



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

ALZIANE ANDRADE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO COLÁGENO DA DERME DOS MEMBROS DE NEONATOS
PROVENIENTES DE MATRIZES SUBMETIDAS AO ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia*
substellata DURANTE A PRENHEZ**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALZIANE ANDRADE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO COLÁGENO DA DERME DOS MEMBROS DE NEONATOS
PROVENIENTES DE MATRIZES SUBMETIDAS AO ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia*
substellata DURANTE A PRENHEZ**

TCC apresentado ao Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas como requisito para incremento da Disciplina Eletiva do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos
Co-orientadora: Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2015

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

A447a Almeida, Alziane Andrade.

Avaliação do colágeno da derme dos membros de neonatos provenientes de matrizes submetidas ao ácido úsnico de *cladonia substellata* durante a prenhez./ Alziane Andrade Almeida. - Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.

36 folhas: il.; fig., tab.

Orientadora: Katharine Raquel Pereira dos Santos.

Co-orientadora: Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho.

TCC (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Licenciatura em Ciências Biológicas, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Líquens. 2. Colágeno. 3. Testes de Toxicidade. I. Santos, Katharine Raquel Pereira dos (Orientadora). II. Marinho, Ketsia Sabrina do Nascimento (Co-orientadora). III. Título.

589.1 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-025/2016

ALZIANE ANDRADE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO COLÁGENO DA DERME DOS MEMBROS DE NEONATOS
NASCIDOS DE MATRIZES SUBMETIDAS AO ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia*
substellata DURANTE A PRENHEZ**

Trabalho de Conclusão de Curso –
TCC apresentado ao Curso de
Graduação em Licenciatura em
Ciências Biológicas como requisito
para incremento da Disciplina Eletiva
do Curso de Licenciatura em Ciências
Biológicas.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dra. Maria Juliana Gomes Arandas
Universidade Federal Rural de Pernambuco

“Dedico a Deus, por me proporcionar
forças e conquistas. Aos meus pais,
como reconhecimento ao seu apoio e
dedicação”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser meu braço forte, iluminando meu caminho a todo o momento. E que somente a Ele seja dada toda honra, glória e louvor.

Aos meus pais, Eliane Henriques e Davi Almeida, por serem meus exemplos de caráter e por toda paciência, apoio, amor incondicional e orações realizadas em prol do meu futuro.

À minha querida orientadora, professora Katharine Santos, pelos ensinamentos, paciência, incentivos, e por sempre se fazer presente nos momentos de dúvidas. Obrigada por contribuir com minha formação profissional.

À minha querida co-orientadora, Ketsia Sabrina, pelo exemplo de competência, sempre presente em todos os momentos de aflição e dúvidas nas pesquisas. Agradeço imensamente a você por cada ensinamento. Que Deus lhe recompense por tudo e te permita crescer cada vez mais, pois você merece.

À querida Juliana Arandas, por toda paciência e ensinamentos transmitidos. Que Deus lhe abençoe e recompense. Agradeço de coração por todas palavras de apoio.

Ao meu namorado Rinaldo Neto, pelas palavras de incentivo, carinho e brincadeiras que sempre me animavam nos momentos mais difíceis.

Aos colegas e companheiros da minha linha de pesquisa: Keila Tamires, Lavínia Tomás e Josemi Neto, muito obrigada pelos momentos de compreensão e descontração.

Às minhas grandes amigas/irmãs Ruthellen de Kássia, Hérica Lúcia, Carla Soares, e irmão José Everton por toda amizade, carinho e momentos de diversão. MUITÍSSIMO obrigada!

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Centro Acadêmico de Vitória (CAV) pela oportunidade de realizar este trabalho.

A todos os meus professores da UFPE/CAV que contribuíram para minha formação durante a graduação.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta, no desenvolvimento deste trabalho.

“Porque para Deus, nada é impossível”. (*Lucas 1:37*)

RESUMO

O ácido úsnico é um composto resultante do metabólito secundário de líquens, e pode ser produzido por várias espécies destes, tais como *Cladonia substellata*. A literatura descreve relevantes atividades biológicas para o ácido úsnico. Porém, há algumas limitações para a sua aplicação terapêutica. Em recentes estudos foi relatado que tal composto provoca alterações morfológicas externas em neonatos expostos durante o período fetal. Alterações estas que podem afetar diretamente as redes de colágeno, influenciado pelo composto administrado. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo analisar histologicamente a deposição do colágeno na derme dos membros de neonatos provenientes de matrizes submetidas ao ácido úsnico. Foram utilizados 60 neonatos de mães submetidas ao ácido úsnico. As ratas do grupo controle (n=6) receberam por gavagem uma solução fisiológica, e as do grupo tratado (n=6) receberam o ácido úsnico purificado na dose 25mg/Kg. Ao 20º dia de prenhez as fêmeas foram sacrificadas por overdose dos anestésicos xilazina (0,3 ml/kg) e cetamina (0,3 ml/kg), e em seguida, os úteros foram dissecados para retirada dos neonatos. Para a análise histológica dos membros foram considerados cinco fetos de cada progenitora. Os membros dianteiros e traseiros foram fixados em (NBF) formalina a 10% neutra tamponada, e posteriormente, processados seguindo a técnica histológica de rotina. Os blocos foram cortados em 4µm de espessura, corados pelo Picrosirius red, e analisados em microscópio óptico de luz polarizada. Os resultados demonstraram que todos os neonatos do grupo tratado apresentaram uma menor quantidade de colágeno distribuído na derme, enquanto que os neonatos do grupo controle mostraram-se com uma maior deposição de colágeno na derme. Esses resultados sugerem uma redução na deposição do colágeno da derme, influenciado pelo ácido úsnico, que trará consequências futuras na estrutura dos tecidos dos membros.

Palavras-chave: Metabólito secundário. Colágeno. Toxidade.

ABSTRACT

The usnic acid and a metabolite of Compound Resulting Secondary lichens, and can be produced by various species thereof such as *Cladonia substellata*. The literature describes relevant biological activity for usnic acid. However, there are some limitations to their therapeutic application. In recent studies it has been reported that this compound causes external morphological changes in neonates exposed during the fetal period. These changes that can directly affect the collagen network, influenced by the administered compound. In view of this, the present study aimed to analyze histologically the deposition of collagen in the dermis of the members of newborns from mothers submitted to úsnico acid. 60 were used neonates from mothers submitted to úsnico acid. The headquarters of the control group ($n = 6$) received by gavage a physiological solution , and the treated group ($n = 6$) were purified usnic acid at a dose 25 mg / kg . At day 20 of pregnancy females were sacrificed by anesthetic overdose of xylazine (0.3 ml / kg) and ketamine (0.3 ml / kg) , and then the uteri were dissected for removal of neonates. For histological analysis of members were considered five fetuses from each parent . The front and hind limbs were fixed in (NBF) buffered 10% formalin neutral , and thereafter processed according to routine histological technique . The blocks were cute into 4 μ m thick, stained with Picrosirius red, and analyzed by polarized light optical microscope. The results showed that all newborns treated group had a lower amount of collagen distributed in the dermis, while the control group neonates showed up with a production of collagen in the dermis. These results suggest a reduction in the dermal collagen deposition, influenced by usnic acid, which will further affect the structure of the tissues of the limbs.

