inflamatório e baixos níveis de efeitos tóxicos (Van Ryn et al., 2000). Estudos têm revelado um aumento das pesquisas em relação aos produtos de origem natural como importantes produtores de pequenas moléculas bioativas contra diversas patologias (Rouhi e Washington, 2003).

Os líquens, organismos simbióticos, compostos por uma associação permanente entre um micobionte e um fotobionte, produzem uma variedade de substâncias bioativas (Xavier-Filho et al., 2006) com atividades biológicas como antimicrobiana (Falcão et al., 2004), citotóxica (Brandão et al., 2013), antioxidante (Sahin et al., 2015), antitumoral (Zugic et al., 2016) e anti-inflamatória (Choudhary et al., 2005), objeto deste estudo.

Durante a inflamação células especializadas no combate ao dano tecidual agem liberando mediadores químicos para acelerar o processo inflamatório e reparar os danos. Os linfócitos liberam também enzimas que produzem radicais livres no local da lesão, o oxigênio então é oxidado, gerando novos radicais livres que promovem a destruição da bactéria, um dos agentes causadores da inflamação (Franco et al., 2010). A resposta inflamatória é inicialmente benéfica, porém pode-se tornar prejudicial se o processo for desregulado, causando patologias que levam à morte do indivíduo (Medzhitov, 2008).

Neste sentido, substâncias de origem líquênica apresentam-se como fontes promissoras para busca de novas moléculas bioativas, apresentando baixa toxidez celular, já comprovado, tendo assim grandes chances de obter ações positivas no processo inflamatório. Em adição, não há estudos que relatem possível ação anti-inflamatória de extratos de *R. aspera* e do ácido divaricático.

Desta forma, o presente trabalho descreve a composição fenólica dos extratos orgânicos e do ácido divaricático isolado e purificado do extrato etéreo, bem como as ações anti-inflamatória *in vivo*, toxidez celular *in vivo* e *in vitro* e ação antioxidante *in vitro*, visando encontrar novos compostos ativos com uma significativa potencialidade farmacológica.

Material e Métodos

Coleta e Identificação da Espécie

A *Ramalina aspera* Räsänen (líquen) foi coletada no município de Limoeiro, situado no agreste Pernambucano, Nordeste do Brasil. Altitude de 138 m e coordenadas de latitude 07° 52' 29" S e longitude de 35° 27' 01" O. As amostras foram identificadas pela Dr^a Maria de Lourdes Lacerda Buril, do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica - UFPE, uma exsiccata da amostra foi depositada no Herbário UFPE - Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de depósito UFP 81.233 (Anexo 1).

Preparo dos Extratos Orgânicos

Foram pesados 40g do líquen macerado. A extração foi realizada por esgotamento a quente em aparelho de Soxhlet, seguindo a série eluotrópica dos solventes éter dietílico, clorofórmio, acetona e metanol. Foram utilizados 200 mL de cada solvente à temperatura refluxo. Em seguida os solventes foram evaporados em rotaevaporador em temperatura de ebulição para cada solvente e o material sólido foi mantido em dessecador para posterior cálculo de seus rendimentos.

Isolamento do Ácido Divaricático

O ácido divaricático foi obtido por cristalização a partir do extrato etéreo, que apresentou maior rendimento e maior concentração do metabólito, foi utilizado o método de Asahina e Shibata (1954), com alterações. Foram pesados 200mg dos cristais impuros obtidos do extrato etéreo e em seguida o material sólido foi lavado sucessivamente em funil poroso G4 utilizando os solventes hexano, clorofórmio e metanol, em sequência, a pureza do material obtido foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) e confirmada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Análises da composição fenólica dos extratos orgânicos

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os ensaios em CCD dos extratos orgânicos e composto purificado foram feitos através da metodologia descrita por Culberson (1972). As substâncias liquênicas foram diluídas até a concentração de 0,01 mg.mL⁻¹, sendo aplicados 0,001 µL da solução nas cromatoplasas de sílica Gel Merck F_{254nm}. Foi utilizado como sistema de

elução a mistura tolueno:dioxano:ácido acético (180:45:5, v/v). As bandas foram observadas sob luz UV, e reveladas com ácido sulfúrico a 10 % / 100 °C por 5 min., sendo as bandas identificadas por suas reações de cor e R_f do ácido divaricático, cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica – UFPE.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises em CLAE foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Legaz e Vicente (1983), como fase móvel, em sistema isocrático constituída por metanol:água:ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v), numa pressão de 88 atm a 30 °C. As substâncias foram diluídas numa concentração de 0,1 mg.mL⁻¹. Os resultados foram avaliados mediante a determinação do tempo de retenção (Tr) das substâncias na coluna e a área dos picos, respectivamente.

Dosagem de Fenóis Totais

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Li et al., 2008). Para cada poço, foi adicionado 1 mL da solução de Folin diluída de 1:10 (v/v) e 0,2 mL dos extratos etéreo, clorofórmico, acetônico, metanólico e o ácido divaricático a 1 mg.mL⁻¹ em metanol. Após 3 min. no escuro, foi acrescentado 0,8 mL de carbonato de sódio a 7,5 %, deixando por mais 120 min. no escuro a temperatura ambiente. Após esse período as absorbâncias das amostras foram lidas a 765 nm contra um branco (reagente adicionado ao metanol). A concentração total de compostos fenólicos presentes nas amostras foi determinada em termos de Equivalente de Ácido Gálico (µg EAG/mg de extrato), usando uma equação que foi obtida a partir de uma curva de calibração ($Y = ax + b$) (anexo 4):

$$\text{Absorbância} = 0,0121 \times \text{fenóis totais } [\mu\text{g EAG/mg de extrato}] + 0,032 \quad (R^2 = 0,9967)$$

Dosagem de Flavonoides

A técnica colorimétrica com cloreto de alumínio descrita por Woisky e Salatino (1998) foi utilizada para estimativa de flavonoides, com algumas modificações. Em cada tubo foi adicionado 0,5 mL do reagente de cloreto de alumínio (2 g de cloreto de alumínio diluído em etanol a 2 %), mais 0,5 mL das amostras (extratos etéreo, clorofórmico, acetônico, metanólico e o ácido divaricático) em triplicata. A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 60 min., no escuro. As absorbâncias das amostras foram lidas a 420 nm contra um branco. A concentração de flavonoides presentes nas amostras foi determinada em termos de Equivalente de Quercetina (µg

EQ/mg de extrato), usando uma equação que foi obtida a partir de uma curva de calibração ($Y = ax + b$) (anexo 5):

$$\text{Absorbância} = 0,0284 \times \text{teor de flavonoides } [\mu\text{g EQ/mg de extrato}] + 0,037 \quad (R^2 = 0,9918)$$

Atividade Citotóxica *in vitro*

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Mosmann, 1983). Foi utilizada a linhagem de células murinas Raw 264.7 (macrófagos) e mantida em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). O meio foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em incubadora a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂. As células (10⁵ células/mL) foram postas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (1 %) foram adicionadas aos poços nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL juntamente com o grupo controle contendo meio DMEM. Após 24 h de incubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg.mL⁻¹) em cada poço e as células reincubadas por 3 h. Após o período de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço. A absorbância foi lida a um comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas e apenas amostras que apresentaram atividade citotóxica menor que 30 % foram consideradas não-citotóxicas.

Atividade Hemolítica *in vitro*

Os testes de atividade hemolítica seguiram a metodologia descrita por Jandú et al. (2013). O sangue (A+ e O+) do ensaio hemolítico *in vitro* (5 a 10 mL) foi obtido de voluntários saudáveis por punção venosa e colocado em tubos heparinizados. Os eritrócitos humanos foram isolados por centrifugação (1500 rpm, 10 min. a 4 °C). Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4). Cada tubo recebeu 1,1 mL de suspensão de eritrócitos (1 %) e 0,4 mL dos extratos etéreo, clorofórmico, acetônico e do ácido divaricático (0,5 a 0,05 mg.mL⁻¹) nas concentrações 62,5; 125; 250 e 500 µL.mL⁻¹. Foi utilizado como controle negativo o DMSO 20% e como controle positivo o Triton. Após 90 min. de incubação sob agitação as células foram centrifugadas (3.500 rpm 10 min.) e a absorbância do

sobrenadante foi registrada a 540 nm. A atividade hemolítica foi expressa pela fórmula seguinte:

$$H = \frac{(As - Ac)}{Ac - Ab} * 100$$

Onde: H = Atividade hemolítica (%)

Ab = absorbância do controle negativo;

As = absorbância da amostra;

Ac = absorbância do Triton.

