



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

GERLINY BEZERRA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS DO LÍQUEN *Ramalina usnea* (L.) R. Howe

Vitória de Santo Antão

2017

GERLINY BEZERRA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS DO LÍQUEN *Ramalina usnea* (L.) R. Howe**

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

Vitória de Santo Antão

2017

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia F. dos Santos, CRB4-2005

O48a Oliveira, Gerliny Bezerra de
Avaliação da atividade antineoplásica *in vitro* dos extratos orgânicos do líquen *ramalina usnea* (L.) R. Howe./ Gerliny Bezerra de Oliveira. - Vitória de Santo Antão, 2017.
80 folhas: fig.; tab.

Orientador: Emerson Peter da Silva Falcão.
Coorientadora: Teresinha Gonçalves.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2018.

1. Líquens. 2. Antioxidantes. I. Silva, Emerson Peter Falcão da (Orientador).
II. Gonçalves, Teresinha (Coorientadora). III. Título.

589.1 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-013/2018

GERLINY BEZERRA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS DO LÍQUEN *RAMALINA USNEA* (L.) R. HOWE**

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**.

Aprovado em: 23/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Cristiano Aparecido Chagas
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - CAV

Profª. Dra. Mônica Cristina Barroso Martins
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Dra. Lourdes Lacerda Buriel
Universidade Federal de Pernambuco

A minha avó Helena Maria,
que mesmo sem ter acesso ao estudo nunca
deixou de nos incentivar a estudar.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre iluminar o meu caminho e ter me dado calma para enfrentar as dificuldades.

A minha família pelo esforço, paciência e incentivo durante toda minha caminhada de vida.

A meu orientador Prof. Dr. Emerson Peter Falcão da Silva por ter me aceito em seu laboratório, acreditado em mim, pela paciência e por todo o tempo que dispôs para repassar seus conhecimentos. E por me fazer acreditar que sou capaz, mesmo quando eu não acreditava.

A Professora Dr^a Teresinha Gonçalves por aceitar ser minha co-orientadora e me receber em seu laboratório.

A Professora Dr^a Simey Magnata pelas sábias palavras durante a minha qualificação, contribuindo para meu amadurecimento científico.

A Professora Dr^a Jaciana Aguiar pela realização do teste de Atividade citotóxica.

A doutoranda Tamiris Alves Rocha por toda amizade, orientação e pela contribuição significativa para realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Emerson Gumboski pela identificação do material liquênico.

A todos os amigos do Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular (SIM): André Silva, Cristiane Conceição, Rosikelly, Erima Amorim, Aparecida Lira (Cida), Rosália Rodrigues e Laurentino Neto, por todos os momentos que vivemos juntos.

A Monique Assis por toda amizade, companheirismo e incentivo durante a iniciação científica e agora na pós-graduação.

A todos os colegas de curso, em especial, a Cleciana Maristela, Laís Andrade, Katharine Angélica (Kathy) Anna Aca e Tatiane França.

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

E a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho, seja com palavras de incentivo ou cientificamente.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

O aumento no número de casos neoplasias em todo mundo impulsiona pesquisas por novas fontes bioativas para a produção de fármacos antineoplásicos. Os metabólitos liquênicos apresentam uma vasta atividade biológica, sendo fontes promissoras para o surgimento de novos fármacos. Este estudo descreve a avaliação antineoplásica *in vitro* dos extratos orgânicos do líquen *Ramalina usnea* (L.) R. Howe. Os extratos orgânicos foram obtidos por esgotamento a quente utilizando aparelho de Soxhlet com os solventes éter, clorofórmio e acetona. As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas para identificação da composição fenólica dos extratos. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de sequestro de radicais livres (DPPH), redução do íon férrico e dosagem de fenóis totais. O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método do 3-[4,5dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e teste de atividade hemolítica. A análise cromatográfica por CCD dos extratos identificou a presença do ácido divaricático no extrato etéreo. Análise em CLAE identificou a presença de 9 picos no extrato etéreo (Tr = 2,41; 2,69 ; 3,00, 3,14; 5,36; 6,58; 10,74; 14,17; 28,23) , três no no extrato acetônico (Tr= 3,00; 13,85; 14,54; 24,65) e dois no extrato clorofórmico (Tr=2,99; 24,24). Foi confirmada a presença dos ácidos divaricático e úsnico nos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico No teste de atividade antioxidante observou-se uma relação entre a composição fenólica do extrato e a capacidade de sequestro de radicais livres, obtendo o extrato etéreo o maior potencial na captura de ROS para concentração de 1000 µg/mL sendo este de 60%.O mesmo extrato demonstrou melhor eficácia na redução o íon férrico. Os extratos apresentaram baixa toxicidade para eritrócitos humanos nas concentrações de 500 , 250 e 125 µg/mL. A citotoxicidade em células tumorais foi significativa para os extratos clorofórmico e acetônico apresentando um maior percentual inibitório para as células NCL-H292 e HL-60. Os extratos orgânicos de *Ramalina usnea* apresentaram efeitos significativos para as atividades antioxidante e citotóxicas, demonstrando promissores para atividade antineoplásica.

Palavras chaves: Antioxidante. Citotóxico. Líquen.

ABSTRACT

The increase in the number of neoplastic cases worldwide drives research by new bioactive sources for the production of antineoplastic drugs. Lichen metabolites have a wide biological activity and are promising sources for the development of new drugs. This study describes the in vitro antineoplastic evaluation of organic extracts of lichen *Ramalina usnea* (L.) R. Howe. The organic extracts were obtained by hot exhaustion using Soxhlet apparatus with the solvents ether, chloroform and acetone. The analysis of thin layer chromatography (CCD) and high efficiency liquid (HPLC) were performed to identify the phenolic composition of the extracts. The antioxidant activity was evaluated by the methods of free radical sequestration (DPPH), ferric ion reduction and total phenol dosage. The cytotoxicity assay was performed by the method of 3- [4,5-dimethylthiazole-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) and hemolytic activity test. The CCD chromatographic analysis of the extracts identified the presence of divaric acid in the ethereal extract. Analysis in HPLC identified the presence of 9 peaks in ethereal extract (Tr = 2.41, 2.69, 3.00, 3.14, 5.36, 6.58, 10.74, 14.17, 28.23), Three in the acetone extract (Tr = 3.00, 13.85, 14.54, 24.65) and two in the chloroform extract (Tr = 2,99, 24,24). The presence of divarictic and unique acids in the ethereal, chloroform and acetonic extracts was confirmed in the antioxidant activity test. A relation was observed between the phenolic composition of the extract and the capacity of free radical sequestration, obtaining the ethereal extract the highest potential in the capture Of ROS for a concentration of 1000 µg / mL being 60%. The same extract showed better efficacy in reducing the ferric ion. The extracts presented low toxicity to human erythrocytes at concentrations of 500, 250 and 125 µg / mL. Cytotoxicity in tumor cells was significant for chloroform and acetone extracts with a higher inhibitory percentage for NCL-H292 and HL-60 cells. The organic extracts of *Ramalina usnea* presented significant effects for the antioxidant and cytotoxic activities, showing promise for antineoplastic activity.

Keywords: Antioxidant. Citotoxic. Lichen.

LISTA DE QUADRO E ILUSTRAÇÕES

Fig. 1	Esquema representativo da carcinogênese em vários estádios.	17
Fig. 2	Morfologia do Talo liquênico.....	24
Quad. 1	Principais compostos originados das rotas biossintéticas do metabolismo liquênico.	27
Fig. 3	Exemplar de <i>Ramalina usnea</i> .	28
Fig. 4	- Modelo Esquemático da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos orgânicos de <i>Ramalina usnea</i>	44
Fig. 5	Cromatografia em CLAE dos extratos orgânicos de <i>Ramalina usnea</i>	45
Fig. 6	Cromatografia em CLAE dos padrões dos ácidos úsnico e Divaricático.....	46
Fig. 7	Análise da atividade antioxidante DPPH em diferentes concentrações dos extratos orgânicos de <i>Ramalina usnea</i>	47
Fig. 8	Atividade hemolítica dos extratos orgânicos de <i>Ramalina usnea</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tab. 1	Proporção dos casos de Câncer no Brasil identificada por sexo para o ano de 2016. Exceto pele não melanoma (Números arredondados para múltiplos de 10)	19
Tab. 2	Concentração Relativa dos fenóis nos extratos de <i>R. usnea</i>	46
Tab. 3	Total de compostos fenólicos e potencial redutor do íon férrico (FRAP) dos extratos orgânicos de <i>Ramalina usnea</i> .	48
Tab. 4	Efeitos dos extratos liquênicos sobre a viabilidade de células tumorais	49
Tab. 5	CI ₅₀ para os extratos acetônico e clorofórmico de <i>Ramalina usnea</i> expressos µg /mL	50

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INCA	Instituto Nacional do Câncer
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HPV	Vírus do papiloma humano
MTT	Brometo de 3-{4,5 dimetiltiazol-2-il}-2,5 –difentetrazólio
R _f	Fator de Retenção
WCR	World Cancer Report
OMS	Organização Mundial da Saúde
Tr	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Neoplasia	16
3.2 Produtos Naturais	19
3.3 Características Gerais dos Líquens	21
3.4 Metabolismo Liquênico.....	25
3.5 Gênero Ramalina.....	26
3.5.1 Ramalina usnea	27
3.6 Atividades Biológicas das Substâncias Liquênicas	28
3.6.1 Atividade Antioxidante.....	29
3.6.2 Atividade Citotóxica e Antineoplásica.....	31
3.6.3 Outras Atividades	33
4 ARTIGO: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE RAMALINA USNEA (LÍQUEN).....	34
5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO A – NORMAS DA REVISTA.....	69

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas são descritas como um problema de saúde pública, e consideradas como epidemia no século XXI (STRATTON; DORR; ALBERTS, 2000). Originam-se de alterações genéticas, que podem ser causadas de maneira espontânea, como também induzidas por fatores ambientais (STEICHEN *et al.*, 2013). O acúmulo de mutações é capaz de induzir modificações nas células normais, originando a célula neoplásica. Estas apresentam características particulares como a autossuficiência a sinais de crescimento, evasão à morte celular, capacidade de induzir angiogênese e de deslocamento para outros tecidos, provocando metástase (KUMAR, 2005).

O aumento no número de casos de neoplasias no mundo eleva à necessidade de estudos sobre novas fontes de compostos com potencial antineoplásico. No período de 1981 a 2002, estima-se que 61% de pequenas moléculas descobertas e em processo de desenvolvimento são produtos naturais ou são deles originados, sendo importantes fontes para descoberta de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Em torno de 60% dos medicamentos utilizados para tratamento antineoplásico possui origem de uma fonte encontrada na natureza. Plantas, fungos, organismos marinhos e líquens são fontes promissoras para o desenvolvimento e identificação de novos compostos com atividade anticâncer (SHRESTHA; CLAIR, 2013).

Os líquens são organismos formados pela associação simbiótica entre um fungo (micobionte) e uma alga verde ou cianobactéria (fotobionte), produzindo substâncias classificadas em metabólitos primários e secundários (NASH III, 1996; STOCKER-WORGOTTER, 2008). Em seu metabolismo primário são produzidos carboidratos, proteínas, vitaminas e aminoácidos; já no metabolismo secundário há a produção de substâncias possuidoras de grande interesse farmacológico sendo, divididas em quatro grupos: depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos e ácidos úsnicos (HALE, 1983; NASH III, 1996).

O potencial biológico dos metabólitos secundários liquênicos é frequentemente citado na literatura por apresentarem promissoras atividades como antimicrobiana (FALCÃO *et al.*, 2004; KOSANIC *et al.*, 2011), antitumoral (COSKUN

et al., 2015), citotóxica (BRANDÃO *et al.*, 2013) e antioxidante (SAHIN *et al.*, 2015) entre numerosos outros.

Em meio à necessidade de encontrar novas drogas antineoplásicas e levando em consideração às atividades encontradas para as substâncias liquênicas, torna-se bastante enriquecedor o estudo das propriedades biológicas do líquen *Ramalina usnea*. Na literatura existem poucos estudos sobre este líquen, portanto a investigação de suas propriedades citotóxicas e antioxidantes é relevante para identificação de novas fontes de compostos com interesse terapêutico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antineoplásica *in vitro* de extratos orgânicos de *Ramalina usnea* (L) R Hawe.

2.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos orgânicos do talo *in natura* do líquen *Ramalina usnea*;
- Analisar quimicamente os extratos orgânicos de *R. usnea* por meio de técnicas de Cromatografia em Camada delgada (CCD) e em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e a quantificação de fenóis totais dos extratos de *Ramalina usnea*;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos de *R. usnea* frente a eritrócitos e células neoplásicas humanas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Neoplasia

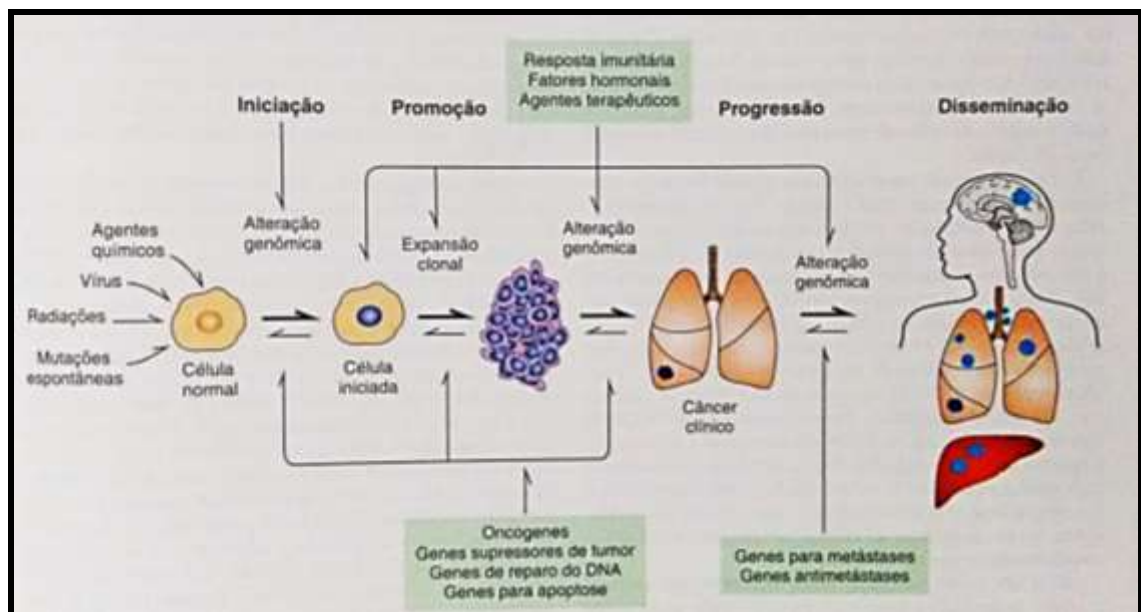
Neoplasia é um termo utilizado para designar a proliferação anormal celular, ocorrendo redução ou perda da capacidade de diferenciação, sendo consequência de alterações em genes e proteínas que regulam a multiplicação e a diferenciação celular. As células neoplásicas podem se tornar imortais (aumento da atividade da telomerase), tendo a capacidade de induzir angiogênese (crescimento de novos vasos e tecidos), inibir o sistema imune, causar estresses metabólicos (proteotóxico, mitótico, oxidativo) e ocasionar metástases (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2006; ROBBINS; COTRAN, 2006; RANG; RITTER; DALE, 2004; LUO, *et al.*, 2009).

As alterações celulares que induzem o surgimento das neoplasias são resultado da interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Dentre os fatores ambientais estão carcinogênicos físicos, como a radiação ultravioleta e a radiação ionizante; os carcinogênicos químicos como componentes do tabaco, aflatoxinas, a contaminação por asbesto e arsênio; e os carcinogênicos biológicos como os vírus, tendo como exemplo o vírus do papiloma humano (HPV) que está associado ao carcinoma de colo uterino e o Vírus Epstein-Barr associada ao linfoma de Burkitt; além de algumas bactérias como a *Helicobacter pylori* que aumenta o risco de carcinoma gástrico (OMS, 2015).

