



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSÉ ALEXANDRE DA COSTA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA,
ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE
DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO
LÍQUEN *Cladonia clathrata***

ARACAJU

2009

JOSÉ ALEXANDRE DA COSTA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTINOCICEPTIVA, ANTI-INFLAMATÓRIA
E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DO LÍQUEN
*Cladonia clathrata***

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sara Maria Thomazzi

ARACAJU

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S586a Silva, José Alexandre da Costa
Avaliação farmacológica das atividades antinoceptiva, anti-inflamatória e antioxidante do extrato hidroalcoólico do líquen *Cladonia clathrata* / José Alexandre da Costa Silva. – Aracaju, 2009. 78 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

Orientador(a): Profa. Dra. Sara Maria Thomazzi.

1. *Cladonia clathrata* (Cladoniaceae) 2. Extrato hidroalcoólico do líquen 3. Atividade antinociceptiva 4. Atividade anti-inflamatória 5. Farmacologia I. Título

CDU 582.29:615.1

*Dedico este trabalho a Deus, o meu
consolador!*

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, que esteve em todos os momentos da minha vida. Que abriu todas as portas, me iluminou, que permitiu que fizesse o mestrado guiando-me com Sua mão bondosa desde a minha aprendizagem laboratorial, passando pela aprovação no mestrado, no decorrer do ano letivo até a conclusão desta pós-graduação. Obrigado, muito obrigado, meu Senhor e meu Deus por ter me confortado seja lendo na Sua Palavra (Jesus) seja através dos homens e mulheres usados pelo Senhor para me orientar e consolar nos momentos de angústia e dor, mostrando a luz no fim do túnel até este momento vitorioso.

A *minha família (mamãe, irmãs, cunhado, esposa, sogra e filha)*, seja pela orientação e cuidados ao longo da minha vida, seja pela contribuição para minha formação moral intelectual e profissional, seja pelas palavras de carinho, confiança e estímulo, não deixaram desperdiçar esta grande oportunidade na vida.

À professora *Sara Maria* por ter conseguido direcionar os meus estudos e ter me apoiado quando estava prestes a desistir.

Ao professor *Ângelo* por ter acreditado em mim e ter me dado a chance de conquistar um título relevante para formação profissional e pela maneira cortês com que sempre me recebeu ao longo de nossas reuniões.

Aos professores *Lucindo, Josemar, Rogéria, Charles e Leonardo* pela atenção que tiveram para comigo quando os procurei.

Aos colegas de caminhada no mestrado (*Cleonice, Amintas, Eugênia, Flávia, Marcelia, Fabíola e Rangel*), sem vocês não teria conseguido este momento importante. Através de vocês aprendi que nunca vencemos sozinhos porque ninguém é auto-suficiente na vida e que nossas cruces se tornam leves através de mãos amigas que as sustentam como Jesus e Simão de Cirene.

A todos, que me ajudaram em algum momento desta jornada e que não foram mencionados, mas que Deus sabe quem são, que Deus os ilumine e os abençoe ricamente.

*O Senhor faz justiça
e julga a TODOS os oprimidos.*

Salmo 103,6

RESUMO

Cladonia clathrata (Cladoniaceae) é uma espécie liquenica e vários extratos de espécies de *Cladonia* são utilizados como remédios na medicina popular. Para avaliar as ações do extrato desse líquen, estudos foram realizados sobre as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante. O extrato hidroalcoólico da *C. clathrata* (EHCc) foi utilizado nos experimentos e produziu atividade inibitória ($p < 0,001$) sobre o efeito do ácido acético no modelo de contorções abdominais nas doses de 100 (47,2%), 200 (47,2%) e 400 mg/Kg (86,4%), além de reduzir o efeito da formalina na primeira (400 mg/Kg, $p < 0,01$) e segunda (200 e 400 mg/Kg, $p < 0,01$) fases da nocicepção. A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela carragenina foi inibida pelo pré-tratamento dos animais com o EHCc na dose de 400 mg/Kg ($p < 0,001$). O EHCc reagiu com o radical DPPH e reduziu o mesmo em 25,76%, com um valor de CI_{50} de $77,39 \pm 5,03 \mu\text{g/mL}$ de DPPH. O EHCc mostrou atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, com potencial antioxidante.

Palavras-chave: antioxidante; atividade anti-inflamatória; *Cladonia clathrata*; efeito antinociceptiva; líquen.

ABSTRACT

Cladonia clathrata (Cladoniaceae) is a lichen specie and several *Cladonia* species extracts have been used in folk medicine. In order to evaluate the actions of this lichen extract, studies were performed on antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant activities. The hydroalcoholic extract of *C. clathrata* (HECc) was used in the following experiments and elicited inhibitory activity ($p < 0.001$) on acetic acid effect at 100 (47.2%), 200 (47.2%), and 400 mg/Kg (86.4%), and reduced the formalin effect on both the first- (400 mg/Kg, $p < 0.01$) and second-phases (200 and 400 mg/Kg, $p < 0.01$). Carrageenan-induced neutrophil migration into the peritoneal cavity was inhibited with the HECc ($p < 0.001$) at the dose of 400 mg/Kg. The HECc react with the DPPH radical and reduce the same by 25.76%, and exhibited IC_{50} value of $77.39 \pm 5.03 \mu\text{g/mL}$ DPPH. The HECc shows antinociceptive and anti-inflammatory activities, with antioxidant potential.

Key-words: anti-inflammatory activity; antinociceptive effect; antioxidant; *Cladonia clathrata*; lichen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Tipos de talos liquênicos	15
Figura 2:	Estrutura molecular plana do (a) ácido úsnico, (b) calicina, (c) ácido vulpínico, (d) epanorina, (e) ácido criptoclorofeico (<i>meta</i> -depsídeo), (f) ácido ecanórico (<i>para</i> -depsídeo), (g) depsidona e (h) ácido leprapínico	19
Figura 3:	<i>Cladonia spp</i>	21
Figura 4:	<i>Cladonia clathrata</i>	23
Figura 5:	Estrutura molecular plana do (a) ácido fumarprotocetrárico e (b) ácido confumarprotocetrárico	23
Figura 6:	Estrutura molecular plana da atranorina (depsídeo)	26
Figura 7:	Efeito do EHCc no comportamento nociceptivo de camundongos no modelo de nocicepção induzido pela formalina	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Efeito da <i>Cladonia clathrata</i> nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos	37
Tabela 2:	Efeito da <i>Cladonia clathrata</i> sobre a peritonite aguda induzida por carragenina em camundongos	39
Tabela 3:	Atividade sequestradora de radical livre DPPH para o EHCc com os valores de CI_{50} (concentração inibitória para 50%) e PI (percentual inibitório)	40

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1:	Parecer do comitê de ética (protocolo 26/07)	62
Anexo 2:	Submissão do manuscrito (<i>Pharmaceutical Biology</i>)	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
a.C.	Antes de Cristo
ACh	Acetilcolina
AINE(s)	Anti-inflamatório(s) não esteroidal
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CE ₅₀	Concentração eficiente para 50%
CI ₅₀	Concentração inibitória para 50%
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
d.C.	Depois de Cristo
Dexa	Dexametasona
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHCc	Extrato hidroalcolólico da <i>Cladonia clathrata</i>
E.P.M.	Erro padrão da média
g	Gramas(s)
GP	Galato de propila
h	Hora(s)
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
5-HT	5-Hidroxitriptamina (serotonina)
HECc	Hydroalcoholic extract of <i>Cladonia clathrata</i>
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Quilograma(s)
L	Litro(s)
5-LO	5-Lipoxigenase
LT	Leucotrieno(s)

m	Metro(s)
mg	Miligrama(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
Morf	Morfina
N ₂	Gás nitrogênio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NK	Células natural killer
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
<i>p</i>	Probabilidade
PAF	Fator de ativação plaquetária
PI	Percentual inibitório
PPADS	Ácido piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfônico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo(s)
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
SO ₂	Dióxido de enxofre
s.pl.	Subplantar
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
TNF	Fator de necrose tumoral
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil)adenosina 5'-trifosfato
v.o.	Via oral
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Inflamação	03
2.2 Radicais livres e substâncias antioxidantes	09
2.3 Líquens	13
2.3.1 Histórico	13
2.3.2 Aspectos Gerais	14
2.3.3 Principais constituintes químicos dos líquens	17
2.3.3.1 Substâncias liquênicas	17
2.3.3.2 Carotenóides	20
2.3.3.3 Carboidratos de baixa massa molar	20
2.3.3.4 Carboidratos de alta massa molar	20
2.3.4 <i>Cladonia spp</i>	21
2.3.4.1 <i>Cladonia clathrata</i>	22
2.3.5 Líquens e atividades biológicas	23
2.4 Descrições dos testes farmacológicos e da atividade antioxidante	26
2.4.1 Contorções abdominais	26
2.4.2 Formalina	26
2.4.3 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal	27
2.4.4 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante (DPPH)	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Reagentes e drogas	30
4.2 Material botânico	30
4.3 Preparação do extrato	30

4.4 Fenóis totais	31
4.5 Animais experimentais	32
4.6 Avaliação da atividade antinociceptiva	33
4.6.1 Teste das contorções abdominais	33
4.6.2 Teste da formalina	33
4.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória	34
4.7.1 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos	34
4.8 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante	34
4.8.1 Método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH*)	34
4.9 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Fenóis totais	37
5.2 Atividade antinociceptiva	37
5.2.1 Teste das contorções abdominais	37
5.2.2 Teste de formalina	38
5.3 Atividade anti-inflamatória	39
5.3.1 Peritonite induzida por carragenina em camundongos	39
5.4 Atividade antioxidante	40
5.4.1 Teste do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)	40
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÕES	47
8 PERSPECTIVAS	48
9 REFERÊNCIAS	49
10 ANEXOS	62
10.1 Parecer do comitê de ética (protocolo 26/07)	62
10.2 Submissão do manuscrito (<i>Pharmaceutical Biology</i>)	63

1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes naturais de novos analgésicos e anti-inflamatórios é crescente, isso se deve, principalmente, a necessidade de se encontrar substâncias com efeitos colaterais menores e custos reduzidos, que pode ser uma fonte alternativa de fármacos para minimizar o sofrimento do homem.

Vírus, bactérias e seus produtos ativam o sistema de complemento que tem como uma das funções a amplificação da resposta inflamatória. Os derivados do complemento C3a e C5a ativam leucócitos, induzindo a geração de oxidantes e citocinas que são lesivas aos tecidos quando em excesso (RUBIN; SCHWARTING; STRAYER, 2006). A neurodegeneração mediada por inflamação envolve ativação dos macrófagos residentes no encéfalo (micróglia), que liberam fatores neurotóxicos e pró-inflamatórios, incluindo citocinas, radicais livres, óxido nítrico e eicosanóides, que podem lesar neurônios e células gliais. Além dos macrófagos residentes, neutrófilos e macrófagos derivados de monócitos da corrente sanguínea podem induzir neurodegeneração (LIMA et al., 2007). Na sinovite, as células inflamatórias respondem com incremento na produção de prostaglandinas, citocinas e intensa formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres. Isso leva ao estresse oxidativo, que rapidamente amplifica o processo inflamatório, causando destruição articular, edema e dor (FILIPPIN et al., 2008).

A maioria dos mediadores químicos da inflamação como íons, cininas, histamina, óxido nítrico, prostanóides¹, citocinas, seja direta ou indiretamente, ativam nociceptores periféricos. A bradicinina ativa neurônios sensoriais primários via receptores B₂, entretanto, nos tecidos a bradicinina é convertida em des-Arg⁹ bradicinina, atuando seletivamente sobre os receptores B₁, cuja expressão normal é muito baixa, mas supra-regulada em tecidos inflamados. Os receptores B₁ e B₂ estão envolvidos na patogênese da dor e da inflamação. As prostaglandinas e os fatores de crescimento podem ativar diretamente nociceptores ou incrementar a sensibilidade nociceptora.

1 A enzima ciclooxigenase induzível (COX-2) gera metabólitos importantes na indução da dor e inflamação; o bloqueio na produção de prostaglandinas provenientes da COX-2, pelos anti-inflamatórios não-esteroidais, diminui a dor e a inflamação.

Os líquens são usados pelos homens na medicina tradicional há séculos, por suas propriedades terapêuticas, como se pode notar na arte egípcia (VARTIA, 1973). Papéis médicos e biológicos de líquens começaram a aparecer no final da Segunda Guerra Mundial (COCCHIETTO et al., 2002; XAVIER-FILHO et al., 2006).

Entretanto, tradicionalmente os líquens têm sido negligenciados. Em parte isto se deve a falta de conhecimento sobre suas “aplicações práticas”. Alguns povos, como os japoneses, por exemplo, utilizam determinados líquens para alimentação, mas isso raramente ocorre nos demais países. Os compostos obtidos a partir de líquens têm diversos outros usos, especialmente na indústria de cosméticos (principalmente perfumes), na produção de medicamentos (com atividades antibióticas e antitumorais), na datação de determinados substratos (liquenometria) e também, recentemente, no monitoramento do aquecimento global (VAN HERK; APTROOT; VAN DOBBEN, 2002).

Diante do exposto e do potencial uso dos compostos liquênicos como recursos curativos para a saúde e homeostase do ser humano, quando há desarmonia na interação dos mediadores inflamatórios que regulam a dor e a inflamação, tornando o sistema imunológico um agente agressivo para o corpo, é que se investigou neste trabalho as possíveis ações anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante do extrato hidroalcoólico do líquen *Cladonia clathrata* Ahti & L. Xavier-Filho (Cladoniaceae).

Outro fato que motivou o estudo dessa espécie de líquen é que, até o presente momento, não há relatos sobre seu possível uso na saúde coletiva. Devido a presença de compostos fenólicos e de outras substâncias produzidas pelos líquens para sua sobrevivência, esforços para se conhecer melhor suas propriedades farmacológicas e químicas são importantes. Além disso, busca-se na atualidade, novos compostos anti-inflamatórios que não interfiram na homeostase dos órgãos, não influenciando na síntese da COX-1, e que não tragam supressão ao sistema imunológico, como os glicocorticóides. Para tanto, utilizou-se modelos *in vivo* de nocicepção (contorções abdominais e teste da formalina) e inflamação (peritonite), e o modelo *in vitro* de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), a fim de comprovar a eficácia do uso deste líquen na medicina popular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inflamação

Segundo Rocha e Silva e Garcia Leme (2006) a palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas. Descrições das características clínicas da inflamação foram encontradas em papiros egípcios, datados de aproximadamente 3000 a.C., mas o primeiro autor a listar os quatro sinais cardinais da inflamação foi Celsius, um escritor romano do século I d.C., que relatou o aumento no fluxo sanguíneo e a dilatação dos pequenos vasos (*rubor*), a permeabilidade vascular aumentada (*tumor*), que levaria a um aumento na temperatura local (*calor*), à passagem de células do sangue circulante e dor local (*dolor*). A perda de função (*functio laesa*), o quinto sinal clínico, foi posteriormente adicionada por Virchow (1858).

Kumar et al. (2005) comentam que John Hunter, um cirurgião escocês, em 1793 observou o que é óbvio para os tempos atuais: a inflamação não é uma doença, mas uma resposta sem especificidade, com objetivos salutareos ao hospedeiro. A doença, vinculada à inflamação, está no desequilíbrio desta resposta.

Para Aller et al. (2007) a descrição moderna da inflamação superficial não difere significativamente da definição formulada por Celsius no primeiro século d.C. Estudos microscópicos tornaram possível estabelecer que os sinais clínicos da inflamação são resultantes da vasodilatação, acúmulo de leucócitos, aumento do fluido intersticial e estimulação dos terminais nervosos por mediadores.