Animais experimentais

Camundongos albinos swiss (*Mus musculus*) de ambos os sexos (25-35g), com idade de 60 dias, foram mantidos em gaiolas de polipropileno com grades inoxidáveis e maravalha como cobertura, à temperatura de 22 ± 3 °C, com ciclo claro-escuro de 12 h, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a jejum de 8 horas antes de cada experimento. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE (nº 23076.049165/2015-96) (Anexo 2), com as normas proposta pelo Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS) e pelas normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Toxicidade Aguda *in vivo*

A Toxicidade Aguda foi avaliada segundo a metodologia recomendada pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001). O teste constituiu na administração da dose de 2000 mg.kg⁻¹ via oral dos extratos orgânicos e ácido divaricático. Um grupo recebeu apenas solução salina, controle negativo. Foram utilizados 3 animais para cada composto em duplicata. Após a administração, os animais foram observados continuamente nas primeiras duas horas e depois a cada 24 horas diariamente durante 14 dias, para a verificação de qualquer alteração comportamental ou nas atividades fisiológicas e mortalidade. Não havendo morte dos animais, a amostra será considerada atóxica.

Teste de Edema de Pata Induzido por Carragenina (Cg) em Camundongos *in vivo*

Camundongos machos (n=5) foram tratados via oral com os extratos etéreo, clorofórmico, acetônico e ácido divaricático (dissolvidos em salina + tween 80 5%) na dose de 30 mg.kg⁻¹ (1,5 % da dose utilizada na toxicidade aguda), indometacina (10 mg.kg⁻¹) como controle positivo e veículo (salina + tween 80 5%) como controle negativo 1 h antes da injeção da Cg. O edema foi induzido pela injeção de 50 µL de Cg a 1% (v/v) na região subplantar da pata posterior direita (Winter et al., 1962). O volume da pata foi medido antes e nos intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a injeção de Cg pelo pletismômetro (Ugo Basile). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo e o volume inicial. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, o tecido plantar inflamado foi coletado e armazenado em tampão fosfato de potássio com 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) para determinação da atividade enzimática da mieloperoxidase. O modelo de edema de pata também foi utilizado como triagem para escolha da substância mais eficiente para realização da atividade experimental de permeabilidade vascular.

Atividade Enzimática da Mieloperoxidase (MPO) *in vivo*

O tecido plantar (25 mg / pata) coletado do experimento anterior (Edema de pata induzido por Cg) foi adicionado a 0,5 mL de solução de fosfato de sódio 80 mM contendo 0,5 % de HTAB (Young et al., 1989). A amostra foi homogeneizada e centrifugada durante 10 min. a 3.000 rpm. Alíquotas do sobrenadante (10 µL) foram distribuídas em triplicata em placa de 96 poços e adicionado 200 µL da solução de O-dianisidina (16,7 mg de O-dianisidina [Sigma, St. Louis, Missouri, USA] mais 90 mL de água deionizada, 10 mL de tampão fosfato de potássio, 50 µL de peróxido de hidrogênio a 1 %). A leitura foi realizada imediatamente após a adição da solução de O-dianisidina a 450 nm e expressa como Densidade Óptica / tecido.

Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético *in vivo*

Os efeitos dos compostos no aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético foram determinados de acordo com o método descrito por Whittle et al. (1964). Os camundongos (n=5) receberam por via oral o extrato etéreo e o ácido divaricático (30 mg.kg⁻¹) (obtiveram melhor ação anti-inflamatória), indometacina (10 mg.kg⁻¹) como controle positivo e veículo (salina) como controle negativo, 30 min. após, os animais receberam no plexo-orbital 0,2 mL de solução de azul de Evans a 1 % (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 10 min. após, foi injetado 0,5 mL de ácido acético a 1 % por via intraperitoneal. Após 30 min., os animais foram eutanasiados em câmara

de CO₂ e a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de solução salina. Os exsudatos foram centrifugados e o sobrenadante foi distribuído em microplaca de 96 poços em triplicata. As absorbâncias foram medidas a 630 nm e a concentração de azul de Evan foi calculada usando uma curva padrão.

Atividade Antioxidante

Sequestro de radicais livres (SRL) pelo método do DPPH

A atividade sequestradora de radicais livres das substâncias foi medida em termos de doação de hidrogênio usando o radical estável 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH) (Blois, 1958). Foram adicionados 250 µL da solução de DPPH (1 mM) em 40 µL de diferentes concentrações das amostras (extratos etéreo, clorofórmico, acetônico, metanólico e o ácido divaricático) 62,5; 125; 500 e 1000 µg.mL⁻¹. Após 25 min. foi medida a absorbância em 517 nm. O ácido gálico foi utilizado como o composto de referência, e para o controle negativo foi utilizado o DPPH adicionado a 40 µL de metanol (solvente utilizado para diluir as amostras). A eliminação de radicais de DPPH foi calculada pela fórmula:

$$EDPPH = \frac{(A-C)}{C} * 100$$

Onde:

EDPPH – Eliminação de DPPH (%)

A – Amostra;

C – Controle

Atividade Antioxidante Total – ATT

Para a verificação do ATT, os extratos etéreo, clorofórmico, acetônico, metanólico e o ácido divaricático foram diluídos a concentração de 1 mg.mL⁻¹ em metanol. 0,1 mL de cada amostra foi adicionada à 1 mL da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio), e posteriormente incubados em água a 95 °C por 90 min. Após voltarem a temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram medidas a 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL do metanol) (Pietro et al., 1999). A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido gálico, calculada pela seguinte fórmula:

$$ATT = \frac{(A-C)}{VitC-C} * 100$$

Onde:

ATT – Capacidade de captura de radicais livres

A – Amostra;

C – Controle;

VitC – Ácido ascórbico

Método de Redução do Íon Férnico

Para a preparação do FRAP foram utilizados 10 mL de TPTZ, 10 mL de FeCl₃ e 100 mL de tampão acetato, aquecer por 5 min. em 37 °C sob agitação. Os extratos etéreo, clorofórmico, acetônico, metanólico e o ácido divaricático foram diluídos em metanol (1 mg.mL⁻¹). Em placa de 96 poços foram adicionados 20 µL da amostra mais 180 µL do reagente (no escuro), incubados por 40 min. a 37 °C. A leitura foi feita em espectro a 593 nm. A redução do Fe³⁺ em Fe²⁺ foi calculado em Trolox Equivalente (TE) a partir da curva de calibração, em anexo 3.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, com nível de significância de 5 %, sendo aplicado o teste de Tukey a 5 % de probabilidade, através do software SAS (Statistical Analysis System) 9.1 e pelo programa GraphPad Prism 5.0.

Resultados

Obtenção dos extratos orgânicos

Foram obtidos os extratos de interesse, sendo que o extrato metanólico apresentou um maior rendimento (43,5 %) em relação aos demais extratos. Os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico obtiveram um rendimento de 7,5 %, 0,61 % e 0,87 % respectivamente. O ácido divaricático isolado do extrato etéreo com cristais de coloração amarela, apresentou um rendimento de 40 %.

Análises da composição fenólica de *R. aspera*

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na análise em CCD dos extratos orgânicos observou-se a presença do ácido divaricático nos extratos etéreo, clorofórmico e metanólico. Uma banda não identificada foi observada no extrato acetônico (0,15). Nos extratos etéreo e clorofórmico observaram-se bandas distintas ao ácido divaricático, porém não foram identificadas (Figura 1). O composto isolado do extrato etéreo, confirmou-se como ácido divaricático, pois o valor de seu RF (0,57) foi confirmado com o padrão (0,55).

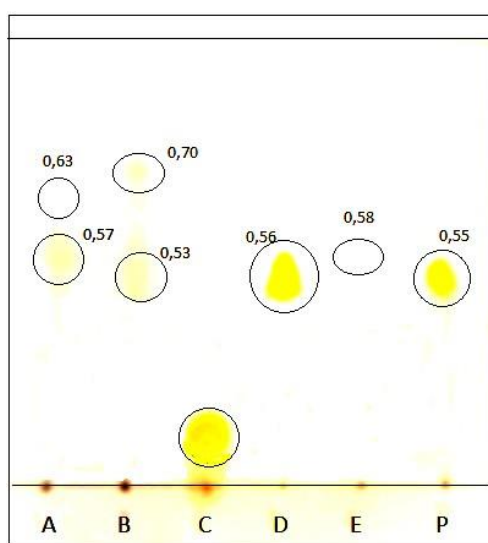


Figura 1- Análise em CCD. **A-** Extrato etéreo; **B-** Extrato clorofórmico; **C-** Extrato acetônico; **D-** ácido divaricático isolado; **E-** Extrato metanólico e **P-** Ácido divaricático.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O processo de purificação do ácido divaricático mostrou-se satisfatório obtendo-se o composto com pureza de 99,3 % e com um Tr de 15,97 min. como visto na Figura 2.

A análise em CLAE do extrato etéreo evidenciou a presença de 7 picos (Figura 3), sendo o composto principal (95,8 %) identificado por comparação com o padrão como o ácido divaricático (Tr= 15,80 min.). Os demais compostos permaneceram não identificados. O cromatograma do extrato clorofórmico está descrito na Figura 4. O cromatograma do extrato acetônico curiosamente apresenta um único pico, com um Tr de 3.02 min. (Figura 5).