A classificação das neoplasias é feita de acordo com seu comportamento clínico, aspecto histomorfológico, microscópico e por sua origem tecidual. A classificação histomorfológica é a mais utilizada para classificar o tumor, nomeando a neoplasia em relação com o tecido de origem ou célula proliferante. O sufixo –*oma* é empregado para denominar qualquer tipo de neoplasia, seja ela benigna ou maligna. Por exemplo, neoplasias benignas originadas do epitélio glandular são chamadas de adenomas. Na nomenclatura dos tumores malignos, além do sufixo, são acrescentadas algumas expressões, como é o caso do carcinoma que indica tumores originados do epitélio de revestimento (p. ex. adenocarcinoma) e sarcoma que denomina neoplasias originadas do tecido mesenquimal (BRASILEIRO FILHO, *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da carcinogênese envolve três etapas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação corresponde ao período de exposição a agentes carcinogênicos, levando a uma alteração permanente na estrutura do DNA das células normais, sendo um processo irreversível. Durante a promoção, há a incapacidade de reparação do DNA, havendo o desenvolvimento de fenótipos celulares alterados e surgimento de lesões tumorais. No último estágio, a progressão, as células apresentam-se geneticamente instáveis, com altas taxas de proliferação e capacidade de produzir metástases. Nesta fase acontece a manifestação clínica da doença (Figura 1) (FRANCO *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2013).

Figura 1 – Esquema representativo da carcinogênese em vários estádios.

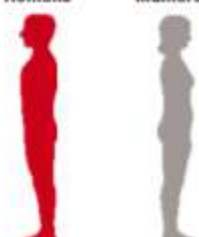


Fonte: Brasileiro Filho, 2012.

No ano de 2012 houve em todo mundo 14 milhões de novos casos de câncer, 8,2 milhões mortes e 32,6 milhões de pessoas vivendo com a doença. Estima-se que em 2030 o número de novos casos de câncer alcancem 21,3 milhões ao ano. Os tipos de câncer com maior prevalência mundial foram, em homens, os de pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em relação às mulheres a maior incidência se deu com os cânceres de mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (VISVADER, 2011, GOSS *et al.*, 2013, WCR, 2014).

No Brasil estima-se o surgimento de 600 mil novos casos de câncer para 2016 e 2017, com perfil epidemiológico semelhante a países da América Latina e Caribe, sendo mais frequente o câncer de próstata (61 mil casos) e mama (51 mil casos). Dos 530 mil novos casos estimados para homens, o câncer de próstata será o mais frequente (28,6%), seguido pelos cânceres de pulmão (9,8%), intestino (8,0%), estômago (6,8%) e bexiga (3,3%). Já para as mulheres, a maior incidência será mama (27%), colo do útero (12,2%), intestino (7,9%), pulmão (5,7%) e estômago (4,3%), para os 560 mil novos casos (Tabela 1) (BRASIL. INCA, 2015).

Tabela 1 - Proporção dos casos de Câncer no Brasil identificada por sexo para o ano de 2016. Exceto pele não melanoma (Números arredondados para múltiplos de 10).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: BRASIL, 2016/2017. INCA 2015

As terapias comumente empregadas para o tratamento do câncer incluem radioterapia, cirurgia e quimioterapia. Recentemente, alternativas são utilizadas para o tratamento das neoplasias, que envolvendo a utilização de moduladores hormonais que inibem a proliferação e diferenciação celular (hormonioterapia) e da imunoterapia que utiliza anticorpos monoclonais (ALVARENGA *et al.*, 2014).

A cirurgia é uma técnica eficaz no tratamento de neoplasias, tendo um resultado satisfatório quando não há a presença de metástases. A radioterapia é um tratamento complementar a cirurgia, mas que pode ser empregada isoladamente, auxiliando na diminuição de tumores e metástases (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Na quimioterapia utilizam-se fármacos direcionados a agirem sobre o funcionamento celular, inibindo sua replicação ou induzindo a apoptose; porém, não são eficazes para controle do surgimento de metástases. Um dos grandes desafios no emprego dos agentes quimioterápicos esta no fato de não haver seletividade apenas para o tecido específico, afetando desta maneira o funcionamento das

células normais, podendo resultar em graves efeitos colaterais além de aumentar a resistências a esses fármacos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011; STEICHEN *et al.*, 2013).

O aumento da resistência farmacológica que o quimioterápico provoca, associado ao alto índice no surgimento de neoplasias no mundo, impulsiona a busca de novos compostos sintéticos e naturais com potencial antitumoral a serem utilizados tanto na prevenção como no tratamento das neoplasias (ALMEIDA *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2006).

Os fármacos ideais para o tratamento do câncer deveriam erradicar as células cancerosas sem erradicar as células normais do paciente. O uso clínico dessas drogas exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, procurando um índice terapêutico favorável (KATZUNG, 2006).

3.2 Produtos Naturais

Os produtos naturais são fontes de recursos farmacêuticos para a produção de novas drogas, havendo relatos de sua aplicação para o tratamento de doenças em registros encontrados na China antiga em 2700 a.C. e no Antigo Egito há 1500 a.C.. Contudo, o desenvolvimento em pesquisas científicas e a investigação de suas aplicações foram significativos a partir da década de 1940 (SOUZA *et al.*, 2007).

O estudo sobre as aplicações biológicas de compostos oriundos de fontes naturais tornou-se possível, pois, a partir daquela década houve o surgimento de métodos de análise como, por exemplo, a espectroscopia na região do visível, ultravioleta e infravermelho. Além disso, a ressonância magnética nuclear e as análises em cromatografia permitiram os avanços no conhecimento da composição química destes compostos (SOUZA *et al.*, 2007).

A importância dos compostos bioativos obtidos de fontes naturais é refletida pela quantidade de fármacos comercializados aos quais dão origem. É o caso da artemisinina, antimalárico oriundo da *Artemisia annua*; a atropina, anticolinérgico extraído de *Atropa beladonna*; a morfina analgésica extraído da *Papaver somniferum*, a estreptomicina, antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose isolado do fungo *Streptomyces griseus* e a penicilina, primeiro antibiótico descoberto isolado do fungo *Penicillium notatum* (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; SOUZA *et al.*, 2007).

No Brasil há uma vasta diversidade de espécies distribuída nos diferentes biomas existentes em seu território, representando 15 % da biodiversidade encontrada no mundo. Deste percentual 45.000 são espécie de plantas - 18% da flora encontrada no planeta- com ampla importância econômica mundial, como é o caso do café (*Coffea* sp.) e o guaraná (*Paullinia cupana*). Além disso, a fauna brasileira possui 10% das espécies existentes no mundo (SILVA; RODRIGUES, 2014).

O isolamento de compostos oriundos de produtos naturais brasileiros é bem relatado na literatura. É o caso da Tubocurarina, alcaloide encontrado em *Chondodendron tomentosum*, utilizado como o relaxante muscular pré-operatório. Outro exemplo é o peptídeo bradiginina obtida do veneno da *Bothrops jararaca*, sendo um modelo para a síntese de fármacos reguladores da hipertensão (SILVA; RODRIGUES, 2014).

Pesquisas com o fungo endofítico *Penicillium janthinellum* encontrado em frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae), resultaram no isolamento o policetídio citrinina, com atividade significativa contra *Leishmania mexicana*. Outra fonte promissora de pesquisa de novos fármacos originados de fontes encontradas no Brasil é a fauna e flora oceânica, um exemplo é a droga anticâncer halicondrina B, isolada de briozoários (SILVA; RODRIGUES, 2014).

As substâncias originadas de produtos naturais possuem um papel importante para o descobrimento de novas drogas anticâncer, bem como para a síntese e melhoramento destes compostos, potencializando sua capacidade antineoplásica. Várias drogas anticâncer já comercializadas são possuem sua origem nos produtos naturais. É o caso da vimblastina e vincristina, alcaloides de vinca isolados da espécie *Catharanthus roseus* (CRAGG; NEWMAN, 2013). Outro exemplo é o paclitaxel - biossintetizado a partir de folhas de espécies de *Taxus* sp. - utilizado no tratamento de neoplasias de ovário, mama e pulmão (PRAKASH *et al.*, 2013).

Considerando o grande potencial encontrado nos produtos naturais, é de grande importância à busca por novos compostos com atividade antineoplásica. Embora vários compostos sejam estudados pelo seu potencial biológico, muitas fontes naturais ainda permanecem pouco estudadas, como é o caso dos líquens (GORDALIZA, 2007).

3.3 Características Gerais dos Líquens

Os líquens são definidos como organismos formados pela simbiose entre um fungo, denominado micobionte, e por uma ou mais algas, classificados como fotobionte. Cerca de 40 gêneros de algas e cianobactérias são relatados como constituintes do fotobionte liquênico.

Entre os gêneros de algas verdes que compõem o talo liquênico, destacam-se *Trentepohlia*, *Trebouxia* e *Pseudotrebouxia*, estando presentes em metade das espécies de líquens encontradas na natureza. As cianobactérias, que frequentemente fazem parte do talo liquênico, pertencem aos gêneros *Nostoc* e *Scytonema* (XAVIER FILHO *et al.*, 2006).

A maioria dos líquens é constituída por fungos pertencentes ao Filo Ascomycota, representando em torno de 42% das associações encontradas na natureza, distribuídas em cinco ordens: Graphidales, Gyalectales, Peltigerales, Pertusariales, Teloschistales. Outros filós também participam da composição do talo liquênico; destes 0,3 % são Basidiomicetos e 1,5 % de fungos anamórficos (NASH III, 1996; XAVIER FILHO *et al.*, 2006).

A organização do talo liquênico pode ser feita anatomicamente de duas maneiras. Quando há a presença de camadas internas sem diferenciação, talo é classificado homômeros, com encontrado nos gêneros *Caloplaca*, *Pyrenopsis* e *Collema*. Outra classificação para o talo liquênico em relação a sua organização, é o talo heterômero, sendo encontrado na maioria das espécies liquênicas. Neste caso o talo é uma estrutura estratificada, constituído por córtex superior, camada de fotobionte, medula e córtex inferior (NASH III, 1996; XAVIER FILHO *et al.*, 2006).

O talo liquênico é revestido pelo córtex, que é composto por várias camadas de células. Esta estrutura, normalmente, não possui pigmentação; porém em algumas espécies, há a presença de pigmentos coloridos como forma de proteção à luminosidade excessiva. Esta estrutura é dividida em córtex superior, onde é encontrada a camada de hifas compactadas, e o córtex inferior (HALE JÚNIOR, 1983; AHMADJIAN, 1993).

No córtex pode haver a presença de estruturas que servem como características importantes para identificação de gêneros e espécies liquênicas. A ausência de córtex é uma forma de identificação para algumas espécies líquens, como é vista nos gêneros *Collema* e *Cladina*. Além disso, em outras espécies há a

presença de Pseudocifelas, que são pequenos poros formados pela descontinuidade do córtex, sendo utilizadas para identificação líquênica, podendo aparecer no córtex superior, como no gênero *Punctelia*, como também no córtex superior, encontras no gênero *Pserucyphellaria*. Outra estrutura presente no córtex líquênico que também é uma estrutura utilizada para a determinação de gêneros e espécies de líquens, são as cifelas que ocorrem a apenas no córtex superior (XAVIER FILHO *et al.*, 2006) .

Além do córtex, o talo líquênico é constituído pela camada algal que representa 7% de sua constituição e pela camada medular (HALE JÚNIOR, 1983; AHMADJIAN, 1993). A camada algal, localizada abaixo do córtex superior, é constituída por hifas e células do fotobionte. Esta camada é composta por cristais hidrofóbicos e ácidos líquênicos, tornando o ambiente hidrofóbico facilitando a troca de gases necessária para a fotossíntese dos fotobionte (NASH III, 1996; XAVIER FILHO *et al.*, 2006).

A medula, camada localizada abaixo da camada algal, é o local onde há um maior armazenamento de água e reservas fúngicas representando a maior parte do talo líquênico. Apresenta, geralmente, uma coloração branca. Porém, em algumas espécies, esta região pode apresentar pigmentação que varia desde o amarelo até o vermelho. Em alguns gêneros - como visto no gênero *Usnea* - a medula aparece diferenciada em um tecido que confere resistência a trações sofridas pelo talo. Em outros gêneros (p.ex. espécies de *Ramalina*), esta pode apresentar uma consistência gelatinosa, como também ser oca ou quase oca, sendo córtex responsável pela sustentação do talo líquênico (XAVIER FILHO *et al.*, 2006).

Em relação a sua morfologia externa os líquens classificados em crostosos (Figura 2A), foliosos ou foliáceos (Figura 2B), fruticosos (Figura 2C), filamentosos (Figura 2D) e dimórficos (cladoniforme) (Figura 2E e 2F) (NASH III, 1996).

Os líquens crostosos são encontrados fixados firmemente ao substrato. Tipicamente os líquens crostosos são desprovidos de córtex superior e aderem ao substrato diretamente pela medula. Como a perda de água fica restrita a superfície do líquen, estes são favorecidos pela capacidade de sobreviver em condições ambientais diversas, além se fixarem em diferentes substratos. Apresentam vários subtipos: leproso, contínuo, rimoso, aerolado, placodioide, esquamuloso, endolítico (dentro de rochas) e endofítico crescendo abaixo de cutículas de folhas e caules, sendo esta última considerada a forma mais organizada anatomicamente

(p.ex. *Lecanora*, *Pertusaria*, *Graphis*, *Chiodecton*, *Buellia* e *Lecidia*) (NASH III, 1996; XAVIER FILHO *et al.*, 2006).

Os foliosos possuem morfologia semelhante a uma folha, sua aderência ao substrato é feita por projeções existentes no seu córtex inferior. Muitas vezes o talo apresenta divisão em lóbulos, mostrando vários graus de ramificação, podendo desenvolver-se em variedade de tamanho e diversidade (p.ex. *Parmelia*, *Collema*, *Leptogium*, *Anaptychia*, *Cetraria*, *Heterodermia*, *Phycia* e *Xanthoria*) (HALE JÚNIOR, 1983; NASH III, 2008).

Os fruticosos assemelham-se a pequenos arbustos, apresentando talo com aparência plana ou cilíndrica, não havendo diferenciação entre o córtex inferior e superior. São encontrados numa grande variedade de climas, desde desertos a florestas tropicais úmidas, encontrados em vários tipos de substratos sendo ancorados por rizoides existentes na camada basal do córtex (*Usnea*, *Ramalina*, *Cladonia*, *Stereocaulon*, *Pseudoveria*) (HALE JÚNIOR, 1983; NASH III, 2008).