A inflamação é uma resposta à infecção, antígenos ou lesão tecidual, e tem por função erradicar os agentes microbianos ou irritantes e potencializar o reparo tecidual (FLOWER; PERRETTI, 2005; NATHAN, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; TRACEY, 2002).

A defesa do corpo humano contra hospedeiros compreende barreiras físicas e químicas, como pele e membranas mucosas, assim como a acidez gástrica ou o fluxo secretório e excretório. Agentes que ultrapassam estas barreiras encontram os

mecanismos de defesa, as respostas imunes, designados a reconhecer e eliminar corpos estranhos (WALZOG; GAEHTGENS, 2000).

O processo inflamatório pode ser dividido em: inflamação aguda, inflamação crônica e resposta imune. A divisão das inflamações aguda e crônica é baseada na duração e características patológicas da reação. A inflamação aguda tem, típica ou relativamente, curta duração (horas a dias), e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de fluido rico em proteínas (plasma), migração de células (primariamente neutrófilos) para o sítio lesado e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação. Processos patológicos causados pela exacerbação de quadros inflamatórios agudos estão entre os maiores desafios de gerenciamento para anestesistas e profissionais de cuidados intensivos. Sepses, traumas severos e grandes cirurgias são exemplos de situações que apresentam os principais componentes inflamatórios agudos (BENJAMIM, 2001; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, asma, tuberculose, gota, vasculite, silicose e aterosclerose são exemplos de doenças inflamatórias crônicas. Estas desordens são caracterizadas por longa duração (semanas, meses ou anos), com inflamação ativa, destruição tecidual e tentativa de reparo, ocorrendo simultaneamente. Infiltração de células mononucleares e fibrose são características histológicas típicas da inflamação crônica (DI VAIO; FREITAS, 2001).

A resposta imune aparece, quando as células imunologicamente competentes são ativadas em resposta aos organismos estranhos, ou substâncias antigênicas liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica. A resposta imune pode ser dividida em respostas inatas e adaptativas; o sistema imune inato é ativado imediatamente após uma infecção, desencadeando a resposta do hospedeiro ao microorganismo infectante e emitindo um sinal de ativação para a resposta imunológica adaptativa. Eventos como a vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada e infiltração celular são parte da resposta imune inata, e seus componentes celulares primários são os macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK) e neutrófilos. Proteínas efetoras circulantes como o sistema complemento, reagentes de fase aguda e a cascata da coagulação têm importante função na imunidade inata. A resposta imunológica adaptativa ou específica só é desencadeada após o reconhecimento do patógeno pela resposta imune inata, a qual deflagra todo um conjunto de reações singularmente específicas contra o invasor e

também torna as ações dos componentes da resposta inata muito mais eficazes. Os linfócitos são os principais componentes celulares da resposta adquirida, sendo divididos em linfócitos B, responsáveis pela resposta humoral, isto é, produção de anticorpos; linfócitos T, que fazem a indução da resposta e são responsáveis pelas reações imunológicas mediadas por células; e as células NK, células linfóides ativas na resposta inata (DI VAIO; FREITAS, 2001; RANG; DALE; RITTER, 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Esses mecanismos de resposta imunológica, baseados em funções sofisticadas dos leucócitos, também são responsáveis pela eliminação de células não funcionantes ou lesadas, e assim contribuem para a manutenção da homeostase tecidual. Dessa forma, os mecanismos de defesa não apenas protegem o organismo da infecção, mas também permitem a remoção de restos celulares e de componentes teciduais destruídos, originados, por exemplo, de isquemia ou trauma (WALZOG; GAEHTGENS, 2000).

Como parte dessa defesa inata, a resposta inflamatória aguda, iniciada em situações nocivas, biológicas, químicas ou físicas, dá margem ao recrutamento de leucócitos e sua migração rápida e direcionada para regiões alvo dentro do corpo, o primeiro de quatro pré-requisitos para uma defesa efetiva nos locais de lesão. No segundo passo, os leucócitos desenvolvem instrumentos específicos que são responsáveis pela eliminação de corpos estranhos ou células de tecidos lesados. Estes leucócitos são impedidos de causar lesão tecidual descontrolada, pelos mecanismos de contenção seguidos de formação e, finalmente, resolução da resposta inflamatória aguda. Por fim, a inflamação dá passagem aos processos de reparo e cicatrização que permitem a recuperação integral da função tecidual, *restitutio ad integrum* (WALZOG; GAEHTGENS, 2000). Entretanto, uma reação inflamatória exacerbada pode levar à lesão tecidual e, se severa, causar descompensação fisiológica, disfunção orgânica e morte (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra microorganismos são os anticorpos (defesa humoral) e os leucócitos (defesa celular). Estes são encontrados normalmente na corrente sanguínea, o que justifica a importância atribuída, na inflamação aguda, aos fenômenos vasculares. Em situações de homeostase, normalmente as proteínas plasmáticas e as células circulantes estão contidas no interior dos vasos, em movimento no sentido do fluxo sanguíneo. Diante

de um estado inflamatório, os vasos sanguíneos sofrem várias alterações, com o objetivo de facilitar a passagem de proteínas plasmáticas e células sanguíneas da circulação para o local da lesão ou da infecção (KUMAR et al., 2005).

A vasodilatação segue a vasoconstrição inicial que é revertida 10 a 15 minutos após a lesão. A transição de constrição para dilatação é mediada por diversos fatores, produtos endoteliais, por exemplo, e fatores derivados de mastócitos como leucotrienos, prostaglandinas e, particularmente, histamina, que contribuem para a vasodilatação (ALLER et al., 2006).

O edema, uma característica fundamental da inflamação aguda, é causado pelo aumento da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento transvascular de fluido rico em proteínas de alto peso molecular (exsudato) do compartimento intravascular para o interstício (ALLER et al., 2006; KUMAR et al., 2005). Esse edema é resultado das ações de mediadores como histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do complemento, substância P e fator de ativação plaquetária (PAF). Estes fatores alteram intensamente as funções de barreira dos pequenos vasos e aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas à água e proteínas. Um papel fundamental da mudança na permeabilidade vascular é facilitar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio de lesão tecidual (ALLER et al., 2006; DI VAIO; FREITAS, 2001).

A vasodilatação e a exsudação plasmática são acompanhadas pela marginação de leucócitos, sua adesão e migração (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A migração leucocitária para os sítios de inflamação é crucial para as funções celulares dos leucócitos tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, a qual também foi implicada como uma característica chave em inúmeras doenças inflamatórias como lesão de isquemia-reperfusão, artrite, doença inflamatória intestinal e a síndrome de disfunção múltipla dos órgãos associada à sepse e ao trauma (VAN MIERT, 2002). A migração de neutrófilos, monócitos e células NK é comumente iniciada em respostas inatas, através da geração local de mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas específicas, seguindo uma lesão inflamatória.

Várias citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na geração da febre e estimulam a hipófise a liberar hormônios do estresse. Elas também estimulam o fígado a sintetizar inúmeras proteínas de fase aguda como proteína C reativa, fibrinogênio e antiproteases importantes (NYSTROM, 1998).

A dor constitui um importante sistema de alarme do organismo para sinalizar a existência de ameaça à integridade tissular, sendo assim um dos sinais característicos da resposta inflamatória. Sempre que uma célula ou várias células em um tecido são lesadas, diversas substâncias são liberadas. Uma injúria periférica ou em um nervo faz com que vários mediadores inflamatórios sejam liberados, sensibilizando vários receptores da dor (nociceptores). Com o objetivo de investigar esse fenômeno e verificar a relação dessas substâncias com o fenômeno da dor, vários autores demonstraram que a dor é provocada por substâncias, tais como: acetilcolina (ACh), 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina), histamina, substância P, angiotensina, bradicinina, entre outros (DE LEO; WINKELSTEIN, 2002; KATZUNG, 2000).

Segundo Rang, Dale e Ritter (2001) a dor, uma sensação que normalmente é desagradável e subjetiva, indica um problema orgânico ou a possibilidade de uma lesão do corpo, funciona como um alerta e envolve nocicepção (percepção da dor) e consciência da dor, sua origem, seu significado, suas consequências e como aliviar. Para isso, deve haver atividade cortical, que é evidenciado pelo choro, expressão facial, capacidade de visualização e consciência espacial de pessoas e objetos. A percepção de estímulos nocivos denominada de nocicepção, não é a mesma que dor, que é uma experiência subjetiva e inclui um forte componente emocional (afetivo).

A dor se inicia em terminações nervosas específicas, que são denominadas de nociceptores, os quais se encontram distribuídos por todo o corpo e transmitem as mensagens sob a forma de impulsos elétricos, ao longo dos nervos até a medula espinhal, e em seguida ao cérebro. Algumas vezes, o sinal desencadeia uma resposta reflexa ao chegar à medula espinhal. Quando isto ocorre, um sinal é imediatamente reenviado ao longo de nervos motores até o local original da dor, desencadeando a contração muscular. Um exemplo de resposta reflexa é a reação imediata de afastamento quando se toca inadvertidamente alguma coisa muito quente. Somente quando o cérebro processa o sinal e o interpreta como dor, o indivíduo passa a ter uma percepção consciente da mesma (GOODMAN; GILMAN, 1996).

A diferenciação entre dor e nocicepção depende de interações neuronais complexas, que envolvem sistemas excitatórios e supressores, e reflexos comportamentais a estímulos dolorosos. Em condições normais, a dor está associada a uma atividade elétrica nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos

nervos periféricos. Erlanger e Gasser dividiram as fibras nervosas de mamíferos nos grupos A, B e C, com subdivisão adicional do grupo A em fibras α (alfa), β (beta), γ (gama) e δ (delta). As fibras A δ mielinizadas são mais rápidas, com velocidade de condução de 12 a 30 m/s, e respondem principalmente a estímulos mecânicos ou térmicos, estando relacionadas com dor, frio e tato (SILVA, 1998).

As fibras C (não mielinizadas) possuem baixa velocidade de condução do impulso nervoso, menos de 1 m/s, encontram-se localizadas na raiz dorsal, e respondem a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, razão pela qual são também chamadas de nociceptores polimodais C. Os nociceptores polimodais estão relacionadas diretamente com respostas reflexas. A maior parte das fibras dolorosas pode ser excitada por tipos múltiplos de estímulos. As informações sensoriais periféricas são enviadas para o sistema nervoso central (SNC) através de fibras altamente especializadas, enquanto que a discriminação entre os estímulos cutâneos que ativam as sensações de frio, calor ou toque, deve-se à presença de receptores sensoriais periféricos, por isso essas fibras são tidas como fibras aferentes nociceptivas cutâneas. Existem evidências de que o transmissor secretado pelas fibras aferentes primárias da dor é a substância P (RANG; DALE; RITTER, 2001). Um aspecto da dor inflamatória reconhecido clinicamente há séculos é o fenômeno de hiperalgesia, definida como um estado de intensificação da sensação dolorosa, mediante uma estimulação nociva ou não do tecido periférico. A hiperalgesia pode se manifestar como dor na ausência de estímulos externos (dor espontânea), como resultado de estímulos inócuos de baixa intensidade (alodínia), ou ainda de estímulos nocivos. A hiperalgesia pode ser classificada em dois tipos: primária, a qual ocorre no local da injúria, e secundária, a qual ocorre em áreas próximas ou não do local afetado. A hiperalgesia primária é caracterizada pelo aumento da sensibilidade a estímulos térmicos ou mecânicos, enquanto que a secundária se caracteriza por maior sensibilidade somente a estímulos mecânicos (GOODMAN; GILMAN, 1996).

A explicação clássica para o mecanismo da hiperalgesia inflamatória periférica é que esta resulta da sensibilidade dos nociceptores aferentes primários por mediadores endógenos liberados por tecidos inflamados ou lesados. Existem substâncias que atuam diretamente no nociceptor para produzir hiperalgesia, como por exemplo, a prostaglandina E₂ e a prostaciclina, e dentre as vias indiretas que levam ao desenvolvimento de hiperalgesia pode-se citar o leucócito, o terminal do

neurônio pós-ganglionar simpático, além dos próprios produtos da via da ciclooxigenase do ácido araquidônico (SILVA, 1998).

Os mediadores da dor inflamatória podem ser divididos em duas classes: ativadores diretos dos nociceptores, como por exemplo, a histamina e bradicinina; e *up-regulators* (reguladores para cima), que sensibilizam diretamente os nociceptores, como por exemplo, os produtos do metabolismo do ácido araquidônico pela ciclooxigenase (prostaglandinas) e as aminas biogênicas (noradrenalina, dopamina e 5-HT). Os nociceptores normalmente envolvidos na dor inflamatória são os polimodais de alto limiar ou aqueles concentrados por fibras finas mielinizadas que, geralmente, estão *down-regulated* (regulados para baixo ou desativados). Um estímulo térmico, mecânico ou químico de baixa intensidade que pode ativar o nociceptor, se este estiver sensibilizado, é incapaz de fazê-lo se estiver no seu estado normal (*down-regulated*). Um nociceptor chamado de silencioso, associado à pequenas fibras aferentes, foi mostrado em sítios viscerais e articulações; esses nociceptores não podem ser ativados em tecidos normais, mas são “acordados” durante a inflamação. A neurotransmissão no sistema descendente de controle nociceptivo é muito complexa e envolve principalmente mecanismos opióides, serotoninérgicos, adrenérgicos e colinérgicos, que ativam vias descendentes responsáveis pela inibição de neurônios do corno dorsal da medula espinhal (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Muitas variáveis podem modificar o processo inflamatório básico, como a natureza e a intensidade da lesão, o local e o tecido afetado, e a responsividade do hospedeiro. Entretanto, a inflamação aguda, geralmente evolui para um destes três resultados finais: resolução completa, estado ideal; cicatrização pela substituição de tecido conjuntivo (fibrose); progressão da resposta tecidual, a cronicidade da resposta (DI VAIO; FREITAS, 2001; KUMAR et al., 2005).

2.2 Radicais livres e substâncias antioxidantes

São denominadas radicais livres, quaisquer espécies químicas que apresentam pelo menos um elétron não compartilhado na camada de valência. Em 1900

descobriu-se o primeiro radical livre, e em 1954, o médico e químico Denham Harman, pela primeira vez relacionou estas substâncias reativas e tóxicas a uma doença implacável: o “envelhecimento”. Acredita-se que esses elementos, com elétron não pareado na camada de valência, sejam os responsáveis, pelo menos em parte, por elevado número de doenças no organismo, ou mesmo pelo aceleração de algumas doenças como o câncer, diabetes, asma, doenças cardiovasculares e reumatológicas, entre outras (EBADI, 2002).

Os radicais livres são extremamente reativos, sendo continuamente produzidos na fosforilação oxidativa, processos metabólicos e outros sistemas biológicos. Um radical livre é extremamente instável; como tudo na natureza tende a se estabilizar, esse átomo procura reagir com moléculas do organismo rapidamente, roubando-lhe um elétron (processo designado como oxidação) e assim, gerando outra molécula reativa. Essa reação em cascata, que se forma sucessivamente no organismo, é altamente lesiva e prejudicial para as células. Caso essa reação não seja combatida, existe grande probabilidade de se formar um processo inflamatório no organismo, o qual ativará diferentes sistemas de decomposição, incluindo enzimas hormonais e lipídeos de membranas. O estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação. A desorganização estrutural dos lipídeos de membranas é um processo conhecido como peroxidação lipídica, que é a principal consequência do estresse oxidativo.

Acredita-se que as doenças degenerativas crônicas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, complicações da diabetes *mellitus*, envelhecimento precoce, entre outras, estejam relacionadas com o estresse oxidativo (ANDRADE et al., 2007; VICENTINO; MENEZES, 2007).