As análises em CLAE estão de total acordo com os resultados em CCD.

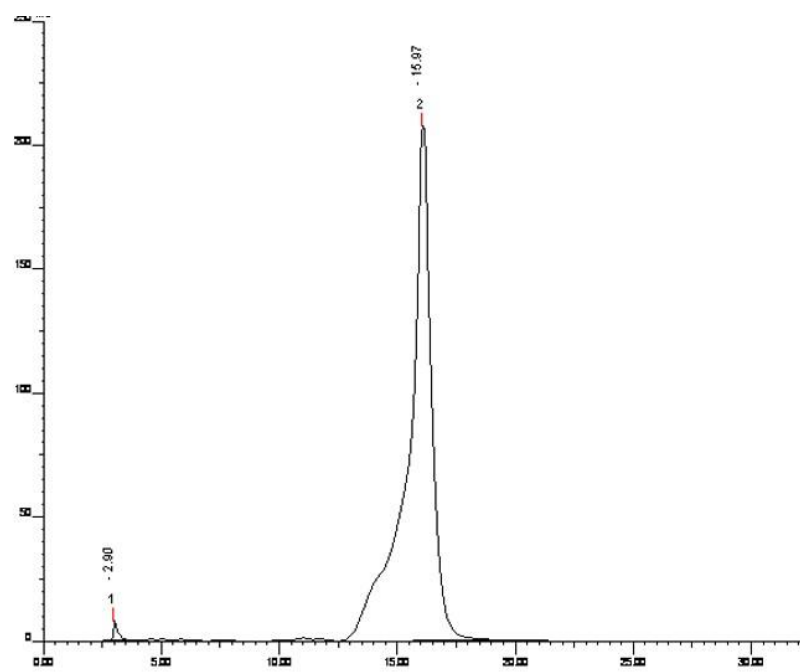


Figura 2 – Análise em CLAE do ácido divaricático

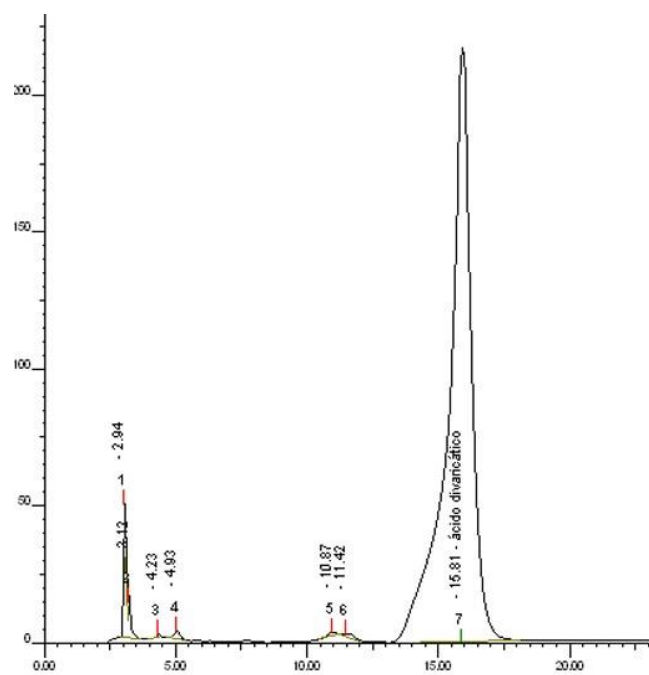


Figura 3 – Análise em CLAE do extrato etéreo

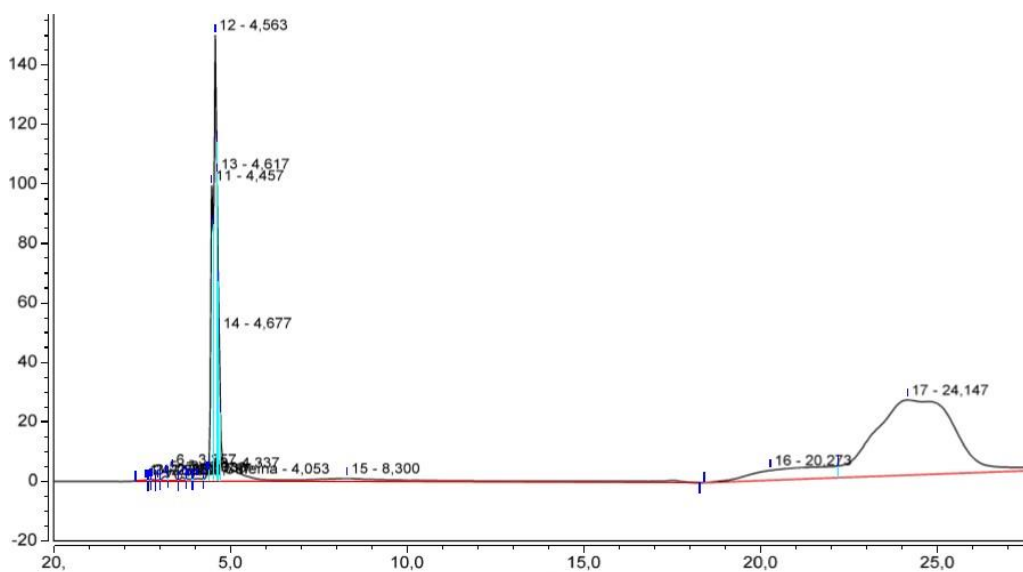


Figura 4 – Análise em CLAE do extrato clorofórmico

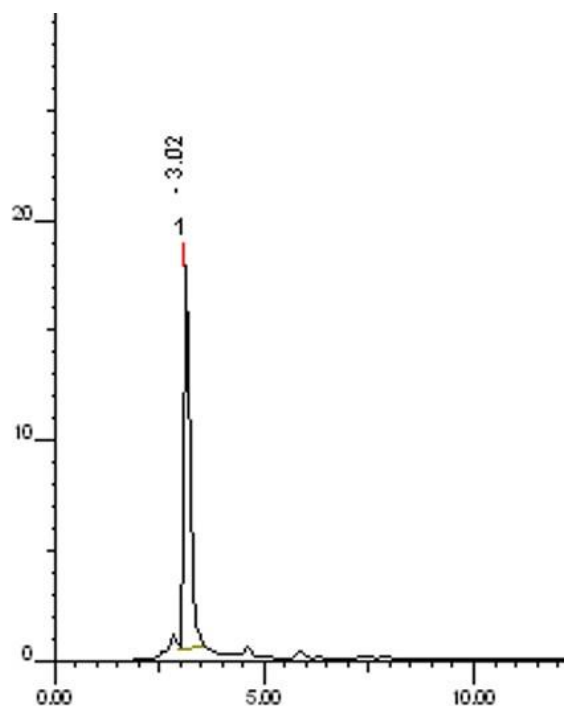


Figura 5 – Análise em CLAE do extrato acetônico

Dosagem de fenóis totais e flavonoides

A quantidade de compostos fenólicos totais foi determinada como o equivalente de ácido gálico sendo identificado uma maior quantidade de fenóis no ácido divaricático e no extrato etéreo. A quantidade total de flavonoides foi determinada como sendo o equivalente de quercetina. O teor de flavonoides

apresentou-se em pequenas quantidades para os compostos liquênicos, como apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Dosagem de fenóis totais e de flavonoides dos extratos de *R. aspera* e do ácido divaricático.

Amostras	Dosagem de Flavonoides ($\mu\text{g EQ/mg amostra}$)	Dosagem de Fenóis Totais ($\mu\text{g EAG/mg amostra}$)
Extrato etéreo	$13,89 \pm 4,55$	$80,83 \pm 7,17$
Extrato clorofórmico	$17,12 \pm 4,50$	$26,50 \pm 6,07$
Extrato acetônico	$6,06 \pm 0,08$	$49,20 \pm 1,40$
Extrato metanólico	$0,93 \pm 0,16$	$20,30 \pm 3,2$
Ácido divaricático	$1,07 \pm 2,12$	$84,83 \pm 4,34$

Resultados expressos em Média $\pm$ DP.

Citotoxicidade *in vitro*

Os compostos liquênicos apresentaram toxidez para as células murinas Raw 264.7 nas doses mais altas, porém nas doses de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ os extratos e o ácido divaricático mostraram não ser tóxicos para as células testadas, visto que, seus valores foram inferiores a 30 %, conforme a Tabela 2.

Tabela 2- Avaliação da atividade citotóxica das frações dos extratos de *R. aspera* e do ácido divaricático em células da linhagem Raw 264.7. Resultados expressos em Média $\pm$ DP.

