



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

Bruno de Luna Oliveira

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE,
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DO ÁCIDO
SALAZÍNICO EXTRAÍDO DO LÍQUEN *Ramalina
complanata***

Vitória de Santo Antão

2014

Bruno de Luna Oliveira

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE,
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DO ÁCIDO
SALAZÍNICO EXTRAÍDO DO LÍQUEN *Ramalina
complanata***

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Coorientador: Prof. Dr. Rene Duarte Martins

Vitória de Santo Antão

2014

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

O48a Oliveira, Bruno de Luna.

Avaliação da atividade cicatrizante, antioxidante e antibacteriana do ácido salazínico extraído do líquen *Ramalina complanata* / Bruno de Luna Oliveira. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2014.
47 folhas.

Orientador: Emerson Peter da Silva Falcão.

Coorientador: Renê Duarte Martins.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia. 2. Ácido salazínico – Ação cicatrizante. 3. Ácido salazínico – Ação antioxidante. 4. Ácido salazínico – Ação antibacteriana. 5. *Ramalina complanata*. I. Falcão, Emerson Peter da Silva (Orientador). II. Martins, Renê Duarte (Coorientador). III. Título.

660.6 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-026/2014



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



Dissertação de Mestrado apresentada por **Bruno de Luna Oliveira** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO SALAZÍNICO EXTRAÍDO DO LÍQUEN RAMALINA COMPLANATA**", orientado pelo Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, aprovada no dia 29 de agosto de 2014 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr.ª Idjane Santana de Oliveira
CAV-UFPE

Dr. René Duarte Martins
CAV-UFPE

Dr.ª Mônica Cristina Barroso Martins
CAV-UFPE

Autor

Bruno de Luna Oliveira

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio Pereira de Oliveira e Maria Luiza de Luna Oliveira, neles percebo um brilho no olhar a cada uma de minhas conquistas e é essa reação que me faz ter força para lutar e vencer.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, pelos ensinamentos, paciência, apoio e conselhos para minha vida profissional e pessoal, serei eternamente grato.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rene Duarte Martins, por todo incentivo, amizade e paciência na resolução dos problemas ao longo dos experimentos, além da concessão do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia (LAFIFA) para o desenvolvimento de grande parte da metodologia.

À minha noiva, Natália Valentim, por escutar todas as minhas angústias e ser meu porto seguro nos momentos difíceis, sempre com um belo sorriso no rosto e palavras de incentivo e positividade.

À Lenise Nogueira, que foi uma pessoa essencial para o andamento da pesquisa, que mesmo em conclusão do seu mestrado, teve paciência e disponibilidade para ensinar, auxiliar e acompanhar o desenvolvimento de várias etapas da pesquisa.

Aos parceiros do grupo de pesquisa do Prof. Peter e do Laboratório SIM, Thiago David, Amanda Nunes, Cristiane Conceição e Cida Lira pelo auxílio em diversas etapas do projeto.

Aos parceiros do grupo de pesquisa do Prof. Rene e do LAFIFA, Renato, Igor, Jaiurte, Sarana, Daniele e demais, pela contribuição e incentivo.

À Prof. Dra. Idjane Oliveira, pela paciência e disponibilidade na realização de uma importante etapa da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Francisco Amanajás, pelo fornecimento de materiais e equipamentos do Laboratório de Biotecnologia e Farmacologia, sendo essenciais para o desenvolvimento dos experimentos. Na sua pessoa também agradeço imensamente ao técnico de laboratório Rafael Albuquerque por toda a contribuição.

Aos companheiros do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, mestres e técnicos administrativos pelos ensinamentos, vivências e apoio.

Aos meus amigos, com os quais compartilho meus momentos de felicidade e dificuldade, em especial ao meu irmão de sangue Rodolfo Luna e meu irmão de coração Kaue Gomes.

Ao meu orientador da graduação e parceiro de diversas atividades profissionais e acadêmicas, meu amigo Prof. Dr. Augusto Barreto, que, mesmo sem estar diretamente ligado ao projeto, foi um dos que mais me incentivaram a concluir este curso de Mestrado.

A todos os professores e amigos de verdade, que me ensinaram, incentivaram e ajudaram, direta ou indiretamente, contribuindo assim para a conclusão de mais uma etapa acadêmica de suma importância na minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
CAPÍTULO 1	11
1.1 Introdução	11
1.2 Objetivos	12
1.2.1 Objetivo Geral	12
1.2.2. Objetivos Específicos	12
1.3 Revisão da Literatura	12
1.3.2 Uso de produtos naturais na medicina e líquens	12
1.3.2 Feridas e cicatrização	13
1.3.3 Compostos antibacterianos	16
1.3.4 Compostos antioxidantes	17
CAPÍTULO 2	
Avaliação da atividade cicatrizante, antioxidante e antibacteriana do ácido salazínico isolado do líquen <i>Ramalina complanata</i>	19
Resumo	20
Abstract	20
Introdução	21
Material e Métodos	23
Resultados e Discussão	28
Conclusões	36
Referências Bibliográficas	36
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Cromatograma do extrato etéreo da <i>Ramalina complanata</i>	29
Figura 2.2	Cromatograma do Ácido Salazínico purificado (CLAE).....	29
Figura 2.3	Fotografia da placa de microdiluição.....	35
Figura 2.4	Curva da atividade antioxidante do ácido salazínico extraído da <i>R. complanata</i> pela redução do DPPH.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Porcentagem de contração das feridas de camundongos tratados com Neomicina+Bacitracina (Controle Positivo), Tween 80 (Controle Negativo), Ácido Salazínico 0,3% e 1%.....	31
Tabela 2.2	Presença de infiltrado inflamatório em feridas de camundongos tratados com Neomicina+Bacitracina (Controle Positivo), Tween 80 (Controle Negativo), Ácido Salazínico 0,3% e 1%.....	32
Tabela 2.3	Presença de fibroblastos em feridas de camundongos tratados com Neomicina+Bacitracina (Controle Positivo), Tween 80 (Controle Negativo), Ácido Salazínico 0,3% e 1%.....	33
Tabela 2.4	Presença de vasos sanguíneos em feridas de camundongos tratados com Neomicina+Bacitracina (Controle Positivo), Tween 80 (Controle Negativo), Ácido Salazínico 0,3% e 1%.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of variance
ATCC	American Type Culture Collection
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DL ₅₀	Dose letal a 50%
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EC50	Concentração do extrato necessário para reduzir 50 % do radical DPPH
EGF	Crescimento Epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de Crescimento dos Fibroblastos
HE	Hematoxilina-eosina
MHA	Ágar Muller-Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente
NBF	Formol neutro tamponado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
Rf	Fator de retenção
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
TGF- β	Fator Transformador do Crescimento β
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A

RESUMO

Os líquens são uma associação simbiótica entre fungos e algas, que apresentam potencial medicinal, como agentes anti-hipertensivos, antitumorais, antivirais, anti-inflamatórios e antiparasitários. O ácido salazínico é uma depsidona derivada da β -orcina, presente na maior parte das espécies do gênero *Ramalina* spp. Estudos publicados em periódicos relatam propriedades antimicrobianas, fotoprotetoras frente a raios UVA, anti-inflamatórias, antioxidantes. Os objetivos deste estudo foram avaliar a atividade cicatrizante, antioxidante e antibacteriana do ácido salazínico extraído do líquen *Ramalina complanata*. Para a avaliação dos efeitos biológicos no modelo de ferida excisional foram usados camundongos albinos swiss submetidos à uma confecção de ferida cirúrgica. Após o procedimento operatório, os camundongos foram organizados em diferentes grupos de tratamento (Grupo Controle Negativo; Grupo Controle Positivo; Grupo Ácido Salazínico 0,3% e o Grupo Ácido Salazínico 1%). Em cada grupo houve sacrifício dos seis animais no 3º, 7º e 14º dias pós-cirúrgico para avaliação da lesão e do processo de cicatrização da ferida. Para a avaliação da atividade antioxidante, foi utilizado o método de captura de radicais DPPH. A avaliação da atividade antibacteriana do ácido salazínico foi realizada através do método de difusão em disco de papel, frente as cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, MRSA, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *Shigella flexneri*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, e dois isolados clínicos de MRSA. Os resultados apontam que o ácido salazínico na concentração de 1% apresenta efeito cicatrizante semelhante ao padrão utilizado, embora não tenha havido significância estatística. O ácido salazínico apresentou um potencial anti-radicalar, surgindo como alternativa de antioxidante natural, com uma $EC_{50\%}$ de 0,3027 mg. O ácido salazínico não apresentou ação antibacteriana frente às cepas utilizadas neste estudo.

Palavras-Chave: *Ramalina complanata*, *Parmeliaceae*, cicatrização, atividade antioxidante, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Lichens are a symbiotic association between fungi and algae with great medicinal potential as anti-inflammatory, antihypertensive agents, antitumor, antiviral, and antiparasitic. The salazinic acid is a derivative from β -Orcina depsidona, present in most species of the genus *Ramalina sp.* Studies published in journals reported antimicrobial properties, photoprotective against UVA rays, anti-inflammatory, antioxidant. The objectives of this study were to evaluate the healing, antibacterial and antioxidant activity of the extracted acid salazinic lichen *Ramalina complanata*. To study the healing potential swiss albino mice subjected to a construction of the surgical wound were used. After the surgical procedure, the mice were organized in different treatment groups (negative control group, positive control group; Group Salazinic acid 0.3% and the Group of Salazinic acid 1%). In each group there was a sacrifice of six animals in the 3rd, 7th and 14th postoperative day evaluation of the injury and the wound healing process. For the evaluation of antioxidant activity, the method of capture DPPH radical, a free radical and stable with which plant compounds with potential antioxidant activity interact, exchanging electrons or hydrogen atoms to the free radical reducing it was used. Evaluation of the antimicrobial activity of salazínico acid was performed using the diffusion method in the paper disk, strains of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, MRSA, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *Shigella felxneri*, *Citrobacter freundii* were used, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, and clinically isolated MRSA two. The results showed that the salazinic acid at 1% has use similar to standard healing effect, although there was no statistical significance. The salazinic acid presented anti-radical potential, emerging as an alternative natural antioxidant. The salazínico acid showed no antimicrobial activity against the strains used in our study.

Key words: *Ramalina complanata*, *Parmeliacea*, Wound Healing, Antioxidant, Antibacterial, Salazinic Acid.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Dentre os produtos naturais que podem ser estudados para contribuir com o processo de cicatrização, os fenóis liquênicos são uma alternativa interessante. Os líquens são uma associação simbiótica entre fungos e algas, com inúmeras utilidades medicinais, já descritas em diversas aplicações na saúde humana, como agentes anti-hipertensivos, antitumorais, antivirais, anti-inflamatórios, antiparasitários, entre outras (MAIA, 2002; RANKOVIC, 2011; FALCÃO et al, 2002).

Antioxidantes naturais, presentes particularmente em vegetais e líquens têm atraído crescente interesse entre a comunidade científica. Estudos sugerem que o frequente consumo desses produtos é associado com a baixa incidência de doenças degenerativas incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, inflamações, artrites, declínio do sistema imune, disfunção cerebral, diabetes, mal de Alzheimer e alguns tipos de catarata (ABDILLE et al., 2005; HE et al., 2007; KUSKOSKI et al., 2005; WU et al., 2004).