Key words: Secondary metabolite. Collagen. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Média e desvio padrão da área do colágeno (mm²) dos grupos controle (C) e tratado (T) **30**

Figura 1 - Fotomicrografia do colágeno da derme do tipo III de neonatos submetidos à solução fisiológica durante o período gestacional das matrizes. Rede de colágeno com o padrão da birrefringência (verde-amarelado), indicando a presença de fibras mais finas e irregulares (seta). Coloração: picrosirius red. Aumento: 100X. **30**

Figura 2 - Fotomicrografia do colágeno da derme do tipo III de neonatos submetidos ao ácido úsnico de *Cladonia substellata* durante o período gestacional das matrizes. Rede de colágeno com o padrão da birrefringência (verde-amarelado), indicando a presença de fibras mais grossas e irregulares (seta). Coloração: picrosirius red. Aumento: 100X. **31**

LISTA DE ABREVIações

CAV: Centro Acadêmico de Vitória

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

NBF: Formalina Neutra Tamponada.

SPSS: StatisticalPackage for the Social Sciences.

Fig.: Figura

T: Tratado

C: Controle

D0: Dia zero

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	LIQUENS	15
2.2	ÁCIDO ÚSNICO	16
2.3	COLÁGENO DA DERME	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	GERAL	21
3.2	ESPECÍFICOS	21
4	REFERÊNCIAS	22
5	ARTIGO	28

1 INTRODUÇÃO

Os líquens são uma das mais importantes fontes naturais de compostos biologicamente ativos, os quais derivam de seu metabolismo primário e secundário. Dos diversos metabólitos secundários produzidos pelos líquens, destaca-se o ácido úsnico (MELO *et al.*, 2008).

Muitos estudos têm demonstrado diversas propriedades biológicas atribuídas ao ácido úsnico, tais como: antibiótica, antiviral, Antiprotozoária, antipirética, antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica e antitumoral (BOMFIM, 2009; CARVALHO *et al.*, 2005; COCCHIETTO *et al.*, 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Entretanto apesar de todas essas atividades biológicas já relatadas, sua utilização terapêutica é bastante limitada, devido a diversos casos de toxicidade já relatados em alguns estudos (COCCHIETTO *et al.*, 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; MULLER, 2001).

Estudo realizado por Silva (2011) com o ácido úsnico de *Cladonia substellata*, relatou relevantes sinais de toxicidade na prole de fêmeas prenhez tratadas. Neste ensaio foi visualizada uma redução no número de fetos viáveis, sendo que 24% dos fetos não prosseguiram o desenvolvimento. Macroscopicamente esta interrupção no desenvolvimento da prole das fêmeas prenhez tratadas, foi visualizada a presença de malformações, inclusive uma atrofia dos membros superiores e inferiores.

Recentes ensaios realizados por Silva (2014) sobre a investigação do potencial toxicológico do ácido úsnico em ratas Wistar durante o período da organogênese, também revelaram várias alterações morfológicas em sua prole. Os fetos apresentaram alterações morfológicas como, exposição do globo ocular, presença de uma massa celular na região superior do feto e atrofia dos membros superiores e inferiores.

Tais alterações podem ser explicadas por Gustafsson *et al.* (2003) em que as muitas das alterações sobre o desenvolvimento esquelético em neonatos, estão relacionadas principalmente às alterações sobre as redes de colágeno e outras proteínas especializadas que compõem os tecidos. Exercendo um papel importante na formação e função adequada do tecido, podendo a sua falta gerar efeitos drásticos sobre o desenvolvimento.

Considerando a ausência de relatos na literatura sobre as possíveis influências do ácido úsnico na deposição do colágeno da derme, e tendo em vista as alterações morfológicas já relatadas na prole de ratas expostas ao composto, torna-se necessário uma maior investigação a respeito da deposição de colágeno na derme dos membros superiores e inferiores de neonatos nascidos de matrizes submetidas ao ácido úsnico de *Cladonia substellata* durante a prenhez.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LIQUENS

Líquens derivam de associações simbióticas entre algas (fotobiontes) e fungos (micobiontes), e são responsáveis pela produção de metabólitos denominados substâncias líquênicas; Eles são conhecidos por habitarem substratos rochosos. Apresentando limite de tolerância às variações climáticas superior a qualquer outro organismo fotossintetizante. E encontram-se dispostos do nível do mar até as montanhas mais altas; No entanto estão ausentes em matas muito escuras e em altitudes acima de 500m. Sendo assim seu habitat varia conforme os fatores físicos e climáticos aos quais estão expostos (MARCELLI, 2006; HONDA; VILEGAS, 1999; WEBSTER; WEBER, 2007).

Os líquens podem apresentar variação na complexidade de suas formas de crescimento, podendo se destacar em diferentes tipos, tais como: crostosos, foliosos, fruticosos, filamentosos e dimórficos (BUDEL; SCHEIDEGGER, 2008).

Calcula-se que existam cerca de 17.000 espécies conhecidas de líquens, com dezenas de novas espécies sendo descobertas a cada ano (COCHIETTO *et al.*, 2002). Tais líquens são extensamente explorados no âmbito medicinal, por apresentarem grande relevância econômica. (ARAÚJO *et al.*, 2003; COCCHIETTO *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2001).

O talo líquênico é a estrutura resultante da simbiose entre os seres fotobiontes e micobiontes, e a partir dele é que vão ser produzidos os metabólitos primários e secundários (PODTEROB, 2008). Os produtos intracelulares são resultantes do metabolismo primário, em que são sintetizados carboidratos, aminoácidos, proteínas, vitaminas e pigmentos. Os produtos do metabolismo primário são processados e, em metabolismo secundário, são produzidas as substâncias líquênicas, únicas neste táxon (NASH, 1996; PEREIRA, 1998). Essas substâncias líquênicas são conhecidas como metabólitos extracelulares, sendo responsáveis pela maioria das atividades biológicas dos líquens (NASH, 1996; MULLER, 2001).

Os produtos do metabolismo secundário dos líquens apresentam várias funções biológicas já relatadas na literatura, dentre as quais se destacam: fotoproteção, antibiótica e prevenção contra a hiperidratação. Até o ano de 2008

foram identificadas 1.050 substâncias resultantes do metabolismo secundário dos líquens (HAUCK, 2010; BAZIN *et al.*, 2008; MULLER, 2001).