Amostras	% de inibição em células Raw 264.7				
	Controle	$100 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$50 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$25 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Extrato etéreo	$12,7 \pm 0,71$	$85,91 \pm 0,36$	$50,06 \pm 0,89$	$18,11 \pm 0,53$	$16,73 \pm 4,62$
Extrato clorofórmico	$12,7 \pm 0,71$	$50,82 \pm 2,67$	$33,46 \pm 0,89$	$20,00 \pm 1,07$	$13,96 \pm 1,78$
Extrato acetônico	$12,7 \pm 0,71$	$57,99 \pm 0,71$	$43,27 \pm 4,80$	$13,33 \pm 0,89$	$10,81 \pm 0,18$
Ácido divaricático	$12,7 \pm 0,71$	$62,01 \pm 0,71$	$30,44 \pm 0,90$	$22,64 \pm 1,24$	0

As diferentes concentrações e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism 5.0*.

Atividade hemolítica *in vitro*

Os extratos clorofórmico e acetônico demonstraram valores inferiores de hemólise nos eritrócitos humanos, para os tipos sanguíneo A+ e O+ se comparados ao controle positivo Triton, como descrito na tabela 3.

Tabela 3- Atividade hemolítica dos extratos de *R. aspera* e do ácido divaricático em eritrócitos humanos. Resultados expressos em Média $\pm$ DP.

Tipo sanguíneo	Concentração	Triton	Extrato etéreo	Extrato clorofórmico	Extrato acetônico	Ácido divaricático
A+	500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	1,92 $\pm$ 1,74	8,11 $\pm$ 0,00	1,64 $\pm$ 0,48	0,68 $\pm$ 0,01	10,59 $\pm$ 5,03
	250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	1,92 $\pm$ 1,74	1,88 $\pm$ 0,60	1,18 $\pm$ 1,70	0,50 $\pm$ 0,18	1,19 $\pm$ 0,40
	125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	1,92 $\pm$ 1,74	1,55 $\pm$ 0,43	0,05 $\pm$ 0,11	0,17 $\pm$ 0,14	0,39 $\pm$ 0,12
	65,2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	1,92 $\pm$ 1,74	0,43 $\pm$ 0,30	0,20 $\pm$ 0,13	0,02 $\pm$ 0,13	0,04 $\pm$ 0,21
O+	500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	1,12 $\pm$ 0,13	11,9 $\pm$ 1,95	0,91 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,17	92,25 $\pm$ 2,04
	250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	1,12 $\pm$ 0,13	9,24 $\pm$ 3,09	1,29 $\pm$ 0,51	0,4 $\pm$ 0,05	2,92 $\pm$ 0,62
	125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	1,12 $\pm$ 0,13	5,58 $\pm$ 1,32	1,67 $\pm$ 0,3	0,64 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 1, 04
	65,2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	1,12 $\pm$ 0,13	-1,32 $\pm$ 0,15	1,53 $\pm$ 0,12	1,32 $\pm$ 0,11	1,22 $\pm$ 0,31

Avaliação da Toxidez Aguda

Os compostos liquênicos não apresentaram toxidez significativa, visto que nenhum animal veio a óbito.

Atividade anti-inflamatória

A injeção de Cg nos animais promoveu um aumento no edema da pata que alcançou o máximo de espessura 5 h após o estímulo (Tabela 4). O ácido divaricático apresentou uma diminuição significativa no edema na segunda hora, (0,046 $\pm$ 0,005 mL) em relação ao controle negativo (0,070 $\pm$ 0,013 mL), os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico também produziram diminuição do edema, 0,050 $\pm$ 0,008; 0,062 $\pm$ 0,004 e 0,057 $\pm$ 0,005 mL, respectivamente. Os extratos e o ácido divaricático provocaram um percentual de inibição significativo quando comparado ao grupo do controle negativo.

Tabela 4- Efeito dos extratos de *R. aspera* e do ácido divaricático sobre o edema de pata induzido por Carragenina.

Grupos	Dose (mg/kg)	Volume do edema (mL)					
		1h	2h	3h	4h	5h	6h
Controle negativo	-	0,051 ± 0,012	0,070 ± 0,013	0,074 ± 0,005	0,085 ± 0,008	0,087 ± 0,009	0,073 ± 0,004
Extrato etéreo	30	0,038 ± 0,010 ^a	0,050 ± 0,008 ^d	0,062 ± 0,004 ^a	0,072 ± 0,004 ^a	0,073 ± 0,005 ^a	0,053 ± 0,005 ^d
Extrato clorofórmico	30	0,048 ± 0,004	0,062 ± 0,004	0,077 ± 0,005	0,075 ± 0,005	0,078 ± 0,007	0,076 ± 0,005
Extrato acetônico	30	0,038 ± 0,008 ^a	0,057 ± 0,005 ^a	0,073 ± 0,005	0,072 ± 0,004 ^a	0,075 ± 0,007 ^a	0,054 ± 0,005 ^c
Ácido divaricático	30	0,024 ± 0,005 ^{d#}	0,046 ± 0,005 ^d	0,070 ± 0,007	0,070 ± 0,007 ^b	0,070 ± 0,001 ^c	0,048 ± 0,010 ^d
Indometacina	10	0,016 ± 0,005 ^a	0,016 ± 0,005 ^d	0,035 ± 0,005 ^d	0,032 ± 0,004 ^d	0,030 ± 0,008 ^d	0,016 ± 0,005 ^d

Dados representam a média ± DP volume do edema (mL) nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a injeção de Cg a 1% (N=5); ^a $P<0,05$; ^b $P<0,01$; ^c $P<0,001$; ^d $P<0,0001$ v.s Controle. # Não significativo vs indometacina. Controle negativo – Sanila + tween 80 5 %.

Para atividade de MPO foi analisado o tecido plantar inflamado dos animais, sendo determinada como indicativo indireto da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. O extrato etéreo e o ácido divaricático demonstraram valores significantes ≤ 0.3 em relação ao controle negativo < 0.5 (DO/tecido) (Figura 6). Os demais extratos não apresentaram resultados significativos.

Com o intuito de avaliar a participação das aminas vasoativas na resposta anti-inflamatória dos compostos liquênicos foi feito o teste de permeabilidade vascular. O extrato etéreo e o ácido divaricático foram submetidos a esse teste por terem demonstrado um resultado significativo no teste anti-inflamatório induzido por Cg. Os compostos apresentaram um valor ≤ 300 $\mu\text{g/mL}$ na diminuição da vascularização local, em comparação ao controle negativo (Figura 7).

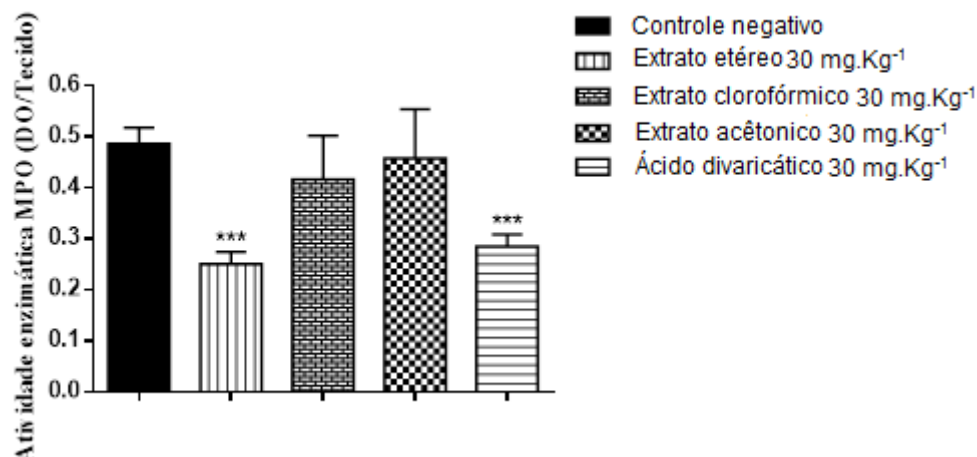


Figura 6– Efeito dos extratos de *R. aspera* e do ácido divaricático sobre a atividade enzimática da MPO. Valores expressos em média $\pm$ DP da densidade óptica por tecido (n=5), ***p<0.001 v.s controle negativo.