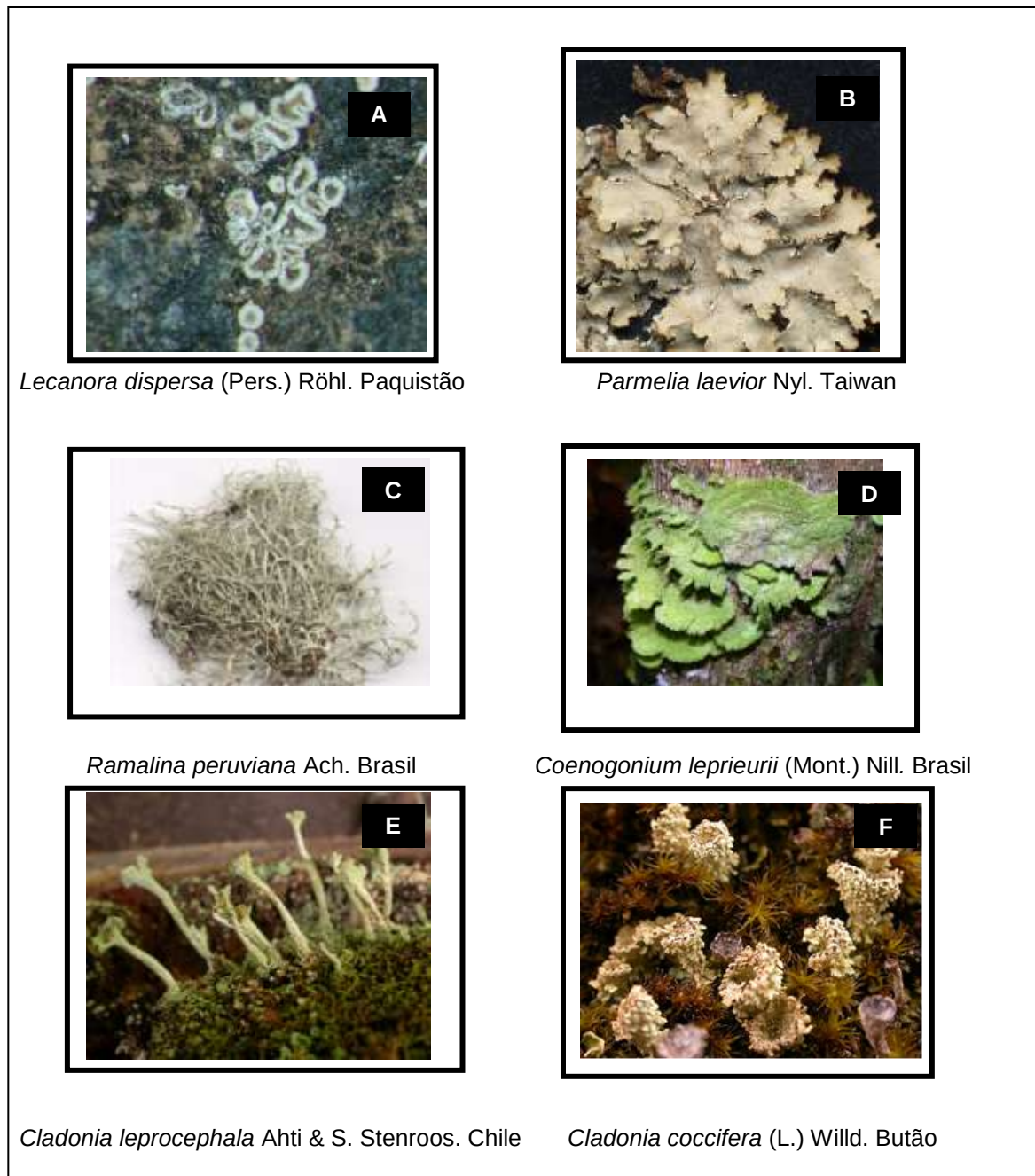
Os líquens classificados como dimórficos são formados pela combinação de dois tipos de talo. O talo primário que surge durante o desenvolvimento do líquen; e o talo secundário que define as características adultas do talo. As combinações encontradas com frequência neste tipo organização morfológica são crostoso – fruticoso e esquamuloso – fruticoso, ficando o talo fruticoso como o secundário. A família Cladoniaceae é a mais representativa para esse tipo morfológico (XAVIER FILHO *et al.*, 2006).

Considerados cosmopolitas, podem ser encontrados nos lugares mais diversificados desde áreas polares até crateras vulcânicas, podendo sobreviver em condições extremas de temperaturas, salinidade, altas concentrações de poluentes no ar e em solo pobre em nutrientes. Encontrados sobre rochas, solos, árvores, bem como em superfícies produzidas pelo homem, como é caso do couro, vidro, tijolo, borracha e plástico (MOLNÁR; FARKAS, 2010).

Além disso, são considerados bioindicadores uma vez que possuem a capacidade de armazenar contaminantes atmosféricos em suas células. A maioria dos líquens é terrestre, contudo são encontrados em locais de água doce e zona entremarés (MOTA FILHO; PEREIRA, 2007; NASH III, 2008).

Os líquens possuem várias estratégias reprodutivas. Na reprodução assexuada, o micobionte e o fotobionte podem se dispersar separadamente (transmissão horizontal), ou por propágulos de simbiontes clonais por meio de

blastídios, isídios e sorédios (transmissão vertical). Algumas espécies de líquens podem apresentar um tipo de reprodução mista apresentando além da reprodução assexual, a reprodução clonal por meio de propágulos simbióticos. (SEYMOUR; Figura 2 – Morfologia do talo liquênico.



Talo crostoso (A), Talo foliáceo (B), Talo fruticoso (C), Talo filamentoso (D), Talo dimórfico (E, F).

Adaptado de MARTINS, M. C. B., 2013.

Fonte: A, B, C, E e F: TROPICAL lichens, [201-]; C: FRANCO, 2012.

3.4 Metabolismo Liquênico

As substâncias químicas produzidas no metabolismo liquênico são classificadas em produtos extracelulares e intracelulares, sendo alguns compostos sintetizados pelo fungo e outros pela alga. Os produtos intracelulares carboidratos, carotenoides, aminoácidos e proteínas são provenientes do metabolismo primário. Já os produtos extracelulares, também chamados de metabólitos secundários, são característicos dos líquens, sendo originados pelo micobionte e depositados na superfície das hifas, geralmente insolúveis em água e de fácil extração em solventes orgânicos. (NASH III, 1996; HONDA; VILEGAS, 1998;).

O estudo sistemático das substâncias químicas resultantes do metabolismo secundário teve início com os trabalhos de Berbet em 1831, Alms em 1832 e Knop em 1844, que isolaram os ácidos pulvínico, picrolíquênico e úsnico, respectivamente. Os primeiros trabalhos sobre a atividade farmacológica dos líquens datam de 1907 com os estudos do químico alemão Wilhelm Zopf, em sua publicação *Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung*. Anos mais tarde os químicos japoneses Yasuhiko Asahina e Shoji Shibata publicaram o clássico *Chemistry of Lichen Substances* (1954), onde elucidaram estruturas químicas de vários compostos liquênicos, além de descreverem suas rotas de síntese (HUDECK; YOSHIMURA, 1996).

São conhecidos aproximadamente 1050 metabólitos provenientes do metabolismo secundário, classificados, de acordo com a estrutura química, em compostos fenólicos (derivados do orcinol e do β -orcinol), dibenzofuranos (ex. ácido úsnico), depsidonas (ex. ácido salazínico), lactonas (ex. ácido nefosterínico), quinonas (ex. parientina) e derivados do ácido pulvínico (ex. ácido pulvínico). Muitos destes metabólitos são produzidos pelos líquens como forma de defesa contra herbívoros e decompositores, e gerando interesse da indústria farmacêutica (HUNECK; YOSHIMURA, 1996; NASH III, 1996; STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008; SHUKLA; JOSH; RAWAT, 2010).

Os metabólitos secundários liquênicos são derivados de três rotas de biossíntese: A rota do ácido chiquímico, do acetato-polimalonato e do ácido mevalônico (tabela 2).

Quadro 1 - Principais compostos originados das rotas biossintéticas do metabolismo liquênico.

Rota do Ácido chiquímico	Rota do Acetato-polimalonato	Rota do Ácido mevalônico
Terfenilquinonas e derivados do ácido pulvínico	Ácidos alifáticos secundários Ésteres e derivados relacionados Antraquinonas Compostos Aromáticos: derivados de Policetídios *Derivados de unidades fenólicas depsídeos, tridepsídeos e éteres benzílicos; depsidonas e éteres difenílicos, depsonas, dibenzofuranos, ácidos úsnicos e seus derivados. *Compostos fenólicos mononucleares	Monoterpenos diterpenos sesquiterpenos triterpenos esteroides

Fonte: adaptado de Martins (2013 *apud* NASH, 2008).

3.5 Gênero Ramalina

O gênero *Ramalina* pertence ao Filo Ascomycota, Família Ramalinaceae; no Brasil a primeira espécie citada foi a *R. denticulata* (Eschw.) Nyl., descrita por Eschweiler como *Parmelia denticulata*. As espécies de *Ramalinas* possuem um talo fruticoso, porém as espécies encontradas no Brasil são morfologicamente caracterizadas pelo talo taloscespitoso (formando tufos densos e aglomerados), decubente (os ramos crescem horizontalmente no chão e as extremidades se colocam em posição vertical) e pendular (os quais se fixam no substrato e crescem pendurados) (KASHIWADANI; KALB, 1993).

As *Ramalinas* brasileiras possuem ramificações que crescem a partir da base do talo liquênico, com ramos dorsiventrais e cilíndricos. Nos ramos cilíndricos há distinção entre as superfícies dorsal e ventral, apresentando de maneira geral diferenças na coloração. Já os ramos cilíndricos são transversalmente circulares, estando presente nas espécies *R. solediosa*, *R. sprengelli* e *R. usnea* (KASHIWADANI; KALB, 1993).

Pseudocifelas estão presentes em todas as espécies brasileiras que possuem um talo sólido, sendo classificadas em quatro tipos: elipsoides, tuberculares, linear curta e linear longa. A do tipo elipsoide pode ser encontrada em espécies como *R. asahinae*, *R. cochlearis*, *R. dendroides*, *R. grumosa*, *R. prolifera*, *R. rigida*, *R. solediosa*. As pseudocifelas tuberculares, também denominadas de papilas, são encontradas em espécies de *R. complanata* e *R. aspera*. O tipo linear curta, também denominadas de fendas estreitas, possuem cerca de 0,5 mm de largura e 1-3 mm de comprimento, encontrada em *R. celastri* e *R. puiggari*. As pseudocifelas lineares longas são formadas lateralmente, sendo também identificadas como estrias longas, são encontradas em espécies de *R. anceps*, *R. camptospora*, *R. dendroides*, *R. sprengelii*, e *R. usnea* (KASHIWADANI; KALB, 1993).

As espécies brasileiras de *Ramalina* possuem sorédios granulares medindo 30-50 µm de diâmetro, sendo encontradas em *R. asahinae*, *R. cochlearis*, *R. dendroscoides*, *R. dendroides*, *R. grumosa*, *R. peruviana*, *R. rectangularis*, *R. rigida*, *R. solediosa* e *R. subpollinaria*. No gênero *Ramalina* há a presença de apotécios, principalmente em espécies que não possuem propágulos sexuais. A localização dos apotécios e o tipo de esporos, constituem uma importante classificação taxonômica, sendo classificado em subapicais (*R. camptospora*, *R. gracilis* e *R. pusiola*), laminais (*R. celastri*, *R. prolifera*), marginais (*R. asahinae*, *R. aspera*, *R. grumosa*, *R. puiggarii* e *R. usnea*) ou laterais (*R. sprengelii* e *R. usnea*) (KROG; JAMES, 1977; KROG; SWINSCOW, 1974, 1975; KASHIWADANI; KALB, 1993).

3.5.1 *Ramalina usnea*

Espécies *Ramalina usnea* são encontradas nos Estados Unidos nos estados do Texas e na Flórida, e no hemisfério Sul na Argentina, Paraguai, Uruguai, Ilhas galápagos e no Brasil. Líquens da espécie *Ramalina usnea* (figura 3) encontrado no Brasil apresentam um talo fruticoso, cortícola, com ramificações irregulares, achatado, sem sorédios. As Pseudocifelas são lineares, marginais e laminais, com córtex possuindo tecido condroide com presença de rachaduras, apotécio marginal ou laminar e ascósporos longo-fusiformes (KASHIWADANI & KALB, 1993).

De acordo com o estudo de kashaiwadani & Kalb (1993) há no Brasil duas raças químicas de *Ramalina usnea*. Na raça I, de acordo com os autores, é

encontrada a presença dos ácidos sequicaico, homossequicaico, usnico; do 4'-O-dimetilhomossequicaico e traços de 4'-O-dimetilssequicaico, 4'-O-metilnormohomossequicaico e 4'-O-metilnorssequicaico. Já na raça química II há a presença dos ácidos do 4'-O-dimetilhomossequicaico, 4'-O-dimetilssequicaico, metilnormohomossequicaico e 4'-O-metilnorssequicaico, como também a presença dos ácidos úsnico e homossequicaico, diferindo da raça 1 pela presença do ácido divaricático.

Figura 3 – Exemplar de *Ramalina usnea*.



Fonte: OLIVEIRA, G. B. de, 2017.

Nota: Fotografia registrada pela autora.

3.6 Atividades Biológicas das Substâncias Liquênicas

As propriedades biológicas dos líquens já são amplamente conhecidas e descritas no Sistema Indiano Ayurveda e Árabe Unani, para aplicação no tratamento de doenças do sangue e coração, bronquite, asma e desordens estomacais. Na medicina popular indiana, os líquens das espécies *Parmelia ssp.*, *Usnea longissima*, *Ramalina subcomplanata* e *Heterodermia tremulans* são vendidos como uma mistura denominada “Chharila”, utilizada por sua ação adstringente e as propriedades laxante e carminativa (SHUKLA, JOSHI; RAWAT, 2010).

Outro exemplo do uso de líquens na medicina popular é o líquen *Cetraria Islandica* é utilizado na Turquia para o tratamento de diabetes, dores estomacais,

bronquite e tuberculose. No norte da Califórnia, *Letharia vulpina* (L.) Hue. (Parmeliaceae) é empregado para tratamento de doenças estomacais. O líquen *T. vermicularis* var. *vermicularis* é utilizado popularmente na China para tratamento de distúrbios psíquicos, pressão arterial e inflamações do trato respiratório (GULÇIN; OKTAY; ASLAN, 2001; ZAMBARE; CHRISTOPHER, 2012).

Existe um grande potencial medicinal nos produtos oriundos do metabolismo líquênico, sendo encontradas substâncias únicas com vasta atividade biológica tais como, antitumoral e citotóxica (EINARSDÓTTIR *et al.*, 2010; BAČKOROVÁ *et al.*, 2012), antimicrobiana e antioxidante (FALCÃO *et al.*, 2004; PIRES *et al.*, 2012; SAHIN *et al.*, 2015), anti-inflamatória (BYEON *et al.*, 2012) e antiviral (GARCIA *et al.*, 2002).

3.6.1 Atividade Antioxidante

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e o radical hidroxila, com consequente oxidação de lipídios, de proteínas e do DNA, podendo levar a degeneração e morte celular. Além disso, o estresse oxidativo implicado no surgimento de várias alterações incluindo distúrbios neurodegenerativos, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (PAZ *et al.*, 2010).

Kosanic' e Ranković (2011) avaliaram a atividade antioxidante dos extratos metanólico, acetônico e aquoso de *Cladonia furcata*, *Hypogymnia physodes*, e *Umbilicaria polyphylla*. Nos resultados obtidos, extrato metanólico de *U. polyphylla* exibiu a maior capacidade de eliminação de radicais livre com um percentual de 90,08%, sendo este maior quando comparado aos antioxidantes padrão, o ácido ascórbico, BHA e α -tocoferol (86.58%, 79.78% e 63.99%, respectivamente).

Estudos de Kosanic *et al.* (2011) avaliaram a capacidade antioxidante dos líquens *Cladonia furcata*, *Hypogymnia physodes*, *Lasallia pustulata*, *Parmelia caperata* e *Parmelia sulcata*, encontrando um percentual de eliminação de radicais livres utilizando o método de DPPH com variação entre 29,99% a 90,93%. Os autores relacionam a presença de compostos fenólicos e flavonoides como importantes para o potencial antioxidante dos líquens.

Manojlovic *et al.* (2012) em seus estudos demonstraram a capacidade antioxidante dos extratos metanólico e clorofórmico de *Umbilicaria cylindrica*. Os extratos exibiram um alto potencial da captura de radicais livres pelo método de DPPH, além da atividade quelante e ação inibitória em relação à peroxidação lipídica. Os autores relacionaram estes resultados à presença de compostos fenólicos e a ação sinérgica dos componentes químicos presente nos extratos.