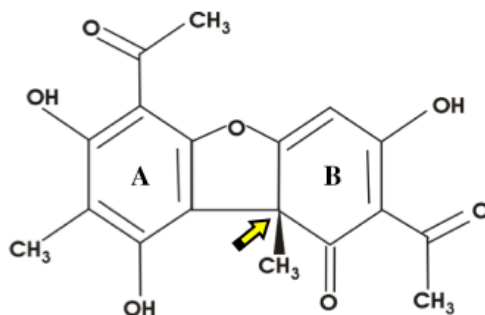
Esses produtos extracelulares são encontrados na medula ou no córtex, mas raramente em ambas as camadas. Tais substâncias podem apresentar cor, como a maioria das antraquinonas, derivados do ácido pulvínico e do ácido úsnico (NASH, 1996). O ácido úsnico é geralmente encontrado em abundância na espécie líquênica de *Cladonia substellata*, resultante do seu metabolismo secundário (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Já as espécies de *Haematoma ventosum*, *Letraria columbina* (RICHARDSON, 1987), *Icmadophila* (RICHARDSON, 1988) e *Pseudocyphellaria* (LEUCKERT *et al.*, 1979) apresentam estas substâncias líquênicas em outras regiões, podendo ser incolores como atranorina (HAWKSWORTH, 1984) e liquexantona (SMITH, 1987). Tais substâncias provenientes dos metabólitos bioativos primários e secundários de líquens, são de extremo interesse à pesquisa, uma vez que apresentam grande eficácia na área farmacológica.

2.2 ÁCIDO ÚSNICO

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2h,9bH)- dibenzeno furadiona; C₁₈H₁₆O₇], (figura 1) ocorre na natureza em duas formas enantioméricas (+) e (-), as quais são dependentes da projeção do grupo metil angular presente na posição do carbono quiral 9b (MULLER, 2001; COCCHIETTO *et al.*, 2002). Sua forma natural é mais ativa do que qualquer derivado sintético do mesmo. E há um limitante no uso prático deste ácido devido a sua baixa solubilidade em solventes orgânicos e água (ERBA, *et al.*, 1998).

Figura1- Modelo estrutural plano do ácido úsnico destacando o carbono quiral 9b



Fonte: (HUNECK e YOSHIMURA, 1996)

O ácido úsnico é provavelmente produzido pelos líquens visando sua auto defesa (CARDARELLI *et al.*, 1997; MULLER, 2001). Ele apresenta caráter hidrofóbico, sendo insolúvel em água e glicerol; Parcialmente solúvel em etanol e facilmente diluído em éter quente, acetona, benzeno e clorofórmio. Seus cristais têm ponto de fusão em torno de 203 °C, de coloração amarelada (ASAHINA; SHIBATA, 1954; INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Ele é o metabólito líquênico mais estudado desde que foi isolado por Pfaff, em 1826 de *Cetraria islandica* (L.) Ach. (L.) Ach. e em 1843, por Roheleder e Heldt de *Usnea barbata* (BUSTINZA, 1951); Por apresentar diversas propriedades biológicas, tais como: antibiótica, anti-proliferativa, analgésica, antipirética, antiinflamatória e antiviral (CARDARELLI *et al.*, 1997; COCHIETTO *et al.*, 2002; OKUYAMA *et al.*, 1995; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2000).

Sendo ainda capaz de apresentar muitas outras propriedades importantes, as quais são extremamente exploradas para fins terapêuticos (COCCHIETTO *et al.*, 2002). O ácido úsnico encontra-se distribuído nos mais variados gêneros de: *Cladonia* (*Cladoniaceae*), *Usnea* (*Usneaceae*), *Lecanora* (*Lecanoraceae*), *Ramalina* (*Romalinaceae*) e *Parmelia* (*Parmeliaceae*) (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

As primeiras avaliações sobre sua ação antibacteriana datam da década de 50. Nestes últimos anos, inúmeras investigações têm ampliado o conhecimento desse metabólito líquênico como antibiótico (COCCHIETTO *et al.*, 2002).

A atividade antitumoral do ácido úsnico foi relatada pela primeira vez por Morris Kupchan e Kopperman (1975) contra o carcinoma pulmonar de Lewis em

ratos. E estudos mais recentes realizados por Ribeiro-Costa *et al.*, (2004) demonstraram a mesma atividade.

Bazin e colaboradores (2008), no que diz respeito à atividade antiproliferativa do ácido úsnico, mostraram que tanto a forma (-) quanto a (+) do ácido, apresentam *in vitro* citotoxicidade contra células cancerígenas em humanos, além de induzir apoptose das células de leucemia; Carderalli *et al.* (1997) também comprovou a mesma eficácia. Tais resultados são semelhantes ao encontrado por Takai *et al.* (1979), em seu estudo sobre derivados do ácido úsnico, como potencial agente antineoplásico.

A literatura atual apresenta diversos relatos da atividade antibiótica do ácido úsnico (COCCHIETTO *et al.*, 2002; SAENZ *et al.*, 2006; WECKESSER *et al.*, 2007). Além de apresentar também relatos da atividade antimicrobiana revelada através de estudos realizados por Ingólfssdóttir *et al.* (1998), onde foram utilizados cinco compostos distintos originados de líquens, os quais mostraram que o ácido úsnico apresentou atividade contra o *Mycobacterium aurum*.

A atividade antiinflamatória do ácido úsnico foi demonstrada por Vijayakumar e colaboradores (2000) em um estudo de edema de pata em ratos. Odabasoglu e colaboradores (2006) mostraram que o ácido úsnico apresentou atividade como protetor gástrico no modelo de indução de úlcera provocada por indometacina.

A literatura ainda relaciona o mecanismo de ação do ácido úsnico como desacoplador da cadeia transportadora de elétrons afetando a função mitocondrial e, por conseguinte, a respiração celular. Entretanto tal mecanismo não encontra-se totalmente definido.

Apesar de sua vasta aplicação, esse composto apresenta uma alta toxicidade (PEREIRA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1997). Investigações recentes comprovam tal potencial toxicológico do ácido úsnico isolado de *Cladonia substellata* em ratas Wistar durante o período da organogênese, no qual as ratas foram submetidas à administração oral deste composto na dose de 25mg/kg, provocando alterações morfológicas em sua prole, tais como, exposição do globo ocular, presença de uma massa celular na região superior do feto e uma atrofia dos membros superiores e inferiores (SILVA, 2014).

2.3 COLÁGENO DA DERME

A derme juntamente com a epiderme, são camadas múltiplas que compõem a pele que é um órgão complexo, o qual recobre o corpo superficialmente. Sabe-se também que a hipoderme, um tecido conjuntivo frouxo, não faz parte da pele, mas, serve de suporte com os órgãos subjacentes da mesma (TAMARKIN, 2004).

A epiderme é formada por uma porção epitelial de origem ectodérmica e constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, sendo assim conhecido por apresentar células de queratinócitos em maior número, com relação às células de Langerhans, de Merckel e aos melanócitos que se apresentam em menor quantidade; A derme é formada por uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, e constituída por células dendríticas e fibroblastos (ROGUET, 1997). Esta camada da derme possui uma substância viscosa rica em mucopolissacarídeos, também conhecida por matriz extracelular, a qual mantém as células unidas, além de proporcionar uma via porosa de difusão entre os nutrientes e O_2 (NELSON, 2006).

A derme é a camada de maior importância e complexidade da pele, pois nela há variadas moléculas, células de defesa e um conjunto de fibras, que se destaca por apresentar as funções de sustentação, elasticidade e força. A derme se diferencia em camadas, as quais se destacam: A camada papilar que é mais superficial composta por fibras colágenas finas, e substância fundamental amorfa em maiores quantidades; e a camada reticular que por sua vez é mais profunda, espessa e menos vascularizada que a papilar, sendo constituída por feixes colágenos mais espessos, distribuídos de forma paralela à epiderme (DÂNGELO E FATTINI, 1998; NOGUEIRA, 2007).