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico bastante estudado atualmente e pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de acelerar esse evento, reduzindo os riscos de infecção e oferecendo uma qualidade de vida melhor aos pacientes em tratamento. Para aperfeiçoar a cicatrização de lesões, podem ser utilizados vários meios, como biomateriais à base de polímeros e géis tópicos que interagem diretamente com a ferida cutânea, podendo apresentar diversas ações, como anti-inflamatória, antioxidante e antisséptica aumentando a cicatrização e protegendo os tecidos envolvidos no processo cicatricial (RATNER & BRYANT, 2004).

Existem muitos tipos de produtos disponíveis no mercado para o tratamento de feridas. Porém, ainda necessita-se de mais alternativas devido à grande variabilidade de fatores envolvidos no processo e à falta de estudos sobre os efeitos adversos dos medicamentos utilizados (MARTINS et al, 2006). Neste sentido, conforme visto, os fenóis liquênicos são compostos promissores.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade cicatrizante, antioxidante e antibacteriana do ácido salazínico extraído do líquen *Ramalina complanata*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a área de contração da ferida, considerando-se o 3º, 7º e 14º dia pós-cirúrgico em camundongos.
- Estudar os efeitos do ácido salazínico sobre os parâmetros histológicos de fibroplastia, vascularização e inflamação em camundongos.
- Avaliar a atividade antioxidante do ácido salazínico isolado do líquen *Ramalina complanata*.
- Avaliar a atividade antibacteriana do ácido salazínico isolado do líquen *Ramalina complanata* frente a bactérias patogênicas ao homem.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Uso de produtos naturais na medicina e líquens

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2002), 80% da população dos países em desenvolvimento usam quase que exclusivamente a medicina tradicional, sendo os vegetais superiores a maior fonte de medicamentos. São cerca de 3,3 milhões de pessoas utilizando mais de 9.000 espécies de plantas, entre monocotiledôneas, dicotiledôneas, briófitas, pteridófitas e líquens.

Várias pesquisas são feitas sobre as propriedades farmacológicas das plantas usadas na medicina popular, demonstradas por meio de análises químicas e atividades biológicas. No entanto, apesar de bastante promissor, este campo ainda resente-se da falta de estudos.

Os líquens são usados pelo homem na medicina tradicional há séculos, por suas propriedades terapêuticas. São encontrados dos trópicos aos polos, apresentando grande capacidade de resistência às adversidades ambientais. Os compostos obtidos do metabolismo secundário dos líquens têm diversos usos, especialmente na indústria cosmética, farmacológica e no monitoramento ambiental. Estes organismos são o resultado da associação simbiótica entre alga e/ou cianobactéria e fungo, o que permite a formação de uma estrutura específica, chamada de talo liquênico. Tal estrutura confere morfologia diferente da estrutura adquirida pela alga ou fungo quando em vida livre (HALE-JÚNIOR, 1983; HONDA & VILEGAS, 1998).

Os líquens produzem um grande número de substâncias, intra e extracelulares. Os produtos intracelulares, resultantes do metabolismo primário, são os carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas, que estão ligados à parede celular e aos protoplastos, sendo frequentemente solúveis em água. A maioria destes compostos não é específica dos líquens, podendo ocorrer em fungos e algas de vida livre, bem como em plantas superiores e animais. Os produtos extracelulares são resultantes do metabolismo secundário dos líquens, podendo ser corticais ou medulares. A maioria é de natureza fenólica, insolúvel em água (HALE, 1983). Dentre as substâncias liquênicas conhecidas, as mais importantes incluem depsídeos, depsidonas e dibenzofuranos. Mais de 630 metabólitos secundários de líquens são conhecidos. A maioria é produzida unicamente pelos líquens e em torno de 50 a 60, é produzida por fungos de vida livre e plantas superiores (HUNECK & YOSHIMURA, 1996).

Diversas atividades biológicas já foram descritas utilizando extratos liquênicos como recurso terapêutico. Propriedade antimicrobiana, antiviral, analgésica, antiparasitária, hipoglicemiante, antitumoral, entre outras (QUINTANS-JÚNIOR, 2008; RANKOVIC, 2011; QUINTANS-JÚNIOR, 2011).

1.3.2 Feridas e cicatrização

O processo de cicatrização envolve diferentes fatores do organismo e do meio ambiente que o mesmo está sendo desenvolvido, apresentando diversas fases. A primeira fase, chamada de fase inflamatória, se inicia imediatamente após a lesão, com a liberação de substâncias vasoconstritoras, principalmente tromboxano A₂ e prostaglandinas, pelas membranas celulares. O endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação. As plaquetas têm papel fundamental na cicatrização. Visando a hemostasia, essa cascata é iniciada e grânulos são liberados das plaquetas, as quais contêm fator de crescimento de transformação beta - TGF- β (e também fator de crescimento derivado das

plaquetas [PDGF], fator de crescimento derivado dos fibroblastos [FGF], fator de crescimento epidérmico [EGF], prostaglandinas e tromboxanos), que atraem neutrófilos à ferida. O coágulo é formado por colágeno, plaquetas e trombina, que servem de reservatório proteico para síntese de citocinas e fatores de crescimento, aumentando seus efeitos. Desta forma, a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (migração de neutrófilos para a ferida). Neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, com maior concentração 24 horas após a lesão. São atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas. Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana). Neutrófilos produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos. Os macrófagos migram para a ferida após 48 - 96 horas da lesão, e são as principais células antes dos fibroblastos migrarem e iniciarem a replicação. Têm papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição para a fase proliferativa (BROUGHTON, 2006).

A segunda fase, a proliferativa, é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Esta fase tem início ao redor do 4º dia após a lesão e se estende aproximadamente até o término da segunda semana. A epitelização ocorre precocemente. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (LAWRENCE, 1994). A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essencial para a cicatrização adequada. A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência. O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o PDGF (BROUGHTON, 2006). Em seguida é liberado o TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida. Entre os fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial podem ser citados o PDGF, que induz a proliferação celular, a quimiotaxia e a síntese matricial; o fator epidérmico, que estimula a epitelização; o fator transformador alfa, responsável pela angiogênese e pela

epitelização; o fator fibroblástico, que estimula a proliferação celular e angiogênese e o fator transformador beta, responsável pelo aumento da síntese matricial (WITTE, 1997).

A fase de maturação ou remodelamento tem como característica mais importante a deposição de colágeno de maneira organizada, por isso é a mais importante clinicamente. O colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele. Com o tempo, o colágeno inicial (colágeno tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. Estas mudanças se refletem em aumento da força tênsil da ferida. A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização. Fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que promovem a lise da matriz antiga. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga, havendo sucesso quando a deposição é maior. Mesmo após um ano a ferida apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele sã, e a força tênsil jamais retornará a 100%, atingindo em torno de 80% após três meses (BROUGHTON et al, 2006).

Vários fatores locais podem influenciar negativamente a cicatrização, dentre eles os principais são: isquemia, infecção, técnica cirúrgica (DEODHAR, 1997), corpo estranho e edema / pressão tecidual elevada (AL-ATTAR et al, 2006; ALLENDORF et al, 1997; LONGAKER, 2001; STEINBRECH, 1999).

Sistemicamente, diversos fatores podem afetar de alguma maneira a cicatrização, dentre eles pode-se citar: diabetes melito, deficiências vitamínicas (DEODHAR et al, 1997), hipotireoidismo, doenças hereditárias (síndrome de Ehler-Danlos), alterações da coagulação, idade, trauma grave, queimaduras, sepse, insuficiência hepática e renal, insuficiência respiratória, tabagismo, radioterapia, desnutrição e o uso de corticosteróides, drogas antineoplásicas, ciclosporina A, colchicina e penicilamina (BROUGHTON et al, 2006; DEODHAR, 1997; LAWRENCE, 1994).

Partindo do princípio da manipulação nutricional, diversos estudos foram realizados com fitoterápicos, mostrando seus efeitos na cicatrização. Dentre os fitoterápicos estudados, podem ser citar a *Passiflora edulis* (maracujá); *Orbignya phalerata* (babaçu) e a *Jatropha gossypifolia* L. (pião roxo) e a *Schimus terebinthifolius raddi* (aroeira). Todos mostraram, de alguma forma, melhora na cicatrização da parede abdominal, anastomoses colônicas e gástricas, mediante avaliação histológica e ou da força de ruptura (BALDEZ et al, 2006; BEZERRA et al, 2006; GOMES et al, 2006; VALE et al, 2006).

Diversos recursos curativos são atualmente disponibilizados nos serviços de saúde, como curativos à base de ácidos graxos essenciais, alginato de cálcio, antissépticos e degermantes, carvão ativado, colágeno biológico, hidrogel, hidrocolóide, sulfadiazina de prata, entre outros tipos. Tendo em vista seu caráter multifatorial, o desenvolvimento de novas alternativas para potencializar a cicatrização é objeto de estudo em diversos centros de pesquisa. Entre estas novas tecnologias, podemos citar a cultura de tecidos, terapias por vácuo, ultrassom e eletroterapia, laser de baixa frequência, terapia larval e várias outras formas alternativas de tratamento, inclusive com fitoterápicos e produtos naturais, como líquens (GARROS et al, 2006; CARVALHO et al, 2010).

1.3.3 Compostos antibacterianos

Nos últimos anos, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, a exposição aos antibacterianos desencadeou resistência bacteriana, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos (CUNICO et al., 2004). A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUARTE, 2006).

Substâncias antimicrobianas, antibacterianas ou antibióticas constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, e, além de prevenir o desenvolvimento de microrganismos resistentes, devem apresentar ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro e estabilidade química, entre outras características (COWAN, 1999).

O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos. Existe uma tendência mundial quanto ao uso de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos (SOUZA et al, 2005), no tratamento de sementes (COUTINHO et al, 1999), no combate a microrganismos causadores de doenças de pele (WECKESSER, 2006; CRUZ et al, 2007), de úlcera gástrica (STEGE et al, 2006) entre outras doenças (SRINIVASAN et al, 2001; PESSINI et al, 2003). Um dos principais interesses, no entanto, é o uso de antimicrobianos naturais no combate a microrganismos resistentes (ARIAS, et al, 2004; NASCIMENTO et al, 2000).

O interesse dos pesquisadores pelos líquens para investigações de novos antibacterianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, tais como ácido úsnico, ácido divaricático, ácido salazínico, ácido fumarprotocetrárico, atranorina, hemaventosina, liquexantona, entre tantos outros.