No sistema fisiológico, os radicais livres são produzidos pelas células durante o processo de respiração celular aeróbica realizado pela maioria dos seres vivos, animais ou vegetais, e fornece à célula a energia necessária para suas atividades metabólicas, como exemplo, a quebra da glicose proveniente dos alimentos absorvidos. Os radicais livres são essenciais para que o sistema de defesa orgânico seja eficaz, como o que ocorre em uma reação inflamatória, onde os radicais livres causam lesão celular, calor, rubor e edema local, mas em contrapartida acabam com o agente invasor. Os processos metabólicos não são as únicas fontes de radicais livres. Fatores externos, como poluição ambiental, fumo, radiação ultravioleta, raios-

X, álcool, resíduos de pesticidas, consumo excessivo de frituras, estresse, alimentos e bebidas com aditivos químicos e hormônios, entre outros, podem contribuir para o aumento da formação dessas moléculas no organismo (VICENTINO; MENEZES, 2007).

Os radicais livres considerados mais reativos e, portanto, considerados mais agressivos para as células do organismo, são os formados a partir do oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila formado a partir do peróxido de hidrogênio ($O_2 + 1e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + 1e^- \rightarrow OH^- + OH^\circ / OH^\circ + 1e^- + H^+ \rightarrow H_2O$), e o oxigênio singleto que é produzido quando a luz ultravioleta ou a camada de ozônio atingem as células. Para regulação dos radicais livres, os seres aeróbios desenvolveram mecanismos antioxidantes de proteção, como enzimas do tipo catalase ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) e peroxidase ($H_2O_2 + 2G-SH \rightarrow 2H_2O + GS-SG$), que são responsáveis pela transformação do peróxido de hidrogênio em água. Entretanto, o organismo não consegue neutralizar o excesso de radicais livres, e como já foi citado anteriormente, o acúmulo de radicais livres é extremamente nocivo ao organismo. O que se tem no momento para combater os radicais livres é a prevenção, por exemplo, através de uma alimentação rica em antioxidantes. Várias substâncias são consideradas antioxidantes como, por exemplo, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), vitamina A (β -caroteno), vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), tofu (queijo de soja), chá verde (flavanol), além de minerais como, zinco, selênio, cobre e manganês, e metabólitos secundários de plantas, polifenóis e isoflavona de soja, flavonóides, entre outros (ANDRADE et al., 2007; EBADI, 2002).

Atualmente a busca pelas propriedades antioxidantes das plantas é relativamente grande, visando substituir os antioxidantes sintéticos ou fazer associação entre eles. Os antioxidantes usados na indústria alimentícia visam evitar a oxidação lipídica, a qual pode ser inibida pelo seqüestro de radicais livres, tendo a função de conservar os alimentos (ANDREO; JORGE, 2006). Os compostos mais utilizados com esta finalidade são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), galato de propila (GP) e terc-butilhidroquinona (TBHQ). Os antioxidantes sintéticos apresentam um inconveniente por serem voláteis e facilmente decompostos em altas temperaturas (ANDREO; JORGE, 2006).

Estudos têm demonstrado a possibilidade dos antioxidantes sintéticos apresentarem alguns efeitos tóxicos para o organismo, principalmente com o consumo crônico. O GP, por exemplo, quando em presença de peróxido de hidrogênio reage com íons ferrosos formando espécies reativas de oxigênio, as quais podem posteriormente atacar alvos biológicos (MOLYNEUX, 2004; SOUSA et al., 2007).

Pode-se encontrar na literatura um aumento crescente de trabalhos científicos onde são investigados extratos brutos, frações purificadas ou seus componentes isolados, visando avaliar o poder antioxidante das plantas (ANDREO; JORGE, 2006; KOLEVA et al., 2002; SILVA et al., 2005).

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de vegetais e plantas. Muitas ervas e especiarias, utilizadas como condimentos em alguns pratos, são excelentes fontes de compostos fenólicos. As plantas podem conter grande variedade de moléculas sequestradoras de radicais livres, como compostos fenólicos das seguintes classes: flavonóides, quinonas, cumarinas, ligninas e taninos. Relata-se que muitos desses compostos possuem além da atividade antioxidante, atividades antimutagênica, antimicrobiana, antidiabética e anti-inflamatória.

Os antioxidantes são moléculas com carga positiva que se combinam aos radicais livres, tornando-os inofensivos ao organismo. Agem reduzindo a concentração de radicais livres, apresentando um papel modulador, e não bloqueador (EBADI, 2002).

Um estudo promovido por Gülçin et al. (2002) mostrou que o extrato aquoso do líquen *Cetraria islandica* apresenta forte poder antioxidante, redutor e sequestrador de radicais livres (método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila - DPPH), associados com a presença de fenóis. Behera et al. (2005) também relacionaram atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (método do DPPH) com a presença de fenóis no líquen *Usnea ghattensis*. Paudel et al. (2008) demonstraram que cinco espécies de líquens polares, *Stereocaulon alpinum* Laurer (Stereocaulaceae), *Ramalina terebrata* Hook and Taylor (Ramalinaceae), *Caloplaca* sp. (Teloschistaceae), *Lecanora* sp. (Lecanoraceae) e *Caloplaca regalis* (Vain.) Zahlbr. (Teloschistaceae), apresentaram atividade antioxidante muito superior quando comparadas aos líquens tropicais.

2.3 Líquens

2.3.1 Histórico

O nome líquen (do grego *leichén*) surgiu por volta do ano 300 a.C. quando Teofrastus, o Pai da Botânica, sentiu necessidade de atribuir um nome às “excrecências” encontradas nos troncos das Oliveiras, muitas das quais eram o que atualmente se conceitua como líquen (MARCELLI, 1995). Entretanto, apenas em 1868, foi reconhecida a verdadeira natureza dos líquens, quando o biólogo suíço Schwendener demonstrou tratar-se, não de um organismo vegetal, mas de uma simbiose complexa entre algas e fungos. No entanto, a idéia inicial de simbiose fungo-alga não foi aceita por todos. Botânicos como Bornet, Bonnier e Warning, inclinaram-se a considerar, nos líquens, a existência de um parasitismo do tipo que Warning denominou helotismo: a alga seria parasitada pelo fungo, que dela retiraria seu alimento. Outros, como Beijerinck (1890), admitiram parasitismo, considerando a alga como parasita do fungo (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976).

Numerosas teorias foram propostas e as explicações se sucederam através dos tempos. Os líquens podem ser compreendidos como o resultado da associação simbiótica entre alga e/ou cianobactéria e fungo, o que permite a formação de uma estrutura específica, denominada talo liquênico (GARGAS et al., 1995; INGÓLFSDÓTTIR, 2002), morfológicamente diferente da estrutura adquirida pela alga ou fungo quando em vida livre (HALE, 1979).

Embora a literatura clássica inclua os líquens na divisão dos criptógamos, admitindo uma relação filogenética com algas pluricelulares, musgos e pteridófitas, há uma grande controvérsia quanto à sua classificação, em níveis taxonômicos superiores (MARCELLI, 1995). Alguns liquenólogos discutem a classificação atual dos líquens e preferem referir-se a estes organismos como fungos liquenizados, devido a predominância do micobionte dentro da associação simbiótica (BARINAGA, 1995) e pela ausência de evidências de um ancestral comum entre os fungos formadores de líquens (GARGAS et al., 1995). A sistemática dos fungos liquenizados, quanto à ordem, família, gênero e espécie, baseia-se principalmente na

análise e descrição de caracteres morfológicos do talo liquênico e dos apotécios (MARCELLI, 1995; NASH, 1996). Contudo, a pesquisa de algumas substâncias químicas características dos líquens também tem sido utilizada como ferramenta da sistemática (MARCELLI, 1995), o que tem despertado grande interesse no desenvolvimento de pesquisas nesta área com o objetivo de isolar, purificar e caracterizar estruturalmente as substâncias presentes neste tipo de organismo (GORIN et al., 1993).

2.3.2 Aspectos Gerais

A simbiose liquênica é uma estratégia evolucionária bem sucedida, resultando em uma rica diversidade de espécies fúngicas (GRUBE; KROKEN, 2000). A significativa diversidade de espécies ilustra-se, conforme se apresenta na fig.1, basicamente por três tipos de talos: folioso, fruticoso e crustoso (AHMADJIAN, 1993; NASH, 1996).

Segundo Smith (1992) os biontes liquênicos associados formam um talo íntegro, no qual a alga e/ou a cianobactéria (fotobionte) está localizada extracelularmente à hifa fúngica (micobionte). O micobionte geralmente pertence ao filo *Ascomycota*, mas também pode pertencer ao filo *Basidiomycota*, já o fotobionte pode pertencer tanto as *Chlorophyta* quanto as *Cyanobacteria* (BENATTI; MARCELLI, 2007). A biomassa liquênica é composta, principalmente, por hifas fúngicas que, em espécies mais complexas, desenvolvem-se em estruturas, com caráter anatômico e morfológico, altamente especializadas. A respeito das características morfológicas, as células fotobióticas são sempre envolvidas por hifas e localizam-se próximo à superfície inferior e acima do córtex fúngico. Desta forma, os líquens apresentam uma organização interna que mimetiza as folhas de plantas superiores, nas quais a absorção de luz pode ser maximizada (HONEGGER, 1993).

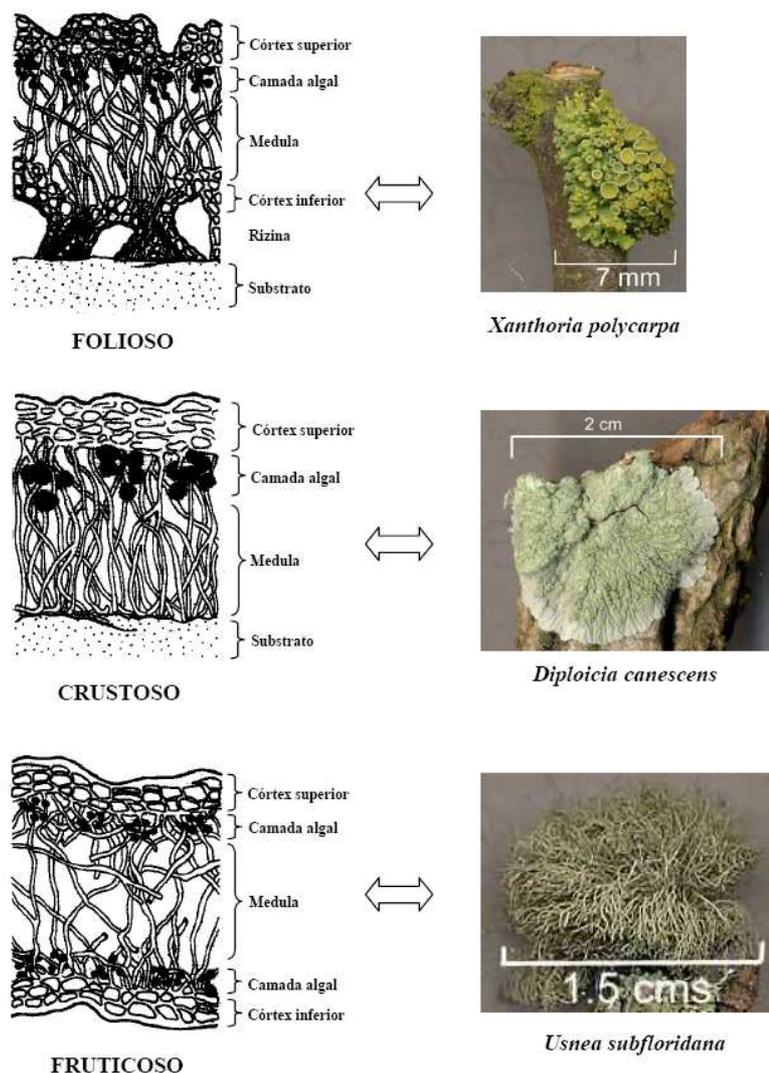


Fig. 1. Tipos de talos líquênicos: folioso (exemplo: *Xanthoria polycarpa*), crustoso (exemplo: *Diploicia canescens*) e fruticoso (exemplo: *Usnea subfloridana*). Fonte: PRITCHARD; BRADT, 1984.

A respeito do micobionte, faz-se necessário salientar a diversidade destes organismos, sendo conhecidas 13.500 espécies de fungos liquenizados, dentre os quais 98% são ascomicetos (GALUN, 1988; GARGAS et al., 1995; HONEGGER, 1993; 1995; 1996). De acordo com Hawksworth e Hill (1984), mesmo que os fungos liquenizados apresentem-se morfológica e anatomicamente mais complexos que os fungos não liquenizados, não há diferenças fundamentais entre estes organismos e não há indicações de crescimento diferenciado dentre estas hifas fúngicas (HONEGGER, 1993).

Já em relação aos componentes fotobiontes da simbiose líquênica, dentre os 1.600 gêneros conhecidos de algas (GALUN, 1988), apenas 40 tem sido reportado

como fotobiontes em líquens (BÜDEL, 1992; TSCHERMACK-WOESS, 1988). A maioria (90%) dos fotobiontes são algas verdes (*Chlorophyta*), sendo os gêneros *Trebouxia* e *Trentepohlia* os mais frequentes. *Nostoc* é o gênero mais comum de cianobactérias e é capaz de fixar tanto CO₂ quanto N₂. Dentre a grande diversidade de fungos liquenizados, em aproximadamente 500 espécies de líquens ocorre a presença de dois fotobiontes associados a um único fungo, sendo uma alga verde o bionte fotossintético primário e uma cianobactéria o membro fotossintetizante secundário, fixador de N₂ (TSCHERMACK-WOESS, 1988). Este último é particularmente complexo e encontra-se nos cefalódios, regiões de crescimento do talo liquênico (MARCELLI, 1995; PURVIS, 2000). Nesta simbiose, tem-se então a contribuição da alga na produção de açúcares através da fotossíntese e, no caso das cianofíceas, a elaboração de aminoácidos a partir de gás carbônico e nitrogênio, em associação com a água (GOLA; NEGRI; CAPPELLETI, 1965).

Os líquens são principalmente rupícolas e epífitas, mas algumas espécies desenvolvem-se diretamente sobre o solo. São elementos importantes na desagregação das rochas devido à eliminação de certos ácidos orgânicos (ácidos liquênicos), os quais reagem com elementos minerais da superfície (JOLY, 1975). Além disso, algumas espécies que fixam o nitrogênio atmosférico (aquelas nas quais o fotobionte é uma cianofícea) são comuns e valiosas para vários ecossistemas (AHMADJIAN, 1993; PURVIS, 2000).

De distribuição cosmopolita, os líquens são especialmente diversificados nas regiões tropicais e em áreas polares, podendo constituir o único tipo de vegetação, indicando uma grande adaptação às condições ambientais adversas. A excepcional resistência as variações de temperatura é uma característica inerente a esses organismos (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976). Os líquens com fotobiontes verdes podem ser metabolicamente reativados quando são expostos somente ao vapor de água. Os cianolíquens precisam de água para reativar seu metabolismo. Os líquens perdem rapidamente compostos inorgânicos e orgânicos após serem re-hidratados. Fotobiontes verdes têm meios de proteger seus sistemas fotossintéticos de repetidos ressecamentos e luz excessiva (AHMADJIAN, 1993).

Muitos produtos liquênicos vêm sendo utilizados como fármacos, bases fixadoras de perfumes, corantes, fontes de alimento (PURVIS, 2000; RAVEN, 1996), ou ainda, como indicadores de poluição ambiental devida a sua sensibilidade

a SO₂, NO₂ e ozônio, e habilidade em absorver e acumular metais pesados (HAWKSWORTH; HILL, 1984; PURVIS, 2000).