As fibras colágenas são predominantes do tecido conjuntivo, sendo constituídas por uma escleroproteína denominada colágeno. O colágeno é uma proteína abundante no corpo do ser humano, representando 30% do total das proteínas deste, e tem como função fornecer resistência e integridade estrutural a diversos tecidos. (GUIRRO, 2004).

Essas fibras colágenas encontram-se intimamente entrelaçados na derme, a qual é um dos principais tecidos de suporte da pele e servem para fornecer

elasticidade e resistência à pele. Estas fibras são encontradas nas mais diversas regiões da mesma, tais como: derme papilar, reticular, traves septais da hipoderme, membranas basais e derme reticular média (VIEIRA, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2007).

O colágeno ganhou espaço nas últimas décadas devido a suas inúmeras aplicações e atividades reparadoras dos tecidos cutâneos, principalmente pelo fato dele ser um dos fatores primordiais no retardo do envelhecimento celular (FRANZEN *et al.*, 2013).

A falta de colágeno sobre os tecidos pode gerar efeitos drásticos ao seu desenvolvimento (GUSTAFSSON *et al.*, 2003). Como a redução na espessura, resistência e tensão da pele; Ocasionando diversas complicações a nível estrutural, tais como: musculatura flácida, diminuição da densidade óssea, perda da elasticidade e força motora das articulações e ligamentos (MOI, 2004; LAPIERE, 1990; RODRIGUES, 2009).

No campo biomédico o colágeno apresenta diversas aplicabilidades, devido a sua alta resistência à tensão, propriedades hemostáticas, não citotóxicas, biodegradabilidade controlada, baixa antigenicidade e características não inflamatórias (FRIESS, 1998).

O colágeno é um substrato natural para as células, por manter sua morfologia e fenótipos normais em cultura. Além de exercer papel bem delineado na cicatrização de feridas. Sabe-se também que a matriz do colágeno oferece uma estrutura de suporte biointerativa, a qual guia e estimula a adequada formação tecidual (LEE *et al.*, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar a distribuição do colágeno na derme dos membros de neonatos provenientes de matrizes submetidas ao ácido úsnico.

3.2 ESPECÍFICOS

- Quantificar o colágeno da derme dos neonatos expostos ao ácido úsnico durante o período da organogênese;
- Avaliar o efeito do ácido úsnico sobre a deposição do colágeno da derme dos neonatos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO A. A. S.; *et al.* Efeitos do ácido úsnico extraído da *Cladonia substellata* Vainio no combate a infecção por *Schistosoma mansoni*. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA FAP-SE, 2003. *Resumos...* Aracaju: Universidade Federal de Sergipe, 2003. p. 1-4
Disponível em:
<http://www.fapitec.se.gov.br/sites/default/files/documentos/joao%20daltro/adriano_antunes_resumo_expandido.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2015.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. *Chemistry of Lichen Substances*. Tokio: Japanese Society of the Promotion of Science, 1954.
- BAZIN, M. A.; *et al.* Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 6860–6866. 2008.
- BOMFIM, R. R.; *et al.* Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n.4, 580-584, 2009.
- BUDEL, B.; SCHEIDEGGER, C. Thallus morphology and anatomy. In: NASH, T. III (Ed.) *Lichen Biology*. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. p. 40-68.
- BUSTINZA, F.; Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas y antifúngicas del ácido úsnico y algunos de sus derivados. *Ann. Inst. Bot. A. J. Cavanilles*. v. 10. p. 157-175, 1951.
- CARDARELLI, M.; *et al.* Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 53, p. 667–672, 1997.
- CARVALHO, E. A.; *et al.* Effects of usnic acid from *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. *Micron*, Estados Unidos, v. 36, n. 1, p. 155-161, 2000.
- COCCHIETTO, M.; *et al.* A review on usnic acid, an interesting natural compound, *Naturwissenschaften*. v.89 p.137-146, 2002.
- DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. *Anatomia humana, sistêmica e segmentar*. São Paulo: Atheneu, 1998.

ERBA, E.; POCAR, D.; ROSSI, L. M.; New esters of R- (+)- usnic acid. *Il fármaco*, v. 53, p. 718-720, 1998.

FRANZEN, J. M; *et al.* Colágeno: Uma abordagem para a estética. *Inter Estudos Saúde*, v. 2, n. 2, p. 5, 2013.

FRIESS. W. Collagen – biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 45, p. 113–136, 1998.

GUIRRO; GUIRRO; E. RINALDO. *Fisioterapia Dermato-Funcional: Fundamentos – Recursos – Patologias*. 3. ed. Barueri: Manole, 2004.

GUSTAFSSON, E.; *et al.* Role of collagen type II and perlecan in skeletal development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 995, n.1, p. 140-150, 2003.

HAUCK, M.; JURGENS, S. R.; LEUSCHNER, C. Norstictic acid: Correlations between its physico-chemical characteristics and ecological preferences of lichens producing this depsidone. *Environmental and Experimental Botany* , v. 68, p. 309–313, 2010.

HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J. *The lichen-forming fungi*. Glasgow: Blackie & Sons, 1984.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W.; A química de liquens. *Química Nova*, v. 22, n. 1, p. 25-55, 1999.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. *Identification of lichen substances*. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; *et al.* Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutical sciences*, v. 6, p. 141-144, 1998.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecule of interest Usnic acid. *Phytochemistry*, v. 61, p. 729-736, 2002.

LAPIERE C. M.; The ageing dermis: the main cause for the appearance of ‘old’ skin. *Br J Dermatol*, v. 122, n. 35, p. 5-11, 1990.

LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 221, p. 1-22, 2001.

LEUCKERT, C.; DOLLING, K.; WOLTERS, R. *Planta Medical. Herzogia*, v. 5, n. 181, p. 15-20, 1979.

MARCELLI, M. D.; *et al.* (Eds.) *Biologia de liquens*. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006.

MELO, M. G. D.; *et al.* Purification, Physicochemical Properties, Thermal Analysis and Antinociceptive Effect of Atranorin. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 31, n.10, p. 1977-1980, 2008.

SANTANA, R. C. M. C. *Envelhecimento do sistema tegumentar: revisão sistemática da literatura*. 2004. Dissertação (Mestrado em Enfermagem Fundamental) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/22/22132/tde-18052004-103619/>>. Acesso em: 10 nov 2015.

MORRIS KUPCHAN, S.; KOPPERMAN, H. L. L-Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 31, n. 6, p. 625-625, 1975.

MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 56, p. 9-15, 2001.

NASCIMENTO, L. F.; *et al.* Estrias. *Rev. Personalité*, v. 2, n. 54, p. 10-12, 2007.

NASH, T. H., *Lichen Biology*. 4. ed. United Kingdom, Cambridge, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

NOGUEIRA, M. Saúde a flor da pele. *Rev. Profissão Beleza*, v. 8, n. 41, p. 10, 2007.

ODABASOGLU, F.; *et al.* Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacininduced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 3, p. 59–65, 2006.

OKUYAMA, E.; *et al.* acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med.* v. 61, n. 2, 113– 115, 1995.