A atividade antioxidante também foi descrita por Grujicic *et al.* (2014), sendo avaliada a capacidade de captura de radicais livres do extrato metanólico de *Cetraria islandica* utilizando o método de DPPH, obtendo o valor de IC₅₀ 678.38 lg/mL, bem como o potencial capturas de ânions de superóxido com IC₅₀ 792.48 lg/mL, tendo estes resultados a relação com os compostos fenólicos presentes no extrato.

O potencial antioxidante de espécies de Ramalina é relatado por diversos autores. No estudo de Luo *et al.* (2010), foi descrita a capacidade antioxidante do extrato metanólico de *R. conduplicans*, que apresentou uma forte atividade para atividade de captura de radicais livres pelo teste de DPPH, obtendo um percentual inibitório de 55,8% para a concentração de 300 µg/mL. Além disso, o extrato apresentou a capacidade de doar elétrons, sendo o potencial redutor evidenciado pelo o aumento significativo de Fe²⁺.

Ramalina isolado de *Ramalina terebrata*, obteve promissora atividade antioxidante os resultados este estudos mostraram que a Ramalina possui uma atividade 27 vezes mais potente em relação a análogos de vitamina E e Trolox, quando avaliados pelo método ABTS. Também apresentando um resultado 2,5 vezes mais significativo que o BHT em relação à redução de íons Fe³⁺; uma maior inibição da atividade da enzima tirosinase quando comparado ao ácido Kójico comercial e um potencial aumentado 1,2 vezes para eliminação de radiais superóxido em comparação ao ácido ascórbico (PAUDEL *et al.*, 2012).

Os extratos acetônico, metanólico e etanólico das espécies *R. farinacea*, *R. fastigiata* and *R. fraxinea* tiveram determinados a quantidade de compostos fenólicos pelo método de Folin–Ciocalteu e o seu potencial antioxidante pelo método de DPPH. O extrato metanólico de *R. fastigiata* obteve composição fenólica e capacidade antioxidante, e o extrato acetônico de *R. fraxinea* a menor atividade. Contudo, para as três espécies o extrato metanólico mostrou maior eficiência para a captura de radicais livres. Este resultado, segundo os autores, pode estar associado

à quantidade total de compostos fenólicos, com também a sinergia entres estes. (SAHIN *et al.*, 2015).

Honda *et al.* (2015) avaliaram o potencial de eliminação de radicais livres de vários compostos isolados de líquens encontrados no Brasil, dentre estes a espécie *R. anceps*, utilizando o método de captura de radicais livres com diferentes concentrações de DPPH (1 mM e 0.3 mM). Os resultados mostraram que a atranorina e o ácido úsnico foram mais ativos em ambas as concentrações avaliadas.

Ristic *et al.* (2016) avaliou o potencial antioxidante do extrato acetônico de *R. fastigata*, e *R. fraxinea* obtendo resultados moderados sobre a capacidade de remoção de radicais livres utilizando o método de DPPH, encontrados valor de IC₅₀ de 285,45 e 423,51 µg/mL, respectivamente. Oran *et al.* (2016) em seus experimentos com as espécies *Usnea intermedia*, *U. filipendula*, e *U. fulvorenata*, demonstrou o potencial antioxidante significativo dos extratos acetônico, etanólico e metanólico das três espécies para o teste com ATT, além de determinar a composição de fenóis totais de cada amostra.

3.6.2 Atividade Citotóxica e Antineoplásica

O extrato acetônico de *Melanelia subaurifera* e *Melanelia Fuliginosa* apresentam uma atividade citotóxica dose-dependente contra células tumorais, porém não foram tóxicos para células normais (RISTIC *et al.* 2016 a). O mesmo autor avaliou o extrato acetônico dos líquens *Ramalina fraxinea* e *Ramalina fastigata*, exibindo atividade significativa contra células HeLa e A549 (RISTIC *et al.*, 2016 b).

Martins *et al.* (2016) isolou o ácido barbático de *Cladia aggregata*, avaliando sua atividade antineoplásica, comprovando seu potencial atitumoral *in vitro* contra as células HEP-2 (Adenocarcinoma de laringe), NCI-H292 (Carcinoma de célula escamosa de Pulmão) e KB (Carcinoma de células escamosa nasofaríngeas), além de baixa toxicidade em testes *in vivo*.

O extrato acetônico do líquen *Flavocetraria cucullata* apresentou uma potente ação citotóxica para células HT29 (câncer de cólon) e AGS (câncer gástrico), induzindo significativamente a apoptose (Nguyen *et al.* 2014). O potencial citotóxico

de compostos liquênicos também foi avaliada por Emsen *et al.* (2015), sendo descrito pelos autores a capacidade dos ácidos olivetórico e psorômico, como uma promissora alternativa para o tratamento de glioblastoma multiforme (GBM).

Basile *et al.* (2015) descreveram a capacidade de induzir apoptose e de inibir a proliferação induzidos por extratos de *Xanthoria parietina* em células de MCF-7 e MDA-MB231(células de câncer de mama) e 3T3L1. Observado também pelos autores a capacidade dos extratos em induzir o efeito modulador no controle da expressão do ciclo celular, regulando a expressão dos genes p16, p27, ciclina D1 e ciclina A.

Os Extratos metanólicos de *Vulpicida canadensis* e de *Cetraria Islandica* apresentaram um resultado significativo para a atividade citotóxica, reduzindo a viabilidade celular para as células Hep-G2 e MCF-7(FERNÁNDEZ-MORIANO, 2015). Ari *et al.* (2015) concluíram ; que o extrato metanólico de *Parmelia sulcata* apresentou forte atividade anticâncer, induzindo apoptose, provavelmente pela via das caspases.

Brandão *et al.* (2013) avaliou a atividade citotóxica dos compostos isolados de diferentes de líquens, incluindo o gênero *Ramalina*, e de seus isolados frente às linhagens de células neoplásicas UACC-62, B16-F10. Dentre os isolados testados, o ácido protocetrário apresentou o maior potencial para o desenvolvimento de estudos experimentais com células de melanoma em modelos experimentais.

Bačkorová *et al.* (2011) descrevem a atividade citotóxica dos compostos liquênicos parietina , atratorina, ácido úsnico e girofórico para as linhagens de células tumorais A27800, MCF-7, HT-29, HL-60. O forte potencial citotóxico dos extratos liquênicos também foi evidenciado nos trabalhos de Kosanić *et al.* (2011) com o extrato acetônico de *P. saxatilis*. Bačkorová *et al.* (2012) relataram a capacidade que metabolitos liquênicos possuem em induzir os mecanismos de morte celular programada por via mitocondrial.

Koparal *et al.* (2010) descreveram a capacidade do ácido olivetórico, isolado de *Pseudevernia furfuracea*, em inibir a angiogênese no tecido adiposo de animais experimentais; além disso, este foi capaz de reduzir a formação do tubo endotelial além de provocar a despolimerização de fibras de actina de forma dose-dependente.

3.6.3 Outras Atividades

Odabasoglu *et al.* (2006) descreveu o efeito gastroprotor do ácido úsnico isolado de *Usnea longissima*, evidenciada pela redução de lesões gástricas em animais. Jin, Li e He (2008) evidenciaram o potencial do ácido úsnico no controle da resposta inflamatória, associando sua ação na diminuição da síntese de proteínas relacionadas ao processo inflamatório. Oettl *et al.* (2013) avaliou a atividade anti-inflamatória de vários compostos liquênicos, descrevendo o potencial de inibição do processo inflamatório dos depsídeos.

Honda *et al.* (2010) avaliaram a atividade de isolados das espécies *Parmotrema dilatatum*, *P. tinctorum*, *P. lichenxanthonicum*, *Pseudoparmelia sphaerospora*, *Usnea subclava*, *Ramalina* sp., frente ao *Mycobacterium tuberculosis* - *tuberculosis*. O ácido difractaico isolado de *Usnea subclava* apresentou um alto poder inibidor de crescimento desta bactéria; além disso, os autores confirmaram o potencial antibacteriano da atranorina e dos ácidos úsnico e salazínico.

Martins *et al.* (2014) avaliaram a atividade moluscicida do composto sintetizado usnato de potássio, derivado do ácido úsnico isolado de *Cladonia substellata* frente a ovos e adultos de *Biomphalaria glabrata*, evidenciando a alta solubilidade do composto e eficácia no controle do molusco. O ácido úsnico também é relatado na literatura pelo seu potencial leishmanicida, como descrito no trabalho de Luz *et al.* (2015).

Vu *et al.* (2015) descreveram a atividade antiviral da atranorina, isolado de *Stereocaulon evolutum* e de suas formas modificadas, contra vírus da hepatite C, com resultados promissores na regulação da viabilidade viral. O ácido difractaico isolado de *Usnea longissima* demonstrou atividade hepatoprotetora contra fibrose cística (KARAGOZ *et al.*, 2015).

Moreira *et al.* (2015) avaliaram o potencial larvicida do extrato metanólico de *R. usnea*, demonstrando uma eficácia de 100% na eliminação de larvas do *Aedes aegypti*. Na literatura há poucas informações sobre a atividade biológica e a composição química da espécie *Ramalina usnea*, tornando o estudo da espécie que significativo, contribuindo para descoberta de novos compostos com propriedades farmacológicas e terapêuticas.

4 ARTIGO

Manuscrito a ser submetido à revista:



Qualis: B2

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE *RAMALINA USNEA* (LÍQUEN)

Tipo de artigo: Original

Gerliny Bezerra de Oliveira^{1, 2}, Tamiris Alves Rocha³, Maria Aparecida da
Conceição Lira², Emerson Luiz Gumboski⁴, Teresinha Gonçalves da Silva⁵, Nicácio
Henrique da Silva⁶, Emerson Peter da Silva Falcão^{1, 2*}

1 Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco - Brasil.

2 Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular-SIM, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco - Brasil.

3 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco- Brasil.

4 Instituto de Biociências – Departamento de Botânica –UFRS. Porto Alegre – RS, Brasil.

5 Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife , Pernambuco – Brasil.

6 Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica – UFPE.

*Autor para correspondência

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

Resumo

Líquens são organismos formados pela simbiose entre um fungo e uma alga. Substâncias originadas no seu metabolismo secundário apresentam uma vasta atividade biológica, tais como antioxidante, antimicrobiana, citotóxica entre outras, sendo fontes promissoras para o surgimento de novos fármacos. Este estudo descreve a avaliação antineoplásica *in vitro* dos extratos orgânicos do líquen *Ramalina usnea* (L.) R. Howe. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de sequestro de radicais livres (DPPH), redução do íon férrico e dosagem de fenóis totais. Para o ensaio de citotoxicidade foi utilizado o método do 3-[4,5dimetiltiliazol-2,5-difeniltetrazólio (MTT) utilizando as linhagens de células HT-29, NCL-H292, MCF-7 e HL-60 e o teste de atividade hemolítica com eritrócitos humanos. No estudo da capacidade de sequestro de radicais livres observou-se que o extrato etéreo obteve um percentual de 60 % na concentração 1000 µg/mL. Para a composição fenólica obtivemos as concentrações de 43,58 µg EAG/mg para o extrato etéreo, 9,09 e 11,46 µg EAG/mg para os extratos clorofórmico e acetônico, respectivamente. Observamos que o extrato etéreo obteve o maior potencial redutor para o íon férrico. Os extratos apresentaram baixa toxicidade para eritrócitos humanos nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL. A citotoxicidade em células tumorais foi significativa para os extratos clorofórmico e acetônico apresentando um maior percentual inibitório para as células NCL-H292 e HL-60. Os extratos orgânicos

de *Ramalina usnea* apresentaram efeitos significativos para as atividades antioxidante e citotóxicas, demonstrando promissores para atividade antineoplásica.

Palavras chaves: *Ramalina usnea*, citotoxicidade, líquen.

Abstract

Lichens are organisms formed by the symbiosis between a fungus and seaweed. Substances originating in their secondary metabolism have a wide biological activity, such as antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, among others, being promising sources for the emergence of new drugs. This study describes the in vitro antineoplastic evaluation of organic extracts of lichen *Ramalina usnea* (L.) R. Howe. The antioxidant activity was evaluated by the methods of free radical sequestration (DPPH), ferric ion reduction and total phenol dosage. For the cytotoxicity assay the 3-[4,5-dimethylthiazole-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) method was used using the HT-29, NCL-H292, MCF-7 and HL-60 cell lines and the activity test Hemolytic reaction with human erythrocytes. In the study of the capacity of free radical sequestration, it was observed that the ethereal extract obtained a percentage of 60% in the concentration 1000 µg / mL. For the phenolic composition, we obtained the concentrations of 43.58 µg EAG / mg for the ethereal extract, 9.09 and 11.46 µg EAG / mg for the chloroform and acetone extracts, respectively. The extracts presented low toxicity to human erythrocytes at concentrations of 500, 250 and 125 µg / mL. Cytotoxicity in tumor cells was significant for chloroform and acetone extracts with a higher inhibitory percentage for NCL-H292 and HL-60 cells. The organic extracts of *Ramalina usnea* presented significant effects for the antioxidant and cytotoxic activities, showing promise for antineoplastic activity.

Keywords: *Ramalina usnea*, citotoxic, lichen

Introdução

O câncer é um termo popularmente utilizado para designar as neoplasias que originam tumores malignos, tendo estas causas multifatoriais, descritas como um problema de saúde pública e uma epidemia no século 21 (Stratton; Dorr; Alberts, 2000). O crescente número de casos de câncer no mundo impulsiona a pesquisa por novas fontes de fármacos para serem utilizados no tratamento desta doença, já que a resistência aos quimioterápicos vem aumentando com o passar dos anos. Vários compostos originados de fontes naturais são conhecidos como agentes anticâncer, sendo capazes de controlar a divisão celular e induzir a apoptose (Bačkorová et al. 2011).

O desenvolvimento e a identificação de novos compostos com promissora atividade anticâncer são originados de várias fontes como plantas, fungos, organismos marinhos e líquens (Shrestha e Clair, 2013). Os líquens são organismos formados por uma parte fúngica (micobionte) e uma parte fotossintética (fotobionte) sendo frequentemente uma alga verde ou uma cianobactéria (Nash III, 2008). Seus metabólitos possuem uma vasta atividade biológica incluindo antimicrobiana (Manojlovic et al., 2012) , antiviral (Vu et al, 2015), anti-inflamatória (Oettl et al., 2013), citotóxica (Brandão et al. 2013), antiproliferativa (Basile et al, 2015), antitumoral (Bogo et al., 2010) e antioxidante (Kumar et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e o ânion superóxido (O_2^-) influenciam o surgimento do estresse oxidativo. Em concentrações normais, as ROS são cruciais para a manutenção das atividades celulares. No entanto, em concentrações elevadas, desencadeiam o desenvolvimento de várias patologias como doenças articulares, síndromes de imunodeficiência e neoplasias (Kosanic' et al. , 2011).

Os compostos antioxidantes interagem com ROS retardando o progresso de várias doenças crônicas. Estes agentes podem induzir modificações no ambiente oxidativo e atuar na modulação do comportamento celular, sendo importantes para o tratamento de neoplasias (Ghate, 2013).

É conhecido na literatura o potencial antineoplásico de vários compostos liquênicos, como os ácidos úsnico (Einarsdóttir et al. 2010), salazínico (Manojlović et al., 2012), protoliquesterínico, atratorina e fisódico (Ranković et al., 2014).

Várias espécies liquênicas são conhecidas por possuírem fontes de compostos antioxidantes, como: *Cladonia furcata*, *Lecanora atra*, *Lecanora muralis* (Anar et al., 2013), *Parmelia sulcata*, *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Cladonia foliacea* (Mitrovic et al., 2011), *Ramalina farinacea*, *R. fastigiata* e *R. fraxinea* (Sahin et al, 2015).

Os metabólitos liquênicos são fontes potenciais para a pesquisa e descobrimento de compostos com importância farmacológica, sendo uma fonte natural promissora para o tratamento de doenças. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante e a atividade citotóxica dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico do líquen *Ramalina usnea* R. Howe.

