

# EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA DE ATRANORINA Y DILACTONA DEL ÁCIDO PULVÍNICO: COMPUESTOS FENÓLICOS BIOACTIVOS DEL LÍQUEN *PARMELINA TILIACEA*

## Evaluation of the Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity of Atranorine and Dilactone of Pulvine Acid: Bioactive Phenolic Compounds from The Lichen *Parmelina tiliacea*

<sup>1</sup>Vinueza Diego\*, <sup>2</sup>Janeta Marco, <sup>1</sup>Pilco Gisela, <sup>1</sup>Acosta Karen, <sup>1</sup>Abdo Susana

<sup>1</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Panamericana Sur km 1 ½, Riobamba-Ecuador.

<sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, 46100, Burjassot, Valencia-España

\*bfdiegov@hotmail.es

### R esumen

*Parmelina tiliacea* es una especie de líquen de Ecuador que ha sido poco estudiada en relación a sus potenciales aplicaciones. La investigación se llevó a cabo con el objetivo de establecer la actividad antiinflamatoria y citotóxica de *P. tiliacea*, mediante un método celular *in vitro* basado en el uso de una sal de tetrazolio soluble (WST-1) sobre neutrófilos aislados. Las moléculas de atranorina y dilactona del ácido pulvínico fueron aisladas del líquen *P. tiliacea* mediante métodos cromatográficos (cromatografía flash en columna y TLC). Los compuestos fueron identificados con la ayuda de estudios espectroscópicos (UV e IR), cromatográficos (TLC) y pruebas de identificación específicas para compuestos líquénicos usando reactivos químicos establecidos para este tipo de moléculas. Los resultados de actividad citotóxica mostraron una reducción de la viabilidad celular hasta un 15 – 20% a una concentración de 200 µg/mL de ambos compuestos identificados. A la misma concentración de 200 µg/mL, la actividad antiinflamatoria de atranorina, dilactona del ácido pulvínico y ácido acetilsalicílico (control positivo) fueron 75.92±0.73%, 73.65±0.44% y 83.77±0.47%, respectivamente. Este estudio constituye la base para investigaciones posteriores sobre líquenes en el Ecuador.

**Palabras claves:** *Parmelina tiliacea*, líquen, actividad antiinflamatoria, citotoxicidad, WST-1.

### A bstract

*Parmelina tiliacea* is an Ecuadorian lichen that has been little studied in relation to its potential applications. The research was carried out with the objective of establishing the anti-inflammatory and cytotoxic activity of *P. tiliacea*, by an *in vitro* cell method based on the use of a soluble tetrazolium salt (WST-1) on isolated neutrophils. Atranorin and pulvinic dilactone were isolated from lichen *P. tiliacea* by chromatographic methods (flash column chromatography and TLC). The compounds were identified with the help of spectroscopic studies (UV and IR), chromatographic (TLC) and specific identification tests for lichen compounds using chemical reagents established for this type of molecules. The results of cytotoxic activity showed a reduction of cell viability up to 15-20% in the presence of a concentration of 200 µg/mL of these compounds. At the same concentration of 200 µg / mL, the anti-inflammatory activity of atranorin, dilactone of pulvinic acid and acetylsalicylic acid (positive control) were respectively 75.92±0.73%, 73.65±0.44% and 83.77±0.47%, respectively. This study represents the basis for subsequent lichen research in Ecuador.