Vários métodos de avaliação da capacidade antibacteriana de um composto são disponíveis na prática laboratorial. O teste da atividade antibacteriana, pelo método de difusão em disco de papel, corresponde a um dos métodos mais amplamente utilizados para o ensaio de susceptibilidade bacteriana, devido à simplicidade da realização e interpretação dos resultados, além de ser um método reconhecido e recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Modificado e padronizado por Bauer e colaboradores em 1966, esse método é baseado nos princípios de difusão inibitória de agentes antimicrobianos em um meio de cultura apropriado contendo o agente patógeno a avaliar. Nesse teste, pequenos discos de papel de filtro com seis mm de diâmetro impregnados de antibiótico e dispostos numa placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton solidificado, e sobre o qual se encontram inoculadas as bactérias a serem testadas, sendo em seguida incubadas por 18 a 24 horas em estufas a 35 °C. Durante esse período, o agente antimicrobiano irá difundir pelo meio e atuará negativamente (ou não) sobre o crescimento do microrganismo, o qual será visualmente identificado pelo aparecimento de uma área em volta do disco antibiótico onde as bactérias não se desenvolverão, denominada halo de inibição. Quanto maior for o seu diâmetro, mais susceptível é o microrganismo enquanto que a pequena ou nenhuma zona de inibição indica resistência por parte da bactéria (TAVEIRA, et al, 2004).

1.3.4 Compostos antioxidantes

O termo antioxidante tornou-se bastante popular e tem recebido publicidade e atenção, sobretudo nos últimos 10 anos. De acordo com Huang; Ou; Prior (2005), antioxidantes são substâncias naturais ou sintéticas que agem no sentido de prevenir ou retardar deteriorações causadas pela exposição ao oxigênio. Também podem ser encarados como compostos capazes de retardar ou inibir a oxidação de diversos substratos, de simples moléculas a polímeros e biosistemas complexos, evitando o início ou prorrogação das reações em cadeia de oxidação (NAMIKI, 1990; SIMIC & JAVANOVIC, 1994).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são encontradas em todos os sistemas biológicos e geradas naturalmente nos organismos pelo processo metabólico normal. Em

sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa. O estresse oxidativo pode ocorrer na vida moderna como resultado da exposição excessiva ao sol (radiação UV), aumento da poluição do ar, fumo, estresse, dentre outros fatores. É um evento causado pela deficiência do sistema protetor e/ou pelo excesso de agentes oxidantes e apresenta efeitos prejudiciais ao funcionamento das células, tais como agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, prejuízo às enzimas, danos ao DNA. Desta forma, está relacionado a várias doenças, como artrite, câncer, doenças do coração e do pulmão, demência senil, esclerose múltipla, entre outras. O envelhecimento também é um evento relacionado com as espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL et al., 1992; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VICEDO & CORREAS, 1997).

Alguns autores mencionam a importância de se aumentar a ingestão de antioxidantes naturais na dieta humana. Os antioxidantes sintéticos podem apresentar toxicidade e altos custos de produção, além de demonstrar menos eficiência quando comparados aos naturais. Com isto, os autores chamam a atenção da necessidade de se identificar antioxidantes naturais possivelmente mais econômicos e eficientes (SOONG & BARLOW, 2004).

Experimentos simples podem ser realizados para examinar diretamente a habilidade antioxidante in vitro e para testar possível efeito pró-oxidante em diferentes alvos moleculares. Um dos métodos mais utilizados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – o DPPH. Este teste permite determinar a porcentagem de atividade antioxidante – que corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante – que corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante – ou a atividade sequestradora de radicais livre e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (SOUSA et al., 2007).



CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido à Revista PLANTA MEDICA–Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research (APÊNDICE B)

Avaliação da atividade cicatrizante, antioxidante e antibacteriana do ácido salazínico isolado do líquen *Ramalina complanata*

Bruno de Luna Oliveira¹, Rene Duarte Martins¹, Nicácio Henrique da Silva², Emerson Peter da Silva Falcão¹.

Filiação

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, Brasil.

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Recife, Brasil.

Correspondência

Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Rua Alto do Reservatório, s/n. Bela Vista, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil. E-mail: emerson_falco@yahoo.com.br Telefone: +55 81 3523 4520.

RESUMO

Os líquens são uma associação simbiótica entre fungos e algas, com potencial aplicação em saúde humana. O ácido salazínico é uma depsidona derivada da β -orcina, presente na maior parte das espécies do gênero *Ramalina sp.* A literatura relata propriedades antimicrobianas, fotoprotetoras frente a raios UVA, anti-inflamatórias, antioxidantes. Os objetivos deste estudo foram avaliar a atividade cicatrizante, antioxidante e eventual ação antibacteriana do ácido salazínico extraído do líquen *Ramalina complanata*. Para o estudo do potencial cicatrizante foram utilizados camundongos albinos *swiss* submetidos a uma ferida cirúrgica e tratados com ácido salazínico nas concentrações de 0,3% e 1%. A atividade antioxidante foi avaliada através do método de captura de radicais DPPH. O método de difusão em meio sólido com discos de papel foi utilizado para o *screening* antibacteriano. Para realização dos testes de avaliação da atividade antimicrobiana do ácido salazínico pelo método de difusão em disco de papel, foram utilizadas 15 cepas bacterianas. O ácido salazínico na concentração de 1% apresenta efeito cicatrizante semelhante ao padrão Neomicina associada com Bacitracina, embora não tenha havido significância estatística. A depsidona apresentou um potencial anti-radicalar, surgindo como alternativa de antioxidante natural, com uma $EC_{50\%}$ de 0,3027 mg. Em relação ao antibiograma, o ácido salazínico não apresentou potencial antibacteriano contra as cepas utilizadas em nosso estudo.

Palavras-chave

Ramalina complanata, *Parmeliacea*, cicatrização, atividade antioxidante, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Lichens are a symbiotic association between fungi and algae, with potential application in human health. The salazinic acid is a β -Orcina depsidone derivative of, found in most species of the *Ramalina sp* genus. The literature reports antimicrobial properties, photoprotective against UVA rays, anti-inflammatory, antioxidant. The objectives of this study were to evaluate the healing, antioxidant and antibacterial action of salazinic acid extracted from lichen *Ramalina complanata*. To study the healing potential swiss albino mice subjected to a wound and treated with salazinic acid in concentrations of 0.3% and 1% were used. The antioxidant activity was evaluated by the capture DPPH radicals method. The method of diffusion with paper discs Solid medium was used for screening the antibacterial. For conducting the evaluation of the antimicrobial activity of salazinic acid diffusion method in paper disc tests, 15 bacterial strains were used. The salazinic acid at 1% similar to the standard features associated with Bacitracin Neomycin healing effect, although there was no statistical significance. The depsidone showed a potential antiradicalar activity, emerging as an alternative natural antioxidant. Regarding the antibiogram, the salazinic acid did not antimicrobial activity over the assay conditions against the strains used in our study.

Key words: *Ramalina complanata*, *Parmeliacea*, Wound Healing, Antioxidant, Antibacterial, Salazinic Acid.

INTRODUÇÃO

Os líquens são uma associação simbiótica entre fungos e algas, com potenciais aplicações à saúde humana, tais como agentes anti-hipertensivos, antitumorais, antivirais, anti-inflamatórios, antiparasitários, entre outras (RANKOVIC et al, 2011; FALCÃO et al, 2002).

Dentre os derivados do metabolismo secundário dos líquens, podemos destacar o ácido salazínico, que é uma depsidona derivada da β -orcina, presente na maior parte das espécies do gênero *Ramalina sp*. (KOMYIA & SHIBATA, 1969). Estudos publicados em periódicos relatam propriedades antimicrobianas (CANDAN et al, 2007; HONDA et al, 2010), fotoprotetoras de raios UVA (DÉVÉHAT et al, 2013), antioxidantes (MANOJLOVIC et al, 2011), entre outras.

Os vários compostos provenientes do metabolismo dos líquens interessam ao homem principalmente por sua potencialidade em se tornar um produto terapêutico. Muitos desses

componentes, quando utilizados em doses adequadas, podem converter-se em medicamentos (HONDA et al, 2010). Desse modo, produtos secundários envolvidos na defesa através de atividade citotóxica contra patógenos podem ser úteis como agentes antibacterianos (BRISKIN, 2000). Além da atividade antimicrobiana de metabólitos extraídos de plantas, um novo conceito na utilização desses produtos vem sendo estudado, a associação com antimicrobianos sintéticos (COUTINHO et al, 1999; MATIAS et al, 2010).

O produto natural pode agir minimizando o mecanismo de resistência microbiana e, desta forma, serem considerados como moduladores de resistência ou agir de forma sinérgica com o antimicrobiano, através de mecanismo ainda não caracterizado (GIBBONS, 2005). O conceito de utilização de um composto que inibe a resistência de um microrganismo e que pode ser usado em associação com antimicrobiano convencional já é bem aceito clinicamente, como por exemplo, na combinação dos antibióticos amoxicilina (um beta-lactâmico) com ácido clavulânico (um inibidor de beta-lactamases). A eficácia da ação antibacteriana é aumentada, pois o inibidor estabiliza a amoxicilina, impedindo a degradação pelas enzimas beta-lactamases produzidas pela bactéria como um mecanismo de defesa e sobrevivência do microrganismo (GIBBONS, 2004; SANGWAN et al, 2008).

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação do substrato. Algumas características são necessárias para ser considerado um bom antioxidante, por exemplo, ter a presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função de seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo; e acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofilia ou lipofilia e de seu coeficiente de partição (SOUSA et al., 2007).

Quanto ao mecanismo de combate aos radicais livres, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Outra classificação divide os antioxidantes em sintéticos e naturais (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Os antioxidantes são conhecidos pela ação em diferentes níveis do processo de oxidação envolvendo moléculas de lipídeos. Eles podem agir diminuindo a concentração de oxigênio; evitando a fase de iniciação da oxidação; quelando íons metálicos; decompondo produtos primários a compostos que não são radicais.

Existem algumas lacunas com relação aos antioxidantes, tais como: a inexistência de recomendação para cada antioxidante; falta de padronização quanto ao real valor

antioxidante dos alimentos; e possíveis efeitos tóxicos da administração de elevadas doses desses compostos (MANCINI-FILHO et al, 1998).

Os antioxidantes naturais incluem os tocoferóis, vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos existentes nas plantas atuam protegendo-as contra injúrias em seus tecidos, contra a ação de subprodutos provenientes da fotossíntese que podem causar danos e também contra animais herbívoros. Muitos desses compostos têm similaridades quanto à estrutura molecular básica, em que todos possuem pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila ligado a ele, incluindo, principalmente, os ácidos fenólicos e flavonóides, que conferem defesa contra o ataque de radicais livres (BIANCHI, 1999).

O DPPH é um método químico, aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 515-520 nm. A redução do radical DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação. O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes. O método de sequestro do radical livre DPPH pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em curto período de tempo (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Este trabalho tem como objetivos avaliar a atividade cicatrizante, antioxidante e antibacteriana do ácido salazínico extraído do líquen *Ramalina complanata*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta, identificação e extração da *Ramalina complanata* (Sw.) Ach.

Foram coletados 500 g da *Ramalina complanata* na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Fazenda Brejo, em Saloá, município localizado na Mesorregião do Agreste de Pernambuco, Microrregião Garanhuns - Latitude - 8°58'32,70" e Longitude -36°41'01,63". O líquen foi identificado pelas características morfológicas e químicas do talo pelo taxonomista de líquens Dr. Ermerson Luiz Gumboski - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Uma exsicata da *R. complanata* (Sw.) Ach. foi depositada no Herbário UFP - Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número de tombamento UFP 74.408.

Extração e purificação do Ácido Salazínico da *R. complanata* (Sw.) Ach.