PEREIRA E. C.; *et al.* Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos. In: *Cladonia corallifera e Cladonia substellata*. Série: Ciências Biológicas. Manaus, Ver. UA, 1996.

PEREIRA, E. C. Produção de Metabólitos por espécies de *Cladoniaceae* (líquen), a partir de imobilização celular. 1998. 225f. (Tese) - Doutorado em Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.

PEREIRA, E. C. G.; *et al.* Bioconservação e utilização econômica de líquens. In: ENCONTRO NORDESTINO DE BIOGEOGRAFIA, 2, 2001. Macéio *Anais...* Macéio, 2001. p. 20-32.

PODTEROB, A. P. Chemmical composition of lichen and their edical applications. *Pharm Chem J*, v. 42, n. 1, p. 32-38, 2008.

RIBEIRO, S. M.; *et al.* Produção de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio, p.265-272, 2006.

RIBEIRO-COSTA, R.M.; *et al.* *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *Journal of Microencapsulation*, v.21, n.4, p.371-384, 2004.

RICHARDSON, D. S. H.; GALUN, M.; NASH III, T. H. Medicinal an other economic aspects of lichens; In *CRC Handbook of Lichenology*. 8. ed. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1988, p 93.

RICHARDSON, D. S. H.; WILKINS, A. L.; JAMES, P. W. In Lichenol, *Medicinal an other economic aspects of lichens*; Química Nova, v. 10, n. 6, p. 109-122, 1987.

RODRIGUES, V. *Análises dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos*. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-28042009-171944/>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

ROGUET, R.; SCHAEFER, H. Overview of *In vitro* cell culture Technologies and pharmaco-toxicological applications. *Toxicology in Vitro*. v. 11, n. 5, p. 591-599, 1997.

SAENZ, M. T.; GARCIA, M. D.; ROWE, J. G. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain. *Fitoterapia*. v. 77, p. 156– 159, 2006.

SANTOS, N. P.; *et al.* *Cladonia substellata* Vainio, *Revista do Amazonas*, v.2, n.2, 1997.

SILVA, C. R. *Avaliação da Embriotoxicidade de Ácido Úsnico Obtido de Cladonia Substellata frente às ratas prenhez Wistar*. 2011. (Monografia). Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2011.

_____. Toxicologia do Ácido Úsnico obtido da *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o ciclo reprodutivo das fêmeas Wistar. 61 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

Disponível em: <

<http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/12107/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20Cle%C3%B3patra%20Regina%20da%20Silva.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

SMITH, D. C.; DOUGLAS, A. E.; ARNOLD E. *The Biology of Symbiosis*. London: Cambridge UK, 1987.

TAKAI, M.; UEHARA, Y.; BEISLER, J. A. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 2, p. 1380–1384, 1979.

TAMARKIN, D. Uso da Iontoforese para Aumento da Permeação de Cosméticos. *Cosmetics & Toiletries*. v. 16, p. 76-82, 2004.

VIEIRA, G. B. Cosmiatria nos pacientes com seqüelas de queimaduras. *Rev. Personalité*, v. 9, n. 48, p. 9, 2006.

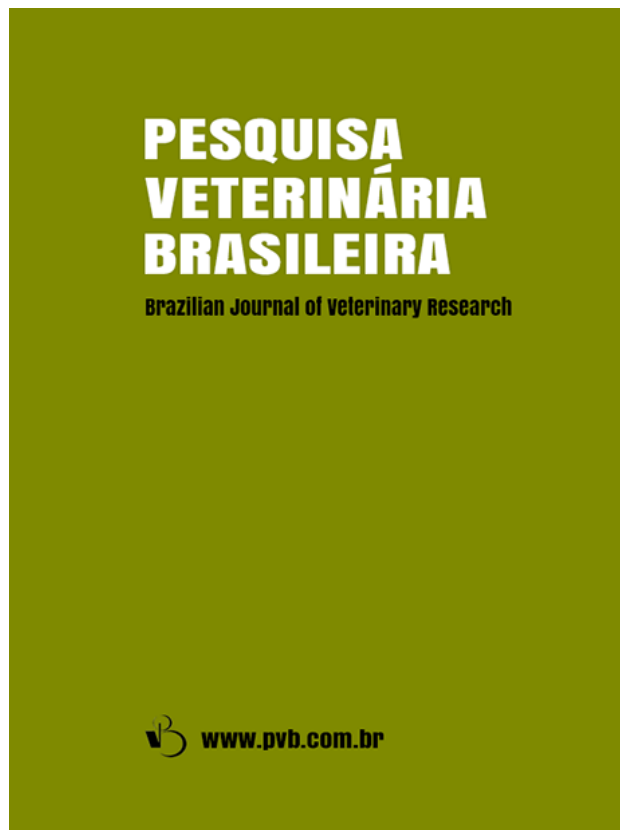
VIJAYAKUMAR, C. S.; *et al.* Anti-inflammatory activity of (+)- usnic acid. *Fitoterapia* v. 71, p. 564–566, 2000.

WEBSTER, J.; WEBER, R.W.S. *Introduction to Fungi*. 3. ed. Cambridge: University Press, 2007.

WECKESSER, S.; *et al.* Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*. v. 14, p. 508–516, 2007.

5 ARTIGO

AVALIAÇÃO DO COLÁGENO DA DERME DOS MEMBROS DE NEONATOS NASCIDOS DE MATRIZES SUBMETIDAS AO ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* DURANTE A PRENHEZ



Artigo a ser submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira - Brazilian Journal of Veterinary Research.

Avaliação do colágeno da derme dos membros de neonatos nascidos de matrizes submetidas ao ácido úsnico de *Cladonia substellata* durante a prenhez

Alziane A. Almeida^{2*}, Ketsia S. N. Marinho², Cleopatra R. da Silva², Francisco C.A. Aguiar Júnior², Noêmia P. dos Santos², Katharine R.P. Santos².

ABSTRACT. – Almeida A.A., Marinho K.S.N., Aguiar Júnior F.C.A., Santos K.R.P., Santos, N.P. & Silva C.R.S 2015. [**Dermal collagen evaluation of members of neonates born to mothers submitted to usnic acid *Cladonia substellata* during pregnancy.**] Avaliação do colágeno da derme dos membros de neonatos nascidos de matrizes submetidas ao ácido úsnico de *Cladonia substellata* durante a prenhez *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Área de Morfologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Rua Alto do Reservatório S/N Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE 55.608-680, Brasil. E-mail: alziane_almeida00@hotmail.com

The usnic acid and a metabolite of Compound Resulting Secondary lichens, and can be produced by various species thereof such as *Cladonia substellata*. The literature describes relevant biological activity for usnic acid. However, there are some limitations to their therapeutic application. In recent studies it has been reported that this compound causes external morphological changes in neonates exposed during the fetal period. These changes that can directly affect the collagen network, influenced by the administered compound. In view of this, the present study aimed to analyze histologically the deposition of collagen in the dermis of the members of newborns from mothers submitted to usnic acid. 60 were used neonates from mothers submitted to usnic acid. The headquarters of the control group (n = 6) received by gavage a physiological solution , and the treated group (n = 6) were purified usnic acid at a dose 25 mg / kg . At day 20 of pregnancy females were sacrificed by anesthetic overdose of xylazine (0.3 ml / kg) and ketamine (0.3 ml / kg) , and then the uteri were dissected for removal of neonates. For histological analysis of members were considered five fetuses from each parent . The front and hind limbs were fixed in (NBF) buffered 10% formalin neutral , and thereafter processed according to routine histological technique . The blocks were cut into 4µm thick, stained with Picrosirius red, and analyzed by polarized light optical microscope. The results showed that all newborns treated group had a lower amount of collagen distributed in the dermis, while the control group neonates showed up with a production of collagen in the dermis. These results suggest a reduction in the dermal collagen deposition, influenced by usnic acid, which will further affect the structure of the tissues of the limbs.