Materiais e Métodos

Coleta do material liquênico

O líquen *Ramalina usnea* foi coletado no município de Rio Negrinho, Santa Catarina, Brasil (Latitude 26°17'55.42"S e Longitude 49°37'24.16" O). As amostras foram coletadas e identificadas pelo Prof. Dr. Emerson Luiz Gumboski do

Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Uma amostra foi depositada no Herbário UFP – Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco (Brasil) comprovante nº 81875.

Preparação dos extratos orgânicos

Foram macerados 20 g do talo in natura de *R. usnea*. A extração foi realizada utilizando a técnica por sistema de esgotamento a quente em aparelho de Soxhlet, seguindo a sequência eluotrópica com os solventes éter, clorofórmio e acetona. A extração foi realizada utilizando-se 10 mL de cada solvente à temperatura de ebulição dos mesmos durante um período de 6 h. Para a remoção do solvente do e concentração de cada extrato, estes foram realizados sob pressão à temperatura de cada solvente utilizando rotaevaporador. Em seguida os extratos foram mantido em dessecador a temperatura ambiente até que fosse obtido um peso constante.

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para as análises em CCD os extratos liquênicos foram diluídos em solvente clorofórmio e aplicados em cromatoplaças de sílica Gel Merck (F-254 nm). Foi utilizado o sistema A tolueno:dioxano:ácido acético (180:45:5, v/v), descrito por Culberson (1972). As bandas foram observadas sob luz UV (254 – 366 nm) e reveladas com ácido sulfúrico a 10% a 100 °C/ 5 min. As bandas foram identificadas por coloração e R_f, comparados com padrões do ácido úsnico (Merk ®) e do ácido divaricático (isolado e cedido pelo laboratório de Química de Produtos naturais da Universidade de Pernambuco).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os ensaios em CLAE foram feitos com os três extratos seguindo a metodologia utilizada por Vicente e Legaz (1983), utilizada por Falcão et al. (2002). A separação dos compostos foi realizada em coluna de fase reversa C18, acondicionada em forno ajustado a 30°C numa pressão de 88 atm, utilizando fase móvel em sistema isocrático metanol/água/ácido acético (80:19,5:05, v/v/v), em cromatógrafo líquido Thermo Fischer, modelo Ultimate 3000 acoplado a detector de UV com arranjos de Diodor (DAD), fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 10 µL. Os resultados foram avaliados mediante Tempo de Retenção (Tr) das substâncias na coluna e área dos picos cromatográficos respectivamente e comparados com os padrões do ácido úsnico e divaricático.

Atividades Antioxidantes

Sequestro de radicais livres (SRL) pelo método do DPPH

A atividade de sequestro de espécies reativas de oxigênio (EROs) das substâncias foi determinada em termos de doação de radicais livres usando DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (Blois, 1958). Foram adicionados 250 µL de DPPH (1mM) em 40 µL de diferentes concentrações das amostras de cada extrato (31,25;62,5;125,250,500 e 1000 µg/mL). Após 25 min foi feita a leitura da absorbância em 517nm. O ácido gálico foi utilizado como controle positivo e o metanol utilizado para diluição dos extratos como controle negativo (40 µL). As

análises foram feitas em triplicata e a concentração de radicais livres DPPH foi calculada utilizando a fórmula:

$$\text{DPPH (\%)} = ([A_0 - A_1] / A_0) \cdot 100$$

Onde: A_0 = Absorbância do Controle

A_1 = Absorbância da amostra

Análise de Fenóis Totais

O total de compostos fenólicos foi determinado utilizando o método Folin-Ciocalteu (Li et al., 2008). A quantidade total de fenóis foi expressa em equivalentes de ácido gálico (mg EAG /g de extrato), utilizando a curva de calibração ($y = 1.6221x + 0.0084$, $r^2 = 0.9934$). Em cada poço foram 1 mL da solução de Folin diluída de 1:10 (v/v) e 0,2 mL das amostras de cada extrato foram dissolvidas a 1 mg/mL em metanol. Após 3 min. adicionou-se 0,8 mL de carbonato de cálcio a 7,5%. Durante 120 min. a placa permaneceu em local escuro. As análises foram feitas em triplicata e a absorbância mensurada a 765 nm em espectrofotômetro.

Método de Redução do Íon Ferro (FRAP)

Para a preparação do FRAP foram utilizados 10 mL de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazine), 10 mL de FeCl_3 e 100 mL de tampão acetato. A solução foi aquecida a 37 °C, sob agitação durante 5 min. As amostras de cada extrato foram dissolvidas com metanol (1mg/mL). Em placa de 96 poços foram adicionados 20 μL de cada amostra e 180 μL do reagente (no escuro). O material foi incubado por 40 min. a 37°C. Em seguida feita leitura da absorbância em espectrofotômetro a 593

nm. A redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} e calculado em Trolox equivalente (TE). As análises foram feitas em triplicata.

Determinação da Citotoxicidade

Atividade Hemolítica

Para os ensaios de atividade hemolítica *in vitro* foram utilizados 5 a 10 mL de sangue O⁺ obtidos de voluntários saudáveis através de punção venosa e colocado em tubos heparinizados. Os eritrócitos foram isolados por centrifugação (1500 rpm, 10 min. a 4 °C, em seguida, foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PSB , pH 7,4). Cada tubo recebeu 1,1 mL de suspensão de eritrócito (1%) e 0,4 mL de cada extrato dissolvido em metanol nas concentrações 62,5; 125; 250 e 500 μL / mL. Como controle foram utilizados o solvente metanol (negativo) e Triton 0,0025 % (positivo). Após 60 minutos as células foram centrifugadas e absorbância mensurada em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade hemolítica foi expressa pela fórmula:

$$\text{Atividade hemolítica (\%)} = (\text{As} - \text{Ac}) \times 100 / (\text{Ac} - \text{Ab})$$

Onde: Ab = absorbância do solvente; As = absorbância da amostra ; Ac =
absorbância do triton.

Atividade Citotóxica

O teste de atividade citotóxica foi realizado através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983). As linhagens de células utilizadas foram: NCI-H292 (carcinoma

(carcinoma de laringe humana), HT-29 (adenocarcinoma de colón humano) mantidas em meio de cultura DMEM; HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e MCF-7 (câncer de mama humano) mantidas em meio de cultura RPMI. Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina), sendo mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

As células NCI-H292, MCF-7, HT-29 (10⁵ células/mL) e HL-60 (0,3 x 10⁶ células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Em seguida as amostras de células foram dissolvidas em DMSO (1%) foram adicionadas aos poços em concentração de 50 µg/mL de cada extrato. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO adicionado a cada poço. O fármaco doxorrubicina (5µg/mL) foi utilizado como padrão. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 560nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0.

Resultados

Análises Cromatográficas

Cromatografia em Camada delgada (CCD)

Na análise em CCD observou-se a presença do ácido divaricático no extrato etéreo com R_f (0 52). No extrato clorofórmico e no acetônico observou-se uma única banda com R_f = 0,69 e R_f = 0,8, respectivamente; a primeira não identificada e a segunda correspondente ao ácido úsnico (Figura 1).

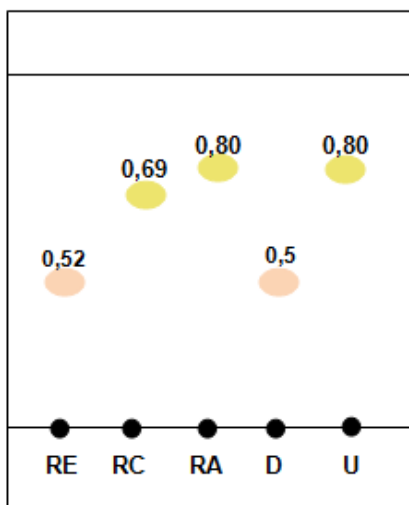


Figura 4- Modelo esquemático da Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos orgânicos de *Ramalina usnea*. RE- Extrato etéreo; RC- Extrato clorofórmico; RA- Extrato acetônico; D- Ácido divaricático; U- ácido úsnico.

Cromatografia em Camada Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Nas análises em CLAE o cromatograma do extrato etéreo evidenciou 9 picos tendo como composto majoritário aquele cujo $Tr = 14,17$ (70,1%), corresponde ao padrão de ácido divaricático utilizado na análise ($Tr = 15,87$), como pode ser visto na figura 2 e Tabela 1. Os demais picos permanecem não identificados.

O extrato clorofórmico, 2 picos, tendo como composto principal com $Tr = 24,28$ (98,40%), correspondente ao ácido úsnico padrão. O segundo composto permanece não identificado. O extrato acetônico apresentou três picos, sendo o composto majoritário $Tr = 14,54$, semelhante ao do ácido divaricático. Os demais compostos não foram identificados.

O resultado encontrado no extrato etéreo está de acordo com o encontrado na análise de CCD, onde foi evidenciada a presença dos ácidos divaricático e úsnico. Observou-se ainda a maior concentração do ácido divaricático no extrato etéreo, enquanto que a maior para o úsnico foi evidenciada no extrato clorofórmico.

Os resultados foram comparados com os valores de Tr dos ácidos divaricático e úsnico (figura 3).

Atividade antioxidante

DPPH

Os resultados da atividade antioxidante usando o método de DPPH estão mostrados na figura 4. Entre os extratos avaliados, o extrato etéreo apresentou a maior capacidade na eliminação de radicais livres (EROs) possuindo uma capacidade de 65% no sequestro de radicais livres na concentração de 1000 μ /mL. Os extratos clorofórmico e acetônico apresentaram baixa capacidade de eliminação, obtendo valores abaixo 20% para a mesma concentração.

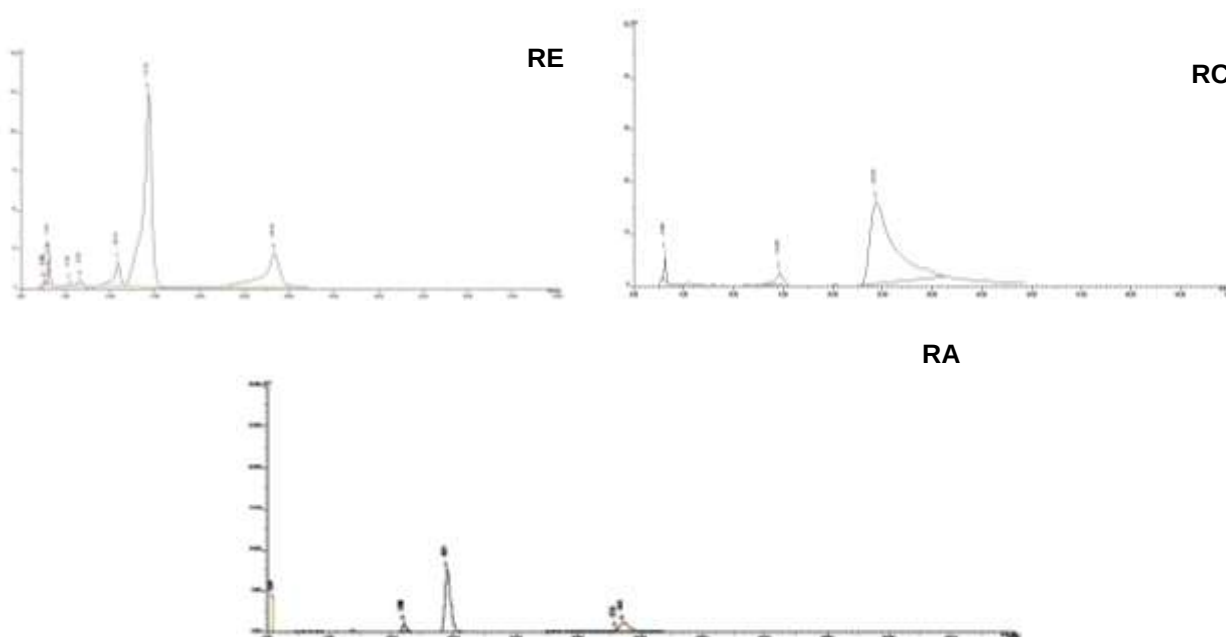


Figura 5- Cromatografia em CLAE dos extratos orgânicos de *Ramalina usnea*. RE- Extrato etéreo, RC - Extrato clorofórmico, RA - extrato acetônico.

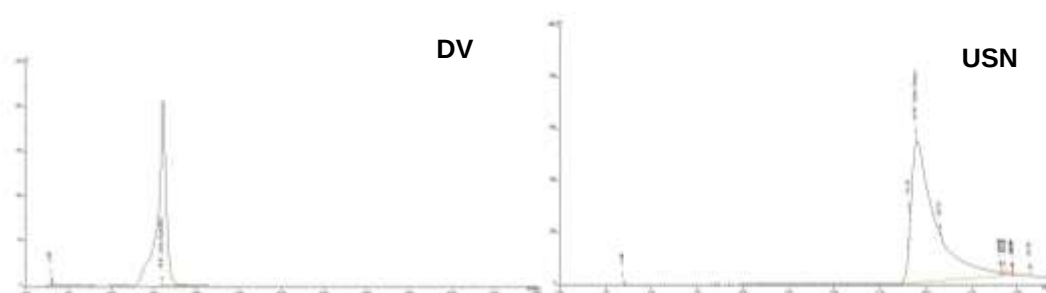


Figura 6 - Cromatografia em CLAE dos padrões ácido úsnico e divaricático .DV- ácido divaricático;
USN- ácido úsnico.

Tabela 2 - Concentração relativa dos fenóis nos extratos de *R.usnea*.

Extratos	Pico = (Tr)	Área (mV)	% da Amostra
RE	P1= 2, 41; P2= 2,69 P3= 3,00; P4= 3,14; P5= 5,36	P1= 9,53; P2= 11,64 P3= 173,19; P4= 11,17; P5= 13,79	P1= 0,06; P2= 0,10 ; P3= 1,49;P4= 0,09; P5= 0,11
	P6= 6,58P7= 10,74; P8= 14,17 ; P9= 28,23	P6= 104,97;P7= 674,75 P8= 8.126,88 ; P9= 20,56	P6= 0,90; P7= 5,82; P8= 70,10 ; P9= 21,27
RC	P1= 2,99; P2= 24,24	P1= 42,38; P2= 11,64	P1= 1,59; P2= 98,40
RA	P1= 3,00; P2= 13,85 P3= 14,54; P4= 24,65	P1= 14,65; P2= 0,00 P3= 41,75; P4= 5,86	P1= 23,53; P2= 0,00 P3= 67,05; P4= 9,41

RE- Extrato etéreo, RC - Extrato clorofórmico, RA - extrato acetônico, P –picos.

Análise de fenóis totais

Na análise da composição fenólica total dos extratos feita pelo método de Folin-Ciocalteu, observou-se que o extrato etéreo apresentou a maior concentração de fenóis 43,58µg EAG/mg, seguido do extrato acetônico e clorofórmico, com valores 11,46µg e 9,9 EAG/mg, respectivamente (tabela 2).

Método de Redução do Íon Ferro (FRAP)

A avaliação do potencial redutor do íon ferro, mostrou que o extrato etéreo obteve uma maior capacidade redutora com valor de $4,08 \pm 0,25 \text{ FeSO}_4 \text{ } \mu\text{g/ mg}$. No entanto, a atividade apresentou valores menores comparada ao controle positivo trolox - $24,70 \pm 0,41 \text{ FeSO}_4 \text{ } \mu\text{g/ mg}$ (tabela 2).

Atividade Hemolítica

Na atividade hemolítica foi observado que os extratos de *R. usnea* apresentaram uma baixa citotoxicidade para eritrócitos humanos em todas as concentrações avaliadas(figura 5).