O material liquênico foi seco a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e armazenado em sacos de papel até sua utilização. Amostra liquênica de *R. complanata*, 25 g, foram submetidas à extração com 50 mL de acetona por esgotamento a frio, respectivamente para obtenção dos extrato orgânico. Ao extrato, previamente pesado, 9,8 g, foi adicionado clorofórmio e submetido a cinco extrações sucessivas. O resíduo foi dissolvido em 10 mL de acetona e centrifugado a 3000 RPM por 5 minutos, o procedimento foi repetido três vezes. O pó amorfo obtido foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ASAHINA; SHIBATA, 1954).

Identificação por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato acetônico, o ácido salazínico purificado e o padrão do ácido salazínico obtido do Laboratório de Química de Produtos Naturais, do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, foram submetidos a CCD ascendente, unidimensional (CULBERSON, 1972). Amostras foram aplicadas sobre as placas de sílica Gel ^{PF254+366} Merk®, e desenvolvidas no sistema de solventes (tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 v/v/v). Após a evaporação dos solventes, o cromatograma foi visualizado sob luz UV curta e longa (254 e 366 nm), e, posteriormente, pulverizado com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 50 °C por 30 minutos. Os resultados foram avaliados mediante comparação dos valores do fator de retenção (Rf) do extrato acetônico, do ácido salazínico purificado e do padrão de ácido salazínico.

Identificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os ensaios em CLAE seguiram a metodologia de Vicente; Legaz (1983), em cromatógrafo líquido Hitachi modelo 655-11 acoplado a detector de UV da marca CG, modelo 437-B a 254 nm, coluna C18 de fase reserva, usando metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v) como fase móvel, em sistema isocrático. O extrato acetônico, o ácido salazínico purificado e o padrão do ácido salazínico (0,1 mg/mL) foram dissolvidos em metanol espectroscópico e injetados 20 µL na coluna. Os resultados foram avaliados mediante tempo de retenção (TR) das substâncias na coluna e, área dos picos cromatográficos respectivamente.

Atividade cicatrizante

Identificação dos animais

Para os experimentos de cicatrização, foram utilizados 36 camundongos albinos *swiss*, entre 2 e 4 meses de idade, com 20 a 40 gramas de peso, adquiridos no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), na Universidade Federal de Pernambuco, Campus Recife, e mantidos no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (CAV). Antes de serem submetidos aos experimentos, todos os animais passaram pelo processo de aclimação no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia durante 24 horas.

Após aclimação, os animais foram pesados e divididos igualmente em quatro grupos: o Grupo Controle Positivo (C+); o Grupo Controle Negativo (C-); o Grupo do Ácido Salazínico 0,3% (SAL 0,3%) e o Grupo do Ácido Salazínico 1% (SAL 1%). Estes foram subdivididos em 3 subgrupos, os quais correspondem aos dias de sacrifício: 3, 7 e 14 dias. Ademais, o Grupo C+ foi tratado com o fármaco Neomicina + Bacitracina; o Grupo C- foi tratado com Tween 80 (Tabela 1).

Procedimento Experimental

Com os animais devidamente anestesiados, foi realizada tricotomia na região dorso-costal de uma área de aproximadamente 6 cm², e em seguida foi feita excisão cutânea com ajuda de um *punch* cirúrgico de aproximadamente 6 mm de diâmetro, e com uma tesoura romba, aprofundou-se a incisão até a fáscia. Contabilizou-se como sendo dia 0 (zero), a realização da cirurgia. Através de aplicação tópica, administraram-se Neomicina+Bacitracina nos animais do C+; 40 µL de Tween 80 nos animais do C-; 40 µL do ácido salazínico na concentração de 0,3% e 40 µL do ácido salazínico na concentração de 1%, uma vez ao dia, respeitando um intervalo de 24 horas durante todos os dias até o sacrifício do animal.

Após os procedimentos cirúrgicos, os camundongos foram distribuídos em gaiolas de polipropileno, sendo mantidos durante todo o experimento em temperatura e umidade ambientais controladas (22 ± 2 °C em um ciclo claro/escuro de 12 horas), boas condições de higiene, e alimentados com dieta padrão do biotério, ração (Labina – Purina Nutrimentos LTDA) e água *ad libitum* (VENTURA; PINTO; SILVA, 2001).

Após realização de todos os tratamentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e encaminhados para o biotério do CAV/UFPE para um adequado descarte.

Análise da área de contração

Antes do descarte dos animais, as feridas cirúrgicas foram fotografadas e passaram por uma análise do tamanho da área com o objetivo de avaliar o percentual de contração no 3º, 7º e 14º dias em relação ao dia 0.

Para tanto, utilizou-se o *software ImageJ* versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Os resultados de área de contração das feridas foram expressos em média \pm desvio padrão, submetidos à análise estatística (ANOVA), considerando-se significativo os valores comparados ao nível de 5% de significância.

Histopatologia

Cada ferida do animal foi excisada após sacrifício e à subsequente fotografia. As feridas foram acondicionadas em uma solução de formol a 10 % neutro tamponado (NBF), permanecendo nesta solução pelo período de 48 h. Após esse procedimento, as amostras foram desidratadas em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizadas pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 5 μ m. Assim, os cortes obtidos foram colocados em lâminas de microscopia e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C, por 24 h para secagem.

Os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.) para contagem de células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibroblastos. As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por câmera digital (Moticam 3.0) acoplada ao microscópio óptico (Nikon-E200), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 15 campos por lâmina com aumento final de 100X. As fotomicrografias foram avaliadas através do *software ImageJ* versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.), o *plugin* “cell counter” foi utilizado na contagem celular, infiltrado inflamatório, fibroblastos e de vasos sanguíneos.

Os dados obtidos da avaliação histomorfométrica foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA e Teste de Tukey com o intuito de se verificar possíveis diferenças entre os grupos nos períodos de 3, 7, 14 dias. Foi adotado o nível de significância de 5% ou $p < 0,05$.

Determinação da dose letal a 50% (DL₅₀)

O ácido salazínico extraído do líquen *Ramalina complanata* foi submetido ao teste de toxicidade para determinação da dose letal a 50% (DL₅₀) em 4 (quatro) camundongos, seguindo-se a metodologia de Karber & Berhrens (1964), modificada por Berlion (1988). O composto foi administrado por via intraperitoneal sendo a dose aplicada segundo o peso de

cada animal. Em ambos os ensaios os animais foram observados por período de 24, 48 e 72 h, registrando-se os principais eventos ocorridos durante período avaliado. Os resultados finais foram avaliados segundo a equação descrita por Karber & Bhehrens (1964) e modificada por Berlion (1988).

$$DL50\% = Df - \frac{\sum(a.b)}{n}$$

Df = dose mínima capaz de matar todos os animais

a = diferença entre duas doses consecutivas administradas

b = média de animais mortos entre duas doses consecutivas

n = número de camundongos por lote

Atividade Antimicrobiana

Micro-organismos testados

Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 6057), MRSA (ATCC 33591), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Serratia marcescens* (ATCC 8100), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), obtidos no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, e dois isolados clínicos (sítio de infecção de ferida) de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA), obtidos de feridas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Padronização do inóculo

As suspensões microbianas foram padronizadas de acordo com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias (BARRY, 1986).

Teste de difusão em disco de papel

A atividade antimicrobiana do ácido salazínico foi avaliada pelo método de difusão em disco de papel. Discos de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 10 μ L da solução do ácido salazínico (diluído em DMSO) e colocados sobre a superfície do meio semeado com as

suspensões microbianas padronizadas, em placas de Petri de dimensões de 100x15mm. As placas foram incubadas a 37 °C, por um período de 24 horas. Após o período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, pela medição do diâmetro do halo de inibição formado em volta dos discos (BAUER; KIRBY, 1966).

Atividade antioxidante

Foi utilizado o método de captura de radicais DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil), que tem por base a redução do radical DPPH, que ao fixar um H (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância. Para a análise das amostras, adicionou-se a 250µL da solução metanólica de DPPH (6x10⁻⁵M) uma alíquota de 40 µL das amostras contendo diferentes concentrações do ácido salazínico. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (BioRad Xmark) a 374 nm, após 20 minutos do início da reação. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle (sem antioxidante). A queda na leitura da absorbância das amostras foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH, conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ proteção} = [(Abscontrole - Absbranco) / Abscontrole] \times 100$$

Para o cálculo dos valores de EC₅₀ (concentração do extrato necessário para reduzir 50 % do radical DPPH) do ácido salazínico, foi calculada a atividade antioxidante em diferentes concentrações, de forma a traçar uma curva linear entre a capacidade antioxidante do ácido salazínico e sua concentração. Esses dados foram submetidos a uma regressão linear e obtida uma equação da reta para o cálculo do EC₅₀ (BRAND-WYLLIANS et al., 1995).

Aspectos Éticos

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, sendo aprovado sob o processo nº 23076.0154402/2013-53, estando esta pesquisa em conformidade com as normas éticas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação do ácido salazínico extraído da *Ramalina complanata*

Através do desenvolvimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi possível a confirmação da presença, como também do grau de pureza da amostra purificada, sendo então identificada como ácido salazínico quando comparado seu fator de retenção ($R_f=0,173$) com aquele referente ao padrão do ácido em questão (Figuras 2.1 e 2.2).

Figura 2.1 Cromatograma do extrato etéreo de *Ramalina complanata* (CLAE).



Figura 2.2 Cromatograma do ácido salazínico purificado (CLAE).



Atividade cicatrizante

Muitos fatores intrínsecos e extrínsecos podem influenciar diretamente no processo de reparo (TAZIMA; VICENTE & MORIYA, 2008).

A avaliação macroscópica empregada, embora de caráter subjetivo, é de grande importância para o acompanhamento do reparo cutâneo. Na prática corrente, é o meio disponível mais usual, de baixo custo e que geram excelentes informações em relação ao comportamento dos eventos biológicos durante a reparação do tecido conjuntivo e epitelial, já que em humanos, não se justificaria retirada de tecidos cirurgicamente, tão somente para acompanhamento da evolução de uma ferida no controle de eficácia dos tratamentos. A análise macroscópica foi baseada de acordo com a presença ou ausência das características clínicas das feridas.

Macroscopicamente, no período de tratamento, pôde-se observar que junto à superfície da ferida houve a formação de uma crosta superficial a partir do 3º dia pós-cirúrgico, no 7º dia esta crosta foi tornando-se mais espessa em todos os animais dos grupos controle (positivo e negativo) e dos grupos tratados com o ácido salazínico a 0,3% e 1%. A solução de continuidade causada pela remoção do fragmento de pele é inicialmente preenchida por coágulo, fibrina e exsudato inflamatório, que originam uma crosta fibrino-leucocitária. Esta crosta protege a ferida contra a ampla perda de eletrólitos e fluidos e contra a contaminação por agentes nocivos. A presença da crosta pode ser observada tanto macroscopicamente como microscopicamente (MARTORELLI et al 2011).

Os animais mantiveram-se saudáveis e apresentaram características de cicatrização sem evidências clínicas e/ou macroscópicas de infecção. Macroscopicamente, nos animais dos grupos controles e dos tratados com o ácido salazínico, notou-se o fechamento completo da lesão por volta do 14º dia.