2.3.3 Principais constituintes químicos dos líquens

As substâncias químicas produzidas pelos líquens são agrupadas, de acordo com a localização no talo, em produtos intracelulares e extracelulares. Os produtos intracelulares (carboidratos, carotenóides, vitaminas, aminoácidos e proteínas) estão ligados à parede celular e ao protoplasto. Os produtos extracelulares, frequentemente chamados de metabólitos secundários, são encontrados na medula ou no córtex, raramente em ambas as camadas (antraquinonas, atranorina, liquexantona, depsidonas, dibenzofuranos, entre outros) (HONDA; VILEGAS, 1998).

2.3.3.1 Substâncias liquênicas

Substâncias liquênicas, conhecidas como ácidos liquênicos, são na maioria compostos fenólicos, produtos do metabolismo secundário do micobionte (produzidos pela hifa), sendo depositados no córtex e/ou medula, em concentração de 0,1 a 10% em relação ao peso do líquen seco, embora em alguns casos a concentração possa ser superior (HALE-JR, 1983). A produção das substâncias liquênicas se dá por três principais vias biossintéticas: a do acetato polimalonato, a do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico. Dessas vias são originados os grandes grupos de compostos. Na primeira são formados os ácidos graxos, depsídeos, depsidonas e quinonas; na segunda são originados os pigmentos amarelos ou laranjas (calicina, epanorina, ácido leprapínico e ácido vulpínico), derivados do ácido vulpínico, e na terceira são produzidos os terpenóides e esteróis. Outras vias podem ser ainda destacadas como dos aminoácidos e dos carboidratos verificando-se, nesta última, a biossíntese dos sacarídeos e polióis. Entretanto, a maioria dos metabólitos

secundários tem origem biossintética via ácido chiquímico e acetato polimalonato (HALE-JR, 1983; NASH, 1996; XAVIER-FILHO et al., 2006) (Fig. 2).

Cerca de 630 compostos, provenientes do metabolismo secundário de líquens, são conhecidos. Dentre estes, estão os ácidos alifáticos *meta*- e *para*-depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido vulpínico. Ainda que alguns destes compostos sejam produzidos por fungos de vida livre e por plantas superiores, a maior parte é considerada exclusiva de líquens (ELIX, 1996). Devido à capacidade de reagirem com substâncias químicas específicas, produzindo na maioria das vezes reações coloridas, e a sua grande especificidade de ocorrência nos líquens, estas substâncias vêm sendo utilizadas com propósitos taxonômicos. Elas são estudadas rotineiramente pelos liquenólogos, sendo para vários grupos (ex.: Parmeliaceae e Cladoniaceae) essenciais para a identificação das espécies (HONDA; VILEGAS, 1998).

Embora muitas destas substâncias liquênicas sejam conhecidas, o seu papel ainda não está bem definido. Porém, parece que estas estão envolvidas no mecanismo de proteção contra o ataque de animais e contra o desenvolvimento de bactérias, fungos e musgos. Os fenóis liquênicos, acumulados sobre as hifas do córtex superior, participam do mecanismo adaptativo de diversas espécies (LAWREY, 1986), e o ácido úsnico, um dos mais freqüentes compostos de líquens, protege o fotobionte da radiação de baixo comprimento de onda (RUNDEL, 1987), sendo considerado, inclusive, como recurso energético em casos de estresse nutricional (VICENTE; RUIZ; ESTÉVEZ, 1980).

Entre as centenas de metabólitos secundários conhecidos de líquens, o ácido úsnico é sem dúvida o mais extensivamente estudado, o qual é amplamente distribuído em espécies de *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae), *Evernia*, *Parmelia* (Parmeliaceae) e outros gêneros de líquens (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

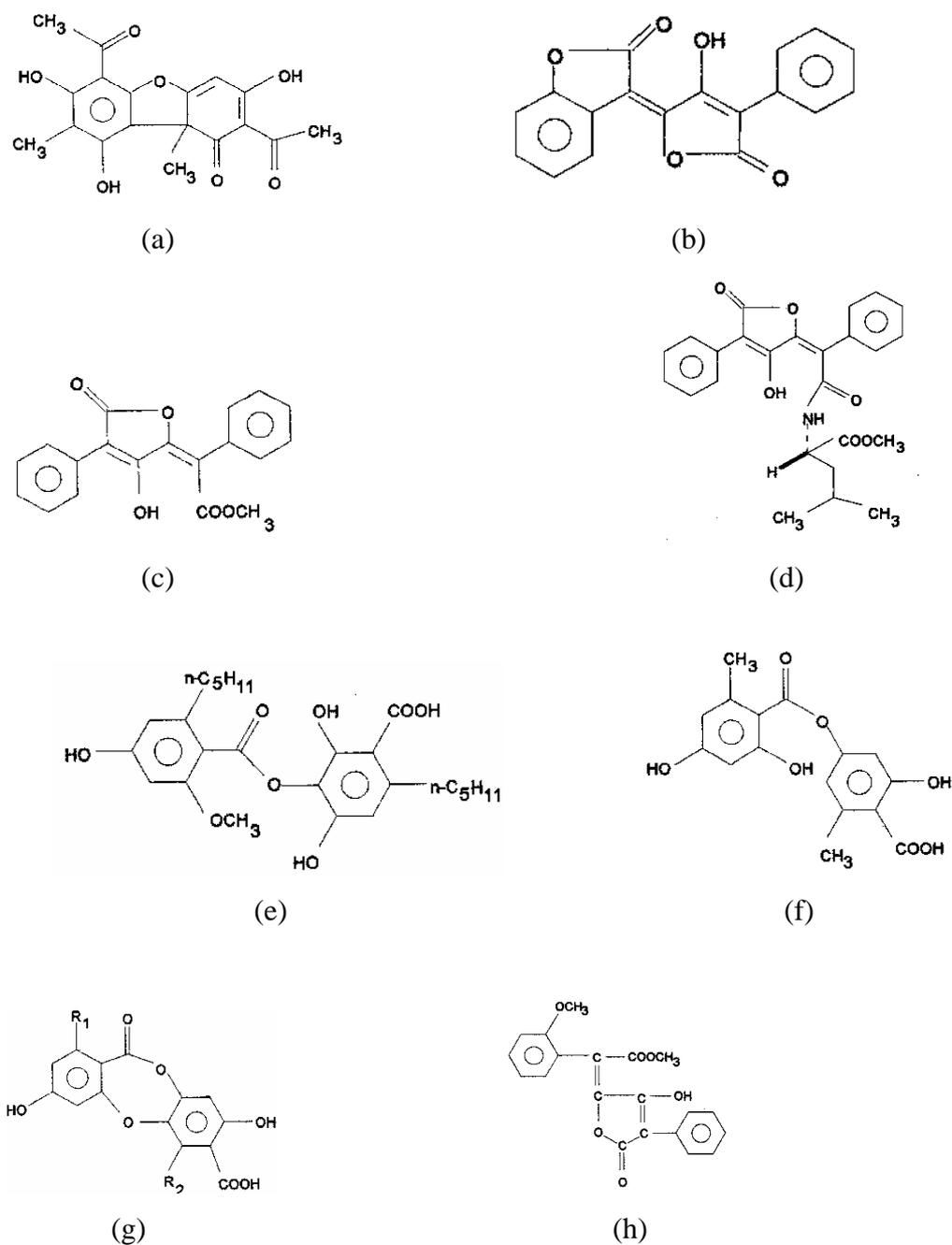


Fig. 2. Estrutura molecular plana do (a) ácido úsnico, (b) calicina, (c) ácido vulpínico, (d) epanorina, (e) ácido criptoclorofoico (*meta*-depsídeo), (f) ácido ecanórico (*para*-depsídeo), (g) depsidona e (h) ácido leprapínico. Fonte: HONDA & VILEGAS, 1998.

2.3.3.2 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos secundários ou acessórios que absorvem luz, em comprimentos de onda diferentes da clorofila, que ocorrem regularmente em líquens. A ocorrência destes compostos nos talos líquênicos pode ser influenciada por fatores ambientais como clima, altitude, latitude e, principalmente, a intensidade da luz ambiental (HALE-JR, 1983). Seu papel em líquens não é bem conhecido, porém, parece estar envolvido na proteção do líquen contra luminosidade excessiva e também na foto e termo-proteção evitando a dissipação de energia (ADAM; DEMMING-ADAMS; LANGE, 1993).

2.3.3.3 Carboidratos de baixa massa molar

Relativamente, poucos estudos têm sido realizados a cerca da distribuição destes carboidratos de baixa massa molar em diferentes espécies de líquens (NISHIKAWA; MICHISHITA; KURONO, 1973). A investigação mais abrangente foi realizada por Lindberg, Misiorny e Wachtmeister (1953) em 60 espécies de líquens. Eles pesquisaram a presença de polióis arabinitol, manitol e volemitol, e de dissacarídeos.

Nesta classe de carboidratos encontram-se os monossacarídeos redutores (pentoses, metilpentoses, hexoses e cetoses), polióis (com moléculas contendo entre 3 a 7 átomos de carbono) e os oligossacarídeos (GORIN et al., 1993).

2.3.3.4 Carboidratos de alta massa molar

O primeiro relato descrevendo a presença de polissacarídeos em líquens foi realizado por Berzelius, em 1815. A partir de estudos com o líquen *Cetraria islandica* foram isolados dois polissacarídeos conhecidos por liquenina (= liquenana)

e isoliquenana, os quais eram constituídos por unidades de glicose (GORIN et al., 1993; MEYER; GÜRTLER, 1947). Muitos outros trabalhos sucederam com o objetivo de obtenção de polissacarídeos de diferentes espécies de líquens. Dentre os polissacarídeos caracterizados, as glucanas são os homopolímeros comumente encontrados.

2.3.4 *Cladonia spp*

O gênero *Cladonia* (Fig. 3), pertencente à família Cladoniaceae, é caracterizado por apresentar um talo crustoso ou esquamuloso, às vezes estipitado, e raramente folioso, com ascomas claros e negros do tipo lecideino biatorino e algumas vezes imerso (fotobionte clorofíceo unicelular; esporos variados; ápice do asco com uma estrutura em forma de capuz). Porções semelhantes às hastes suportam o ascostroma, também denominadas de podécios, que é parte dominante do talo (NASH, 1996; XAVIER-FILHO et al., 2006). Segundo Hammer (2003), a Austrália é um centro de endemismo do gênero *Cladonia*, sendo a diversidade claramente notável na Nova Zelândia, que possuía cerca de 60 espécies reconhecidas até 2003, ano em que oito novas espécies foram descobertas e mais oito em discussão.



Fig. 3. *Cladonia spp*. Fonte: mason.gmu.edu/~jlawrey/biography/Cladonia.jpg

Backor e Fahselt (2004) verificaram a existência de participação de metais pesados na constituição do líquen *Cladonia pleurota* em Sudbury (Ontário, Canadá).

Ribeiro et al. (2006) estudaram os metabólitos da *Cladonia substellata* Vainio e comprovaram potencial bactericida e antifitopatogênica.

Segundo Xavier-Filho et al. (2006), o líquen *Cladonia clathrata* pertence a um dos principais fungos liquenizados da ordem Lecanorales, que se encontra em sua maioria em climas extratropical e em zonas temperadas e frias. Woranovicz et al. (1997) referem que a galactomana (principal polissacarídeo em líquens micobiontes ascomicetos) é quase idêntica entre os líquens *Cladonia imperialis* e *Cladonia clathrata*.

2.3.4.1 *Cladonia clathrata*

Entre 15 espécies da *Cladonia* os β -D-glucanas são os mais encontrados (CARBONERO et al., 2001).

Segundo Ahti (2000) a *Cladonia clathrata* (Fig. 4) possui como características: um talo primário persistente, esquamuloso, de 2-6 x 1-4 mm, com lóbulos arredondados quase isodiamétricos, de cores verde e branco papilado-areolado; um podécio entre 2-4,5 cm de comprimento, com pedúnculo entre 0,5-1,5 mm de espessura, de cor cinza pálido ao violeta marrom, com partes necróticas amarelo marrom; córtex pobremente desenvolvido; medula incluindo um estrato algal contínuo; e eixo um pouco macio, bem delimitado na medula. A espécie similar *Cladonia rappii* é dificilmente perfurada. A *Cladonia clathrata* é distinguida da *Cladonia verticillaris*, devido ao seu pequeno tamanho de ponta a ponta, e por conter os ácidos fumarprotocetrárico, protocetrárico e confurmaprotocetrárico (Fig. 5).



Fig. 4. *Cladonia clathrata*. Fonte: o autor.

A *Cladonia clathrata* é distribuída endemicamente no Nordeste do Brasil, da Paraíba ao Espírito Santo e Minas Gerais, raramente em São Paulo. Cresce em áreas abertas, habitats arenosos, especialmente próximo da costa. Em Sergipe é encontrada no município de Areia Branca, na Serra de Itabaiana (AHTI, 2000).

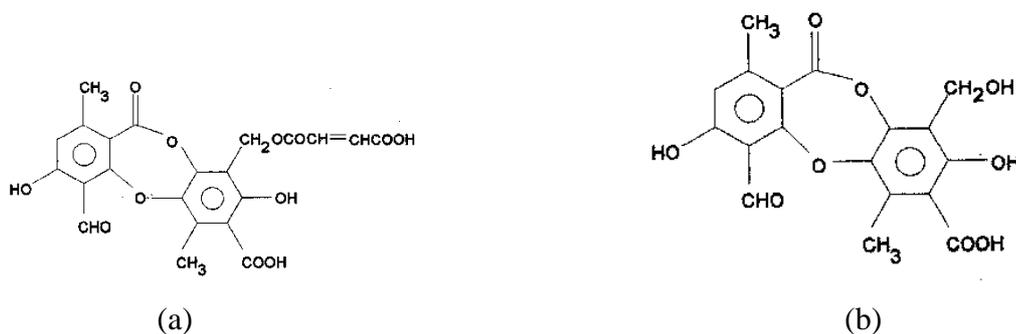


Fig. 5. Estrutura molecular plana do (a) ácido fumarprotocetrárico e (b) ácido confumarprotocetrárico. Fonte: HONDA & VILEGAS, 1998.

2.3.5 Líquens e atividades biológicas

Alguns extratos de líquens são utilizados como recursos curativos na medicina popular, e testes realizados com líquens mostraram a ocorrência frequente de metabólitos com propriedades antibiótica (CAVALLITO et al., 1948), antimicrobiana (INGÓLFSDÓTTIR et al., 1998), antiviral (NEAMATI et al., 1997;

PENGSUPARP et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1995), analgésica e antipirética (OKUYAMA et al., 1995). Alguns líquens também são utilizados como produtos naturais na medicina tradicional para tratar bronquite e desordens inflamatórias (SAKLANI; UPRETI, 1992).

Na antiguidade clássica, Hipócrates recomendava o uso de *Usnea barbata* como opção terapêutica frente a desordens uterinas, e na medicina popular, é utilizado para tratamento de “pé de atleta” (XAVIER-FILHO et al., 2006). Extratos de *Usnea ghattensis* possuem atividade contra *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (BEHERA et al., 2005). Os líquens *Usnea esculenta* e *Usnea longissima* evidenciaram efeitos inibitórios contra melanogenesis (KIM; CHO, 2007).

O extrato da *Cladina dendroides* e a atranorina, um dos compostos deste líquen, foram capazes de inibir as contorções abdominais induzidas por ácido acético (MAIA et al., 2002). Entretanto, Maia et al. (2002) não foram capazes de afirmar se a redução das contorções se deu por sedação, por mudança da função motora (observada no estudo de toxicidade) ou por mecanismo periférico.

Na Europa, o extrato da *Cetraria islandica* é utilizado para tratar inflamações da mucosa (SÜLEYMAN et al., 2002). No Uruguai, uma espécie de líquen fruticoso, *Usnea densirostra* Taylor, chamada popularmente de “yerba de la piedra”, tem sido usada medicinalmente (OSORIO, 1982).