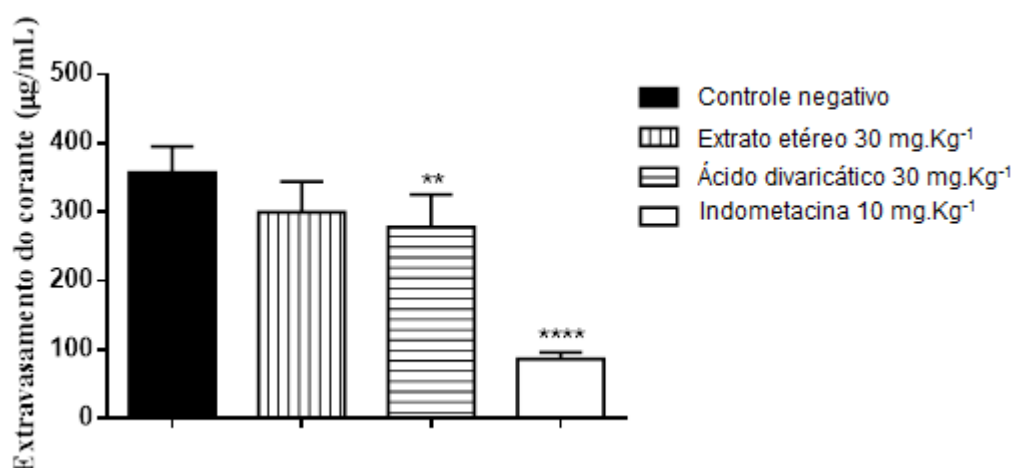


Figura 7 – Efeito do extrato etéreo e do ácido divaricático sobre o aumento da permeabilidade induzida por ácido acético. Valores expressos em média $\pm$ DP representa por concentração do azul de Evan extravasado no peritônio de camundongos (n=5), **p<0.01, ****p<0.0001 v.s controle.

Atividade Antioxidante

Constatou-se que o ácido divaricático apresentou porcentagem de inibição de $59,67 \pm 0,42$ % para a concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 5). Os extratos etéreo, clorofórmico, acetônico e metanólico apresentaram valores significativos de inibição aos radicais livres. Todos demonstraram valores inferiores aos do controle positivo, o ácido gálico ($95,53 \pm 0,09$ %) na maior concentração.

Os resultados observados para os ensaios de ATT e FRAP também estão expressos na tabela 5. A capacidade antioxidante total dos extratos liquênicos mostrou-se significativa, sendo o extrato clorofórmico o mais ativo com o valor de

32,54± 0,8 % e superior aos padrões, ácido gálico (1,62±0,12 %) e o BHT (3,98±0,02 %). A redução do íon férrico demonstrou que o extrato clorofórmico foi o mais ativo em comparação com os outros extratos, apresentando porcentagem de inibição de 6,78±0,67 %, inferior ao Trolox (38,13±0,07 %).

Tabela 5- Atividade antioxidante dos extratos de *R. aspera* e do ácido divaricático

Amostras	ATT (µg/mL)	FRAP µg FeSO ₄ /mg de extrato	DPPH (µg/mL)
Extrato etéreo	25,08 ± 0,3	3,90 ± 0,10	25,30 ± 1,71
Extrato clorofórmico	32,54 ± 0,8	6,78 ± 0,67	47,04 ± 3,72
Extrato acetônico	6,14 ± 0,06	5,70 ± 0,51	45,82 ± 1,21
Extrato metanólico	10,36 ± 5,13	4,87 ± 0,42	21,80 ± 2,35
Ácido divaricático	15,02 ± 0,63	3,28 ± 0,17	59,67 ± 0,42
Ácido Gálico	1,62 ± 0,12	1849,20 ± 59,66	95,53 ± 0,09
BHT	3,98 ± 0,02	206,64 ± 19,25	X
Trolox	X	38,13 ± 0,07	X

Os resultados são apresentados como média ± DP, expressos em porcentagem de inibição.
X= não foi avaliado.

Discussão

As análises dos perfis fenólicos confirmaram o ácido divaricático presente em *R. aspera* como o principal componente da espécie. A presença de um único pico no extrato acetônico, entretanto, pode não indicar composto puro. Resultado semelhante foi observado por Gonçalves (2013) que, porém, atribuiu, após análise por CLAE acoplado a espectrômetro de massas, a uma possível sobreposição dos picos correspondentes aos ácidos homosequicáico e sequicáico. Uma vez que o padrão de fragmentação e íons moleculares apresentados corresponderem às massas dos mencionados compostos.

Na literatura não há descrição sobre atividade citotóxica em linhagem de macrófago para extratos ou compostos liquênicos. Entretanto são diversas as menções de ação citotóxica de compostos liquênicos. Na dissertação de Moura (2006) foi feita a avaliação do ácido úsnico encapsulado a lipossoma e testado em cultura de

macrófagos e em célula HEP – 2 (câncer), verificando uma ação tóxica para as duas linhagens celulares, sendo mais ativo para a inibição do câncer.

Brandão et al. (2013) comprovou o potencial do ácido divaricático como um forte inibidor de células tumorais (UACC-62; B16-F10), sendo mais ativo do que a droga testada, doxorrubicina, e pouco tóxico para células normais 3T3. Resultado semelhante ao presente trabalho, que mostrou o ácido divaricático pouco tóxico para linhagens de macrófagos. Paudel et al. (2011) comprovou ação citotóxica de espécies de *Ramalina* para queratinócitos e fibroblastos humanos, semelhante os resultados deste trabalho, o qual os compostos avaliados mostraram-se hemolítico para os eritrócitos humano.

Oliveira (2003) comprovou que os extratos do líquen *Cladonia verticillaris* apresentaram baixa toxicidade por via oral, proporcionando uma boa margem de segurança em doses terapêuticas, o mesmo relatou Silva (2014) para o ácido salazínico, extraído da *Ramalina complanata*, semelhante com os resultados de toxicidade celular *in vivo* do presente estudo.

Os extratos etéreo, clorofórmico, acetônico e o ácido divaricático apresentaram valores significantes para a ação anti-inflamatória, sendo o ácido divaricático o composto mais ativo para o método de edema de pata induzido por Cg, semelhante aos resultados descritos por Vijayakumar et al. (2000), que comprovaram o potencial anti-inflamatório do ácido úsnico, extraído do líquen *Roccella montagnei*, pelo mesmo método estudado.

O edema de pata provocado pela ação da Cg possibilita inicialmente um aumento na permeabilidade vascular pela histamina e serotonina, sendo que o maior volume do edema é após as três horas da aplicação da Cg, é caracterizado pela ação das prostaglandinas sobre a permeabilidade capilar (Di Rosa et al., 1971). Choudhary et al. (2005) já tinham comprovado ações de isolados liquênicos acelerando o processo inflamatório.

Tanas et al. (2010) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico de *Peltigera rufescens* e verificaram a redução da inflamação aguda, no modelo de edema de pata induzido por Cg, mostraram também um efeito proliferativo potente no modelo de inflamação crônica. E a redução da enzima MPO que foi aumentada pela injeção de Cg. Oettl et al. (2013) descreveram o forte efeito da atividade anti-inflamatória para compostos liquênicos, dando destaque para os compostos depsídeos, sendo mais ativos do que os depsídonas. Resultados estão de acordo com o presente estudo.

Jain et al. (2016) recentemente comprovaram a atividade do extrato acetônico do líquen *Parmotrema reticulatum*, inibindo significativamente o edema de pata induzido

por Cg e concluíram a eficácia do extrato etanólico na dose de 300 mg/Kg em todos os modelos anti-inflamatórios testados em sua pesquisa. Estes resultados confirmam o presente estudo, sendo a dose testada com menor diluição, 30 mg/Kg.

Os extratos do líquen *Ramalina aspera* Räsänen e o ácido divaricático, composto majoritário da espécie, tiveram a confirmação de sua ação antioxidante em técnicas diferentes de avaliação de captura de radicais livres. Estudos feitos por Paudel et al. (2011) mostram resultados diferentes, em seus experimentos o extrato metanólico de *Ramalina terebrata*, a ação antioxidante por DPPH mostrou um potencial cinco vezes maior do que o padrão positivo, BHA. Porém, nos trabalhos de Gulluce et al. (2006), analisando o extrato metanólico de algumas *Ramalina*, não apresentam um índice de inibição superior que 50% para a eliminação de radicais livres, resultado semelhante ao presente trabalho.

Manojlović et al. (2012) em seus experimentos com os extratos clorofórmico, etéreo e metanólico de espécies liquênicas, evidenciaram um resultado significativo para captura de radicais livres para os testes com DPPH e ATT. Nos estudos de Zugic et al. (2016), utilizando o ácido úsnico e os extratos de *Usnea barbata* para a avaliação do efeito antioxidante, pelo método de DPPH, não comprovaram atividade para os compostos liquênicos.

Sahin et al. (2015) estudaram três espécies diferentes do gênero *Ramalina* com extratos acetônico, etanólico e metanólico. A técnica utilizada de captura foi o ATT. Para as três espécies, o extrato metanólico mostrou-se o mais ativo, discordante deste trabalho, sendo as substâncias extraídas com o metanol, as menos eficientes. A presença de fenóis em extratos com o metanol, é considerado um fator responsável pelos efeitos antioxidantes dos líquens, porém efeitos antagonistas e sinérgicos das interações de diferentes moléculas entre si, não pode ser descartado (Sahin, et al., 2015). Para Behera et al. (2005), os solventes de extração podem gerar diferenças na atividade antioxidante, devido a capacidade de cada um em extrair substâncias bioativas diferentes.