As áreas de contrações das feridas (TABELA 2.2) do 3º, 7º e 14º dias, obtidas através do *ImageJ* e submetidas à análise estatística ANOVA, mostram que no 3º dia houve um menor percentual de contração da área da ferida dos Grupos Controle Negativo e SAL 0,3% em relação ao Grupo Controle Positivo. O aumento da área da ferida, verificado em todos os grupos, no 3º dia de tratamento, deve-se à intensa inflamação local neste período. O Grupo SAL 1% apresentou resultados próximos no 3º, 7º e 14º dia de tratamento em relação ao Grupo Controle Positivo, demonstrando ser relevante para o processo de cicatrização. As menores médias de contração da ferida foram apresentadas pelo Controle Negativo e pelo SAL 0,3%, como esperado, desta forma, o ácido salazínico em baixas concentrações não demonstra ser eficaz no processo de reparação tecidual. Embora estas diferenças sejam

notadas nos números absolutos das médias de redução da área da ferida, nenhum grupo experimental apresentou significância estatística ($p < 0,05$).

TABELA 2.1 Porcentagem de contração das feridas de camundongos tratados com Neomicina+Bacitracina (Controle Positivo), Tween 80 (Controle Negativo), Ácido Salazínico 0,3% e 1%.

	3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
Controle Positivo	-20,7 ± 7,86	85,19 ± 10,6	97,6 ± 3,31
Controle Negativo	-53,09 ± 27,16	61,69 ± 16,16	92,3 ± 6,35
SAL 0,3%	-55,09 ± 24,75	75,87 ± 6,32	96,72 ± 5,54
SAL 1%	-24,42 ± 16,33	79,97 ± 17	97,98 ± 4,52

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Neste estudo verificou-se um aumento da área da ferida no 3º dia de tratamento com o uso da Neomicina associada com Bacitracina (Controle Positivo), contrapondo-se a característica do antibiótico, de fazer o controle do componente infeccioso, assim acelerando a reparação da lesão. Efeito semelhante ocorreu nos estudos conduzidos por VITORINO FILHO (2012) e MAGALHÃES et al (2008), onde foi empregado clostebol associado à neomicina no tratamento de feridas em ratos. Segundo Mandelbaum, Di Santis e Mandelbaum (2003), o uso de antibióticos tópicos, para prevenção ou tratamento de infecção em feridas, tem sido contraindicado, pois, quando empregados em concentrações adequadas, apresentam ação citotóxica sobre os queratinócitos e, se utilizados em concentrações muito baixas, podem provocar aparecimento de resistência e ainda a dermatite de contato. Segundo Geronemus; Mertz e Eaglstein (1979), a grande maioria dos agentes antimicrobianos, quando usados topicamente em lesão, impede a proliferação de queratinócitos. Verificou-se neste estudo que houve expansão da área das feridas no grupo controle até o terceiro dia após a cirurgia, fase na qual a proliferação de queratinócitos é mais intensa e a presença da neomicina foi deletéria. Do terceiro dia em diante, o incremento de reparação tissular verificado nas feridas dos animais do grupo controle sugere que a presença da neomicina associada com bacitracina nesta etapa da cicatrização já não mais foi consideravelmente negativa.

Histopatologia

Os resultados do presente estudo demonstram a comparação das médias e desvios padrões (+-) nos diferentes tempos experimentais, comparando-as entre si e entre os diferentes grupos ao nível de significância de 5%.

Infiltrado inflamatório

A inflamação é um processo dinâmico que depende do tecido viável e um fenômeno benéfico que conduz à cura. A resposta inflamatória é um instrumento que fornece fatores de crescimento e citocinas que coordenam às células e os movimentos teciduais necessários para o reparo. O reparo tecidual em mamíferos é rápido e eficiente e seu maior objetivo consiste em cessar a hemorragia e reconstituir a barreira estrutural e funcional, prevenindo o ressecamento e a invasão de microrganismos no organismo (TORISEVA; KAHARI, 2009).

O infiltrado inflamatório é o conjunto de células inflamatórias presentes na região da injúria tecidual. A tabela 2.3 se refere à evolução do infiltrado inflamatório nos grupos tratados com o Controle Positivo e Negativo e Ácido Salazínico a 0,3% e 1%.

TABELA 2.2 Presença de infiltrado inflamatório em feridas de camundongos tratados com Neomicina+Bacitracina (Controle Positivo), Tween 80 (Controle Negativo), Ácido Salazínico 0,3% e 1%.

	3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
Controle Positivo	15,48 ± 4,26	17,63 ± 6,56	9,39 ± 4,87
Controle Negativo	39,24 ± 10,3 *	11,52 ± 6,5 *	10,13 ± 4,85
SAL 0,3%	19,69 ± 5,75 **	9,16 ± 3,61 *	11,32 ± 4,64
SAL 1%	16,21 ± 3,97 #	31,6 ± 6,75 **	5,73 ± 3,91 **

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

*Diferença significativa em relação ao grupo controle positivo (p<0,05)

#Diferença significativa em relação ao grupo controle negativo (p<0,05)

Verificou-se diferença significativa (p<0,05) nos valores do infiltrado inflamatório no 3º e 7º dia, tanto nos grupos tratados com SAL 0,3% quanto a 1%, em relação ao Controle Positivo. Apesar de demonstrar certo efeito irritante, aumentando o número de células inflamatórias no 7º dia de tratamento com ácido salazínico a 1%, ocorreu um intenso declínio deste parâmetro no 14º dia, apresentando diferença significativa em relação ao controle positivo e negativo.

Fibroblastos

A fibroplasia caracteriza-se pela presença dos fibroblastos, que migram para o interior da ferida a partir do tecido circundante, sendo responsáveis pela produção e deposição do colágeno, proteína de grande importância na matriz extracelular (ISAAC et al, 2010; DIEGELMANN & EVANS, 2004).

A tabela 2.4 corresponde a evolução fibroblástica dos grupos de animais tratados com Controle Positivo e Negativo e Ácido Salazínico nas concentrações de 0,3% e 1%.

TABELA 2.3 Presença de fibroblastos em feridas de camundongos tratados com Neomicina+Bacitracina (Controle Positivo), Tween 80 (Controle Negativo), Ácido Salazínico 0,3% e 1%.

	3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
Controle Positivo	3,15 ± 1,85	7,88 ± 3,35 [#]	25,75 ± 10,4
Controle Negativo	4 ± 2,14	3,46 ± 1,7 ^{**}	17,36 ± 6,6 *
SAL 0,3%	2,9 ± 2,1 [#]	16,64 ± 7,49 ^{**}	16,33 ± 6,93 *
SAL 1%	1,2 ± 0,92 ^{**}	11,8 ± 2,91 ^{**}	20,71 ± 5,02 *

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

*Diferença significativa em relação ao grupo controle positivo (p<0,05)

[#]Diferença significativa em relação ao grupo controle negativo (p<0,05)

Verificou-se diferença significativa (p<0,05) nos valores do infiltrado inflamatório no 3º e 7º dia, tanto nos grupos tratados com SAL 0,3% quanto a 1%, em relação ao Controle Positivo. O SAL 1% apresentou p<0,05 em relação do Controle Positivo no 7º e 14º dia. Observa-se que o SAL 1% induziu uma crescente proliferação fibroblástica ao longo dos dias de análise, resultado semelhante ao controle positivo (p>0,05).

Angiogênese

A angiogênese é etapa fundamental do processo de cicatrização, na qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes. Os novos vasos participam da formação do tecido de granulação provisório e suprem de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento (MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009).

A tabela 2.5 corresponde à quantidade de vasos sanguíneos presentes nas feridas dos grupos Controle Positivo e Negativo e dos animais tratados com Ácido Salazínico nas concentrações de 0,3% e 1%.

TABELA 2.4 Presença de vasos sanguíneos em feridas de camundongos tratados com Neomicina+Bacitracina (Controle Positivo), Tween 80 (Controle Negativo), Ácido Salazínico 0,3% e 1%.

	3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
Controle Positivo	0,11 ± 0,38	0,62 ± 0,91	0,66 ± 1
Controle Negativo	1,05 ± 1,64 *	0,46 ± 0,66	0,22 ± 0,48 *
SAL 0,3%	1 ± 1,24 *	0,86 ± 1,01	0,05 ± 0,21 *
SAL 1%	0,13 ± 0,34 #	0,77 ± 0,67	0,42 ± 0,69

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

*Diferença significativa em relação ao grupo controle positivo (p<0,05)

#Diferença significativa em relação ao grupo controle negativo (p<0,05)

De forma geral, o grupo tratado com ácido salazínico na concentração de 1% apresentou resultados de angiogênese semelhantes ao Controle Positivo, tendo uma diferença significativa em relação ao Controle Negativo (p<0,05). A acentuada redução no número de vasos no 14^o dia pós-cirúrgico é um achado já esperado. A baixa tensão de oxigênio e o alto conteúdo de ácido láctico presentes no leito da ferida, juntamente com fatores de crescimento endoteliais vasculares secretados pelos queratinócitos, estimulam a angiogênese que diminui à medida que a oxigenação local aumenta (DOUGHTY e SPARKS-DEFRIESE, 2007; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Determinação da dose letal a 50% (DL₅₀)

A dose letal (DL₅₀), calculada através do teste de toxicidade aguda do ácido salazínico extraído da *Ramalina complanata*, por via intraperitoneal em camundongos, foi 268,61 mg/Kg.

Atividade antibacteriana

Neste estudo, após 24 horas de incubação, não houve formação de halo inibitório para nenhuma das bactérias testadas neste estudo, utilizando o ácido salazínico extraído da *Ramalina complanata*, em três diluições diferentes.

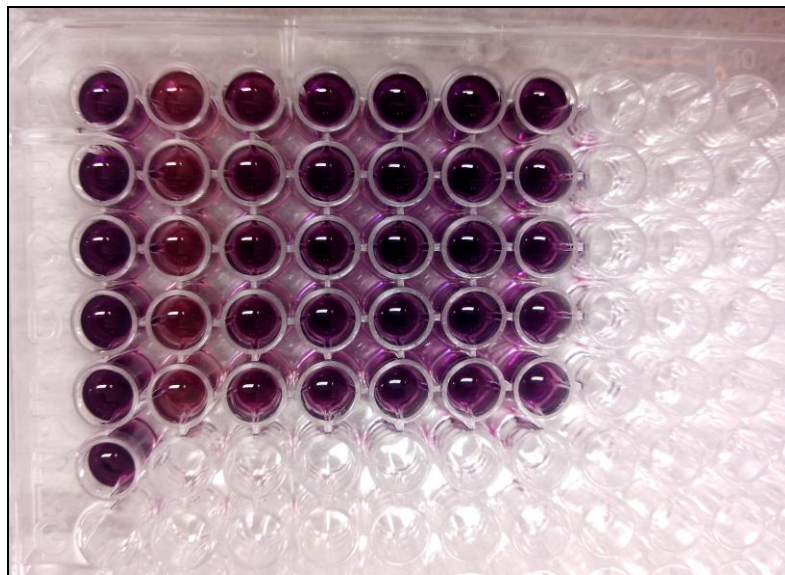
Esses dados da avaliação antibacteriana não corroboram com os estudos publicados sobre os extratos liquênicos e seus componentes que têm sido estudados há muitos anos no Brasil e no mundo, principalmente em relação às bactérias gram-positivas, como nos

experimentos de Manojlovic et al (2012), que utilizou o ácido salazínico extraído de líquens do gênero *Parmelia*.