Os dibenzofuranos possuem atividade antibiótica frente a uma gama de bactérias. Os derivados do ácido polipórico e alguns polissacarídeos demonstram atividade antitumoral. O ácido polipórico foi isolado de *Sticta coronata* e ensaiado frente a leucemia L1210 em rato, revelou-se altamente ativo, mesmo após modificações dos anéis benzênicos terminais ou de alguns dos seus substituintes (XAVIER-FILHO et al., 2006).

O ácido úsnico e os ácidos alifáticos *meta*- e *para*-depsídeos foram identificados como componentes ativos do extrato metanólico da *U. diffracta*, apresentando atividades analgésica e antipirética em camundongos (OKUYAMA et al., 1995). Estudos anteriores realizados por Vijayakumar et al. (2000) demonstram que a atividade anti-inflamatória do ácido úsnico, quando administrado por via oral na dose de 100 mg/Kg, foi comparável a do ibuprofeno na mesma dose, usando os

modelos experimentais de edema de pata em ratos (efeito agudo) e *pellet* de algodão (efeito crônico).

A administração oral do ácido úsnico, nas doses de 30 e 100 mg/Kg, resultou em efeito analgésico significativo nos modelos de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e pressão da cauda (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). O ácido úsnico administrado oralmente, nas doses de 100 e 300 mg/Kg, exibiu atividade antipirética significativa no modelo de hipertermia induzida por lipopolissacarídeo (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Além disso, algumas substâncias liquênicas, como os ácidos úsnicos, apresentam também atividade antihistamínica, espasmolítica e antiviral (VARTIA, 1973).

Odabasoglu et al. (2006) referem que o ácido úsnico pode ter um efeito gastroprotetor devido à redução do dano oxidativo e infiltração de neutrófilo nos tecidos. Em outro trabalho, Odabasoglu et al. (2005) verificaram que o líquen da espécie *P. rufescens* possui maior atividade antioxidante que as espécies *Bryoria fuscescens*, *Dermatocafron intestiniformis* e *Pseudeyernia furfuracea*.

Muitas espécies de *Cladonia* foram usadas no tratamento da tuberculose pulmonar (VARTIA, 1973). As ações anti-inflamatória, analgésica e antipirética parecem estar relacionadas com a inibição da síntese de prostaglandinas devido aos efeitos de desacoplamento sobre a fosforilação oxidativa (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Pelo fato dos leucotrienos (LT), produtos do metabolismo da via 5-lipoxigenase (5-LO) do ácido araquidônico, desempenhar um importante papel em diversos estados fisiopatológicos em humanos (FORD-HUTCHINSON, 1989; JONES et al., 1989; WASSERMAN et al., 1991), particularmente naqueles envolvendo inflamação, talvez estes mediadores possam ser influenciados por compostos derivados de líquens (KUMAR; MULLER, 1999). Além disso, duas pequenas moléculas derivadas do metabolismo dos líquens, ácido protoliqueterínico e ácido lobárico, demonstraram inibir a 5-LO em leucócitos suínos (OGMUNDSÓTTIR et al., 1998). Os depsídeos liquênicos (ex.: atranorina) são descritos inibir a biossíntese de prostaglandinas (SANKAWA et al., 1982) (Fig. 6).

Entretanto, dados da literatura sobre a atividade biológica destes compostos de ocorrência natural são escassos. Isto se deve, parcialmente, às dificuldades encontradas com a coleta em quantidade suficiente de material, visto que a maioria

das espécies de líquens crescem como porções dispersas, principalmente sobre pedras ou troncos de árvores.

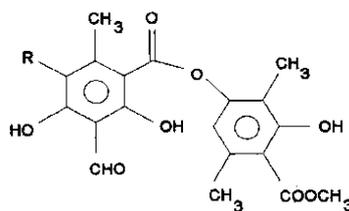


Fig. 6. Estrutura molecular plana da atranorina (depsídeo). Fonte: HONDA & VILEGAS, 1998.

2.4 Descrições dos testes farmacológicos e da atividade antioxidante

2.4.1 Contorções abdominais

Depois da injeção de um agente irritante por via intraperitoneal, o rato ou o camundongo apresenta uma resposta característica, que consiste de contração da musculatura abdominal acompanhada de estiramento dos membros posteriores e, algumas vezes, de torção do tronco. Quando uma substância tem uma longa latência, como o ácido acético ou fenilbenzoquinona, pode-se supor que sua ação seja indireta, possivelmente por liberação de uma substância endógena que excita as terminações nervosas (COLLIER et al., 1968).

2.4.2. Formalina

O teste da formalina foi introduzido por Dubuisson e Dennis (1977) quando demonstraram que após uma injeção de formalina, os ratos apresentavam uma resposta de dor bifásica: uma fase inicial e uma fase tardia. O uso de drogas narcóticas, como a morfina, inibe tanto a primeira como a segunda fase. Entretanto, a

segunda fase também pode ser inibida por drogas de ação periférica, como o ácido acetilsalicílico (SHIBATA et al., 1989).

Segundo Murray, Porreca e Cowan (1988), esta avaliação foi adaptada posteriormente para camundongos por Hunskaar et al. (1985). A formalina, diluída entre 1 a 5%, é aplicada na superfície plantar de uma das patas traseiras, e o tempo que o camundongo gasta lambendo a pata afetada é parâmetro de dor, sendo esse tempo de lambida considerado nos 5 primeiros minutos (fase inicial) e no intervalo de 20 a 30 minutos (fase tardia) após a injeção de formalina.

2.4.3 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, no método descrito por Matos et al. (2003), é induzida pela administração de 0,25 mL do agente flogístico carragenina (1% em salina) por via intraperitoneal. Após quatro horas os animais são sacrificados e recebem 2 mL de PBS heparinizado (10 UI/mL) em suas cavidades peritoneais. A contagem de leucócitos total é realizada em câmara de Neubauer, com as amostras de PBS recuperadas após leve massagem da cavidade peritoneal.

2.4.4 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante (DPPH)

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•]), de coloração purpúrea que absorve a 515 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R[•]), o DPPH[•] é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante, também denominado de

percentual de inibição (PI), ou poder sequestrador de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional. A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial do radical DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀) ou concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH[•] por uma amostra, menor será a sua CI₅₀ e maior será a sua atividade antioxidante (MOLYNEUX, 2004; SOUSA et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar estudos farmacológicos e químicos com o extrato hidroalcoólico da *Cladonia clathrata* (EHCc) a fim de se verificar possíveis efeitos anti-inflamatório, antinociceptivo e antioxidante que possam ser úteis na saúde coletiva.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a dosagem de fenóis totais no EHCc;
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva do EHCc nos modelos *in vivo* de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e teste da formalina em camundongos;
- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória do EHCc no modelo *in vivo* de peritonite induzida por carragenina em camundongos;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do EHCc no modelo *in vitro* de análise quantitativa, usando-se o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e drogas

Ácido acetilsalicílico (AAS), ácido gálico, butil-hidroxi-tolueno (BHT), carragenina, dexametasona, 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e morfina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A.). O ácido acético obtido da Merck (Damstadt, Alemanha) e a formalina da Baker (Santo Amaro, SP, Brasil). Os solventes foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Todas as substâncias usadas foram dissolvidas em solução salina a 0,9%, com as exceções do AAS que foi dissolvido em Tween 80 a 5% em solução de NaCl a 0,9%, e ácido gálico, BHT e DPPH que foram dissolvidos em metanol. A concentração final do tween 80 não excedeu a 5%, não apresentando nenhum efeito *per se*.

4.2 Material botânico

Os líquens *Cladonia clathrata* foram coletados no município de Itabaiana, Estado de Sergipe (10°44'S, 37°23'W), em março de 2007. O material botânico foi identificado pelo Prof. Dr. Marcelo Pinto Marcelli do Instituto de Botânica de São Paulo/SP e depositado com o *voucher* de número SP 393248. Antes da extração, os líquens foram secos a 40°C, em estufa com circulação e renovação de ar (Marconi MA-037) por 24 h.

4.3 Preparação do extrato

Os talos secos da *C. clathrata* foram triturados até produzir um pó fino. O EHCc foi obtido por maceração, de 200 g da amostra dissolvidos em 1 L de álcool a

70% (formulação de tintura), à temperatura ambiente e sob agitação, durante 10 dias. Posteriormente, o material foi filtrado à pressão reduzida, o solvente removido usando-se um rotaevaporador e a massa semi-sólida seca em dessecador. O resíduo sólido resultante (EHCc) foi estocado a 5°C até ser ressuspensão em diferentes concentrações com salina.

A dose e o volume administrados foram calculados como descrito a seguir:

Massa total = soma do peso de 6 camundongos / dose

a) Dose:

100, 200 ou 400 mg 1000 g

X (mg)..... massa total do grupo / dose

X = Valor (mg)

b) Volume:

0,1 mL 10 g

Y (mL)..... massa total do grupo / dose

Y = Valor (mL)

c) Dose extrapolada para administração / grupo:

X (mg)..... Y (mL)

Z (mg)..... (Y + 1) mL

Z = Valor (mg)

4.4 Fenóis totais

A análise quantitativa dos fenóis totais foi baseada no método descrito por Bonoli et al. (2004), com pequenas modificações. O EHCc (10 mg) foi dissolvido em metanol (10 mL). Uma alíquota de 7,5 mL foi diluída em 42,5 mL de metanol, e 100 µL desta solução foram adicionados a 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu

(diluído 1:10 com água destilada) e agitado por 1 min. Posteriormente, 2 mL de solução de Na_2CO_3 a 20% foram adicionados e a amostra agitada novamente por 30 s. Após 2 h, a absorbância foi lida a 750 nm. O ácido gálico foi usado para obter uma curva de calibração. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 $\mu\text{g/mL}$). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 809,0200A + 5,0827$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 750 nm; o coeficiente de correlação foi de $R = 0,999$. As medidas foram realizadas em triplicata. O resultado está expresso como mg de ácido gálico/g de EHCc \pm desvio padrão.

4.5 Animais experimentais

Foram usados camundongos Swiss adultos jovens (20-30 g), de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central da UFS. Os animais foram alojados em caixas plásticas padronizadas, separados de forma randômica por grupos e sexos (10 camundongos/caixa), e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia, em ambiente aclimatizado à $21 \pm 2^\circ\text{C}$, sob ciclo natural claro e escuro, por pelo menos 2 dias para aclimação. Ofereceu-se ração e água *ad libitum*. Os animais tiveram sua alimentação retirada 12 h antes dos experimentos, tendo sido fornecido durante este período água, e ambientados no laboratório de experimentação por 2 h. Todos os procedimentos adotados foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisas com Animais (CEPA) da UFS (protocolo 26/07 aprovado em 02/08/2007, Anexo 1).

4.6 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.6.1 Teste das contorções abdominais

O EHCc, nas doses de 100, 200 ou 400 mg/Kg, foi administrado por via oral (v.o., 0,1 mL/10 g de peso) 60 min antes da estimulação algésica ($n = 6$). Um grupo de camundongos (controle padrão) recebeu ácido acetilsalicílico (AAS, 300 mg/Kg de peso, v.o., 60 min antes, $n = 6$), e um outro grupo de animais (controle negativo) recebeu apenas salina (v.o., 60 min antes, $n = 6$). Após os 60 min, os animais receberam o agente nociceptivo, uma solução de ácido acético a 0,6% (0,1 mL/10 g), por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida o número das contorções abdominais foi observado, em câmaras individuais, por um período de 20 min, iniciando logo após a administração do ácido acético (KOSTER; ANDERSON; BEER, 1959).

4.6.2 Teste da formalina

Grupos de camundongos ($n = 6$) foram pré-tratados por v.o. com o EHCc (100, 200 ou 400 mg/Kg) 60 min antes da administração de formalina. Grupos separados de animais, usados como controles padrão, receberam pré-tratamento com morfina (10 mg/Kg, i.p., 30 min antes, $n = 6$) ou AAS (300 mg/Kg, v.o., 60 min antes, $n = 6$), e um grupo, usado como controle negativo, recebeu apenas salina (0,1 mL/10 g, v.o., 60 min antes, $n = 6$). Posteriormente ao pré-tratamento, os animais receberam uma solução de formalina a 1% (20 μ L), injetada por via s.pl. em uma das patas posteriores. O tempo que o animal passou lambendo e/ou mordendo sua pata foi cronometrado em dois períodos: durante a primeira fase (0-5 min após a injeção de formalina) e durante a segunda fase (20-25 min após a injeção de formalina) (DUBUISSON; DENNIS, 1977).

4.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.7.1 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos

A atividade anti-inflamatória foi estudada usando-se o modelo de peritonite induzida pela injeção i.p. de carragenina a 1%, administrada no volume de 0,25 mL por animal (MATOS et al., 2003).

O EHCc, nas doses de 100, 200 ou 400 mg/Kg ($n = 6$), foi administrado por v.o. 60 min antes da injeção da carragenina. Outros grupos de animais receberam dexametasona (2 mg/Kg, s.c., $n = 6$, controle padrão) ou salina (v.o., $n = 6$, controle negativo) 60 min antes do agente inflamatório. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg, i.p.) e eutanasiados por deslocamento cervical 4 h após a injeção de carragenina. Logo após, injetou-se salina contendo 1 mM de EDTA (i.p., 3 mL) e uma breve massagem feita para coleta do fluido peritoneal, que foi centrifugado (2.000 rpm, 5 min) a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 300 μ L de salina. Uma alíquota de 10 μ L desta suspensão foi diluída em 190 μ L de solução de Turk e as células totais contadas em câmara de Neubauer sob microscópio ótico. Os resultados estão expressos como número de neutrófilos/mL. A porcentagem de inibição leucocitária = $(1 - T/C) \times 100$, onde T representa a contagem de leucócitos nos grupos tratados e C representa a contagem de leucócitos no grupo controle.

4.8 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante

4.8.1 Método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•])

A análise quantitativa da atividade antioxidante utilizada foi baseada no método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Sanchez-Moreno et

al. (1998), com pequenas modificações. O sequestro do radical livre DPPH foi acompanhado pelo monitoramento da diminuição na absorbância a 515 nm, a qual ocorre devido a redução pelo antioxidante.

Uma solução estoque do radical DPPH na concentração de 100 µg/mL foi preparada em metanol, diluições para obter as concentrações finais de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 65 e 70 µg/mL foram realizadas e usadas na curva-padrão. A absorbância de cada concentração padrão foi monitorada em um espectrofotômetro (UV BEL Photonics 1105) a 515 nm, tendo o metanol como o branco. As medidas foram realizadas com três repetições em intervalos de tempo de 1 min. A equação da concentração x absorbância da curva-padrão para o radical DPPH foi $C = -0,01923 + 0,0284A$, onde C é a concentração do radical DPPH no meio, A é a absorbância em 515 nm, e o coeficiente de correlação foi de $R = 0,9918$.

Soluções contendo 500 µg/mL do EHCc (5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 65 e 70 µg/mL) foram preparadas em metanol. O desaparecimento do radical DPPH[•] foi monitorado pela diminuição na absorbância em 515 nm, que foi observada após 0, 1, 5 e 10 min, e subsequentemente a cada 10 min até completar 1 h (SOUSA et al., 2007). Metanol puro, utilizado para dissolver as amostras, foi o controle negativo. Os controles referências utilizados foram ácido gálico e butilhidroxitolueno (5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL) dissolvidos em metanol. A mistura de metanol e EHCc foi usada como branco.