Manojlović et al. (2012) sugerem que o potencial antioxidante dos compostos liquênicos, estão associados a presença de compostos fenólicos nas substâncias bioativas. Compostos fenólicos possuem um alto nível de atividade antioxidante, pois agem como doadores de H^+ e supressores de 1O_2 , com isso possui uma elevada capacidade redox (Rice-Evans et al., 1995).

A composição fenólica de *Ramalina* pode explicar o significativo efeito antioxidante observado. Compostos químicos contendo grupos hidroxílicos presentes nos fenóis ou até mesmo os ácidos carboxílicos têm a capacidade de trocar

hidrogênios e, portanto, podem capturar radicais livres. Da mesma forma os grupos aminos podem doar seus elétrons livres para íons reativos, tornando-os estáveis (Paudel et al., 2011).

O ácido divaricático mostrou-se um índice mais elevado na captura de radicais livres, em relação aos extratos orgânicos. Hidalgo et al. (1994), isolaram o ácido divaricático da espécie *Protusnea malacea* e avaliou o potencial antioxidante *in vivo*, juntamente com outros isolados, a atranorina, pannarina e 1'chloropannarina e verificou que, os compostos pertencentes ao grupo depsídonas (1'chloropannarina e pannarina) são mais ativos na ação antioxidante do que os depsídeos (ácido divaricático e atranorina). Os autores ainda concluíram que isso ocorre por causa da maior incorporação dos depsídonas em microdomínios lipídicos na sua molécula.

Conclusão

O procedimento de extração e as técnicas de recristalização utilizados foram adequados para a obtenção do ácido divaricático e dos extratos orgânicos obtidos a partir do líquen *Ramalina aspera* Räsänen, apresentando rendimentos satisfatórios e alto nível de pureza. Os extratos e o ácido divaricático não apresentaram toxidez significativa para linhagens de macrófagos nas menores doses. Porém, somente os extratos clorofórmico e acetônico foram atóxicos para os eritrócitos humanos. Na análise de toxicidade *in vivo*, todos os compostos testados foram atóxicos. Os mesmos compostos comprovaram uma boa ação anti-inflamatória *in vivo* e antioxidante *in vitro*.

Conflitos de Interesse

Os autores não relatam conflito de interesses.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE pelo suporte financeiro.

Referências

1. Asahina, Y., Shibata, S., 1954. Chemistry of Lichen Substances. Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo.
2. Behera, B. C., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U., 2005. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* *in vitro*. Biotechnology Letters 27, 991–995.
3. Blois, M. S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature 181, 1199-1200.
4. Brandão, L. F. G., Alcantara, G. B., Matos, M. F. C., Bogo, D., Freitas, D. S., Oyama, N. M., Honda, N. K., 2013. Cytotoxic Evaluation of Phenolic Compounds from Lichens against Melanoma Cells. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 2, 176–183.
5. Choudhary, M. I., Azizuddin, Jalil, S. Atta-ur-Rahman, 2005. Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen, *Usnea longissimi*. Phytochemistry 66, 2346–2350.
6. Culberson, C. F., 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thinlayer-chromatographic method. Journal of Chromatography 72, 113-125.
7. Di Rosa, M., Willoughby, D. A., Giroud, J. P., 1971. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. Journal Pathology 104, 15-29.
8. Falcão, E. P. S., Silva, N. H., Gusmão, N. B., Ribeiro, S. M., Pereira, E. C., 2004. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina solediosa* (B. de Lesd.) Laundron¹. Acta Botanica Brasil 18, 911-918.
9. Franco, M., Nego, T. B., Bacchi, C. E., Almeida, P. C., 2010. Patologia – Processos Gerais. Atheneu, São Paulo.
10. Gonçalves, J. P. Avaliação da atividade citotóxica de extratos orgânicos e ácido divaricático purificado de *Ramalina aspera* (líquen). 2013. Monografia (Curso de Bacharelado em Biomedicina), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
11. Gulluce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adiguzel, A., Agar, G., Sokmen, A., 2006. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. Phytomedicine 13, 515–521.

12. Hidalgo, M. E., Fernandez, E., Quilhot, W., 1994. Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry* 37, 1585- 1587.
13. Jain, A. P., Bhandarkar, S., Rai, G., Yadav, A. K., Lodhi, S. 2016. Evaluation of *Parmotrema reticulatum* Taylor for Antibacterial and Antiinflammatory Activities. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 78, 94-102.
14. Jandú, J. J. B., Silva, L. C. N., Pereira, A. D. P. C., Souza, R. M., Silva Júnior, C. A., Figueiredo, R. C. B. Q., Araújo, J. M., Correia, M. T. S., Silva, M. V. da, 2013. Myracrodruon urundeuva bark: an antimicrobial , antioxidant and non-cytotoxic agent. *J. Med. Plants Res.* 7, 413–418. doi:10.5897/JMPR12.681.
15. Legaz, M. E. E., Vicente, C., 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxilase and agmatine amidinohydrolase in Evernia prusnatri thallus. *Plant Physiologie* 71, 300-302.
16. Li, H., Wong, C., Cheng, K., Chen, F., 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in metanol extracts from medicinal plants. *LWT – Food Science and Technology* 41, 385–390.
17. Manojlović, N. T., Vasiljević, P. J., Maskovic, P. Z., 2012. Chemical composition and antioxidant activity of lichen *Toninia candida*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22, 291-298.
18. Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454.
19. Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
20. Moura, M. P. S. Atividade antimicrobiana, citotóxicidade e interação com macrófagos J774 de lipossomas contendo ácido úsnico. 2006. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
21. Oettl, S. K., Gerstmeier, J., Khan, S. Y., Wiechmann, K., Bauer, J., Atanasov, A. G., Malainer, C., Awad, E. M., Uhrin, P., Heiss, E. H., Waltenberger, B., Remias, D., Breuss, J. M., Boustie, J., Dirsch, V. M., Stuppner, H., Werz, O., Rollinger, J. M., 2013. Imbricarinic Acid and Perlatolic Acid: Multi-Targeting AntiInflammatory Depsides from *Cetrelia monachorum*. *Plos One* 8, 1-10.
22. Oliveira, M. S. Avaliação da itotoxicidade e ação genotóxica de extratos orgânicos e ácido úsnico de *Cladonia substellata* (líquen) e derivados pirazólicos sintéticos. 2003. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

23. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development, OECD/OCDE, 2001. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic – Acute Toxic Class Method. Guideline for the Testig of Chemicals.
24. Paudel, B., Bhattarai, H. D., Koh, H. Y., Lee, S. G., Han, S. J., Lee, H. K., Oh, H., Shin, H. W., Yim, J. H., 2011. Ramalin, a novel nontoxic antioxidant compound from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. *Phytomedicine* 18, 1285–1290.
25. Pietro, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantification of antioxidante capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269, 337–341.
26. Rouhi, A. M., Washington, C., 2003. Rediscovering Natural Products. *Chemical & Engineering News* 81, 77-91.
27. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22, 375-383.
28. Sahin, S., Oran, S., Sahintürk, P., Demir, C., Öztürk, S., 2015. *Ramalina* Lichens and their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Journal of Food Biochemistry* 39, 471–477.
29. SILVA, T. D. S. Atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (Líquén). 2014. Dissertação (Programa de pós-graduação em bioquímica e fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
30. Tanas, S., Odabasoglu, F., Halici, Z., Cakir, A., Aygun, H., Aslan, A., Suleyman, H. 2010. Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Peltigera rufescens* lichen species in acute and chronic inflammation models. *Journal of Natural Medicines* 64, 42–49.
31. Van Ryn, J., Trummelitz, G., Pairet, M., 2000. *Current Medicinal Chemistry* 7, 1145.
32. Vijayakumar, C. S., Viswanathan, S., Kannappa Reddy, M., Parvathavarthini, S., Kundu, A. B., Sukumar, E., 2000. Anti-inflammatory activity of (+) -usnic acid. *Fitoterapia* 71, 564-566.
33. Winter, C. A., Risley, E. A., Nuss, G. W., 1962. Carrageenin. Induced Edema in Hind Raw of the Rat as Assay for Antinflammatory Drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 111, 544-547.

34. Whittle, B. A., 1964. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *British Journal of Pharmacology Chemotherapy* 22, 246–253.
35. Woisky, R. G., Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37, 99-105.
36. Xavier- Filho, L. et al., 2006. *Biologia de Líquens. Âmbito Cultural*, Rio de Janeiro.
37. Zugic, A., Jeremic, I., Isakovic, A., Arsic, I., Savic, S., Tadic, V., 2016. Evaluation of Anticancer and Antioxidant Activity of a Commercially Available CO₂ Supercritical Extract of Old Man's Beard (*Usnea barbata*). *Plos One* 1-14.