**Keywords:** *Parmelina tiliacea*, líquen, actividad antiinflamatoria, citotoxicidad, WST-1.

Fecha de recepción: 01-dic-2017

Fecha de aceptación: 17-may-2018

## INTRODUCCIÓN

Los líquenes son una asociación simbiótica entre un micobionte heterotrófico (hongo) y un fotobionte autótrofo (pareja fotosintética, un alga verde eucariótica o una cianobacteria). Los líquenes en estado seco se caracterizan por una inactivación total de la actividad fotosintética y el intercambio de gases. Al igual que otros organismos poiquilohídricos, la regulación negativa de su metabolismo en estado seco permite que los líquenes mantengan la integridad funcional de sus membranas mediante la inmovilización del citoplasma en una matriz vítrea multicomponente estable. La adición de agua a los líquenes secos puede restaurar su actividad fotosintética en pocos minutos. Muchos estudios han demostrado que las especies de líquenes son notablemente resistentes a las condiciones ambientales extremas, haciendo uso de estrategias de adaptación específicas para hacer frente a las duras condiciones ecológicas. *Parmelina tiliacea* (Hoffm.) Ach. (*P. tiliacea*) es una asociación simbiótica entre *Parmelina* (un género de hongos liquenizados) y el alga *Trebouxia jamesii* (la pareja fotosintética) (1). Los compuestos aislados de líquenes han sido ampliamente estudiados en detalle alrededor de todo el mundo, particularmente en su composición química. Sin embargo, en Ecuador los estudios han sido limitados. La primera investigación en el Ecuador continental está enfocada principalmente en la distribución geográfica de líquenes (2). El primer informe de aislamiento de atranorina reportado fue en *Stereocaulon vesuvianum* (3). Actualmente, un protocolo común de aislamiento de atranorina está relacionado con una investigación de *Cladonia kalbi* (4). Se han estudiado varias actividades biológicas *in vitro* de atranorina aislada de *C. kalbii*, tales como su efecto antioxidante y citoprotector en líneas celulares SH-SY5Y (5). La atranorina

aislada de *Parmotrema saccatilobum* fue ensayada para la inhibición de ciclooxigenasa *in vitro* (6).

Por otra parte, el compuesto dilactona del ácido pulvínico ha sido escasamente estudiado en relación a su potencial aplicación biológica. Los trabajos sobre este compuesto se han centrado en sus cambios estructurales (7) y su caracterización química mediante espectroscopía FT-Raman (8).

A través de esta investigación, se logró determinar la actividad antiinflamatoria y citotoxicidad *in vitro* de dos compuestos aislados del líquen ecuatoriano *P. tiliacea* mediante un ensayo simple utilizando la sal de tetrazolio soluble en agua (WST-1) sobre el modelo celular de neutrófilos aislados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material liquénico y reactivos químicos

La muestra de *P. tiliacea* fue recolectada en Ecuador, provincia de Bolívar, cantón San Miguel, recinto Laguatan, sector S 01° 43' 51.139" W 079° 3' 4.402", a una altitud promedio de 2714 m.s.n.m. Los reactivos Ficol paque, solución modificada de Hanks, Zimosan A y Triton X-100, fueron adquiridos a Sigma-Aldrich, S.L. (USA). La sal de tetrazolio soluble (WST-1) fue adquirida a Roche (USA), el ácido acetilsalicílico a J.T. Baker (USA), el dimetilsulfóxido y cloruro de amonio a Merck (Germany). Cabe remarcar que se usó agua desionizada en todos los procedimientos experimentales.

### Aislamiento e identificación de atranorina y dilactona del ácido pulvínico

El aislamiento de los compuestos atranorina y dilactona del ácido pulvínico a partir de *P. tiliacea* (25 g) fue llevado a cabo mediante extracción por reflujo usando etanol (500 mL). Después de someter el extracto a concentración en rotavapor bajo condiciones controladas (45°C and -0.5 bar) se obtuvieron 4.6967 g de residuo sólido. Posteriormente, se llevó a cabo la cromatografía del residuo sólido redissuelto usando un sistema de solventes que consistió en una mezcla de tolueno, acetato de etilo y ácido fórmico (139:83:8). Las fracciones eluidas que contenían el mismo compuesto (comprobado mediante TLC) fueron reunidas. Después de la evaporación del solvente el rendimiento de los compuestos obtenidos fue respectivamente: C1 (23.7 mg) and C2 (21.2 mg).