A concentração do radical DPPH na mistura de reação foi calculada baseando-se na curva-padrão, onde a concentração do radical DPPH é expressa em µg/mL. O percentual restante do radical DPPH (%DPPH_{REM}) foi calculado de acordo com Brand-Willams, Cuvelier e Berset (1995): $\%DPPH_{REM} = [DPPH]_T / [DPPH]_{T_0} \times 100$, onde T é o tempo no qual as absorbâncias foram medidas (1-60 min) e T_0 é o tempo zero. O valor de CI₅₀ foi calculado plotando-se o %DPPH_{REM} nos tempos de 60 min contra 5 a 70 µg/mL da amostra de cada extrato. Os resultados estão expressos em µg antioxidante/mL do radical DPPH \pm desvio padrão da média.

Os valores de absorbância observados em todas as amostras (30 µg/mL) no tempo de 60 min foram transformados em %AA, utilizando-se a equação: $\%AA = \{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\} / Abs_{controle}$, onde $Abs_{controle}$ é a absorbância inicial da solução metanólica do radical DPPH e $Abs_{amostra}$ é a

absorbância da mistura de reação (DPPH + amostra). Os resultados estão expressos como % de inibição.

4.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada usando-se o teste de análise de variância (ANOVA) seguida de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de n (números de animais por grupo), utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0. A atividade antioxidante foi avaliada usando-se o programa Origin, versão 7.5 (Microcal, Northampton, MA, E.U.A.) e os valores estão apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições.

5 RESULTADOS

5.1 Fenóis totais

A concentração de fenóis totais foi de $371,8 \pm 57,3$ mg de ácido gálico/g de EHCc, sem contudo a verificação dos compostos fenólicos existentes.

5.2 Atividade antinociceptiva

5.2.1 Teste das contorções abdominais

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que o EHCc administrado por v.o. (100-400 mg/Kg) 60 min antes do experimento, causou uma inibição de 47,2% ($p < 0,001$), 47,2% ($p < 0,001$) e 86,4% ($p < 0,001$) sobre as contorções induzidas pelo ácido acético nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg, respectivamente ($n = 6$ /grupo). O AAS (300 mg/Kg) exibiu significativa inibição (90,4%, $p < 0,001$) sobre as contorções abdominais, quando comparada ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da *Cladonia clathrata* nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

Composto	<i>n</i>	Dose (mg/Kg)	Nº de contorções ± E.P.M.	% de inibição de contorções
Controle	6	-	20,8 ± 1,4	-
AAS	6	300	2,0 ± 0,9	90,4*
EHCc	6	100	11,0 ± 1,3	47,2*#
EHCc	6	200	11,0 ± 2,1	47,2*#
EHCc	6	400	2,8 ± 1,3	86,4*

* $p < 0,001$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,01$ em relação a dose de 400 mg/Kg ou grupo AAS (ANOVA seguida de Tukey).

5.2.2 Teste de formalina

Na Fig. 7 observa-se que o EHCc quando administrado oralmente (100–400 mg/Kg, 60 min antes do experimento, $n = 6$ /grupo) produziu uma significativa inibição em ambas as fases da dor, neurogênica (primeira fase) e inflamatória (segunda fase), após administração s.pl. em camundongos de formalina. O EHCc inibiu a primeira fase na dose de 400 mg/Kg ($p < 0,001$) e a segunda fase nas doses de 200 ($p < 0,01$) e 400 mg/Kg ($p < 0,001$). O AAS (300 mg/Kg, v.o., 60 min antes) causou inibição apenas na segunda fase da nocicepção induzida pela formalina ($p < 0,001$, $n = 6$) (Fig. 7). A morfina (10 mg/Kg, i.p., 30 min antes) causou inibição significativa em ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina ($p < 0,001$, $n = 6$) (Fig. 7).

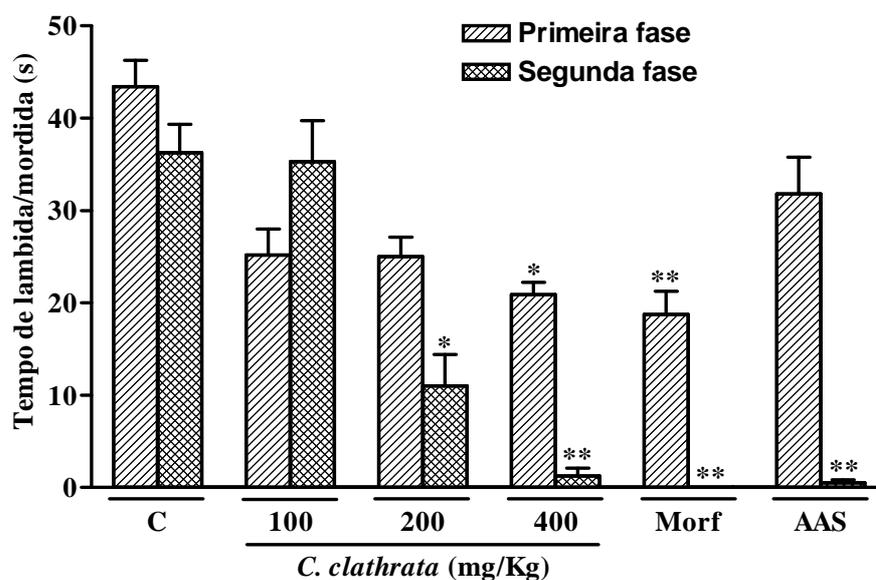


Fig. 7. Efeito do EHCc no comportamento nociceptivo de camundongos no modelo de nocicepção induzido pela formalina. Os grupos de animais foram pré-tratados com salina (C, grupo controle, 0,1 mL/10 g, v.o., 60 min antes), AAS (300 mg/Kg, v.o., 60 min antes), morfina (Morf, 10 mg/Kg, i.p., 30 min antes do estímulo químico) ou EHCc (100–400 mg/Kg, v.o., 60 min antes), contra a primeira fase (0-5 min) ou fase tardia (20-25 min) da nocicepção induzida por formalina. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$, em relação ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ /grupo).

5.3 Atividade anti-inflamatória

5.3.1 Peritonite induzida por carragenina em camundongos

O efeito anti-inflamatório do EHCc (100, 200 e 400 mg/Kg) foi avaliado no modelo de peritonite induzida por carragenina (1%, 0,25 mL) em camundongos ($n = 6$ /grupo). Como se observa na Tabela 2, a carragenina foi capaz de induzir migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos 4 h após o estímulo. O EHCc apresentou efeito inibitório de 41,5% sobre a resposta induzida pela carragenina na dose de 400 mg/Kg ($p < 0,001$, $n = 6$) (Tabela 2). O resultado obtido em relação ao controle negativo dá suporte ao efeito do EHCc, visto que a salina não apresenta atividade, e o controle padrão dexametasona (2 mg/Kg, s.c., 60 min antes, $n = 6$) inibiu a migração de leucócitos induzida pela carragenina para a cavidade peritoneal em 57,4% ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da *Cladonia clathrata* sobre a peritonite aguda induzida por carragenina em camundongos

Composto	n	Dose (mg/Kg)	Nº de leucócitos x 10^6 /mL \pm E.P.M.	% de inibição da migração de leucócitos
Controle	6	-	18,7 \pm 0,9	-
Dexametasona	6	2	8,0 \pm 0,9	57,4*
EHCc	6	100	17,7 \pm 1,4	5,6
EHCc	6	200	15,8 \pm 0,7	15,5
EHCc	6	400	10,9 \pm 0,8	41,5*

* $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de Tukey).

5.4 Atividade antioxidante

5.4.1 Teste do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

O EHCc (30 $\mu\text{g/mL}$, 60 min, triplicata) consumiu 25,76% do radical DPPH (Tabela 3). O EHCc apresentou uma resposta inferior aos controles positivos, ácido gálico e BHT (superior a 96%, 30 $\mu\text{g/mL}$, 60 min, triplicata, Tabela 3). Mesmo quando o EHCc foi utilizado na concentração de 70 $\mu\text{g/mL}$, observou-se um consumo de apenas 50,19% do radical DPPH.

De acordo com os valores de CI_{50} no tempo de 60 min, a concentração de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial do radical DPPH é muito maior para o EHCc ($77,39 \pm 5,03 \mu\text{g/mL DPPH}$) quando comparado ao apresentado pelos compostos referências ácido gálico e BHT ($9,33 \pm 0,22$ e $12,33 \pm 3,25 \mu\text{g/mL DPPH}$, respectivamente, triplicata, Tabela 3).

Tabela 3. Atividade sequestradora de radical livre DPPH* para o EHCc com os valores de CI_{50} (concentração inibitória para 50%) e PI (percentual inibitório)

Amostras	PI (%)*	CI_{50} ($\mu\text{g/mL DPPH}$)**
EHCc	25,76	$77,39 \pm 5,03^b$
Ácido gálico	96,24	$9,33 \pm 0,22^a$
BHT	96,91	$12,33 \pm 3,25^a$

Letras pequenas diferentes significam diferenças estatísticas com $p < 0,05$ (triplicata; ANOVA seguida de Tukey).

*PI - amostras na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 60 min.

** CI_{50} – no tempo de 60 min.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que o EHCc apresenta propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória com ação antioxidante, e mostra algumas evidências dos possíveis mecanismos implicados nestes efeitos.

Este estudo mostra pela primeira vez que o EHCc, quando administrado por via oral, é capaz de produzir um efeito antinociceptivo, demonstrado no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este método é sensível aos analgésicos não esteroidais (AINEs), analgésicos narcóticos e outras drogas de ação central (COLLIER et al., 1968). Os resultados apresentados neste estudo confirmam estudo prévio da literatura (COLLIER et al., 1968), o qual demonstra que o AAS causa significativa inibição da nociceção induzida pelo ácido acético.

A literatura sugere que o ácido acético age através da liberação de mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptores (COLLIER et al., 1968). Ribeiro et al. (2000) demonstraram que a atividade nociceptiva do ácido acético pode ser devido à liberação de citocinas, tais como fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-8, por macrófagos e mastócitos peritoneais residentes. Portanto, os resultados apresentados em estudos prévios e em nossos achados podem indicar que a ação antinociceptiva do EHCc nas contorções abdominais induzidas por ácido acético pode ser devido à inibição da liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-8 por células peritoneais residentes. Entretanto, esta possibilidade necessita ser investigada em estudos futuros.

O EHCc mostrou inibição similar ao AAS, na resposta nociceptiva visceral induzida pelo ácido acético a 0,6%, quando administrado oralmente (100, 200 e 400 mg/Kg). Estes resultados se assemelham aos estudos de Melo et al. (2008) onde se observou que o composto atranorina, extraído da *Cladina kalbii*, foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais (52,6 e 61,3% nas doses de 200 e 400 mg/Kg, respectivamente) e reduzir o tempo de lambida de pata na segunda fase do teste da formalina (50,3 e 64,8% nas doses de 200 e 400 mg/Kg, respectivamente), devido à atuação periférica sobre mediadores inflamatórios, especialmente prostaglandinas.

Como o teste de contorções abdominais é inespecífico, não estabelecendo se a ação é sobre receptores centrais ou periféricos, foi necessária a utilização do teste

de formalina para tentar responder a esta inespecificidade. Estudos prévios têm demonstrado que a formalina age liberando vários mediadores inflamatórios tais como substância P, neurocininas A e B, e prostaglandinas (HUNSKAAR; BERGE; HOLE, 1986; HUNSKAAR; HOLE, 1987; SANTOS; CALIXTO, 1997), em duas fases: uma fase neurogênica (primeira fase) e uma fase inflamatória (segunda fase; HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; HUNSKAAR; HOLE, 1987). A fase inicial se deve a ação direta sobre os nociceptores e pode ser inibida por analgésicos de ação central, enquanto a segunda fase pode ser devida a uma resposta inflamatória, parcialmente mediada pelas prostaglandinas, e inibida por drogas esteroidais e não-esteroidais, como também por drogas de ação central (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Mesmo usando uma pequena concentração de formalina, a fase inicial da resposta é insensível a drogas anti-inflamatórias não-esteroidais. A fase tardia é diferente qualitativamente da fase inicial e a resposta, ao menos em parte, é devida à inflamação. Se a fase inicial é a desejada na investigação, concentrações de formalina igual ou inferior a 0,2% são recomendadas para evitar inflamações, e assim reduzir o sofrimento do animal. Se a fase tardia é o objetivo da investigação, concentrações de formalina em torno de 1% ou maiores devem ser usadas. Contudo, a habilidade de demonstrar efeito de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais pode ser perdida se a concentração de formalina for muito grande (ROSLAND et al., 1990).

Neste estudo mostrou-se que o EHCc, quando administrado por via oral, produz inibição sobre a primeira fase (nocicepção neurogênica) e a segunda fase (nocicepção inflamatória) no teste de formalina em camundongos, similar a ação da morfina.

Os resultados deste estudo confirmam dados da literatura mostrando que a morfina é eficiente em inibir as duas fases da nocicepção induzida pela formalina. A morfina e outras drogas opióides exercem suas atividades antinociceptivas agindo em receptores (μ , κ , and δ) e, possivelmente, modulando a transmissão do estímulo doloroso sem interferir na causa. Dois fatores podem afetar a potência da morfina neste modelo experimental, o regime de administração e a concentração de formalina. Parece que alguma atividade neural limita o efeito da morfina nos comportamentos induzidos pela formalina (SEVOSTIANOVA et al., 2003).

Está bem estabelecido que os AINEs (tais como AAS, paracetamol e diclofenaco), conhecidos por inibir a atividade da enzima COX, são ineficientes ou causam fraca inibição da primeira fase do teste de formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987; MALMBERG; YAKSH, 1992; SANTOS et al., 1998). Entretanto, os AINEs podem atenuar de maneira dose-dependente a segunda fase da nocicepção (HUNSKAAR; HOLE, 1987; MALMBERG; YAKSH, 1992; SANTOS et al., 1998). A inibição da nocicepção na segunda-fase do teste de formalina é um modelo experimental com capacidade de identificar uma provável atividade anti-inflamatória de uma substância, que apresenta a participação efetiva de mediadores pró-inflamatórios. Entretanto, a intensidade do estímulo nocivo induzido pela formalina é tanta, que nem todos agentes que inibem a síntese de prostaglandina são analgésicos, neste modelo experimental (MURRAY; PORRECA; COWAN, 1988).

Para Shibata et al. (1989) a dessensibilização pela capsaicina do nervo ciático produz analgesia na primeira fase, mas não na segunda fase do teste de formalina. Neste estudo sugere-se que a substância P deve estar relacionada à resposta da formalina na fase inicial. O inibidor de bradicinina inibe tanto a primeira fase quanto a segunda fase da resposta, portanto pode-se inferir que a bradicinina está sendo liberada na reação de injúria induzida pela formalina. Infere-se também neste artigo que a estimulação pela formalina leve a liberação de substância P mediada por reflexo axonal, e a substância P pode exercer seu papel através de cooperação com bradicinina na primeira fase da resposta, contudo há possibilidade que a bradicinina não seja tão importante nesta fase. Estes autores, partindo do princípio que prostaglandina e a bradicinina cooperam para produzir a segunda fase da resposta, concluíram nesta pesquisa que a fase inicial seja iniciada pela estimulação direta das terminações nervosas pela formalina, seguida de liberação de substância P, e a segunda fase seja, principalmente, devida à subsequente inflamação.

Estudos sugerem que a adenosina trifosfato (ATP) na coluna espinal é um substrato endógeno indutor de dor, resultante de ativação direta de fibras aferentes primárias por irritantes (dor neurogênica) e da hiperatividade das fibras aferentes primárias pela inflamação (dor inflamatória). Há evidências que subtipos de receptores P2X sensíveis aos antagonistas PPADS (ácido piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfônico; antagonista seletivo de receptor P2) e TNP-ATP (2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil)adenosina 5'-trifosfato; antagonista seletivo de receptores P2X₁,

P2X₃ e P2X₂₊₃) desempenham um importante papel na dor neurogênica, enquanto subtipos de receptores P2X (e/ou P2Y) sensível ao antagonista PPADS e insensível ao antagonista TNP-ATP possam estar envolvidos na dor inflamatória induzida pela formalina (TSUDA; UENO; INOUE, 1999).