4 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

As técnicas cromatográficas indicam que o, ácido divaricático, é o metabólito secundário majoritário do líquen *Ramalina aspera*. Este resultado corrobora os dados de Huneck e Yoshimura (1996). Outros compostos foram observados nessa espécie, porém, não foram identificados. Não foi observado a presença do ácido divaricático no extrato acetônico, e sim outro metabólito distinto. Quanto a isto, Gonçalves (2013) após análise, através de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, do extrato acetônico de *R. aspera* observou indícios da presença de compostos do grupo dos ácidos sequicaico e homosequicaico.

Os extratos e o ácido divaricático apresentaram compostos fenólicos em suas estruturas moleculares, comprovando uma maior ação dessas substâncias na captura de radicais livres. A presença de fenóis em derivados liquênicos, é considerado um fator responsável pela ação antioxidante das substâncias (MANOJLOVIĆ et al., 2012a; SAHIN et al., 2015).

O ácido divaricático apresentou um maior potencial anti-inflamatório se comparado aos extratos. Choudhary et al. (2005) em seus experimentos, também já havia comprovado um grande potencial de isolados liquênicos no processo inflamatório.

Todos os compostos derivados do líquen *R. aspera* apresentaram atividades significativas antioxidante e anti-inflamatória *in vivo*, demonstrando ser agentes promissores para este fim.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q. et al. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em Substratos Orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, G. M. B. et al. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, London, v. 27, n.2, p. 139-143, 2014.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 350, n.1, p. 103-108, 1995.

APTROOT, A.; BUNGARTZ, F. The lichen genus Ramalina on the Galapagos. **The Lichenologist Journal**, Cambridge, v. 39, n. 6, p. 519–542, 2007.

BAČKOROVÁ, M. et al. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 37 – 44, 2011.

BASILE, A. et al. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen Xanthoria parietina and its secondary metabolite parietin. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 4, p. 7861–7875, 2015.

BEHERA, B. C. et al. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. **Biotechnology Letters**, v.27, n.14, p. 991–995, 2005.

BEHERA, B. C. et al. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. **Bioresource Technology**, Barking, Essex, v. 99, n.4, p. 776–784, 2008.

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, n. 6-7, p. 499–503, 2003.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIODIVERSIDADE. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. [Acesso em 20 de janeiro de 2016]. **Disponível em:** http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Liqueniza_dos_Spielmann_&_Marcelli.pdf

BOGLIOLO, L. **Bogliolo: Patologia Geral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

BRAGA, G. M. S. et al. Obtenção de Extratos Liquênicos no Cerrado Maranhense para controle do *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Pesquisa em Foco**, Maranhão, v. 20, n. 1, p. 165-172, 2015.

BRANDÃO, L. F. G. et al. Cytotoxic Evaluation of Phenolic Compounds from Lichens against Melanoma Cells. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v. 61, n. 2, p. 176–183, 2013.

CANSARAN, D. et al. HPLC analysis of usnic acid in some Ramalina species from Anatolia and investigation of their antimicrobial activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 1, p. 77–81, 2007.

CHOUDHARY, M. I. et al. Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen, *Usnea longissima*. **Phytochemistry**, London, v. 66, n. 19, p. 2346–2350, 2005.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 89, n. 4, p. 137-149, 2002.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual Química**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thinlayer-chromatographic method. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 72, n.1, p. 113-125, 1972.

EMERY, F. S.; SANTOS, G. B.; BIANCHI, R. C. Química da Natureza. **Sociedade Brasileira de Química**, São Paulo, v. 7, 2010.

FALCÃO, E. P. F. et al. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, p. 43-49, 2002.

FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H.; GUSMÃO, N. B.; RIBEIRO, S. M.; PEREIRA, E. C. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do Líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron¹ **Acta Botânica Brasil**, Brasil, v. 18, n. 4, p. 911-918, 2004.

FARIA, J. L.; et al. **Patologia Geral: Fundamentos das Doenças, com Aplicações Clínicas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003.

- FERNÁNDEZ-MORIANO, C. et al. Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two Parmeliaceae lichens: Identification of active compounds. **Phytomedicine**, v. 22, p. 847–855, 2015.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.
- FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a Fat Chance? **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 201, n. 5, p. 671–674, 2005.
- FRANCO, M. et al. **Patologia: Processos Gerais**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- GOMES-LEAL, W. **Inflamação Aguda, Resposta Glial e Degeneração Axonal em um Modelo de Excitotoxicidade na Medula Espinhal**. 2002. 197f. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Belém, 2002
- GONÇALVES, J. P. **Avaliação da atividade citotóxica de extratos orgânicos e ácido divaricático purificado de *Ramalina aspera* (líquen)**. 2013. Monografia (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Curso de Bacharelado em Biomedicina, Recife, 2013.
- HALE- JR., M. E. **The Biology of Lichens**. 3. ed. London: Edward Arnold Pub., 1983.
- HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**, London, v. 344, n. 8924, p. 721-724, 1994.
- HIDALGO, M. E.; FERNANDEZ, E.; QUILHOT, W. Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry**, London, v. 37, p. 1585- 1587, 1994.
- HONDA, N. L. **Líquens de Mato Grosso do Sul: Estudo Químico e Avaliação da Atividade Biológica**. 1997. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, São Paulo, 1997.
- HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, São Paulo v. 21, n. 6, p. 110-125, 1998.
- HONDA, N. K. et al. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 17, n. 5, p. 328–332, 2010.
- HUNECK, S.; YOSHIMURA, Y. **Identification of lichen substances**. New York: Springer-Verlag, 1996.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JUNIOR, A. C. **Constituintes Químicos da Espécie Vegetal *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae)**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2002.

KASHIWADANI, H.; KALB, K. The genus *Ramalina* in Brazil. **Lichenologist**, Cambridge, v. 25, n. 1, p. 1-31, 1993.

KOSANIĆ, M. et al. Biological Activities and Chemical Composition of Lichens from Serbia. **EXCLI Journal**, Dortmund, v. 13, p. 1226-1238, 2014.

KOSANIĆ, M.; RANKOVIĆ, B.; SLOBODAN, S. Antimicrobial activity of the lichen *Lecanora frustulosa* and *Parmeliopsis hyperopta* and their divaricatic acid and zeorin constituents. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 9, p. 885-890, 2010.

LAI, D. et al. Phenolic compounds with in vitro activity against respiratory syncytial virus from the nigerian lichen *Ramalina farinacea*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 79, n. 15, p. 1440–1446, 2013.

LUO, H. et al. Antioxidant activities of edible lichen *Ramalina conduplicans* and its free radical-scavenging constituents. **Mycoscience**, Japão, v. 51, p. 391–395, 2010.

LUZ, J. S. B. et al. Ultrastructural Analysis of *Leishmania infantum* chagasi Promastigotes Forms Treated In Vitro with Usnic Acid. **The Scientific World Journal**, p. 1-7, 2015.

MANOJLOVIC, N. T. et al. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae), **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-8, 2012a.

MANOJLOVIC, N. T.; VASILJEVIC, P. J.; PAVLE, Z. Chemical composition and antioxidant activity of lichen *Toninia candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, p. 291–298, 2012b.

MOREIRA, A. S. N. et al. Chemistry and biological activity of *ramalina* lichenized fungi. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 5, p. 8952–8987, 2015.

MOREIRA, A. S. N. et al. Larvicidal activity of *Ramalina usnea* lichen against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, p. 4–6, 2016.

MOREIRA Jr. Grupo Editorial Moreira Jr. [Acesso em 20 de janeiro de 2016]. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&idmateria=4053>

MOURA, M. C. G. G. **Atividade antimicrobiana de compostos de *Canoparmelia texana* (TUCK.) ELIX & HALE (líquen)**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Programa de pós-graduação em bioquímica, Recife, 2008.

NASCIMENTO, J. C. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, [s.l.], v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

NASH III, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge, USA: Cambridge University Press, 1996.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 70, n. 3, p. 661-477, 2007.

ODABASOGLU, F. et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n. 1, p. 59–65, 2006.

OETTL, S. K. et al. Imbricarinic Acid and Perlatolic Acid: Multi-Targeting Anti-Inflammatory Depsides from *Cetrelia monachorum*. **PLoS ONE**, California, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.

OLIVEIRA, M. S. **Avaliação da itotoxicidade e ação genotóxica de extratos orgânicos e ácido úsnico de *Cladonia substellata* (líquen) e derivados pirazólicos sintéticos**. 2003. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2003.

PAUDEL, B. et al. Ramalin, a novel nontoxic antioxidant compound from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 18, p. 1285–1290, 2011.

PAUDEL, B. et al. Antioxidant, Antibacterial activity and Brine shrimp toxicity test of some Mountainous Lichens from Nepal. **Biological Research**, Santiago, v. 45, n. 4, p. 387-391, 2012.

PAZ, G. A. DE et al. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 165–171, 2010.

PERICO-FRANCO, L. S. et al. Antioxidant Activity and Protective Effect on Cell and DNA Oxidative Damage of Substances isolated from Lichens of Colombian páramo. **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, v. 3, n. 4, p. 9–17, 2015.