Atividade antioxidante

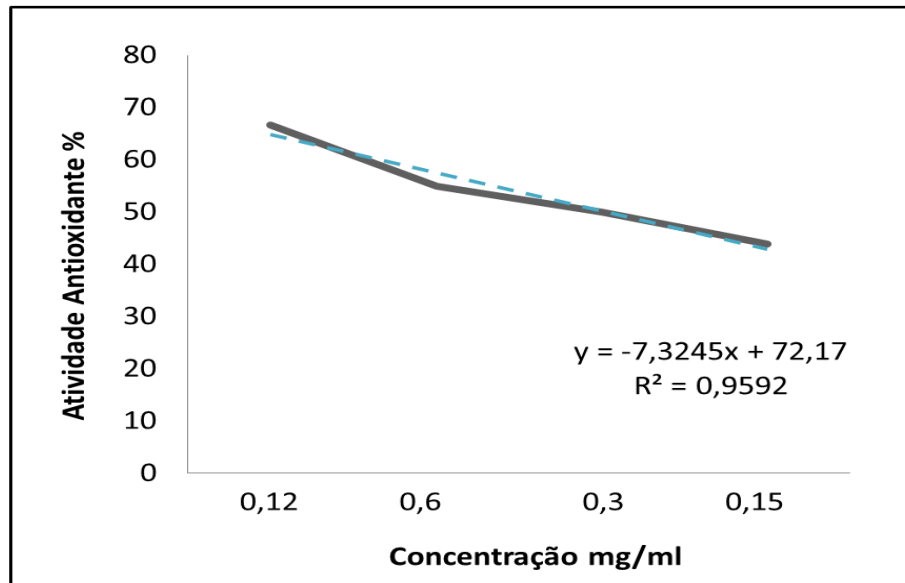
A molécula do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, radical livre e estável devido à localização de um elétron sobressalente ao longo da molécula como um todo, o qual não dimeriza, o que normalmente ocorre com os demais radicais livres, apresenta uma cor violeta intensa, e quando esta solução entra em contato com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio o radical passa à sua forma reduzida, perdendo a coloração violeta e se tornando amarelo pálido, como pode ser visualizado na Figura 2.16 (MOLYNEUX, 2004).

FIGURA 2.3 Fotografia da placa de microdiluição de 96 poços mostrando a reação fotocolorimétrica do ácido salazínico pelo método DPPH.



A atividade antioxidante, utilizando o método de captura dos radicais DPPH, do ácido salazínico isolado da *Ramalina complanata*, neste estudo está apresentada na Figura 2.17. Os resultados foram expressos em EC_{50} (concentração do composto em $\mu\text{g/mL}$ capaz de reagir com 50% do radical presente na solução de DPPH). Portanto, quanto menor o valor do EC_{50} , maior será a atividade antioxidante do extrato analisado.

FIGURA 2.4 Curva da atividade antioxidante do ácido salazínico extraído da *R. complanata* pela redução do DPPH.



Como se pode observar na Figura 2.17, o ácido salazínico isolado da *R. complanata* apresentou uma atividade antioxidante diretamente proporcional à sua concentração, semelhante aos resultados obtidos por Manojlovic et al (2012). Acredita-se que os compostos fenólicos têm um importante papel na atividade antioxidante de líquens. Vários estudos apontaram a relação dos compostos fenólicos com uma evidente atividade antioxidante (BEHERA et al. 2009; KOSANIT et al. 2012).

A EC_{50} obtida nesta avaliação da atividade antioxidante do ácido salazínico extraído da *Ramalina complanata* foi de 0,3027 mg.

CONCLUSÕES

O ácido salazínico extraído do líquen *Ramalina complanata* na concentração de 1% pode contribuir no processo de reparo tecidual após ferida cirúrgica, através do estímulo à fibroplastia e por apresentar efeito semelhante ao controle positivo (neomicina associada com bacitracina) na angiogênese. Na avaliação antibacteriana, o ácido salazínico não apresentou poder de inibição bacteriana no teste de difusão em disco de papel. Entretanto, demonstrou ser uma opção interessante de antioxidante natural.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. Chemistry of lichens substances. **Tokyo Society for the Promotion of Science**, 1954.

BARRY, A.L. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations. In: **Lorian V (ed) Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins. p.13, 1986.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal fo Clinical Pathology**. v.45, p.493-499, 1966.

BEHERA, B.C., VERMA, N., SONONE, A., MAKHIJA, U. Optimization of culture conditions for lichen *Usnea ghattensis* G. *Awasthi* to increase biomass and antioxidant metabolite production. **Food Technology and Biotechnology** 47, 7-12, 2009.

BERLION, M. M. **Mice an point d'étude d'analogues struturax de la geotaline**. Tese de doutorado, 1988.

BIANCHI M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n.2: p. 123-130, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRISKIN, D.P. Medical plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human healthy. **Plant Physiology**. 124:507-514, 2000.

CANDAN, M; YILMAZ, M; TAY, T; ERDEM, M; TÜRK, AO. Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Parmelia sulcata* and its salazinic acid constituent. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, 2007.

COUTINHO, W.M.; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeito de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos Benomyl e Captan sobre a microflora e qualidade fisiológica de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p.560-568, 1999.

CULBERSON, C.F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer-cromatografic method. **Journal of Chromatography** 72: 113-125, 1972.

DÉVÉHAT, FL; LEGOUIN, B; COUTEAU, C; BOUSTIE, J; COIFFARD, L. Lichenic extracts and metabolites as UV filters. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2013.

DIEGELMANN, R.F., EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front. Biosci.** 9, 283-289, 2004.

DOUGHTY, D.B.; SPARKS-DEFRIESE, B. Wound healing physiology. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. Acute and chronic wounds: current management concepts. 3 ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007.

FALCÃO, E.P.S.; SILVA, N.H.; GUSMÃO, N.B.; RIBEIRO, S.M.; HONDA, N.K.; PEREIRA, E.C. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farm. Bonaerense**, 21 (1): 2012.

GERONEMUS, R.G.; MERTZ, P.M.; EAGLSTEIN, W.H. The effect of topical antimicrobial agents. **Archives of Dermatology**, New Jersey, v.115, p.1311-1314, 1979.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, p.263-277, 2004.

GIBBONS, S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 04, p. 63–78, 2005.

HONDA, NK; PAVAN, FR; COELHO, RG; ANDRADE LEITE, SR; LEITE, CQF. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, 2010.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidante capacity assays. **Journal Agricultural Food and Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

ISAAC C, LADEIRA P.R.S, REGO F.M.P, et al. Physiological wound healing. **Ver. Med. V.** 89, n.3/4, p.125-31 jul.-dez. 2010.

KARBER, G & BEHRENS, B. Statistical methods in biological assay. Ed. Griffin **Ch. and C.** (London), 1964.

KOMIYA, T. & SHIBATA, S. Formation of lichen substances by mycobionts of lichens. Isolation of (+) usnic acid and salazinic acid from *Ramalina* ssp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 17:1205–1206, 1969.

KOSANIT, M., RANKOVIC, B., STANOJKOVIE, T. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of 3 *Umbilicaria* species. **Journal of Food Science** 77, T20-T25, 2012.

LEGAZ, M.E.E. & VICENTE, C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prusnatri* thallus. **Plant Physiologie** 71: 300-302, 1983.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinical Dermatology**. v.25, n.1, p.9-18, 2007.

LUCENA, P. L. H.; RIBAS FILHO, J. M.; CZECKO, M. M. N. G.; DIETZ, U. A.; CORREA NETO, M. A.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELE, E. S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 46-51, 2006.

MAGALHAES, Maria Sonia Felício et al . Effect of a combination of medium chain triglycerides, linoleic acid, soy lecithin and vitamins A and E on wound healing in rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 23, n. 3, June 2008 .

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA T. S., COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum L.* **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 09, p. 13-16, 2010.

MANOJLOVIC, NT; VASILJEVIC, PJ; MASKOVIC, PZ; JUSKOVIC, M; BOGDANOVIC-DUSANOVIC, G. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica*(L.) Delise (Umbilicariaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

MENDONÇA R.J.; COUTINHO-NETTO J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**. 84(3):257-262, 2009.

MANCINI FILHO, J.; VAN-KOIJ, A.; MANCINI, D.A.P.; COZZOLINO, F.F.; TORRES, R.P. Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomun zeylanicum*, Breyne) extracts. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v.137, n.11, p.443-447, 1998.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.5, p.525-542, 2003.

MARTORELLI, S.B.F. *et al.* Efeito anti-inflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius Raddi* (AROEIRA) a 30% em orobase – estudo “*in vivo*”. **International Journal of Dentistry**, v. 10, nº 3, p. 80-90, 2011.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26, 211–219, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; Extraction and analysis of phenolics in food, **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95–111, 2004.

RANKOVIĆ et al. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

SANGWAN, P. L.; KOUL, J. L.; KOUL, S.; REDDY, M. V.; THOTA, N.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; KALIA, N. P; QAZI, G. N. Piperine analogs as potent *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9847-9857, 2008.

SOUSA, ET AL., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. 30, 351-355. 2007.

T. KOMIYA ND S. SHIBATA, *Chem. Pharm. Bul.* (Tokyo), 17, 1305, 1969.

TAZIMA, M. F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Simpósio: Fundamentos em clínica cirúrgica – 1ª parte**, Capítulo II. Medicina (Ribeirão Preto). N. 41 (3), p.259-64, 2008.

TORISEVA, M.; KAHARI, V.M. Proteinases in cutaneous wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.66, p-203-224, 2009.

VENTURA, M. S. F.; PINTO, R. H.; SILVA, F. H. F. Aspectos histológicos do processo de cicatrização de feridas abertas após tratamento com *Aloe barbadensis*. **Sanitas** 6, n. 12, p. 86-90, 2001.

VITORINO FILHO, R. N. L. **Uso de polissacarídeo extraído do exsudato de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) na terapêutica tópica de feridas**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O ácido salazínico extraído do líquen *Ramalina complanata* a 1% apresentou efeito pró-inflamatório no 7º dia pós-cirúrgico, mas ocorrendo um severo declínio desse parâmetro no 14º dia de tratamento, com diferença significativa em relação ao controle positivo e negativo.

Na avaliação da contração da ferida, o ácido salazínico a 1% apresentou uma porcentagem de redução semelhante ao grupo controle positivo em todos os dias de avaliação pós-cirúrgica, embora não tenha havido diferença significativa em nenhum dos grupos acompanhados. O ácido salazínico também apresentou resultados semelhantes ao controle positivo na avaliação da proliferação fibroblástica em todos os dias analisados (3º, 7º e 14º dia pós-cirúrgico).

Apesar da baixa indução da formação de novos vasos sanguíneos, ocorrida em todos os grupos experimentais, o ácido salazínico na concentração de 1% apresentou números absolutos próximos aos encontrados utilizando o controle positivo, ao longo de todos os dias de análise.

Diante destas observações, podemos apontar que o ácido salazínico na concentração de 1% pode apresentar atividade cicatrizante semelhante a Neomicina associada com a Bacitracina.