INDEX TERMS: Secondary Metabolite , collagen, toxicity

RESUMO- O ácido úsnico é um composto resultante do metabólito secundário de líquens, e pode ser produzido por várias espécies destes, tais como *Cladonia substellata*. A literatura descreve relevantes atividades biológicas para o ácido úsnico. Porém, há algumas limitações para a sua aplicação terapêutica. Em recentes estudos foi relatado que tal composto provoca alterações morfológicas externas em neonatos expostos durante o período fetal. Alterações estas que podem afetar diretamente as redes de colágeno, influenciado pelo composto administrado. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo analisar histologicamente a deposição do colágeno na derme dos membros de neonatos provenientes de matrizes submetidas ao ácido úsnico. Foram utilizados 60 neonatos de mães submetidas ao ácido úsnico. As ratas do grupo controle (n=6) receberam por gavagem uma solução fisiológica, e as do grupo tratado (n=6) receberam o ácido úsnico purificado na dose 25mg/Kg. Ao 20º dia de prenhez as fêmeas foram sacrificadas por overdose dos anestésicos xilazina (0,3 ml/kg) e cetamina (0,3 ml/kg), e em seguida, os úteros foram dissecados para retirada dos neonatos. Para a análise histológica dos membros foram considerados cinco fetos de cada progenitora. Os membros dianteiros e traseiros foram fixados em (NBF) formalina a 10% neutra tamponada, e posteriormente, processados seguindo a técnica histológica de rotina. Os blocos foram cortados em 4µm de espessura, corados pelo Picrosirius red, e analisados em microscópio óptico de luz polarizada. Os resultados demonstraram que todos os neonatos do grupo tratado apresentaram uma menor quantidade de colágeno distribuído na derme, enquanto que os neonatos do grupo controle mostraram-se com uma maior deposição de colágeno na derme. Esses

resultados sugerem uma redução na deposição do colágeno da derme, influenciado pelo ácido úsnico, que trará consequências futuras na estrutura dos tecidos dos membros.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Metabólito secundário, colágeno, toxicidade.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

²Área de Morfologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Rua Alto do Reservatório S/N Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE 55.608-680, Brasil. *Autor para correspondência: alziane_almeida00@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Os líquens são seres resultantes da associação simbiótica entre algas e fungos, e são considerados uma importante fonte de compostos naturais biologicamente ativos, os quais resultam do seu metabolismo secundário (RIBEIRO *et al.*, 2006; HONDA & VILEGAS, 1999).

Dentre os compostos resultantes do metabolismo secundário líquênico, pode-se destacar o ácido úsnico, o qual pode ser extraído de várias espécies de líquens, tais como de *Cladonia substellata* (CARDARELLI *et al.*, 1997; MULLER, 2001).

Desde que foi isolado pela primeira vez, o ácido úsnico é considerado o composto líquênico mais explorado pela farmacologia devido as suas propriedades biológicas, dentre as quais podemos destacar a sua atividade antibiótica, anti-proliferativa, analgésica, antipirética, antiinflamatória e antiviral (CARDARELLI *et al.*, 1997; COCHIETTO *et al.*, 2002; OKUYAMA *et al.*, 1995; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2000).

No entanto, apesar de todas as propriedades farmacológicas apresentadas pelo composto, o ácido úsnico possui algumas limitações para a sua aplicação terapêutica, como alguns casos de toxicidade já relatados na literatura (PEREIRA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1997; ROCHA e MAGALHÃES, 2011; SILVA, 2014).

Estudos recentes desenvolvidos por Silva (2011., 2014) relatou relevantes sinais de toxicidade na prole de fêmeas tratadas com o ácido úsnico de *Cladonia substellata*. Neste ensaio foi evidenciada uma interrupção no desenvolvimento da prole das fêmeas prenhez tratadas, além da presença de malformações nos neonatos expostos *in útero*, inclusive uma atrofia dos membros dianteiros e traseiros.

Alterações esqueléticas durante o desenvolvimento embrio-fetal podem está diretamente relacionadas às alterações sobre as redes de colágeno e outras proteínas especializadas que compõem os tecidos. A diminuição do colágeno pode implicar em efeitos drásticos no organismo em desenvolvimento não somente a nível ósseo, mas também nas demais regiões que apresentam o colágeno em sua constituição (GUSTAFSSON *et al.* 2003; SILVA e PENNA, 2012; MOI, 2004; LAPIERE, 1990).

Moi (2004) e Lapiere (1990) esclarecem que a diminuição da quantidade de colágeno, é resultante de uma diminuição da atividade metabólica dos fibroblastos, que são as células responsáveis por sua síntese. Na qual, essa diminuição da quantidade de colágeno pode ocasionar diversas complicações a nível estrutural.

O colágeno pode se apresentar em diferentes tipos, conforme suas propriedades. Ele tende a se modificar conforme o desenvolvimento do feto, havendo uma diferença entre a produção de colágeno fetal, e produção de colágeno na fase adulta. Há vários tipos de colágeno, dentre eles destacam-se: o mais resistente do tipo I predominando na pele fetal e adulta. E o colágeno do tipo III, menos resistente representando de 30% a 60% do total da pele humana fetal (LADEIRA *et al.*, 2011; MATSURABA e ZORNOFF, 1995).

De acordo com os pressupostos teóricos referidos, e tendo em vista a ausência de relatos na literatura sobre as possíveis influências do ácido úsnico na deposição do colágeno da derme, torna-se necessário um estudo de avaliação do efeito de tal composto sobre o colágeno da derme de neonatos expostos ao ácido úsnico de *Cladonia substellata* durante o período da organogênese.

METODOLOGIA

Os estudos foram conduzidos em ratos Wistar com idade de aproximadamente 60 dias e peso médio de 250 a 300g, provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob ciclo dia/noite natural (12h luz e 12h escuro), com livre acesso de água e alimento durante o experimento. Foram utilizadas 12 fêmeas. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 23076.029828/2013-94).

Inicialmente as fêmeas foram submetidas ao estudo do ciclo estral no intuito de se determinar o período fértil. Foram coletadas células da parede vaginal e através da técnica de estiração preparadas as lâminas, que posteriormente foram coradas com SHORR. Através de análises microscópicas (Olympus BH-2, Japan) foi identificado o período de ovulação das fêmeas, denominado estro.

Após a confirmação do período de ovulação. As fêmeas foram pareadas com machos (2:1) *overnight* e, o acasalamento foi confirmado com a presença do “plug” (massa esbranquiçada de espermatozoides na abertura vaginal) ou com a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. As primeiras 24 horas após a confirmação do acasalamento foram consideradas como dia zero (D0) de gestação, onde cada fêmea foi pesada.