Los espectros IR fueron registrados en un espectrofotómetro Jasco FT/IR-4100. Los espectros UV fueron re-

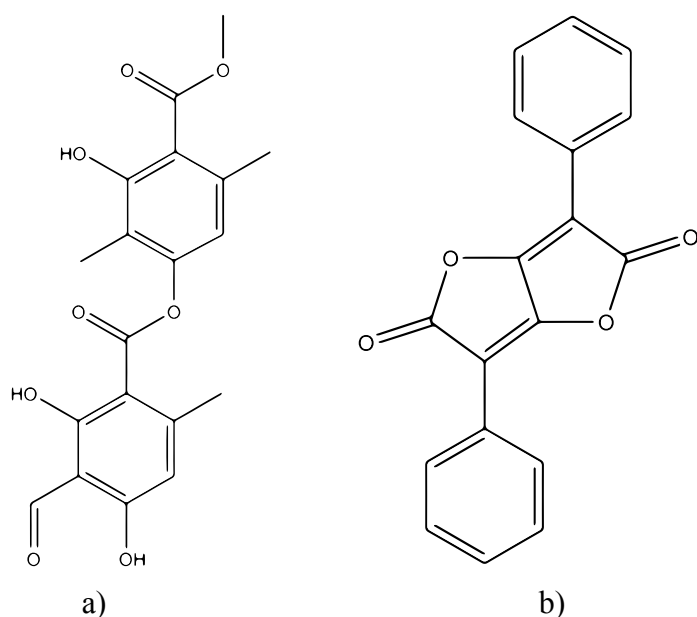


Figura 1. Estructuras de a) Atranorina y b) Dilactona del ácido pulvínico

gistrados en un espectrofotómetro Thermo Spectronic HeλOS-β. La cromatografía se llevó a cabo sobre placas de silica gel 60 F254 (20x20 cm, 0.25 mm, Merck) y los compuestos fueron detectados bajo luz UV (254 y 366 nm), mientras que una solución de ácido sulfúrico al 10% en etanol se usó como reactivo revelador. La placa fue sometida a calentamiento para el desarrollo de las manchas (9-10).

### Ensayos de actividad biológica

Se realizó la extracción de muestras frescas de sangre venosa en voluntarios sanos, a partir de las cuales fueron aislados los neutrófilos (11). La sangre fue añadida

al reactivo Ficoll paque, la mezcla obtenida fue centrifugada durante 30 minutos a 1500 rpm. Después de descartar el sobrenadante, las trazas de células rojas sanguíneas fueron lisadas mezclando el pellet con una solución hipotónica de cloruro de amonio (0.83%). La suspensión fue centrifugada nuevamente y los neutrófilos fueron lavados con solución modificada de Hanks (pH 7.4) y resuspendidas a la concentración de 107 células/mL en un volumen apropiado de solución modificada de Hanks (12). Las células metabólicamente activas reducen las sales de tetrazolio para producir compuestos coloreados derivados de formazán; de manera que los ensayos colorimétricos basados en sales de tetrazolio detectarán únicamente células viables. Estos ensayos sensibles pueden ser fácilmente llevados a cabo en un lector de microplacas con un número relativamente bajo de células usando un método modificado (13). En este estudio, los neutrófilos humanos aislados (107 células/mL) fueron incubados con los compuestos de prueba durante 30 minutos; posteriormente, la sal de tetrazolio WST-1 (250 μM) fue añadida y la mezcla fue incubada a 37°C por 3 h. La absorbancia se registró a una longitud de onda de 450 nm. El tensoactivo Triton X-100 (0.1%) fue usado como control negativo exhibiendo 0.00% de viabilidad celular (12). Una solución de DMSO 5% fue usada como blanco mostrando 100.00% de viabilidad celular. Los valores obtenidos son el promedio de cinco repeticiones. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado mediante la siguiente fórmula y los resultados se muestran en la Tabla 1:

CONCENTRACIÓN (μg/mL)	VIABILIDAD CELULAR (%)	
	Atranorina	Dilactona del ácido pulvínico
200	14.98±0.75	20.47±0.46
100	24.19±0.29	25.39±0.42
50	42.27±0.30	38.86±0.93
25	71.04±0.33	58.81±1.24
12.5	83.44±0.63	90.67±3.45
LC <sub>50</sub>	55.64±1.22	53.19±4.46

Los resultados son el promedio±SD de al menos 5 repeticiones

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad celular de los compuestos a diferentes concentraciones.