Neste estudo não se verificou atividade antibacteriana ao utilizar o ácido salazínico extraído da *R. complanata*. Este achado não corrobora com diversos estudos anteriores e novas análises devem ser conduzidas para elucidar o efeito encontrado neste experimento.

Quanto à atividade antioxidante verificada neste estudo, o ácido salazínico apresenta potencial antioxidante natural, diretamente proporcional a sua concentração. Este resultado corrobora com diversos estudos já conduzidos no mundo.

REFERÊNCIAS

- ABDILLE, M. H.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.
- AL-ATTAR A, MESS S, THOMASSEN JM, KAUFFMAN CL, DAVISON SP. Keloid pathogenesis and treatment. **Plast Reconstr Surg**, 117(1): p. 286-300, 2006.
- ALLENDORF, J.D.; BESSLER, M.; HUANG, J.; KAYTON, M.L.; LAIRD, D.; NOWYGRAD, R.; TREAT, M.R. Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4 J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength. **Lasers Surg Med**; 20(3):340-5, 1997.
- ARIAS, M.E.; GOMEZ, J.D.; CUDMANI, N.M.; VATTUONE, M.A.; ISLA, M.I. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill ex Hook et Arn. **Life Science**, 75 (2), 191-202, 2004.
- BALDEZ, R.N.; MALAFAIA, O.; CZESCKO, N.G.; MARTINS, N.L.P.; FERREIRA, L.M.; RIBAS, C.A.P.M.; SALLES JR., G.; DEL CLARO, R.P.; SANTOS, L.O.M.; GRAÇA NETO, L.; ARAÚJO, L.R.R. Análise da cicatrização do colon com uso do extrato aquoso da *Orbignya phalerata* (babaçu) em ratos. **Acta Cir Brasil.**; 21 (suplem 2): 31-38, 2006.
- BEZERRA, J.A.F.; CAMPOS, A.C.L.; VASCONCELOS, P.R.L.; NICARETA, J.R.; RIBEIRO, G.R.; SEBASTIÃO, A.P.M.; URDIALES, A.I.A.; MOREIRA, M.; BORGES, A.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cir Bras.**; 21(suplem 3): 16-25, 2006.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**; 117(7 Suppl):12S-34S, 2006.
- CARVALHO, V.F.; COLTRO, O.S.; FERREIRA, M.C. Feridas em pacientes diabéticos. **Revista de Medicina** (São Paulo). jul.-dez.:89(3/4):164-9, 2010.
- COUTINHO, W.M.; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeito de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos Benomyl e Captan sobre a microflora e qualidade

fisiológica de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p.560-568, 1999.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agentes. **Clin. Microbiol. Rev.**, 2 (4), 564-82, 1999.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O. BARBOSA JR., A. M.; MELO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, 111, 409-4012, 2007.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 14:: 97-103, 2004.

DEODHAR, A.K.; RANA, R.E. Surgical physiology of wound healing: a review. **J Postgrad Med**; 43(2):52-6, 1997.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7::1-16, 2006.

FALCÃO, E.P.S.; SILVA, N.H.; GUSMÃO, N.B.; RIBEIRO, S.M.; HONDA, N.K.; PEREIRA, E.C. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farm. Bonaerense**, 21 (1): 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, 43 (1), 61-68, 1997.

GARROS, I.C.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRE, O.J.M.; AGULHAM, M.A.; ARAÚJO, A.C.F.; SANTIS-ISOLAN, P.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; ARRUDA, E.C.M. Extrato *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, n.3, p.55-65, 2006.

GOMES, C.S.; CAMPOS, A.C.L.; TORRES, O.J.M.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, A.T.R.; TENÓRIO, S.B.; TÂMBARA, E.M.; SAKATA, K.; MORAES JR., H.; FERRER, A.L.S. Efeito do extrato de *Passiflora Edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**; 21 (suplem 2): 9-16, 2006.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.C.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 119, 598-560, 1992.

HE, F.; NOWSON, C.; LUCAS, M.; MACGREGOR, G. Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: Metaanalysis of cohort studies. **Journal of Human Hypertension**, v. 21, n. 9, p. 717-782, 2007.

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

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agricultural Food and Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUNECK, S; YOSHIMOURA, I. Identification of lichen substances. Berlin. **Springer-verlag**. p. 493, 1996.

KUSKOSKI, M.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAWRENCE, W.T.; DIEGELMANN, R.F. Growth factors in wound healing. **Clin Dermatol**; 12(1):157-69, 1994.

LONGAKER, M.T.; PELED, Z.M.; CHANG, J.; KRUMMEL, T.M. Fetal wound healing: progress report and future directions. **Surgery**; 130(5):785-7, 2001.

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.

MARTINS, N.L.P. et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, Supl.3, 2006.

NASCIMENTO, G.G.F./ LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. 31, 247-256, 2000.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, v.29, p. 273-300, 1990.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra, 2002.

PESSINI, G.L.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G. Antibacterial activity of extracts and neoglicans from *Piper regnellii* (miq.) C. DC. Var. *Pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 98 (8), 1115-1120, 2003.

QUINTANS-JÚNIOR et al. Purification, Physicochemical Properties, Thermal Analysis and Antinociceptive Effect of Atranorin Extracted from *Cladina kalbii*. **Biol. Pharm. Bull.** 31(10) 1977—1980, 2008.

QUINTANS-JÚNIOR et al. Anti-inflammatory and toxicity studies of atranorin extracted from *Cladina kalbii* Ahti in rodents. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 47, n. 4, oct./dec., 2011.

RANKOVIĆ et al. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. BIOMATERIALS: Where We Have Been and Where We Are Going. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v.6, 41-75, 2004.

SIMIC, M.G., JAVANOVIC, S.V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. Food phytochemicals for cancer prevention Washington: **American Chemical Society**. P20-33, 1994.

SOONG, Y.Y.; BARLOW, P.J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v.88, p.411-417, 2004.

STEGE, P. W.; DAVICINO, R. C.; VEGA, A. E. Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*. **Phytomedicine**, 13, 724-727, 2006.

SRINIVASAN, D.; NATHAN, S.; SURESH, T.; PERUMALSAMY, P L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Jornal of Ethnopharmacology**, 74, 217-220, 2001.

SOUSA, ET AL., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. 30, 351-355. 2007.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; FILHO, J. M. B. Orégano (*Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista de Higiene Alimentar**, 19 (132), 40-45, 2005.

STEINBRECH, D.S.; LONGAKER, M.T.; MEHRARA, B.J. et al. Fibroblast response to hypoxia: the relationship between angiogenesis and matrix regulation. **J Surg Res**; 84(2):127-33, 1999.

TAVEIRA, N.; NASCIMENTO, T.; GOMES, P.; OLIVEIRA, A. 2004. Manual prático de microbiologia. **Caparica, Lisboa: Instituto Superior de Ciências da Saúde-Sul**, Cap. 5, p.49, 2004.

VALE, J.R.; CZECZKO, N.C.; AQUINO, J.U.; RIBAS-FILHO, J.M.; BETTEGA, L.; VASCONCELOS, P.R.L.; CORREA NETO, M.A.; NASSIF, P.A.N.; MAZZA, M.; HENRIQUES, G.S. Estudo comparativo da cicatrização de gastrorrafias com e sem o uso do extrato de *Jatropha gossypifolia* L. (pião roxo) em ratos. **Acta Cir Brasil**; 21 (suplem 3): 40-48, 2006.

VICEDO, T.B.; CORREAS, F.J.H. Antioxidants: uma terapêutica de futuro? **Nutr. Hosp.** 12 (3), 108-120, 1997.

WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A.; PELZ, K.; SCHEMPP, C. M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, 2006.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg Clin North Am.**; 77(3):509-28, 1997.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 4026-4037, 2004.

APÊNDICE A

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 02 de maio de 2013.

Ofício nº 560/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profº Emerson Peter da Silva Falcão**
Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória - CAV
Processo nº 23076.015402/2013-53

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, “**Avaliação dos Efeitos Biológicos de Compostos Isolados do Líquen *Cladina dendroides* (des Abb) Ahti no Modelo de Ferida em Camundongos**”.

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

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

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

Origem dos animais: Biotério UFPE/CAV. Animais: camundongos heterogênicos; Linhagem: Albino Suíço; Idade: 2 meses; Peso: 20-30g; sexo: machos; nº total de animais: 60.

Atenciosamente,

Prof.ª Maria Teresa Janssen
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

APÊNDICE B

PLANTA MEDICA—Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research

Guidelines for Authors

1. Editorial Policy

PLANTA MEDICA—Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research is published in 18 issues a year. The following areas of medicinal plant and natural product research are covered:

1. Biological and pharmacological activity
2. Pharmacokinetic investigations and clinical studies (Pharmacokinetic investigations examining the kinetics of drug disposition and bioavailability including the use of in vitro, in vivo and human studies)
3. Natural product chemistry
4. Analytical studies

Only papers of highest scientific quality, concisely written and complying with these Guidelines for Authors can be considered for publication. All contributions are peer-reviewed by independent referees.

Submission of a manuscript to *Planta Medica* implies that it represents original research not previously published and that it is not being considered for publication elsewhere.

The corresponding author must declare that the manuscript is submitted on behalf of all authors. Copyright belongs to the publisher upon acceptance of the manuscript. There are no page charges.

The language of publication is English. Manuscripts written by authors whose mother tongue is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission. Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to the authors.

Authors investigating the chemistry of a single species should aim to publish their results in a single manuscript rather than in a series of papers. Manuscripts should not report fragmentary parts of a larger study. Pharmacological investigations of extracts require detailed extract characterization (see below).

Submission of a manuscript signifies acceptance of the journal's Guidelines for Authors. Submissions which are not in line with these principles may be returned directly to the authors by the Editorial Office.

A statement clarifying the conflicts of interests of all authors must be included at the end of the manuscript (before the references); this will be published. Conflicts of interest also need to be declared during the submission process. Declaration of conflicts of interest is mandatory; if none, this also needs to be stated.

2. Submission of Manuscripts

Manuscripts can be submitted exclusively online at <http://mc.manuscriptcentral.com/plamed> or using the link at <http://www.thieme.de/plantamedica>. Submissions of hardcopy manuscripts or by email will not be accepted.

A sample manuscript (for Original Papers) is available at <http://mc.manuscriptcentral.com/plamed> → Instructions and Forms, and at www.thieme.de/plantamedica. In addition to the Guidelines, authors are urged to follow these formats when preparing a manuscript.

Commonly used text processors should be used for preparation of the manuscripts. No pdf files must be submitted. The manuscript has to be accompanied by a cover letter, in which the authors briefly explain the significance of their findings and the interest to the readership of *Planta Medica*.

The manuscript (main text, tables, structural formulas and figures) should be submitted as one file. Figures will be automatically rendered in colour online and black and white in print. Colour reproduction in print will be subject to fees of EUR 440 for the first colour figure and EUR 80 for any further figure (incl. 19% VAT).

Authors are strongly encouraged to provide non-essential but useful data, figures and tables as Supporting Information(see below).