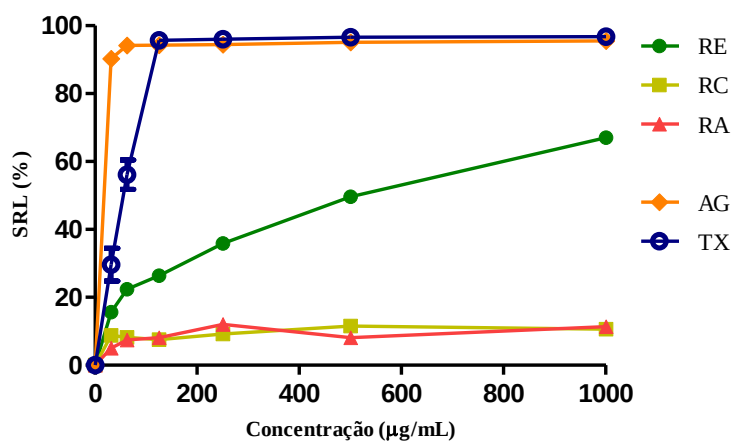


Figura 7 - Análise da atividade antioxidante DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) em diferentes concentrações dos extratos orgânicos de *Ramalina usnea*. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. RE- Extrato etéreo; RC- Extrato clorofórmico; RA- Extrato acetônico; AG- Ácido gálico ; TX- Trolox

Tabela 3 - Total de compostos fenólicos e potencial redutor do íon férrico (FRAP) dos extratos orgânicos de *Ramalina usnea*.

Amostras	FeSO ₄ µg/ mg de extrato	Fenóis (µg EAG/mg amostra)
RE	4,08 ± 0,25	43,58± 1,05
RC	0,91 ± 0,13	9,09 ± 1,41
RA	1,29 ± 0,04	11,46 ± 4,03
TX	24,70 ± 0,41	_____

Determinação da Citotoxicidade

Método de MTT

Os resultados da atividade citotóxica em células tumorais esta descrito na tabela 3. O extrato acetônico apresentou uma capacidade inibitória sobre crescimento celular superior a 70% para as células HT-29, MCF-7, NCI-H292 e HL-60. Para o extrato clorofórmico essa faixa de inibição ocorreu para as linhagens HT-29, NCI-H292 e HL-60. O extrato acetônico e o clorofórmico apresentaram para as linhagens HT-29(77% e 79,4%) e HL-60 (97,6 e 96,5 %) inibições maiores quando comparados com a doxorrubicina (64,1% HT-29 e 92,9 HL-60). O extrato etéreo não obteve atividade significativa. Para os extratos de *R. usnea* que apresentaram atividade superior a 70% foi calculada a IC₅₀, tendo o melhor resultado para o acetônico com uma IC₅₀ de 1,1 µg/mL para as linhagem de células HT-29 (tabela 4). Os extratos de *Ramalina usnea* demonstraram efeito citotóxico moderado sobre as linhagens de células tumorais testadas, além de baixa toxicidade para eritrócitos humanos. Observou – se, porém um resultado mais significativo com o extrato

clorofórmico, possivelmente este achado condiz com a proporção maior deste composto neste extrato, conforme os achados em CCD e CLAE. Entretanto, os resultados vistos para o extrato acetônico podem apontar para um bom potencial citotóxico do ácido divaricático e/ou um efeito sinérgico significativo entre os dois compostos.

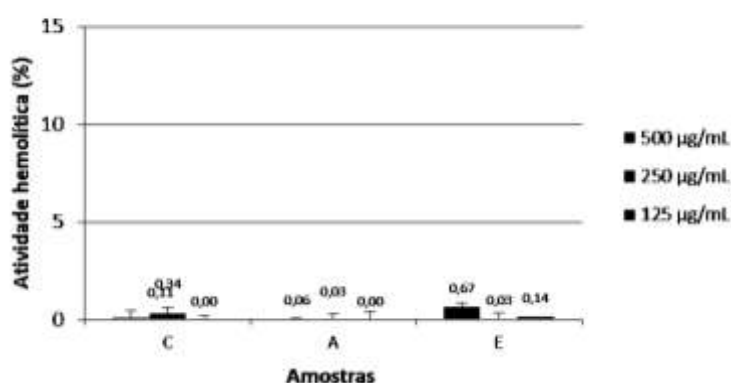


Figura 8 - Atividade hemolítica dos extratos orgânicos de *Ramalina usnea*
E- Extrato etéreo; C- Extrato clorofórmico ; A- Extrato acetônico.

Tabela 4 - Porcentagem de inibição dos extratos liquênicos sobre o crescimento de células tumorais.

Extratos	% inibição							
	HT-29	EPM	NCI-H292	EPM	MCF-7	EPM	HL-60	EPM
RE	13	0	23,8	8,3	33,8	2,1	23,4	0,3
RC	79,4	4,8	90,3	5	56,2	5,1	96,5	3,4
RA	77	7	87,9	7,5	77,4	2,8	97,6	2
Doxorrubicina	64,1	1,1	94,1	1,9	94,1	1,9	92,9	0,6

RE- Extrato etéreo; RC- Extrato clorofórmico; RA- Extrato acetônico; EPM – Erro médio Padrão.

Tabela 5 - CI_{50} para os extratos etéreo e clorofórmico de *Ramalina usnea*, expressos em $\mu\text{g/mL}$.

Extratos	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	Intervalo de confiança			
	NCI-H292	HT-29	MCF-7	HL-60
RA	24,8	1,1	-	12,4
	20,5-29,9	0,7-1,6	-	10,8-14,9
RC	13	-	n.t.	4,8
	10,6 - 15,9	-	n.t.	4,2 - 5,6
Doxorrubicina	0,08	1,83	0,11	0,06
	0,06 – 0,12	1,36-2,40	0,08 - 0,15	0,05 – 0,07

RE- extrato etéreo; RC – extrato clorofórmico; n.t. = não testado.

Discussão

O presente estudo examinou as atividades antioxidante e citotóxica dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico do líquen *Ramalina usnea*, além da análise da constituição química e fenólica dos três extratos.

Nas análises da composição fenólica do líquen *Ramalina Usnea* identificou-se por meio de CCD e CLAE a presença do ácido divaricático e úsnico, sendo a maior concentração do primeiro evidenciada no extrato etéreo enquanto que o segundo no extrato clorofórmico. Observou – se ainda que a proporção relativa do ácido divaricático foi maior nos extratos etéreo e acetônico e menor apenas no extrato clorofórmico. Esta é a primeira descrição da composição fenólica desta espécie.

Os extratos liquênicos são amplamente estudados, pois apresentam uma forte atividade antioxidante. Kosanic et al. (2014) descreveu em seus estudos haver relação entre a atividade antioxidante com a presença de compostos fenólicos, já que quanto maior a constituição fenólica mais expressiva significativa será a capacidade captura de radicais livres. Observou-se que o extrato etéreo apresentou a maior composição fenólica e uma maior atividade de sequestro de radicais livres quando comparado aos extratos clorofórmico e acetônico, podendo este resultado

está associado à presença destes compostos. Sabe-se que os compostos fenólicos agem como doadores de hidrogênio para radicais livres e desta maneira atuam como agentes antioxidantes (Shahidi F. & Wanasundara, 1992; Maeda et al, 1999).

Russo et al. (2008) evidenciaram em seus experimentos a capacidade protetora ao DNA frente à ação oxidativa de radicais livres do H_2O_2 e do NO de esferoforina, um depsídeo semelhante ao ácido divaricático, obtendo uma ação que chegou a 93%. Dada à semelhança química dos dois compostos, consideramos a presença do ácido divaricático influenciou no melhor resultado encontrado no extrato etéreo. Quando comparamos ao trabalho de Russo et al.(2008), observamos que o ácido divaricático e a esferoforina apresentam semelhanças estruturais, o que pode indicar que o ácido divaricático contribuiu para a maior atividade antioxidante obtida no extrato etéreo.

Vários autores relatam haver influência entre a quantidade de compostos fenólicos e a uma maior atividade antioxidante. No estudo do potencial antioxidante do extrato acetônico de *Toninia candida* demonstrou-se uma atividade significativa pelo teste de DPPH com CI_{50} de 115, 77 $\mu g/mL$, sendo relacionada à presença de compostos fenólicos, dentre eles o ácido úsnico (Ranković et al., 2012). Oran et al. (2016) evidenciou a presença do ácido úsnico no extrato acetônico de *Usnea filipendula* e *U. fulvorenans*, associando à presença deste composto a alta atividade antioxidante dos extratos.

Luo et al.(2010) em seus experimentos com o extrato metanólico de *Ramalina conduplicans*, observaram uma atividade antioxidante moderada para o teste de DPPH, com percentual de 55,8% para concentração de 300 $\mu L/mL$. O extrato de hexano de *Ramalina roesleri* apresentou uma variação na eliminação de ROS entre 29.42% a 87.90% (Sisodia et al., 2013). Esses valores foram

semelhantes às porcentagens encontradas em nosso trabalho, onde os extrato de *R. usnea* apresentaram uma variação entre 20 - 60 % de capacidade antioxidante.

Gulluce et al. (2006) em seu estudo avaliou o potencial antioxidante do extrato metanólico de *Ramalina pollinaria* e *R. polymorpha* , observando uma atividade de eliminação de ROS inferior a 50 % .Esta faixa de eliminação de ROS foi encontrada no teste de DPPH para os extratos clorofórmico e acetônico de *Ramalina usnea*.

Os extratos líquênicos são fontes promissores de compostos com atividade antiproliferativa e anticâncer. Triagini et al. (2009) avaliaram o potencial antiproliferativo dos extratos de *Xanthoria parietina* ,que foi capaz de inibir a proliferação de células de mieloma de murino. Os autores associaram este resultado à presença de compostos antioxidantes presentes no extrato, como peroxidases e superóxido desmutase.

Martins et al. (2016) avaliaram a atividade citotóxica do extrato etéreo de *Cladia aggregata*, apresentando em seus resultados o potencial inibitório deste extrato frente em células HEP-2 e NCI-H292 , sugerindo que a inibição do crescimento celular é ocasionado pela ação sinérgica de substâncias presentes na sua composição.

Kosanić et al (2013) avaliaram as propriedades anticâncer de *Parmeliopsis ambigua*, *Parmelia pertusa* e *Hypogymnia physodes* , mostrando que os extratos foram citotóxicos para as linhagens de células FemX e LS174, porém o controle positivo demonstrou uma melhor atividade. Resultados semelhantes aos encontrados em nosso trabalho.

A produção de espécies reativas de oxigênio está relacionada ao surgimento de várias patologias, como desordens neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, e com o surgimento do câncer (Amo de paz et al., 2010).Existem

evidências que o estresse oxidativo está associado ao surgimento dos cânceres de mama, colorretal , e fígado, devido à peroxidação de lipídios e a formação de aldeídos tóxicos. Desta maneira, é possível considerar que o potencial dos compostos fenólicos na eliminação de ROS atue também impedindo a carcinogênese (Fernandes – Moriano, et al. , 2016).

Conclusão

Identificou-se por meio de técnicas cromatográficas CCD e CLAE a presença dos ácidos divaricático, nos três extratos analisados, e úsnico, nos extratos etéreo e acetônico.

Os extratos apresentaram atividade antioxidante moderada, sendo o etéreo o mais ativo. Igualmente a dosagem de fenóis identificou maior concentração no extrato etéreo.

A atividade citotóxica foi significativa para o extrato acetônico e o clorofórmico.

Todos dos extratos se mostraram não tóxicos para eritrócitos humanos.

Conflitos de Interesse

Os autores não relataram conflito de interesses.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE pelo apoio financeiro.

Referências

Alley, M. C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48:589- 601.

Amo de Paz, G, Raggio J, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, González-Burgos E, carretero ME, Crespo A . 2010. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. *J. Pharmaceut. Biomedical Analysis*, 53: 165-171.

Anar, M., Aslan, A., Agar, G., Ozgencli, I. Antigenotoxic and Antioxidant Activity of Lichens *Anaptychia ciliaris*, *Bryoria fuscescens*, *Parmotrema chinensa* and *Xanthoria candelaria* : An in vitro Study. 2013. *Medicinal & Aromatic Plants*, 5: 1-6.

Ari, F., Ulukaya E., Oran, S., Celikler, S., Ozturk, S., Ozel, M.Z. 2015. Promising anticancer activity of a lichen, *Parmelia sulcata* Taylor, against breast cancer cell lines and genotoxic effect on human lymphocytes. *Cytotechnology* 67: 531–543.

Bačkorová, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Jendželovský, R.; Fedoročko, P. 2011. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicology in Vitro* 25: 37-44.

Basile, A.; Rigano, D.; Loppi, S.; Santi, A.; Nebbioso, A.; Sorbo, S.; Conte, B.; Paoli, L.; Ruberto, F.; Molinari, A.M.; Altucci, L.; Bontempo, P. Antiproliferative, Antibacterial and Antifungal Activity of the Lichen *Xanthoria parietina* and Its Secondary Metabolite Parietin. 2015. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 7861-7875.

Bogo, D., Matosa, M.F.C., Honda, N.K., Pontes, E.C., Oguma, P.M., Santos, E.C.S., Carvalho, J.E.C., Nomizo, A. In vitro Antitumour Activity of Orsellinates. 2010. *Zeitschrift für Naturforschung*, 65 : 43-48.

Brandão, L.F.G., Alcantara, G.B., Matos, M.F.C., Bogó, 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*, 61: 176-183.

Culberson, C.F. Improved conditions and new data for the identification of the lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. 1972. 72: 113-125.

D. Atmani, M. B. Ruiz-Larrea, J. I. Ruiz-Sanz, L. J. Lizcano, F. Bakkali, D. Atmani. 2011. Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 : 598.

Einarsdóttir, E.G.; Groeneweg, J. M.; Björnsdóttir, G.M.; Harðardóttir, G.M.; Omarsdóttir, S. M.; Ingólfssdóttir, K.M.; Ögmundsdóttir, H.M. Cellular Mechanisms of the Anticancer Effects of the Lichen Compound Usnic Acid. 2010. *Planta medica* 76: 969-974.

Falcão, E.P.S., H.N.; Silva, N.H., Gusmão, Ribeiro, S.M., Honda, N.K., Pereira, E.C. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. 2002. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 21 43:49.

Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., Divakar, P.K., Crespo, A., Gómez-Serranillos, M.P. Evaluation of the Antioxidant Capacities and Cytotoxic Effects of Ten Parmeliaceae Lichen Species. 2016. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016 1:11.

Gulluce, M., Aslan, A., Sokem, M., Sahin, F., Adguzel, A., Agar, G., Sokmen, A. 2006. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Plastimatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* e *Umbilicaria ylanderiana*. *Phytomedicine* 13 : 515-521.

Imshaug, H. A. Typification of *Ramalina usnea* (L.) R. H. Howe. *Lichenologist*. 1972. 5: 317-318.

Li, H., Wong, C., Cheng, K., Chen, F. 2008. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT – Food Science and Technology* 41: 385-390.

Luo, H., Wei, X., Yamamoto, Y., Liu, Y., Wang, I., Jung, J.S., Koh, J.Y., Hur, J.S., Antioxidant activities of edible lichen *Ramalina conduplicans* and its free radical-scavenging constituents. 2010. *Mycoscience*, 51 :391–395.

Kashiwadani, H.; Kalb, K. The Genus *Ramalina* in Brazil. 1993. *Lichenologist* 25: 1-31.

Kaushik R, Narayanan P, Vasudevan V, Muthukumaran G, Antony U. 2010. Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 47:27-33.

Kosanica, M., Ranković, B., Vukojević, J. Antioxidant properties of some lichen species. 2011. *Journal of Food Science and Technology* 45:584-590.

Kosanica, M.; Manojlović, N. T.; Janković, S.; Stanojković, T.P.; Ranković, R.B. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuracea* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. 2013. *Food and Chemical Toxicology* 53: 112-118.

Kosanić, M. ; Šeklić, D., Marković, S., Ranković, B. Evaluation of antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of selected lichens from Serbia. 2014. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 9 : 273 – 287.

Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Stosić, I., Grujčić, D., Milosević-Djordjević, O. *Lasallia pustulata* lichen as possible natural antigenotoxic, antioxidant, antimicrobial and anticancer agent. 2015. Cytotechnology 68: 999–1008.