Portanto, os resultados sugerem que o EHCc pode apresentar efeito antinociceptivo através de mecanismos mediados por receptores opióides e/ou inibição da COX, e conseqüentemente da síntese de prostaglandinas. Entretanto, a possibilidade deste extrato estar agindo via receptores opióides e/ou COX precisa ser testada em experimentos futuros.

Para compreender melhor os mediadores inflamatórios, através do estudo iniciado com o teste de formalina, o efeito anti-inflamatório do EHCc foi também avaliado no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos. A carragenina é um colóide obtido por extração em fase aquosa de variedades naturais de algas das famílias Gigartinaceae, Solieriaceae, Hypneaeceae e Furcellariaceae da classe Rhodophyceae (algas vermelhas). Sua administração promove intensa vasodilatação e extravasamento plasmático pela liberação de mediadores, que contribuem também na intensa migração celular para o sítio inflamatório.

No presente estudo, demonstrou-se que o tratamento oral com o EHCc, na dose de 400 mg/Kg, foi efetivo em reduzir a resposta inflamatória ativada pela carragenina em camundongos, 4 h após a injeção do agente flogístico, de forma similar ao observado com a dexametasona, uma droga anti-inflamatória esteroideal. A dexametasona e outros glicocorticóides inibem a liberação de mediadores inflamatórios de várias células, em particular leucócitos, mastócitos, plaquetas, células endoteliais e macrófagos residentes, mas também são potentes inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS) induzível (macrofágica) (KLIMENKO; PAVLOVA, 1999). Segundo Omarsdottir, Glafsdottir e Freysdottir (2006) os polissacarídeos derivados dos líquens possuem atividade imunorregulatória.

O recrutamento de células durante a inflamação depende da liberação de mediadores locais, os quais são responsáveis pelas mudanças locais, vascular e tecidual, bem como pelo recrutamento de células defensoras do hospedeiro (LUSTER et al., 2005). A inflamação induzida pela carragenina envolve a migração celular, extravasamento plasmático e produção de mediadores, tais como óxido nítrico (NO), prostaglandina E₂, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (LORAM et al., 2007;

SALVEMINI et al., 1996). Estes mediadores são capazes de recrutar leucócitos, tais como neutrófilos, em vários modelos experimentais. O EHCc inibiu a migração leucocitária induzida pela injeção i.p. de carragenina, no modelo de peritonite. Um possível mecanismo associado com esta atividade pode ser a inibição da síntese de muitos mediadores inflamatórios, cujo envolvimento na migração celular está bem estabelecido.

Várias substâncias fenólicas são descritas na literatura como responsáveis por diversas atividades biológicas de produtos naturais. Observa-se neste estudo que o EHCc apresentou grande quantidade de fenóis totais. Xantonas, compostos polifenólicos, possuem inúmeras atividades biológicas tais como antioxidante, anti-hipertensiva, inibidora de agregação plaquetária, antiulcerosa e anti-inflamatória (PERES, NAGEM, DE OLIVEIRA, 2000; LIBROWSKI et al., 2005). Estudos mostram que a atividade de compostos fenólicos se deve principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química (SOUSA et al., 2007). Vários estudos mostram a importância de compostos fenólicos como agentes antioxidantes, uma vez que o esqueleto de seus carbonos aromáticos é adequado para a estabilidade de radicais livres, tais como DPPH. Entretanto, a composição e o grau de hidroxilação são fatores importantes para a atividade antioxidante (LARRAURI et al., 1996).

Quando se compara os resultados apresentados neste estudo com dados da literatura, onde utilizaram extratos de outras espécies de líquens, apesar das metodologias serem diferentes pode-se observar que a *C. clathrata* apresentou 37,1% de fenóis totais, diferentemente de outras espécies: *Parmelia saxatilis* (1,0%), *Platismatia glauca* (1,1%), *Ramalina pollinaria* (1,0%), *Ramalina polymorpha* (0,8%), *Umbilicaria nylanderiana* (3,0%), *Umbilicaria esculenta* (1,4%) e *Usnea longissima* (2,6%) (GULLUCE et al., 2006; KIM; CHO, 2007).

Em estudo com extratos de três espécies de líquens (*Usnea longissima* Ach., *Usnea florida* (L.) Weber ex Wigg. e *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm) observou-se que todos apresentaram atividade antioxidante com correlação com a quantidade de fenóis totais (ODABASOGLU et al., 2004).

Diante do exposto, e visto as células de defesa através de suas enzimas oxidativas, a saber, radicais livres, quando produzidas em excesso, serem capazes de provocar uma piora na resposta inflamatória, lesando tecidos indistintamente, resolveu-se avaliar o potencial antioxidante do EHCc.

As vantagens de se usar o método de sequestro do radical livre DPPH estão relacionadas à rapidez, a sensibilidade, a não relação com a polaridade das amostras testadas e ao fato de não requerer instrumentos especiais. Segundo a literatura, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI_{50} e maior a sua atividade antioxidante (MOLYNEUX, 2004; SOUSA et al., 2007).

A capacidade sequestradora de radicais livres, avaliada pela técnica quantitativa do radical livre DPPH, demonstrou que o EHCc apresenta valores de CI_{50} de $77,39 \pm 5,03 \mu\text{g/mL}$ de DPPH e PI de 25,76% com $30 \mu\text{g/mL}$ da amostra. Em comparação com dados da literatura, apesar da metodologia ser diferente do estudo do EHCc, a espécie de líquen *Umbilicaria nylanderiana* (Zahlbr.) H. Magn apresentou CI_{50} de $400,2 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ de DPPH (GULLUCE et al., 2006). Portanto, é plausível considerar que o EHCc apresenta atividade antioxidante, quando comparado a outros extratos de líquens, apesar dessa atividade ser inferior a dos compostos referências (ácido gálico e BHT).

Visto o EHCc apresentar atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, é provável que haja uma relação entre estas atividades com a atividade antioxidante observada neste estudo e com a presença de fenóis.

Este trabalho contribui para uma melhor compreensão de alguns efeitos farmacológicos e bioquímicos da *C. clathrata*, tais como ações antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante.

7 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- O EHCc apresenta grande quantidade de fenóis determinada no teste de fenóis totais quando comparados com outros líquens;
- O EHCc apresenta atividade antinociceptiva, reduzindo o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético;
- O EHCc produz inibição em ambas as fases da nocicepção no teste de formalina: primeira fase – nocicepção neurogênica e segunda-fase - nocicepção inflamatória;
- O EHCc apresenta um efeito anti-inflamatório no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos;
- Nos experimentos *in vivo* a dose de 400 mg/Kg do EHCc produziu efeitos semelhantes aos padrões positivos utilizados;
- O EHCc apresenta um forte potencial antioxidante, demonstrado no ensaio de sequestro do radical livre DPPH, quando comparado a outras espécies de líquens;
- As ações farmacológicas (antinociceptiva e anti-inflamatória) apresentadas pelo EHCc podem ser atribuídas, em parte, a inibição da COX e a síntese de prostaglandinas, bem como a mecanismos envolvendo receptores opióides. Estas ações podem ainda estar relacionadas à ação antioxidante e a presença de fenóis relatadas neste estudo.

8 PERSPECTIVAS

É necessário que estudos adicionais sejam realizados com o EHCc, utilizando antagonistas e/ou inibidores farmacológicos, na tentativa de esclarecer mecanismos de ação, e com isso estabelecer maiores critérios de eficácia e segurança, colaborando assim como uma fonte promissora de novos medicamentos obtidos a partir de produtos naturais.

Recomenda-se a realização com o EHCc do teste da placa quente, utilizado para analisar a presença de substâncias de ação central, visto o extrato apresentar atividade na primeira fase do teste da formalina. Os testes de edema de pata, induzidos por carragenina e ácido araquidônico, podem ajudar a estabelecer vias de mediadores inflamatórios onde o EHCc atua.

Um estudo relacionando as concentrações de 100, 200 e 400 mg/Kg com a quantidade de fenóis totais seria importante para se verificar uma possível relação entre fenóis totais e atividades biológicas.

Coletas e análises químicas em várias épocas do ano poderiam trazer clareza entre a relação compostos químicos e atividades biológicas, além da possibilidade de se encontrar compostos ainda desconhecidos.

Faz-se necessário a preservação de espaços naturais como a Serra de Itabaiana/SE, visto que certos compostos não são reproduzidos artificialmente com facilidade pelo homem, como os que são produzidos em seres vivos tais como os líquens.

9 REFERÊNCIAS

ADAM, W.W.; DEMMING-ADAMS, B.; LANGE, O.L. Carotenoid Composition and Metabolism in Green and Blue-Green Algal Lichens in the Field. **Oecologia**, v. 94, n. 4, p. 576-584, 1993.

AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1993.

AHTI, T. Cladoniaceae. In: **Flora Neotropica Monograph 78**. New York: New Botanical Garden, 2000. 302 p.

ALLER, M.A; ARIAS, J.L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J.I. The Inflammatory Response: an efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, n.10, p. 225 – 234, 2006.

ALLER, M.A; ARIAS, J.L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J.I. The Inflammatory Response Recapitulates Phylogeny through Trophic Mechanisms to the Injured Tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 202 – 209, 2007.

ANDRADE, C.A; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do Conteúdo Fenólico e Avaliação da Atividade Antioxidante de Acácia podalyriifolia A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.2, p. 231-235, 2007.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas de extração. B. CEPPA, **Curitiba**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

BACKOR, M.; FAHSELT, D. Physiological attributes of the lichen *Cladonia pleurota* in heavy metal-rich and control sites near Sudbury (Ont., Canada) **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, n.2, p.149-159, 2004.

BARINAGA, M. Origins of lichen fungi explored. **Science**, v. 268, n. 5216, p. 1437, 1995.

BEHERA, B.C.; VERMA, N.; SONONE, A.; MAKHIJA, U. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* *in vitro*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n.14, p. 991-995, 2005.

BENATTI, M.N.; MARCELLI, M.P. Gêneros de Fungos Liquezados dos Manguezais do Sul-Sudeste do Brasil, com Enfoque no Manguezal do Rio Itanhaém, Estado de São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**, v.21, n.4, p.863-878, 2007.

BENJAMIM, C.F. Atualização sobre Mediadores e Modelos Experimentais de Sepse. **Revista Medicina Ribeirão Preto**, v. 34, p. 18-26, 2001.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M.F. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 5195–5200, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Tchnologie**, v. 28, p.25-30, 1995.

BÜDEL, B. Taxonomy of Lichenized Procaryotic Blue-Green Algae. In: REISSER, W. (Ed.) **Algae and Symbiosis**. Bristol: Biopress, 1992. p. 301-324.

CARBONERO, E.R.; SASSAKI, G.L.; STUELP-CAMPELO, P.M.; GORIN, P.A.J.; WORANOVICZ-BARREIRA, S.M.; IACOMINI, M. Comparative Studies of the Polysaccharides Isolated from the Lichenized Fungi of the Genus *Cladonia*: significance as chemotypes. **FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters**, v.194, n.1, p. 65-69, 2001.

CAVALLITO, C.J.; FRUEHAUF, D.M.; BAILEY, J.H. Lactone Aliphatic Acids as Antibacterial Agents. **Journal of the American Chemical Society**, v.70, p. 3724-3726, 1948.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P.L.; GIANNI, S.A. Review on Usnic Acid, an Interesting Natural Compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, n.4, p. 137-146, 2002.

COLLIER, H.O.J.; DINNEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The Abdominal Constriction Response and its Suppression by Analgesic Drugs in the Mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 295-310. 1968.

DE LEO, J.A.; WINKELSTEIN, B.A. Physiology of Chronic Spinal Pain Syndromes from Animal Models to Biomechanics. **Spine**, v. 27, n. 22, p. 2526-2537, 2002.

DI VAIO, M.A.V.; FREITAS, A.C.C. Inflamação, Tratamento e Avanços Recentes na Terapia de Doenças Inflamatórias. **Revista de Ciências Biológicas e da Saúde**, Brasil, v. 22, n. 1, p. 37-67, 2001.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The Formalin Test: a Quantitative Study of the Analgesic Effects of Morphine, Meperidine, and Brain Stem Stimulation in Rats and Cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.

EBADI, M. **Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine-Dietary Antioxidants**. Washington: CRC. Press, 2002. Cap. 4.

ELIX, J.A. Biochemistry and Secondary Metabolites. In: NASH III, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

FILIPPIN, L.I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N.P.; XAVIER, R.M. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n.1, p. 17-24, 2008.

FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a Fat Chance? **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n.5, p. 671 – 674, 2005.

FORD-HUTCHINSON, A.W. **Leukotrienes and Lipoxygenases**. In: ROKACH, J. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 405-425.

GALUN, M. Lichenization. In: GALUN, M. **CRC Handbook of Lichenology**. v. 2. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 153-159.

GARGAS, A.; De PRIEST, P.T.; GRUBE, M.; TEHLER, A. Multiple Origins of Lichen Symbiosis in Fungi Suggested by SSU rDNA Phylogeny. **Science**, v. 268, n. 5216, p.1492-1495, 1995.

GOLA, G.; NEGRI, G.; CAPPELLETI, C. **Tratado de Botânica**. 2.ed. Barcelona, [s.n.] ,1965.p. 793-805.

GOODMAN; GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogman, 1996 Seção IV. Cap. 26 e 27.

GORIN, P.A.J.; BARON, M.; DA SILVA, M.L.C.; TEIXEIRA, A.Z.A.; IACOMINI, M. Lichen Carbohydrates. **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 27-36, 1993.

GRUBE, M.; KROKEN, S. Molecular Approaches and the Concept of Species and Species Complexes in Lichenized Fungi. **Mycological Research**, v. 104, n.11, p. 1284-1294, 2000.

GÜLÇİN, I.; OKTAY, M.; KÜFREVIÖGLÜ, O.I.; ASLAN, A. Determination of Antioxidant Activity of Lichen *Cetraria Islandica* (L) Ach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p. 325-329, 2002.

GULLUCE, M., ASLAN, A., SOKMEN, M., SAHIN, F., ADIGUZEL, A., AGAR, G., SOKMEN, A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. **Phytomedicine**, v.13, n.7, p.515-521, 2006.

HALE, M.E. **How to Know the Lichens**. 2. ed. Iowa: Brown Company Publishers, 1979.

HALE-JR., M.E. **The Biology of Lichens**. 3 ed. London Edward Arnold Pub.1983.

HAMMER, S. Notes on *Cladoniaceae* in New Zealand. **Bryologist**, v.106, n.3, p.410-430, 2003.

HAWKSWORTH, D.L.; HILL, D.J. **The Lichen Forming Fungi**. Glasgow: Blackie, 1984.

HONDA, N.K.; VILEGAS, W. A **Química dos Líquens**. Química Nova, v. 21, n. 6, p. 110-125, 1998.

HONEGGER, R. Developmental Biology of Lichens. **New Phytologist**, v. 125, n.4, p. 659-677, 1993.

HONEGGER, R. Experimental Studies with Foliose Macrolichens: Fungal Responses to Spatial Disturbance at the Organismic Level and to Spatial Problems at the Cellular Level during Drought Stress. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 569-578, 1995.

HONEGGER, R. Mycobionts. In: NASH, T.H. **Lichen Biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 24-36.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin Test in Mice, a Useful Technique for Evaluating Mild Analgesics. **Journal of Neurosciences Methods**, v.14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S., BERGE, O.G., HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v.25, p.125-132, 1986.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The Formalin Test in Mice: Dissociation between Inflammatory and Non-inflammatory Pain. **Pain**, v. 30, n.1, p. 114, 1987.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic Acid. **Phytochemistry**, v. 61 n.7, p. 729-736, 2002.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G.A.C; SKULASON, V.G; GISSURARSON, S.R; VILHELMSDÓTTIR, M. Antimycobacterial Activity of Lichen Metabolites in Vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.2, p. 141-144, 1998.