3. Format of Manuscripts

3.1. Original Papers. Original papers are research articles describing original experimental results. The material should be arranged in the order: Title Page / Abstract / Keywords / Abbreviations / Introduction / Results and Discussion / Materials and Methods / Acknowledgements / Conflicts of Interest / References / Figure Legends / Tables / Structural Formulas / Figures. Results and Discussion sections may appear as two separate parts or as a combined “Results and Discussion” section. No subheadings are allowed within this section. The normal length of the main text of an Original Paper, excluding references, tables, figures and figure legends, is about 3,000 words. In exceptional and well justified cases longer manuscripts may be accepted. When submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement, giving compelling reasons for the length of the paper.

4. Preparation of Manuscripts

Please note that papers published in *Planta Medica* now follow the IRDMAR structure: Introduction, Results and Discussion, Materials and Methods, Acknowledgements, References.

In addition to the Guidelines, authors should consult the sample manuscript (for Original Papers) at <http://mc.manuscriptcentral.com/plamed> →Instructions and Forms, or at www.thieme.de/fz/plantamedica prior to preparing their contribution. Commonly used text processors should be used for preparation of the manuscripts.

For submission of all manuscripts, follow the instructions of the online submission system. Before submission, prepare the cover letter, and keep ready all information on the manuscript (title, full name and affiliation of all authors, abstract, name of all files to be submitted). The author submitting the manuscript will be corresponding author.

4.1. The Title Page must contain the title of the manuscript, the full names referenced by numerical superscripts with affiliation and addresses of all authors, and the full address of the corresponding author.

4.2. The Abstract should contain brief information on purpose, methods, results and conclusion (without subheadings).

4.3. The Keywords should include the scientific name and family of the plant(s) or other organism(s) investigated. 4–6 keywords should be listed.

4.4. Abbreviations should generally be used sparingly. Standard abbreviations such as m. p., b. p., K, s, min, h, μ L, mL, μ g, mg, g, kg, nm, mm, cm, ppm, mmol, HPLC, TLC, GC, UV, CD, IR, MS, NMR can be used throughout the manuscript. Non-standard abbreviations must be defined in the text following their first use. Provide a list of all nonstandard abbreviations after the keywords. Define all symbols used in equations and formulas. If symbols are used extensively, provide a list of all symbols together with the list of abbreviations.

4.5. The Introduction should state the purpose of the investigation and relate to current knowledge in the specific topic addressed.

4.6. Results should be presented in a concise manner. Tables and figures should be presented in a manner which maximises clarity and comprehension. The Discussion should provide an interpretation of the data and relate them to existing knowledge. Subtitles are only admitted in exceptional cases.

4.7. Materials and Methods. Specific details about test materials and test compounds, instrumentation and experimental protocols should be given here. This section should contain sufficient details so that others are able to reproduce the experiment(s). Purity (%) of all reference and standard compounds should be mentioned, as well as the method how it

was determined. Previously reported methods should be referenced only. Suppliers for major equipment, cell lines, chemicals, biochemical reagents and major disposables should be indicated.

4.7.1. Documentation of plants and other organisms or starting materials. Use the correct scientific nomenclature. For plants, the Index Kewensis (electronic Plant Information Centre ePIC, Royal Botanic Gardens, Kew, UK: <http://www.kew.org/epic>), and/or the International Code of Botanical Nomenclature (www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code/tokyo-e/default.htm) should be followed. Give the scientific name (in italics), the author of this name and the family. Indicate who identified the material. The manuscript must include references to voucher specimens of the plants (deposited in a major regional herbarium) or the material examined including their registration number(s). It should be mentioned which plant parts have been used.

4.7.2. Description of the preparation of extracts and isolation of compounds. The kind and amount of starting material, solvents and extraction methods must be indicated. The description of chromatographic systems should contain the quantitative information that allows the reader to repeat the work. Column dimensions, stationary phase, particle size, mobile phase composition, flow rate, sample amount, and elution volumes (or retention times, k' values) of fractions should be given. E. g.: "MPLC on silica gel (40–63 μm ; 2 \times 50 cm), MeOH/EtOAc 8 : 2, 3 mL/min; tR of 1:60–70 mL, 2:120–140 mL, 3: 145–175 mL; detection of eluates by TLC (SiO₂, MeOH/H₂O 9 : 1; Dragendorff reagent), R_f1: 0.35, 2: 0.55, 3: 0.73)." When using gradients the volumes of solvents should be presented; fractions should be defined by their elution volume. Similar information is necessary for HPLC, GLC, DCCC, MLCC and all other methods of purification. Figures of chromatograms will only be accepted if they are essential for understanding the methods or the results described. GC identifications of constituents of essential oils must be supported by retention indices on a polar and an apolar column. Identification by GC- MS is preferred.

4.7.3. Physico-chemical characterisation of compounds. Data provided for new compounds should enable an unambiguous identification of the substance and have to appear in the following order, if available: visual appearance, chromatographic mobility in TLC, GC, or HPLC, mp, UV- vis, specific optical rotation, CD, IR, ¹H- NMR, ¹³C- NMR, low resolution MS, high resolution MS, elemental analysis. Note that for specific optical rotation $[\alpha]_{\text{Dtemp}}$, the symbol c is defined as mass of substance (in g) in 100 mL of solution. For specific optical rotation no unit should be specified; the "degree" symbol "°" should not be used. In case of spectroscopic work on known substances refer, if possible, to published data; the manuscript should then contain the following indication: Copies of the original

spectra are obtainable from the corresponding author. Such original spectra and/or spectral assignments can be provided as Supporting Information (see below), as well as structural formula outlining NMR spectral correlations, MS fragmentations, etc. IR, NMR, mass, and UV spectra should normally not be given in the manuscript as figures, but only if the listing of characteristic signals is not sufficient.

4.7.4. Chemical nomenclature used should be based on the systematic rules adopted by Chemical Abstracts and IUPAC. Trivial names should be avoided unless they are definitely advantageous over the corresponding systematic names. Trivial names are not accepted for close analogues and derivatives of known compounds. For reference drug substances the INN names should be used.

4.7.5. X-Ray crystallographic data must include a line drawing of the structure, a perspective drawing, and a discussion of bond lengths and angles. A supplement describing full details of the structure and methods and means of its determination in a form suitable for deposition must be submitted to the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: + 44 (0)1223 33 60 33 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk). Deposition of the data has to be prior to submission of the manuscript, and appropriate reference has to be made in the Materials and Methods section, including the deposition number.

4.7.6. Analytical studies. Key data on method validation must be provided and should typically include information on specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy, precision, intermediate precision, and some robustness studies. Information on the purity of reference compounds, and on the methods used for the determination of purity must be given. Recoveries of extraction and sample pre-purification steps have to be indicated. Adequate statistical treatment of data is required. For more information regarding validation issues, prospective authors should also refer to ICH guidelines. Analytical studies of a routine nature will not be considered for publication.

4.7.7. Pharmacological investigations. *Planta Medica* will only consider manuscripts in which conclusions are based on adequate statistics that incorporate the appropriate tests of significance, account for the type of data distribution and are based on the number of experimental observations required for the application of the respective statistical method. In each case positive controls (reference compounds) should be used and the dose/activity dependence should be shown. When working with experimental animals, reference must be made to principles of laboratory animal care or similar regulations, and to approval by the local ethical committee. The approval number and the corresponding date must be provided.

Pharmacological investigations of extracts require detailed extract characterisation. This includes botanical characterisation of plant material, solvent(s), duration and temperature of extraction, plus other method(s) used for preparation(s). The drug to extract ratio (DER) must be given. Chromatographic profiling (e.g. HPLC profile with a reference compound recorded at different wavelengths) should be carried out, with at least the major peaks identified, or qualitative and quantitative information on active or typical constituents should be provided. Altogether the phytochemical standardisation of an extract and/or fraction(s) require state-of-the-art methods.

4.7.9. Biological screening. Papers dealing with the biological screening of a meaningful number of extracts of plants or other organisms can be considered for publication in *Planta Medica*. Identification of the material should properly be documented, and preparation of the extracts should clearly be described (see above, sections 4.6.1 and 4.6.2). Biological activities should be reported by listing IC₅₀ values, or a dose-response relationship should be shown by using at least two test concentrations. Positive controls (reference compounds) should be included. Results should be presented in a concise format, and the discussion should be kept to a minimum.

4.8. Acknowledgements should list persons who made minor contributions to the investigation and organizations providing support.

4.9. References should be numbered in the order in which they are cited in the text, using arabic numbers between square brackets, e.g.[1]; for multiple references, e.g. [1–3] or [1, 2, 5].The list of references should be arranged consecutively according to the numbers in the text. Use Index Medicus abbreviations for journal titles. Authors bear complete responsibility for the accuracy of the references. The following examples illustrate the format for references:

a) Journals

Trute A, Nahrstedt A. Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix*. *Phytochem Anal* 1996; 7: 204–208

Article in press without doi:

Lim EK, Ashford DA, Hou B, Jackson RG, Bowles DJ. *Arabidopsis* glycosyltransferases as biocatalysts in fermentation for region selective synthesis of diverse quercetin glucosides. *Biotech Bioeng*, in press

Article in press with doi:

Lim EK, Bowles DJ. A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J*, advance online publication 8 July 2004; doi: 10.1038/sj.emboj.7600295

b) Books

Citation to complete book:

Mabberley DJ. *The plant book*, 2nd edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1997: 520–521

Citation to article within a book:

Lechtenberg M, Nahrstedt A. Cyanogenic glycosides. In: Ikan R, editor. *Naturally occurring glycosides*. Chichester: Wiley & Sons; 1999: 147–191

Lorberg A, Hall MN. TOR: the first ten years. In: Thomas G, Sabatini DM, Hall MN, editors. *TOR—target of rapamycin*. Heidelberg: Springer Verlag; 2004: 1–18

Multi-volume books and encyclopedias:

Warren SA. Mental retardation and environment. In: *International encyclopedia of psychiatry, psychology, psychoanalysis and neurology*, Vol. 7. New York: Aesculapius Publishers; 1977: 202–207

Pharmacopoeia of China, Part 1. Beijing: People's Health Press; 1977: 531–534

c) PhD and Diploma Theses

Dettmers JM. *Assessing the trophic cascade in reservoirs: the role of an introduced predator [dissertation]*. Columbus: Ohio State University; 1995

d) Patents

Cookson AH. Particle trap for compressed gas insulated transmission system. US Patent 4554399; 1985

e) Conference Paper

Okada K, Kamiya Y, Saito T, Nakagawa T, Kaawamukai M. Localization and expression of geranylgeranyldiphosphate synthases in *Arabidopsis thaliana*. Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, Baltimore, MD; 1999

f) Electronic Sources

Agatep R, Kirkpatrick RD, Parchaliuk DL, Woods RA, Gietz RD. Transformation of *S. cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. Technical tips online. Available at <http://research.bmn.com/tto>. Accessed September 22, 2005.

If no author is given, the title is used as the first element of the citation.

If reference is made to papers submitted or in press, authors are requested to add a file of the manuscript or galley proof to the online submission. Avoid references to unpublished personal communications.

5. Proofs and Reprints

Galley proofs will be sent to the corresponding author as a PDF file. An electronic author reprint will be supplied free of charge after online publication.

January, 2013

© 2013 Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York.

All rights reserved.

For further information, please contact plantamedica@thieme.de