PIRES, R. H.; LUCARINI, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Effect of usnic acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 1, p. 595–597, 2012.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RANKOVIC´, B.; KOSANIC´, M. Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. **Lichen Secondary Metabolites**. Springer. p. 1-26, 2015.

ROBBINS, S. L.; RAMZI, S. C.; VINAY, K. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

ROCHA, T. A. **Avaliação da Citotoxicidade e Ação Genotóxica de Extratos Orgânicos e Ácido Úsnico de *Cladonia substellata* (líquen) e derivados Pirazólicos Sintéticos**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2015.

ROUHI, A. M.; WASHINGTON, C. Rediscovering Natural Products. **Chemical & Engineering News**, v. 81, p. 77-91, 2003.

SAHIN, S. et al. *Ramalina* Lichens and their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant and Antimicrobial Agents. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, p. 471–477, 2015.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais Livres e a Resposta Celular ao Estresse Oxidativo**. Canoas: ULBRA, 2004.

SILVA, J. A. C. **Avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante do extrato hidroalcoólico do líquen *Cladonia clathrata***. 2009. Dissertação (Mestrado) -, Universidade Federal de Sergipe, Pós-Graduação em Medicina, Aracajú, 2009.

SILVA, T. D. S. **Atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (Líquén)**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Programa de pós-graduação em bioquímica e fisiologia, Recife, 2014.

SIMBIOTICA. Simbiotica.org. [Acesso em 20 de janeiro de 2016]. **Disponível em: <http://www.simbiotica.org/fungi.htm>**

SOKOLOV, D. N. et al. Anti-viral activity of (-)- and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 22, n. 23, p. 7060–7064, 2012.

VAN RYN, J.; TRUMMLITZ, G.; PAIRET, M. COX-2 selectivity and inflammatory processes. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 7, n.11, p. 1145-61, 2000.

VASCONCELOS, T. B. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR científica. Ciências biológicas e da saúde**, Londrina-PR, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.

VICENTE, C. **Fisiologia de las substancias liquénicas**. Alhambra, Madrid, 1975.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIJAYAKUMAR, C. S. et al. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**, Milano, v. 71, n. 5, p. 564–566, 2000.

VU, T. H. et al. Depsides: Lichen metabolites active against hepatitis C virus. **PLoS ONE**, California, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2015.

XAVIER- FILHO, L. et al. **Biologia de Liquens**. 4. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural. 2006.

ZUGIC, A. et al. Evaluation of Anticancer and Antioxidant Activity of a Commercially Available CO₂ Supercritical Extract of Old Man's Beard (*Usnea barbata*). **PLoS ONE**, California, p. 1-14, 2016.

Anexo A - Ficha de Identificação Botânica

	Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências Biológicas Departamento de Botânica Herbário UFP – Geraldo Mariz
Nº:	
Fam.: Ramalinaceae	
Sp.: Ramalina aspera Räsänen	
Nome vulgar:	
Col.: Emerson Peter da Silva Falcão 27/IX/2014.	
Det.: Maria de Lourdes Lacerda Buril 21/X/2014.	
Proc.: PE. Limoeiro, Altitude de 138m, Coordenadas: latitude 07°52'29" S e Longitude 35°27'01" W, área com solo arenoso.	
Obs.: líquen fruticuloso	

Anexo B - Carta de Aprovação do Comitê de Ética Animal

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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, 04 de maio de 2016.

Ofício nº 32/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Teresinha Gonçalves da Silva**
Departamento de Antibióticos
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.049165/2015-96

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, "*Avaliação da composição fenólica dos extratos orgânicos de *Ramalina aspera*, de seu metabólito o ácido divaricático e da atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*.*"

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.

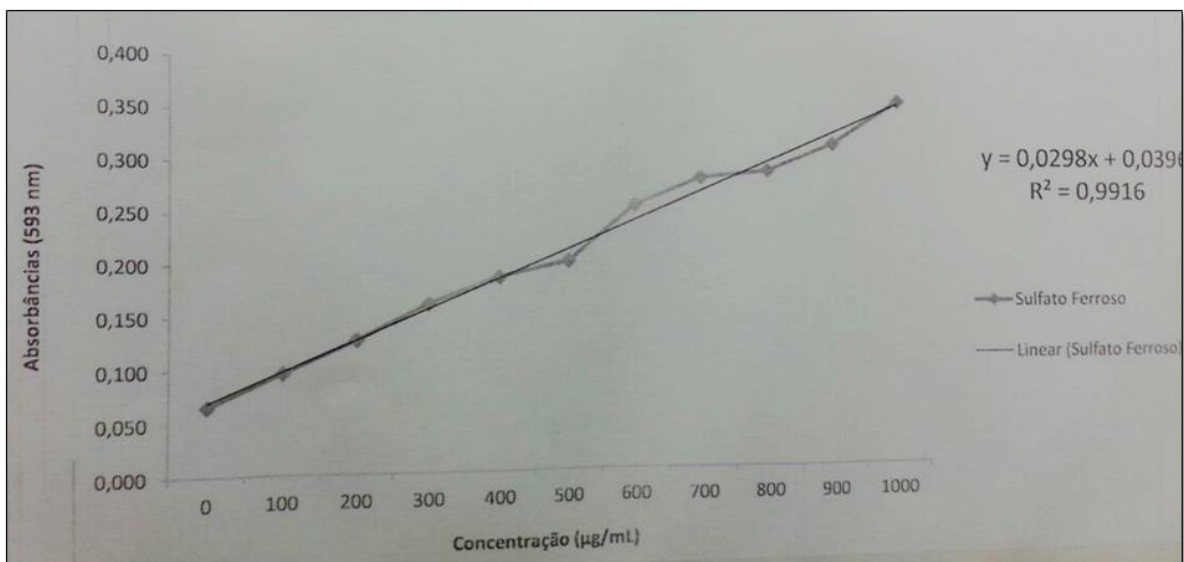
Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

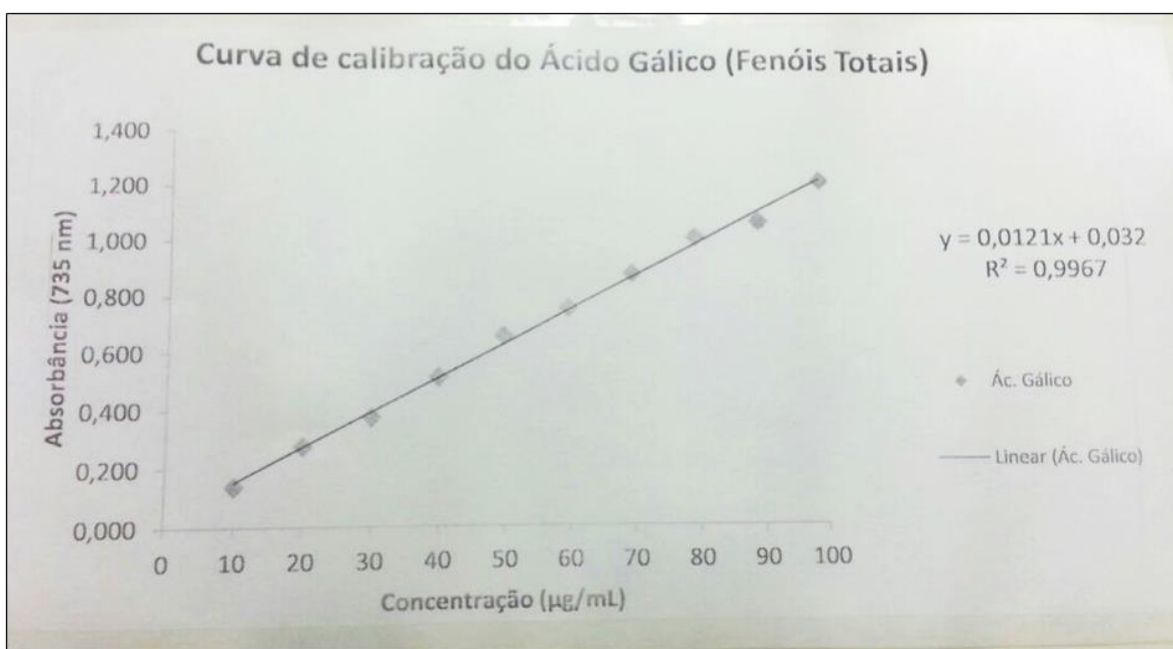
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Antibióticos e Biotério do LIKA - UFPE; Animais: camundongos heterogênicos albinos; Linhagem: Swiss; Idade: 60 dias; Peso: 25-35g; Sexo: machos e fêmeas; Nº total de animais: 155.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584

Anexo C - Curva de Calibração - FRAP



Anexo D - Curva de Calibração – Fenóis Totais

Anexo E - Curva de Calibração -Flavonoides