As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos Controle (n=6) e Tratado (T= 6). Os animais do grupo controle (C) receberam 1,0 mL de solução fisiológica. Os animais do grupo tratado (T)

receberam a solução com o ácido úsnico na dose de 25 mg/kg, via oral. A administração foi do 6^o ao 15^o dia de gestação.

As fêmeas foram sacrificadas no final da gestação por overdose de anestésico (Xilazina, dose de 0,3 ml/kg e cetamina 0,3 ml/kg. Em seguida, foi realizado o procedimento de cesárea para abertura do útero de cada fêmea e retirada dos fetos. Após o procedimento de cesárea, os fetos considerados vivos, ou seja, aqueles que apresentarem movimentos das patas traseiras após estímulos mecânicos e sinais respiratórios foram eutanasiados através da administração de uma overdose dos anestésicos Xilazina (0,01ml/100 mg de peso corpóreo) e Tiopental (0,01ml/100mg de peso corpóreo), via intraperitoneal.

Foram retiradas dos fetos as patas dianteiras e traseiras, as quais foram mantidas em solução tamponada de formalina a 10% por 24 horas até inclusões em parafina, e posteriormente seguiram por todo o processo histológico de fixação, desidratação, diafanização inclusão (impregnação) e microtomia (corte) onde foram obtidos cortes em torno de 4 µm de espessura para confecção das lâminas. Essas lâminas foram coradas pela coloração de picrosirius red e analisadas em microscópio óptico (Olympus BH-2, Japan) equipado com um polarizador de luz, e acoplado a uma câmera. Foram selecionados 10 campos fotográficos para os membros dianteiros e 10 campos para os membros traseiros. O colágeno presente nos campos analisados foi identificado através da seleção de tonalidades birrefringentes (amareladas ou esverdeadas), correspondentes às bandas de colágeno polarizadas de fibras finas.

Os valores obtidos através da morfometria foram analisados estatisticamente através do teste-t de Student (*software* SPSS, versão 11.0), com significância <0,05.

RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir das análises morfométricas do colágeno da derme demonstraram que os membros dos neonatos do grupo tratado apresentaram médias significativamente menores em comparação com o grupo controle, sendo $p=0,001$. Dados expressos no quadro 2.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da avaliação do colágeno da derme indicam que a deposição de colágeno foi reduzida para o grupo tratado com o ácido úsnico na dose de 25mg/Kg. Tal alteração foi evidenciada na camada reticular da derme, a qual é mais profunda apresentando espessas quantidades de fibras colágenas (DÂNGELO E FATTINI, 1998; NOGUEIRA, 2007).

De acordo com Franzen *et al.*, (2013) alterações a nível de colágeno podem ocorrer devido a diversos fatores, tais como o fumo, bebidas alcoólicas, exposição solar sem proteção, estresse, consumo de drogas, falta de atividade física e má alimentação, os quais aumentam os níveis de radicais livres no organismo. No entanto, nenhum trabalho até o presente momento faz inferência a respeito da ação de fármacos sobre a formação e deposição do colágeno, em especial o colágeno da derme.

Os resultados obtidos demonstraram um efeito similar ao que acontece com o colágeno da derme no avançar da idade, porém em indivíduos jovens, provocando uma grande alteração na quantidade do colágeno influenciado pelo ácido úsnico (Fig. 1 e Fig. 2). Tal efeito encontrado pode ser comparado ao que ocorre com indivíduos idosos, podendo levar há uma série de complicações a nível dérmico (SHUSTER; BLACK; MCVITIE, 2006; ORIÁ *et al.*, 2003).

Porém outros estudos foram realizados para examinar a proliferação celular e a expressão do colágeno em fibroblastos da derme, no entanto sobre os efeitos do ácido ascórbico, onde os resultados relataram que na ausência do ácido ascórbico (grupo controle) a capacidade proliferativa foi inversamente relacionada com a idade, nas quais as linhas celulares de indivíduos mais jovens (recém-nascidos) proliferaram mais rapidamente atingindo maiores densidades celulares do que as linhas presentes nos idosos. Entretanto, na presença do ácido ascórbico (grupo tratado), tanto as células dos recém-nascidos quanto de idosos proliferaram a uma taxa mais rápida, atingindo densidades mais elevadas do que o grupo controle. Dessa forma o ácido ascórbico pareceu capaz de superar a capacidade proliferativa reduzida de fibroblastos dérmicos idosos, bem como aumentou a síntese de colágeno nas células idosas por graus semelhantes em células de recém-nascidos ainda que os níveis basais de síntese de colágeno são dependentes da idade (PHILLIPS *et al.*, 1994).

Portanto, a redução na deposição do colágeno na derme do presente estudo foi influenciada pelo ácido úsnico, o qual trará consequências futuras na estrutura dos tecidos dos membros dos neonatos que foram submetidos a esse fármaco.

Agradecimentos: A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por proporcionar a realização desse estudo.

REFERÊNCIAS

- CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, P.; DE CICCIO-NARDONE, F.; ALESIANI, O.; ROSSIELLO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 667–672, 1997.
- COCCHIETTO M.; SKERT N.; NIMIS P. L.; SAVA G.; A review on usnic acid, an interesting natural compound, *Naturwissenschaften.* v.89 p.137-146, 2002.
- DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A.; Anatomia humana, sistêmica e segmentar. São Paulo: Atheneu, 1998.
- FRANZEN, J.M.; SCHOROEDER, J.M.; SANTOS, R.; ZANCANARO, V.; Colágeno: Uma abordagem para a estética. v. 2, n. 2(5), 2013.
- GUSTAFSSON, E.; ASZODI, A.; ORTEGA, N.; HUNZIKER, E. B.; DENKER, H. W.; WERB, Z.; FÄSSLER, R.; Role of collagen type II and perlecan in skeletal development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 995(1), 140-150, 2003.
- HONDA, N.K.; VILEGAS, W.; A química de liquens. *Química Nova.* v. 22(1). P. 25-55, 1999.
- LADEIRA, P.R.S.; ISAAC C.; PAGIAAROC A.O.; BOYACIAYM M. I.; FERREIRA M.C.; Cicatrização Cutânea no Feto. *Rev Med (São Paulo)*, 60-67, 2011.
- LAPIERE, C.M.; The ageing dermis: the main cause for the appearance of 'old' skin. *Br J Dermatol*; 122 (Suppl 35):5-11, 1990.
- MATSUBARA, B.B.; ZORNOFF, L.A.M.; Matriz Colágena Intersticial e sua Relação com a Expansão Miocárdica no Infarto Agudo. *Arq Bras Cardiol* , pp. Vol.64 (6°), 1995.
- MOI, R.C.; Envelhecimento do sistema tegumentar: revisão sistemática da literatura [dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2004.
- MULLER K.; Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 9-16, 2001.
- NOGUEIRA, M.; Saúde a flor da pele. *Rev. Profissão Beleza*, nº41, Ano VIII, Vol.8, 2007.
- OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K.; YAMAZAKI, M.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med.* 61, 113– 115, 1995.
- ORIÁ, R.B.; FERREIRA, F.V.A.; SANTANA, É.N.; FERNANDES, M.R.; BRITO, G.A.; Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência Study of age-related changes in human skin using histomorphometric and autofluorescence approaches. *An Bras Dermatol*, 78(4), 425-434, 2003.
- PEREIRA, E.C.; NASCIMENTO, S.C.; LIMA, R.C.; SILVA, N.H.; OLIVEIRA, F.M.; PEREIRA, V.M.W., Tese de Mestrado Bioquímica-UFPE. 112p, 1996.
- PHILLIPS, C. L.; COMBS, S. B.; PINNEL, S. R.; Effects of Ascorbic Acido on Proliferation and Collagen Synthesis in Relation to the Donor Age of Human Dermal Fibroblasts, 1994.
- RIBEIRO, S.M.; PEREIRA, E.C.; GUSMÃO, N.B.; FALCÃO, E.P.; SILVA, N.H.; Produção de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio, p.265-272, 2006.
- ROCHA, F.S.P; MAGALHÃES, N.S.S.; Desenvolvimento de Nanopartículas Furtivas Contendo Ácido Úsnico para o Tratamento do Câncer. 2011.