Kumar, J. Dhar, P., Tayade, A.B., Gupta, D., Chaurasia, O.P., Upreti, D.K., Arora, R., Srivastava, R.B. Antioxidant Capacities, Phenolic Profile and Cytotoxic Effects of Saxicolous Lichens from Trans-Himalayan Cold Desert of Ladakh. 2014. Plos One. 9: 1-20.

Legaz, M.E.E. & Vicente, C. 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. Plant Physiology 71: 300-302.

Manojlović, N. T.; Vasiljević, P.J.; Masković, P. Z.; Jusković, M.; Bogdanović-dusanović, G. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). 2012. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-8.

Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M., Vasiljević, P., Stanojković, T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some of their major metabolites. 2012. Phytomedicine v19: 1166 -1172.

Martins, M. C. B; Rocha, T.A; Silva, T.D.S, Cavalcanti Neto, M. P.; Santos, N.P.S.; Silva, T.G.; Aguiar Júnior, F. C. A.; Falcao, E.P.S.; Pereira, E.C. 2016. In Vitro and in Vivo Antineoplastic Activity of Barbatic Acid. International Archives of Medicine 9 :1-9.

Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tosić, S., Stanković, M., Radojević, I., Stefanović, O., Comić, L., Đaćić, D., Curčić, M., Marković, S. 2011. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. International Journal of Molecular Sciences, 12:5428–5448.

Moreira, A.S.N., Fernandes, R.O.S., Lemos, F.J.A., Braz-Filho, R., Viera, I.J.C. Larvicidal activity *Ramalina usnea* lichen against *Aedes aegypti*. 2016. Brazilian Journal of Pharmacognosy 26: 1-3.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65 : 55-63.

Nash III, T. H. 2008. Lichen Biology. 2 ed. Cambridge, USA, Cambridge University Press led.

Naveena, B.M.; Sen, A.R.; Kingsly, R.P.; Singh, D.B.; Kondaiah ,N. Antioxidant activity of pomegranate rind powder extract in cooked chicken patties. 2008. International journal of food science & technology 43:1807-1812.

Oettl, S.K, Gerstmeier, J. , Khan, S.Y. , Wiechmann, K. , Bauer, J. , Atanasov, A.G., Malainer, C., Ezzat, M.A., 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.

Oran, S., Sahin, S., Sahinturk, P. , Ozturk, S. Demirb, C. Antioxidant and Antimicrobial Potential, and HPLC Analysis of Stictic and Usnic Acids of Three *Usnea* Species from Uludag Mountain (Bursa, Turkey). 2016. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 15 : 527-535.

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.

Ranković, B., Kosanić, M., Stanojković, T., Vasiljević, P., Manojlović, N. 2012. Biological Activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. *Molecular Sciences* 13 : 14707-14722.

Ranković, B., Kosanić, M., Manojlović, N., Rancic, A., Stanojkovic, T. Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites. 2014. *Medicinal Chemistry Research* v 23: :408–416.

Rundel, P. W. Evolutionary relationships in the *Ramalina usnea* complex. 1978. *Lichenologist* 10 :141-156.

Russo A., Piovano M., Lombardo L., Garbarino J., and Cardile V. 2008. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sciences*. 83 : 468 – 474.

R. W. Owen, A. Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, "The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. 2000. *European Journal of Cancer*. 36: 1235–1247.

Sahin ,S., Oran, S., Sahinturk, P., Demir, C., Ozturk, S. 2015. *Ramalina* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Food Biochemistry* 39 : 471-477.

Shahidi F, Wanasundara PKJPD: Phenolic antioxidants. 1992 *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32:67-103.

Sisodia, R; Geol, M; Verma, S; Rani, A; Dureja, P. Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. 2013. *Natural Product Research* 27 : 2235-2239.

Tomović ,J, Rančić, A, Vasiljević, P, Mašković P, Živanović S, Manojlović N, Sovrlić M. Antioxidant activity of lichen *Cetraria aculeata*. 2015. *Praxis Medica* 44: 107-113.

Triggiani, D; Ceccarelli, D; Tiezzi, A; Pisani, T; Munzi, S; Gaggi, C; Loppi, S. Antiproliferative activity of lichen extracts on murine myeloma cells. 2009 *Biologia* 64 :59–62.

V.Rajkumar, G.Guha, R.AshokKumar. Antioxidant and anti-neoplastic activities of *Picrorhiza kurroa* extracts. 2011. *Food and Chemical Toxicology*. 49:363–369.

Vu, T.H; Lamer, A.L.; Lalli, C.; Boustie, J.; Samson, M.; Françoise Iohézic-le Dévéhat, F.L.; Seyec, J. Depsides: Lichen Metabolites Active against Hepatitis C Virus. 2015. *Plos One* 20 :1-14.

White, P.A.S., Oliveira, R.C. M , Oliveira , A. P., Serafini, M.R., Araújo. A.A.S, P. Gelain, D.P., Moreira, J. C. F., Almeida , J. R. G. S. , Quintans, J.S. S. , Quintans-Junior, L. J., Santos, M. R. V. Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens: A Systematic Review. 2014. *Molecules* 19: 14496-14527.

5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

As análises cromatográficas dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico do líquen *Ramalina usnea*, corroboraram com as referências descritas na literatura, sendo evidenciada a presença dos ácidos úsnico e divaricático.

Em relação à análise de fenóis totais, observamos que o extrato etéreo apresentou a maior concentração de fenóis, o que possibilitou um melhor resultado nos testes DPPH e FRAP, possuindo este uma maior atividade antioxidante.

A avaliação da citotoxicidade dos extratos mostrou que estes apresentaram baixa toxicidade para eritrócitos humanos. Em relação ao teste MTT frente a células tumorais, os extratos clorofórmico e acetônico apresentaram um percentual inibitório superior a 70% para as linhagens células HT-29, MCF-7, NCI-H292, HL-60, podendo este resultado estar associado à presença dos ácidos úsnico e divaricático, como também a ação sinérgica dos compostos químicos presentes nos extratos.

REFERÊNCIAS

- AHMADJIAN, V. **The Lichen symbiosis**. 2. ed. New York: John Wiley and Sons, 1993.
- ALAVARENGA, E. C. et.al. Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.66, p.43-48, 2014.
- ALMBORN, O. The species concept in lichen taxonomy. **Botaniska Notiser**, Lund-SWE, v 4, p. 454-457, 1965.
- ALMEIDA, V.L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo- celular específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com DNA: uma introdução. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129. 2005.
- ARI, F. et.al. Promising anticancer activity of a lichen, *Parmelia sulcata* Taylor, against breast cancer cell lines and genotoxic effect on human lymphocytes. **Cytotechnology**, Hingham, v.67, p.531-543, 2015.
- BAČKOROVÁ, M. et al. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 26, p.462-468, 2012.
- _____. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 25, 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**, British Columbia, v. 16 p. 7861-7875, 2015.
- BRANDÃO, L. F. G. et.al. Cytotoxic Evaluation of Phenolic Compounds from Lichens against Melanoma Cells. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 61, n. 2, p.176-183, 2013.
- BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. (Ed.). **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.171.
- _____. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: GERALDO BRASILEIRO FILHO, G. (Ed.). **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 232
- BYEON, H.E. et al. Stereocalpin A inhibits the expression of adhesion molecules in activated bvascular smooth muscle cells. **Int. Immunopharmacol**, Amsterdam, v.12, p.315–325, 2012.
- CAIN, B. F.; BURTON, J. F. Antileukaemic Activity of Polyporic Acid. **Nature**, London, v. 184, p. 1326-1327, 1959.
- CANSARAN, D. et al. HPLC Analysis of Usnic Acid in Some *Ramalina* Species from Anatolia and Investigation of their Antimicrobial Activities. **Pharmaceutical Biology**, London, v.45, p.77-81, 2007.

- COSKUN, Z. M. et al. Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Methanolic Extracts from Different Cladonia Species on Human Breast Cancer Cells. **Folia Biologica (Praha)**, Praga, v. 61, p. 97-103, 2015.
- COSTA-LOTUFO, L. 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 de Química**, Niterói, v.2, n.1, p.47-58, 2010.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1830, n.6, p. 3670-95, 2013.
- EINARSDÓTTIR, E. et al. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. **Planta Medica**, Stuttgart, v.76, p.969–974, 2010.
- EMSEN, B. et al. In vitro antitumor activities of the lichen compounds olivetoric, physodic and psoromic acid in rat neuron and glioblastoma cells. **Pharmaceutical Biology**, London, p.1-15, 2015.
- ESIMONE, C. O.; ADIKWU, M. U. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 70, p. 428-431, 1999.
- FALCÃO, E. P. S. et al. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v.18, p. 911-918, 2004.
- FAZIO, A. T. et al. Lichen secondary metabolites from the cultured lichen mycobionts of *Teloschistes chrysophthalmus* and *Ramalina celastri* and their antiviral activities. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, Berlim, v. 62, p.543–549, 2007.
- FERNÁNDEZ-MORIANO, C. et al. Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two Parmeliaceae lichens: Identification of active compounds. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.22, p.847-855, 2015
- FRANCO, C. **Coenogonium lepreurii (Mont.) Nill**. In: _____. Cogumelos em Sergipe. [Aracajú]: O autor, 2012. Disponível em: <<http://cogumelos-se.blogspot.com.br/2012/02/o-reino-dos-fungos-ii.html>>. Acesso em: 26 set. 2016.
- FRANCO, M. et al. **Patologia Processos Gerais**. 5 ed. São Paulo: Atheneu.2010.
- GARCÍA, C.C. et al. Evaluation of the antiviral activity against Junin vírus of macrocyclic trichothecenes produced by the hypocrealean epibiont of *Baccharis coriifolia*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 68, p.209–212, 2002.
- GOMES, A. T. et al. Cytotoxic activity of orsellinates. **Zeitschrift Naturforsch**, Berlim, v. 61 p. 653-657, 2006.
- GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer. **Drugs Clinical Translational Oncology**, Salamanca, v. 9, p. 767-776, 2007
- GOSS, P. E. et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. **Lancet Oncology**, London, v. 14, p. 391–436,

GRUJICIC, D. et al. Evaluation of in vitro antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica*. **Cytotechnology**, Hingham, v.66, p.803-813, 2014.

GULÇIN, I. et al. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick - IRL, v. 79, p. 325–329, 2002.

HALE JÚNIOR, M. E. **The biology of lichens**. 3. ed. London: Edward Arnold Pub., 1983. 90p

HONDA, N. K. et al. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 17, n. 5, p. 328-332, 2010.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, p. 110-125, 1998.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. Identification of lichen substances. 1996. 492p.

IMSHAUG, H. A. Typification of *Ramalina usnea* (L.) R. H. Howe. **Lichenologist**, London, v. 5, p. 317-318, 1972.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acesso em: 20 out. 2016.

JIN, J. Q.; LI, C. Q.; HE, L. C. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor-kappaB-dependent tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. **Phytotherapy Research**, London, v. 22, p.1605-1609, 2008.

KARAGOZ, I. D. et al. Hepatoprotective effect of diffractaic acid on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Abingdon - UK, v. 29, p. 1011-1016, 2015.

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

KOPARAL, T. A. et al. Angiogenesis Inhibition by A Lichen Compound Olivetoric Acid. **Phytotherapy Research**, London, v.24, p.754-758, 2010.

KOSANIC, M. M. et al. *Lasallia pustulata* lichen as possible natural antigenotoxic, antioxidant, antimicrobial and anticancer agente. **Cytotechnology**, Hingham, v. 68, p. 999-1008, 2016.

KOSANIC, M. M.; RANKOVIC, R. B. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Some Lichens and Their Constituents. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont - USA, v. 14, p. 1624–1630, 2011.

KOSANIC, M. M.; RANKOVIC, R. B.; STANOJKOVIC, T. P. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.92, pp. 1909-1906, 2011.

- KOSANIC, M. M.; RANKOVIC, R. B; VUKOJEVIĆ, J. Antioxidant properties of some lichen species. **Journal of Food Science and Technology**, Birmingham, v. 48, p. 584–590, 2011.
- KOSANIC, M. M. et al. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuracea* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 53, p.112-118, 2013.
- KUMAR, V. et al. **Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro : Elsevier; 2013.
- KUMAR, V. et al. **Patologia**: bases Patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 5. ed. New York: Worth Publishing, 2011.
- LUO, H. et al. Antioxidant activities of edible lichen *Ramalina conduplicans* and its free radical-scavenging constituents. **Mycoscience**, Tokyo, v. 51, p.391–395, 2010.
- LUZ, J. B. S. et al. Ultrastructural Analysis of *Leishmania infantum chagasi* Promastigotes Forms Treated In Vitro with Usnic Acid. **Scientific Word Journal**, London, v. 2015, n. 6, 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**, New York, p. 1-8, 2012.
- MANOJLOVIC, N. T. et al .HPLC analysis and cytotoxic potential of extracts from the lichen, *Thamnia vermicularis* var. subuliformis. **Journal of Medicinal Plant Research**, Lagos-NGR, v. 4, p. 817-823, 2010.
- MARCELLI, M. P. Fungos Liquezados. In: XAVIER- FILHO, L. et al. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006.
- MARTINS, M. C. B. **Aplicações biotecnológicas de compostos obtidos dos líquens**. 2013. 300p. Tese (Doutorado) - Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, 2013.
- MARTINS, M. C. B. et al. Usnic Acid Potassium Salt: An Alternative for the Control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Plos one**, São Francisco, v.9, p.1-6, 2014
- MARTINS, M. C. B., et al. In Vitro and in Vivo Antineoplastic Activity of Barbatic Acid. **International archives of Medicine**, London, v. 9, p. 1-9, 2016.
- MOREIRA, A. S. N., et al. Larvicidal activity *Ramalina usnea* lichen against *Aedes aegypti*. **Brasilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 26, p 8952-8987, 2015.
- NASH III, T. H. **Lichen Biology**. 2 ed. Cambridge, USA: Cambridge University, 2008. 486p.
- NASH III, T.H. Introduction. In: _____. (ed) **Lichen Biology**. Cambridge: Cambridge University, 1996. p. 1-7.

NEWMAN, J. D.; CRAGG, M. G.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, India, v. 66, p.1022-1037, 2003.

NEWMAN, J. D.; CRAGG, M.G. Natural Products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

NGUYEN, T. T. et al. Lichen Secondary Metabolites in *Flavocetraria cucullata* Exhibit Anti-Cancer Effects on Human Cancer Cells through the Induction of Apoptosis and Suppression of Tumorigenic Potentials. **Plos One**, São Francisco, v. 9, p. 1-14, 2014.

NOBILI, S. et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, Amsterdam, v. 59, p. 365-378, 2009.

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

OETTL, S. K. et al. Imbricarinic Acid and Perlatolic Acid: Multi-Targeting AntiInflammatory Depsides from *Cetrelia monachorum*. **Plos one**, São Francisco, v.8, p.1-10, 2013.

OH, S. O. et al. Antifungal activity of lichen- forming fungi isolated from Korean and Chinese lichen species against plant pathogenic fungi. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad-PAK, v. 22, p. 381-385, 2006.

ORAN, S. et al. Antioxidant and Antimicrobial Potential, and HPLC Analysis of Stictic and Usnic Acids of Three *Usnea* Species from Uludag Mountain (Bursa, Turkey). **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Tehran, v. 15, p. 527-535, 2016.

PARROUT, S. et al. Comparative metabolite profiling and chemical study of *Ramalina siliquosa* complex using LC-ESI-MS/MS approach. **Phytochemistry**, London, v.89, p.114-124, 2013.

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

_____. Ramalin, a novel nontoxic antioxidant compound from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 18, p. 1285-1290, 2011.

PAZ, G. A. de et al. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. **J. Pharmaceut. Biomedical Analysis**, Oxford, p. 165-171, 2010.

PRAKASH, O. M.; KUMAR, A.; KUMAR, P. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. **American Journal of Pharmacological Sciences**, Newark-USA, v.1, n.6, p.104-115, 2013.

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.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, Tarrytown-USA, v.49, p. 1603–1616, 2010.