JOLY, A.B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. 2.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1975, p. 100-106.

JONES, T.R.; LETTS, G.; CHAN C-C, D.P. **Leukotrienes and Lipoxygenases**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 309-403.

KATZUNG, B.G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 8.ed. International Edition. Lang Medical Books / McGraw- Hill, 2000.

KIM, M-S.; CHO, H-B. Melanogenesis inhibitory effects of methanolic extracts of *Umbilicaria esculenta* and *Usnea longissima*. **Journal of Microbiology**, v.45, n.6, p.578-582, 2007.

KLIMENKO, N.A.; PAVLOVA, E.A. Role of Leukocytes in Increased Vascular Permeability in Inflammation **General Pathology and Pathological Physiology**, v. 128, n.8, p. 165-167, 1999.

KOLEVA, I.I.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v.13, n.1, p. 8-17, 2002.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E.J. Acetic Acid for Analgesic Screening **Federal Proceeding**, v.18, p. 412-416, 1959.

KUMAR, K.C; MÜLLER, K. Lichen Metabolites. 1. Inhibitory Action against Leukotriene B4 Biosynthesis by a Non-redox Mechanism. **Journal of Natural Products**, v. 62, n.6, p.817-20, 1999.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **ROBBINS & COTRAN. Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 49 – 79.

LARRAURI, J.A., GOÑI, I., MARTÍN-CARRÓN, N., RUPÉREZ, P., SAURACALIXTO, F. Measurement of health-promoting properties in fruit dietary fibres: Antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.71, p.515-519, 1996.

LAWREY, J.D. Biological Role of Lichen Substances. **Briologisty**, v. 89, n.2, p. 268-275, 1986.

LIBROWSKI, T., CZARNECKI, R., CZEKAJ, T., MARONA, H. New xanthone derivatives as potent anti-inflammatory agents. **Medicina (Kaunas)**, v.41, p.54–58, 2005.

LIMA, R.R.; COSTA, A.M.R.; DE SOUZA, R.D.; GOMES-LEAL, W. Inflamação em Doenças Neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v.21, n.2, p.29-34, 2007.

LINDBERG, B.; MISIORNY, A.; WACHTMEISTER, C.A. Studies on the Chemistry of Lichens. IV. Investigation of the Low-molecular Carbohydrate Constituents of Different Lichens. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 7, n. 4, p. 591-595, 1953.

LORAM, L.C.; FULLER, A.; FICK, L.G; CARTMELL, T.; POOLE, S.; MITCHELL, D. Cytokine Profiles during Carrageenan-induced Inflammatory Hyperalgesia in Rat Muscle and Hind Paw. **The Journal of Pain**, v. 8, n.2, p. 127-136, 2007.

LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U.H. Immune Cell Migration in Inflammation: Present and Future Therapeutic Targets. **Nature Immunology**, v. 6, n.12, p. 1182–1190, 2005.

MAIA, M.B.S.; SILVA, N.H.; SILVA, E.F.; CATANHO, M.T.J.; SCHULER, A.R.P.; PEREIRA, E.C. Antinociceptive Activity of Crude Extracts and Atranorin Obtained from the lichen *Cladina dendroides (des Abb) Ahti*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.21, n.4, p. 259 -264, 2002.

MALMBERG, AB.; YAKSH, T.L. Antinociceptive Actions of Spinal Nonsteroidal Anti-inflammatory Agents on the Formalin Test in the Rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 263, p. 136–146, 1992.

MARCELLI, M.P. **Fungos Liquenizados: Taxonomia e Características de Importância Taxonômica**. São Paulo: Dep. Botânica/USP, 1995.

MATOS, L.G; SANTOS, L.D.A.R; VILELA, C.F.; PONTES, I.S; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R; COSTA, E.A. Atividades Analgésica e/ou Antiinflamatória da Fração Aquosa do Extrato Etanólico das Folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13 (supl. 1), p. 15-16, 2003.

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

MEYER, K. H.; GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXI. La Constitution de La Lichénine. **Helvetica Chimica Acta**, v. 30, p. 751-761, 1947.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), for estimating antioxidant activity. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 26, n.2, p. 211-219, 2004.

MURRAY, C.W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological Refinements to the Mouse Paw Formalin Test (an Animal Model of Tonic Pain). **Journal of Pharmacological Methods**, v. 20, p. 175 -186, 1988.

NASH, T.H. **Lichen Biology**. Cambridge: United Kingdom, p. 225-233, 1996.

NATHAN, C. Points of Control in Inflammation. **Nature** – Insight Review Articles, v. 420, n. (19/26), p. 846 – 852, 2002.

NEAMATI, N.; HONG, H.; MAZUMDER, A.; WANG, S.; SUNDER, S.; NICKLAUS, M.C.; MILNE, G.W.; PROKSA, B.; POMMIER, Y. Depsides and Depsidones as Inhibitors of HIV-1 Integrase: Discovery of Novel Inhibitors through 3D Database Searching. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n.6, p. 942-951, 1997.

NISHIKAWA, Y.; MICHISHITA, K.; KURONO, G. Studies on the Water Soluble Constituents of Lichens. I. Gas Chromatographic Analyses of Low Molecular Weight Carbohydrates. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 5, p. 1014-1019, 1973.

NYSTROM, P. The Systemic Inflammatory Response Syndrome: Definitions and Etiology. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41 (A), n.1, p. 1–7, 1998.

ODABASOGLU, F.; ASLAN, A.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; KARAGOZ, Y.; BAYIR, Y.; HALICI, M. Antioxidant Activity, Reducing Power and Total Phenolic Content of Some Lichen Species. **Fitoterapia**, v. 76, n. 2, p. 216-219, 2005.

ODABASOGLU, F., ASLAN, A., CAKIR, A., SULEYMAN, H., KARAGOZ, Y., HALICI, M., BAYIR, Y. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. **Phytotherapy Research**, v.18, n.11, p.938-941, 2004.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and Antioxidant Effects of Usnic Acid on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 59-65, 2006.

OGMUNDSÓTTIR, H.M.; ZOËGA, G.M.; GISSURARSON, S.R.; INGÓLFSDÓTTIR, K. Anti-Proliferative Effects of Lichen-Derived Inhibitors of 5-Lipoxygenase on Malignant Cell-Lines and Mitogen-Stimulated Lymphocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.50, n.1, p.107-15, 1998.

OMARSDOTTIR, S.; GLAFSDOTTIR, E.S; FREYSDOTTIR, J. Immunomodulating Effects of Lichen Derived Polysaccharides on Monocyte-derived Dendritic Cells. **Internacional immunopharmacology**, v.6, n.11, p. 1642-1650, 2006.

OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K.; YAMAZAKI, M.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y. Usnic Acid and Diffractaic Acid as Analgesic and Antipyretic Components of *Usnea diffracta*. **Planta Medica**, v. 61, p. 113-115, 1995.

OSORIO, H.S. Contribution to the Lichen Flora of Uruguai XVII. The Scientific Name of the "Yerba de la Piedra". **Phytologia**, v. 52, n.4, p. 217-220, 1982.

PAUDEL, B.; BHATTARAI, H.D.; LEE, J.S.; HONG, S.J.; SHIN, H.W.; YIM, J.H. Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). **Polar Biology**, v.31, p. 605-608, 2008.

PENGSPARP, T.; CAI, L.; CONSTANT, H.; FONG, H.H.S.; LIN, L-Z.; KINGHORN, A.D.; PEZZUTO, J.M.; CORDELL, G.A.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; WAGNER, H.; HUGHES, S.H. Mechanistic Evaluation of New Plant-Derived Compounds that Inhibit HIV-1 Reverse Transcriptase. **Journal of Natural Products**, v. 58, n.7, p.1024-1031, 1995.

PERES, V., NAGEM, T.J., DE OLIVEIRA, F.F. Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v.55, p.683-710, 2000.

PRITCHARD, H.N.; BRADT, P.T. **Biology of Nonvascular Plants**. St. Louis: Times Mirror/Mosby College Publishing, 1984.p.424.

PURVIS, W. **Lichens**. Singapore: Craft Print, 2000.

RANG, H.P; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RANG, H.P; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 2460-276.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHEHORNS, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 206-210.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of Resident Macrophages and Mast Cells in the Writhing Nociceptive Response Induced by Zymosan and Acetic Acid in Mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111-118, 2000.

RIBEIRO, S.M.; PEREIRA, E.C.; GUSMÃO, N.B.; FALCÃO, E.P.; SILVA, N.H. Produção de Metabólitos Bioativos pelo Líquen *Cladonia substellata* vainio. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n.2, p. 265-272, 2006.

ROCHA E SILVA, M.; GARCIA LEME, J. Chemical Mediators of the Acute Inflammatory Reaction. In: **International series of Monographs in Pure and Applied Biology, Modern Trends in Physiological Sciences**, v. 37, p. 1-47, 2006.

ROSLAND, J.H.; TJOLSEN, A.; MAELE, B.; HOLE, K. The Formalin Test in Mice: Effect of Formalin Concentration. **Pain**, v. 42, n.2, p. 235-242, 1990.

RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Patologia Rubin: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1625 p.

RUNDEL, P.W. The Ecological Role of Secondary Lichen Metabolites. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 6, p. 157-170, 1987.

SAKLANI, A.; UPRETI, D.K. Folk Uses of Some Lichens in Sikkim. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, n.1, p. 229-233, 1992.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. Nitric oxide: a Key Mediator in the Early and Late Phase of Carrageenan-induced Rat Paw Inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.118, p. 829-838, 1996.

SÁNCHEZ-MORENO, L.J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANKAWA, U.; SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y.; NOGUCHI, H.; KINOSHITA, T.; IITAKA, Y.; ENDO, A.; KITAHARA, N. Depside as Potent Inhibitor of Prostaglandin Biosynthesis: a New Active Site Model for Fatty Acid Cyclooxygenase. **Prostaglandins**, v. 24, n.1, p.21-34, 1982.

SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v.31, p.381-389, 1997.

SANTOS, A.R.S; VEDANA, E.M.A; FREITAS, G.A.G. Antinociceptive Effect of Meloxicam, in Neurogenic and Inflammatory Nociceptive Models in Mice. **Inflammation Research**, v. 47, p. 302–307, 1998.

SEVOSTIANOVA, N.; ZVARTAU, E; BESPALOV, A; DANYSZ, W. Effects of Morphine on Formalin-induced Nociception in Rats. **European Journal of Pharmacology**, v.462, p. 109– 113, 2003.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the Inflammatory Response. **Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n.3, p. 385–405, 2004.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified Formalin Test: Characteristic Biphasic Pain Response. **Pain**, v. 38 , p. 347-352, 1989.

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNO, M.N.; FALCÃO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.M.; NOGUEIRA, F.L.P.; QUARESMA, C.H.; SILVA, J.F.M.; MENEZES, F.S.A. Evaluation of Antioxidant Activity of Brazilian Plants. **Pharmacological Research**, v. 52, n.3, p. 229-233, 2005.

SILVA, P. **Farmacologia**, 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogman, 1998.Cap.2. Seção 2 (42, 43 e 53).

SMITH, D.C. The Symbiotic Condition. **Symbiosis**, v.14, p. 3-15, 1992.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

SÜLEYMAN. H; YILDIRIM, D.; ASLAN, A.; GÖÇER, F.; GEPDIREMEN, A.; GÜVENALP, Z. An Investigation of the Antiinflammatory Effects of an Extract from *Cladonia rangiformis* HOFFM. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.1, p.10-3, 2002.

TRACEY, K.J. The Inflammatory Reflex. **Nature – Insight Review Articles**, v. 420, n. (19 /26), p. 852 – 859, 2002.

TSCHERMAK-WOESS, E. The Algal Partner. In: GALUN, M. **Handbook of Lichenology**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. I. p. 39-92.

TSUDA, M; UENO, S; INOUE, K. Evidence for the Involvement of Spinal Endogenous ATP and P2X Receptors in Nociceptive Responses Caused by Formalin and Capsaicin in Mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p.1497-1504, 1999.

VAN HERK, C.M.; APTROOT, A.; VAN DOBBEN, H.F. Long-term Monitoring in the Netherlands Suggests that Lichens Respond to Global Warming. **The Lichenologist**, v. 34, n. 2, p. 141-154, 2002.

VAN MIERT, A.S.J.P.A.M. Present Concepts on the Inflammatory Modulators with Special Reference to Cytokines. **Veterinary Research Communications**, v. 26, n.2, p. 111 – 126, 2002.

VARTIA, K.O. Antibiotics in Lichens. In: AHMADJIAN, V.; HALE, M. **The Lichens**. New York: Academic Press, 1973. p. 547–561

VICENTE, C.; RUIZ, J.L.; ESTÉVEZ, M.P. Mobilization of Usnic Acid in *Evernia prunastri* under Critical Conditions of Nutrient Availability. **Phyton (Buenos Aires)**, v. 39, p. 15-20, 1980

VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade Antioxidante de tinturas Vegetais, Vendidas em Farmácias com Manipulação e Indicadas para Diversos Tipos de Doenças pela Metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p.384-387, 2007.

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

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. **News in Physiological Sciences**, v. 15, p. 107 – 113, 2000.

WASSERMAN, M.A.; SMITH, E.F.; UNDERWOOD, D.C.; BARNETTE, M.A. **Lipoxygenases and Their Products**. In: Cooke ST, Wong A, eds.; London: Academic, 1991. p. 1-50.

WORANOVICZ, S.M.; GORIN, P.A.J.; MARCELLI, M.P.; TORRIS, G.; IACOMINI, M. Structural Studies on the Galactomannans of Lichens of the Genus *Cladonia*. **The Lichenologist**, v. 29, n.5, p. 471-481, 1997.

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

XAVIER-FILHO, L.; RIZZINI, C.T. **Manual de Liquenologia Brasileiro**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1976. 431 p.

YAMAMOTO Y.; MIURA, Y.; KINOSHITA, Y.; HIGUCHI, M.; YAMADA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K. Screening of Tissue Cultures and Thalli of Lichens and Some of Their Active Constituents for Inhibition of Tumor Promoter-induced Epstein-Barr Virus Activation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.43, p. 1388-1390, 1995.

10 ANEXOS

10.1 Parecer do comitê de ética (protocolo 26/07).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação farmacológica das atividades analgésica, antiartrítica, antiinflamatória e cicatrizante do extrato etanólico da *Cladonia clathrata*", sob coordenação do Prof. Dr. Ângelo Roberto Antonioli, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 02/08/2007.

São Cristóvão, 03 de agosto de 2007

Prof.ª, Dr.ª Flavia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloisio de Campos"
Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

10.2 Submissão do manuscrito (*Pharmaceutical Biology*).

Número do artigo:

NPHB-2008-1030

Título:

Pharmacological Properties of Lichen *Cladonia clathrata*

Nome do periódico:

Pharmaceutical Biology

De: pharmbiol@att.net 

Para: sarathomazzi@uol.com.br 

Assunto: Pharmaceutical Biology - Manuscript ID NPHB-2008-1030

Data: 23/11/2008 23:04

23-Nov-2008

Dear Professor Thomazzi:

Your manuscript entitled "Pharmacological Properties of Lichen *Cladonia clathrata*" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in *Pharmaceutical Biology*.

Your manuscript ID is NPHB-2008-1030.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/nphb> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/nphb>.

Thank you for submitting your manuscript to *Pharmaceutical Biology*.

Sincerely,
Pharmaceutical Biology Editorial Office