RODRIGUES, V.; Análise dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos. [dissertação de mestrado] São Paulo, 2009.

SANTOS, N. P.; PEREIRA, E. C.; LIMA, R. C.; HONDA, N. K.; SILVA, M. P. C. SILVA, N. H.; Revista do Amazonas, v.2, n.2, 1997.

SHUSTER, S.; BLACK, M.M.; MCVITIE, E.; The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density, 2006.

SILVA, C.R.; Avaliação da Embriotoxicidade de Ácido Úsnico Obtido de *Cladonia Substellata* frente às ratas prenhez Wistar [monografia]. Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

SILVA, C.R.; Toxicologia do Ácido Úsnico obtido da *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o ciclo reprodutivo das fêmeas Wistar [dissertação]. Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

SILVA T.F.; PENNA A.L.B.; Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Rev Inst Adolfo Lutz* ; 530-539; 2012.

UITTO, J.; Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-related alterations in collagen and elastin. *Dermatologic clinics*, v. 4, n. 3, p. 433-446, 1986.

VIJAYAKUMAR, C.S.; VISWANATHAN, S.; KANNAPPA-REDDY, M.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A.B.; SUKUMAR, E.; Anti-inflammatory activity of (+)- usnic acid. *Fitoterapia* 71, 564–566, 2000.

Legenda das Figuras

Fig.1. Fotomicrografia do colágeno da derme do tipo III de neonatos submetidos à solução fisiológica durante o período gestacional das matrizes. Rede de colágeno com o padrão da birrefringência (verde-amarelado), indicando a presença de fibras mais grossas e irregulares (seta). Coloração: picrosirius red. Aumento: 100X.

Fig.2. Fotomicrografia do colágeno da derme do tipo III de neonatos submetidos ao ácido úsnico de *Cladonia substellata* durante o período gestacional das matrizes. Rede de colágeno com o padrão da birrefringência (verde-amarelado), indicando a presença de fibras mais finas e irregulares (seta). Coloração: picrosirius red. Aumento: 100X.

Os Quadros

Quadro 1. Média e desvio padrão da área do colágeno (mm²) dos grupos controle (C) e tratado (T).

Grupos	Média e Desvio Padrão
(C)	0, 07 ± 0, 08
(T)	0, 04 ± 0, 04

Valor de p=0, 001

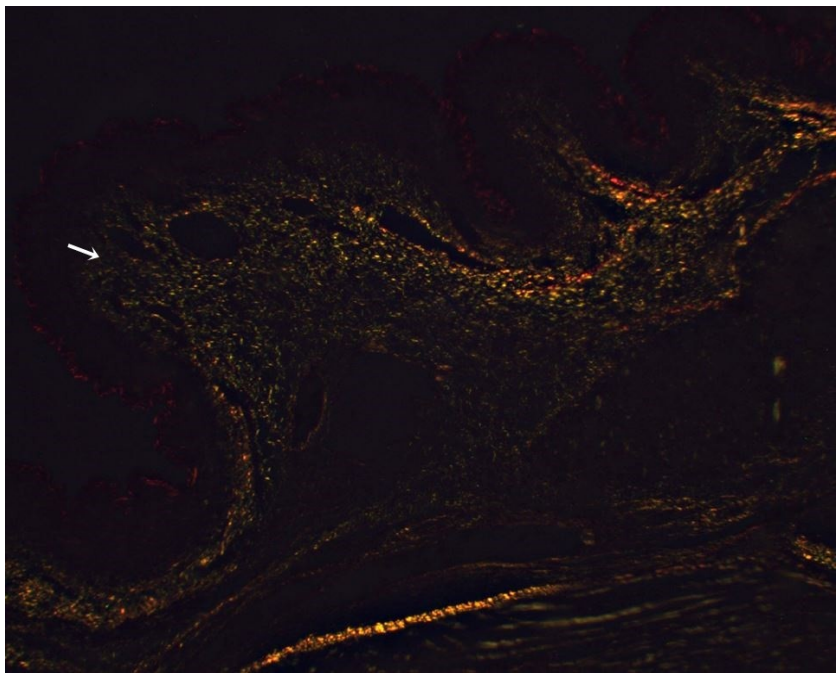


Figura 1

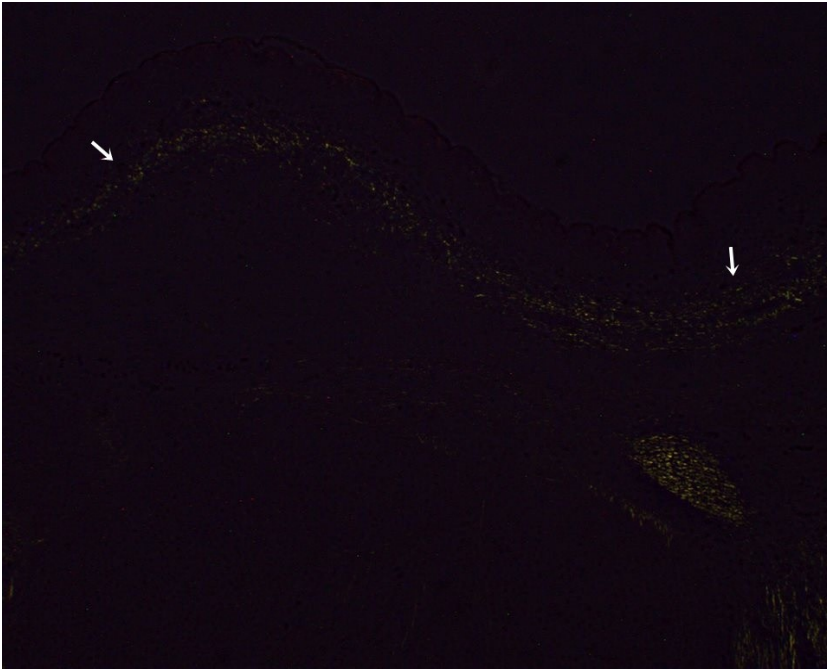


Figura 2