RISTIĆ, S. et al. Biopharmaceutical Potential of Two Ramalina Lichens and their Metabolites. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, Netherlands, v. 17, n. 7, p. 651-658, 2016b.

_____. Phytochemical study and antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of *Melanelia subaurifera* and *Melanelia fuliginosa* lichens. **Journal of Food Science and Technology**, Birmingham, v. 53, p. 2804–2816, 2016a.

RUNDEL, P. W. Evolutionary relationships in the *Ramalina usnea* complex. **Lichenologist**, London, v. 10, p.141-156, 1978

SAHIN, S. et al. *Ramalina* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant and antimicrobial agents. **Journal of Food Biochemistry**, Hoboken-USA, v.39, pp.471-477, 2015.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. A New Antifungal and Antiprotozoal Depside from the Andean Lichen *Protousnea poeppigii*. **Phytotherapy Research**, London, v.22, pp. 349-355, 2008.

SEYMOUR, F. A; CRITTENDEN, P. D; DYER, P. S. Sex in the extremes: lichen-forming fungi. **Mycologist**, Cambridge, v. 19, p. 51-58. 2005.

SHRESTHA, G. et al. Anticancer Activities of Selected Species of North American Lichen Extracts. **Phytotherapy Research**, London, v.29, pp. 100-107, 2015.

SHRESTHA, G.; CLAIR, L. L. S. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drug. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, Netherlands, v.12, p. 229–244, 2013.

SHUKLA, V.; JOSHI, G. P.; RAWAT, M. S. M. Lichens: as potential natural source of bioactive compounds: a review. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, Netherlands v. 9, p. 303:314. 2010.

SILVA, C. V.; RODRIGUES, M. C. Natural products: an extraordinary source of value-added compounds from diverse biomasses in Brazil. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, Portici-ITA, v.14, pp. 01-06, 2014.

SOUZA, M. V. N., et al. Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, p.25-42, 2007.

STEICHEN, D. S.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, London, v.48, pp. 416-427, 2013.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. **Natural Product Reports**, London, v.25, p. 188–200, 2008.

STRATTON, S. P.; DORR, R. T.; ALBERTS, D. S. The state-of-the-art in chemoprevention of skin cancer. **European Journal of Cancer**, Oxford, v.36, p. 1292–1297, 2000.

TROPICAL lichens. In: APTROOT, A.; SPARRIUS, L. (Orgs.). **Pictures of Tropical Lichens**. [s.l.]: EOL, [201-]. Disponível em: <<http://www.tropicallichens.net/>>. Acesso em: 27 set. 2016

VERWEIJ, J.; JONGE, M. J. A. Achievements and future of Chemoterapy. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 36 p. 1479-1487. 2009.

VU, T. H. et al. Depsides: Lichen Metabolites Active against Hepatitis C Virus. **Plos One**, São Francisco, v. 20, p.1-14, 2015.

WORLD CANCER REPORT. **All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer)**: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Lyon-FRA: IARC, 2014. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 24 out. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**: Key facts. [Genebra]: WHO, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 24 out. 2016.

ZAMBARE, P. V.; CHRISTOPHER, P. L. Biopharmaceutical potential of lichens. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 50, n. 6, p. 778–798, 2012.

ANEXO A – NORMAS DA REVISTA



Instructions to authors

Scope of the journal

Acta Botanica Brasilica (Acta bot. bras.) is the official journal of the Sociedade Botânica do Brasil (Botanical Society of Brazil, SBB) and was founded in 1987. Since 1998, the journal publishes four issues per year. Experimental, theoretical and applied papers on all aspects of plant (including algae) and fungi biology are welcome. The submitted manuscript or its essential content must not have been published previously or be under consideration for publication elsewhere. Contributions should be substantial, written in English and show general interest. Manuscripts that report aspects of local interest are discouraged unless the implications of the findings are wide-reaching. Manuscripts with agronomic subjects are expected to contain a substantial amount of basic plant biology. There is no fee for submission and review articles.

Why publish in Acta Botanica Brasilica?

Acta bot. bras. is an indexed, open-access, peer-reviewed journal devoted to publishing high quality research in Plant Biology. There is no cost for publication. All manuscripts published by Acta bot. bras. are open-access, maximizing the impact of your research. The submissions are peer-reviewed by at least two experts who evaluate scientific quality and novelty. Our review process is very efficient. It will only take about two months for the first decision on your manuscript. The manuscripts are advertised to all members of the SBB, available in the journal website, in the SciELO database and in social media. Acta bot. bras. is indexed in Scopus and Web of

Science among others. Increasing impact factor: Acta bot. bras. IF has been increasing in the last evaluations (from 0.374 in 2012 to 0.545 in 2014).

Language editing

If English is not your first language, it is strongly recommended to have your manuscript edited for language before submission. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. Authors are liable for all costs associated with such services.

Types of articles

Standard research papers (ORIGINAL ARTICLES) should not normally exceed twelve printed pages, except for REVIEWS (which may not exceed 25 printed pages). Reviews are solicited by the editors, but authors are also encouraged to submit potential topics for consideration. Opinion papers (VIEWPOINTS), METHODS and SHORT COMMUNICATIONS are also welcome and should not exceed five printed pages. To estimate the number of printed pages, consider that each page of text contains about 500-700 words.

Summary of submission processes

Submission management and evaluation of submitted manuscripts will involve the Journal's online manuscript submission system. The manuscript text should be prepared in English (see PREPARING THE ARTICLE FILE below for details) and submitted online (<http://mc04.manuscriptcentral.com/abb-scielo>). Figures, tables and other types of content should be organized into separate files for submission (see Preparing Tables Figures and Supplementary material below for details). If you are using the online submission system for the first time please go to the login page and generate a login name and password after clicking on the "New user - register here" link. If you are already registered but need to be reminded of your login name or password please go to the login page and inform your email in "password help". Please never create a new account if you are already registered. If you are unable to

access our web-based submission system, please contact the Editorial Office (acta@botanica.org.br)

Cover letter

All manuscripts must be submitted with a cover letter, which should include an approximately 80 word summary of the scientific strengths of the paper that the authors believe qualify it for consideration by Acta Botanica Brasilica. The cover letter should also include a statement declaring that the manuscript reports unpublished work that it is not under active consideration for publication elsewhere, nor been accepted for publication, nor been published in full or in part (except in abstract form).

Preparing the article file

(Please consult a last issue of Acta Botanica Brasilica for layout and style)

All manuscripts must follow these guidelines: the text should be in Times New Roman font, size 12, double-spaced throughout and with 25 mm margins; the paper size should be set to A4 (210 x 297 mm). All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. For text files .doc, .docx and .rtf are the only acceptable formats. Files in Adobe® PDF format (.pdf files) will not be accepted. When appropriate, the article file should include a list of figure legends and table heads at the end. This article file should not include any illustrations or tables, all of which should be submitted in separate files. The first page should state the type of article (Original Article, Review, Viewpoint, Method or Short communication) and provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (1, 2, 3 etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. Only one corresponding author should be indicated with an asterisk and should always be the submitting author. The institutional address (es) of each author should be listed next, each address being preceded by the superscript number where appropriate. The address must be synthetic, Just enough to send a letter. Titles and positions should not be mentioned. This information is followed by the e-mail address

of the corresponding author. The second Page should contain a structured Abstract not exceeding 200 words in a single paragraph without references. The Abstract should outline the essential content of the manuscript, especially the results and discussion, highlighting the relevance of main findings. The Abstract should be followed by between five and ten Key words. Note that essential words in the title should be repeated in the key words.

Original articles should be divided into sections presented in the following order:

Title page

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Acknowledgements

References

Tables and Figure legends

Supplementary Data (if applicable)

Material and Methods and Results should be clear and concise. The Discussion section should avoid extensive repetition of the results and must finish with some conclusions. This section can be combined with results (Results and Discussion), however, we recommend authors consult the Editorial Board for a previous evaluation.

Plant names must be written out in full in the abstract and again in the main text for every organism at first mention but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus (e.g. *Hymenaea stigonocarpa* e *H. stilbocarpa*). The authority (e.g., L., Mill., Benth.) is required only in Material and Methods section. Use The International Plant Names Index (www.ipni.org) for correct plants names. Cultivars or varieties should be added to the scientific name (e.g. *Solanum lycopersicum* 'Jumbo'). Authors must include in Material and Methods a reference to voucher specimen(s) and voucher number(s) of the plants or other material examined.

Abbreviations must be avoided except for usual cases (see recent issues) and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Non-conventional abbreviations should be spelled out at first mention.

Units of Measurement. *Acta bot. bras.* adopts the *Système International d'Unités* (SI). For volume, use the cubic metre (e.g. $1 \times 10^{-5} \text{ m}^3$) or the litre (e.g. 5 μL , 5 mL, 5 L). For concentrations, use μM , $\mu\text{mol L}^{-1}$ or mg L^{-1} . For size and distance use meters (cm, mm, μm , etc) and be consistent in the manuscript.

Numbers up to nine should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals unless they are starting sentences.

Citations in the text should take the form of Silva (2012) or Ribeiro & Furr (1975) or (Mayer & Wu 1987a; b; Gonzalez 2014; Sirano 2014) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by *et al.* (e.g. Simmons *et al.* 2014). If two different authors have the same last name, and the article have the same year of publication, give their initials (e.g. JS Santos 2003). Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and last name of the person concerned (e.g., RA Santos unpubl. res.).

References should be arranged alphabetically based on the surname of the author(s). Where the same author(s) has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Letters 'a', 'b', 'c', etc., should be added to the date of papers with the same citation in the text. Please provide DOI of 'in press' papers whenever possible.

For papers with six authors or fewer, please give the names of all the authors. For papers with seven authors or more, please give the names of the first three authors only, followed by *et al.*

Please follow the styles:

Books

Smith GM. 1938. *Cryptogamic botany*. Vol. II Bryophytes and Pteridophytes. 2nd. edn. New York, McGraw-Hill Book Company.

Chapters in books

Schupp EW, Feener DH. 1991. Phylogeny, lifeform, and habitat dependence of ant-defended plants in a Panamanian forest. In: Huxley CR, Cutler DC. (eds.) Ant-plant interactions. Oxford, Oxford University Press. p. 175-197.

Research papers

Alves MF, Duarte MO, Oliveira PEAM, Sampaio DS. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 714-722.

Papers in press (ahead of print)

Alves JJ, Sampaio MTY. 2015. Structure and evolution of flowers. *Acta Botanica Brasilica* (in press). doi: 10.1590/0102-33062015abb3339.

Online-only journals

Wolkovich EM, Cleland EE. 2014. Phenological niches and the future of invaded ecosystems with climate change. *AoB Plants* 6: plu013 doi:10.1093/aobpla/plu013

Thesis (citation should be avoided)

Souza D. 2014. Plant growth regulators. PhD Thesis, University of Brazil, Brazil.

Websites and other sources (citation should be avoided)

Anonymous. 2011. Title of booklet, leaflet, report, etc. City, Publisher or other source, Country.

References to websites should be structured as: author(s) name author(s) initial(s). year. Full title of article. Full URL. 21 Oct. 2014 (Date of last successful access).

Acknowledgements should be preferably in fewer than 80 words. Be concise: “we thank...” is preferable to “The present authors would like to express their thanks to...”. Funding information should be included in this section.

The following example should be followed:

We acknowledge the Center of Microscopy (UFMG) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy. We also thank J.S. Santos for assistance with the statistical analyses. This work was supported through a research grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (ID number).

For SHORT COMMUNICATIONS note that the editorial guidelines applying to original papers must also applying here. In general, the difference between original papers and short communications is the lack of subsections in the text and limited space for illustrations in the latter. Figures and tables can be present, assuming that the overall size of the manuscript does not exceed the five printed page limit (supplementary material can be added). The abstract (as described for original articles) must be followed by a “running text” (a single section, without subheadings), followed by the acknowledgments and references.

Preparing Figures, Tables and Supplementary material

All figures (photographs, maps, drawings, graphs, diagrams, etc.) and tables must be cited in the text, in ascending order. Citations of figures in the text should appear in an abbreviated, capitalized form (e.g., Fig. 1, Fig. 2A-D, Fig. 3A, Figs. 3A, 4C, Tab.1).

The maximum dimensions of individual figures should be 170 × 240 mm. The width of an individual component can be 170 mm or 85 mm, without exception, whereas the height can be ≤ 240 mm. For continuous tone images (e.g., photographs), please supply TIFF files at 300 dpi. More complex drawings, such as

detailed botanical illustrations will not be redrawn and should be supplied as 600 dpi TIFF files.

Grouping of related graphics or images into a single figure (a plate) is strongly encouraged. When a block of illustrative material consists of several parts, each part should be labelled with sequential capital letters, in the order of their citation in the text (A, B, C, etc.). The letters that identify individual images should be inserted within white circles in the lower right-hand corner. For separate the grouped images, authors should insert white bars (1mm thickness).

Individual images (not grouped as a plate) should be identified with sequential Arabic numerals, in the order of their citation in the text (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, etc.), presented in the same manner as the letters identifying individual images (described above).

The number that identifies a grouped figure (e.g., Fig. 2) should not be inserted into the plate but should rather be referenced only in the figure caption and the text (e.g., Fig. 2A-C).

Scale bars, when required, should be positioned in the lower right-hand corner of the figure. The scale bar units should be given either at the end of the figure caption or, when a figure contains multiple scale bars with different units, above each bar. Details within a figure can be indicated with arrows, letters or symbols, as appropriate.

Tables should be preceded by titles, indicated with sequential Arabic numerals (Table 1, 2, 3, etc.; do not abbreviate). Tables should be created using the Table function of Microsoft Word™. Columns and rows should be visible, although no dark lines should be used to separate them. Horizontal rules should be used only at the top (below the title) and bottom (below the final row) of the table. Do not use fills, shading or colors in the tables.

When appropriate, excess (but important) data can be submitted as Supplementary Files, which will be published online and will be made available as links. This might include additional figures, tables, or other materials that are necessary to fully document the research contained in the paper or to facilitate the readers' ability to understand the work.

Supplementary Materials are generally not peer refereed. When a paper is published, the Supplementary Materials are linked from the main article webpage. They can be cited using the same DOI as the paper.

Supplementary Materials should be presented in appropriate .doc or .pdf file format. These archives should contain inside all supplementary tables and files and any additional text. The full title of the paper and author names should be included in the header. All supplementary figures and tables should be referred in the manuscript body as “Table S1” and/or “Figure S1”.

Acta bot. bras. intends to maintain archives of Supplementary Materials but does not guarantee their permanent availability. Acta bot. bras. reserves the right to remove Supplementary Materials from a published article in the future.

The Review Process

All authors will receive an email acknowledging the submission of the manuscript, with its correspondent reference number. The Editor-in-Chief will evaluate manuscript adherence to instructions, quality and novelty and will decide on the suitability for peer reviewing. Manuscripts failing to adhere to the format will be returned to the authors. Manuscripts are sent to at least two anonymous referees that are given 21 days to return their reports.

Submitting a revised paper

After peer review, go to “click here to submit a revision” and upload the new manuscript version. Remember to delete the documents in duplicate.

Publication and printing process

After acceptance, a PDF proof will be sent to corresponding authors as an e-mail attachment. Corrected proofs should be returned within 72 h. It is the sole responsibility of the corresponding author to check for errors in the proof.

Each article is identified by a unique DOI (Digital Object Identifier), a code used in bibliographic referencing and searching. The dates of submission and acceptance will be printed on each paper. The corresponding author will receive a free PDF or URL that gives access to the article online and to a downloadable PDF. The

corresponding author is responsible for distributing this PDF or URL to any co-authors.

Misconduct

Misconduct on submitted manuscripts will lead to immediate rejection. Duplicate publication, plagiarism, figure manipulation, dual-submission, and any other fraudulent method will not be tolerated. If misconduct is detected after the manuscript publication, the article will be retracted and a retraction note will be published. Submitted manuscripts can be scanned to detect plagiarism and verify the papers' originality.