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{OD}_{\text{COMPUESTOS}}}{\text{OD}_{\text{DMSO}}} \times 100$$

La actividad antiinflamatoria fue determinada usando un método modificado (14). Este ensayo in vitro está basado

en la reducción de la sal WST-1 en la presencia de neutrófilos activados. El ensayo antiinflamatorio fue determinado en un volumen total de 250  $\mu\text{L}$  de solución modificada de Hanks (pH 7.4) conteniendo 104 neutrófilos/ $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{M}$  WST-1 y las concentraciones de los compuestos de prueba o referencia. El blanco estuvo constituido por buffer, neutrófilos y WST-1. Todos los compuestos fueron equilibrados a 37°C y la reacción fue iniciada mediante la adición de Zymosan A opsonizado (15 mg/mL), el cual fue preparado mezclando Zymosan A con suero humano, seguido de centrifugación a 3000 rpm y el pallet fue resuspendido en solución buffer de fosfato. La absorbancia se registró a una longitud de onda de 450 nm (12). Ácido acetilsalicílico fue usado como control positivo, dado que es un antiinflamatorio no esterooidal ampliamente utilizado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (15-16). Los valores de  $\text{IC}_{50}$  fueron calculados mediante comparación con la solución de DMSO usada como blanco y expresados como porcentaje de inhibición de aniones superóxido producidos.

### Análisis de datos

Todos los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado para indicar diferencia significativa. La  $\text{LC}_{50}$  para el ensayo de citotoxicidad y  $\text{IC}_{50}$  para el ensayo antiinflamatorio fueron determinados mediante análisis probit. El test de Student y la prueba de ANOVA-Tukey se usaron para comparar diferencias significativas entre los resultados según fue aplicable.

### RESULTADOS

Fueron aislados atranorina y la dilactona del ácido pulvínico a partir del liquen *P. tiliacea*, usando técnicas cromatográficas sencillas. Los compuestos fueron

caracterizados mediante espectroscopía UV (Atranorina  $\lambda_{\text{máx}}$  nm: 210, 249, 320; dilactona del ácido pulvínico  $\lambda_{\text{máx}}$  nm: 241, 275, 369), espectroscopía IR (atranorina  $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3040, 1803, 1667, 1451, 1270; dilactona del ácido pulvínico  $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2945, 2835, 1630, 1599, 1264), pruebas químicas simples (atranorina y dilactona del ácido pulvínico no fueron reactivas con las pruebas químicas estandarizadas para identificación de compuestos liquénicos) así como cromatografía en capa fina (sistemas de solventes A (tolueno, dioxano, ácido acético 180:45:5), B (hexano, éter dietílico, ácido fórmico 130:80:20), C (tolueno, ácido acético 170:30), G (tolueno, etil acetato, ácido fórmico 139:83:8) (atranorina: RfA 75.6, RfB 77.0, RfC 79.0, RfG X y dilactona del ácido pulvínico: RfA 80.3, RfB 83, RfC 89.7, RfG X) (9). En la Fig.2 se muestran las estructuras de los compuestos aislados.

Como se muestra en la Tabla 1, el porcentaje de viabilidad celular disminuye al incrementarse las concentraciones de atranorina y dilactona del ácido pulvínico. No existen diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas de atranorina y dilactona del ácido pulvínico ( $p < 0.05$  Student t-test). La Tabla 2 indica los porcentajes de actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados (atranorina y dilactona del ácido pulvínico). Se demuestra una relación directamente proporcional entre

CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA (%)	
	Atranorina	Dilactona del ácido pulvínico
200	75.92 $\pm$ 0.73	73.65 $\pm$ 0.44
100	63.77 $\pm$ 0.54	54.88 $\pm$ 1.08
50	46.15 $\pm$ 0.63	37.52 $\pm$ 0.91
25	27.22 $\pm$ 1.04	21.86 $\pm$ 0.29

Los resultados son el promedio $\pm$ SD de al menos 5 repeticiones

Tabla 2. Porcentaje antiinflamatorio de los compuestos a diferentes concentraciones.

COMPUESTO	INHIBICIÓN A 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (%)	$\text{IC}_{50}\pm\text{SDa}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Atranorina	75.92 $\pm$ 0.73	61.21 $\pm$ 4.00
Dilactona del ácido pulvínico	73.65 $\pm$ 0.44	80.26 $\pm$ 4.93
Ácido acetilsalicílico	83.77 $\pm$ 0.47*	2.49 $\pm$ 0.19

a SD fue la desviación estándar de 5 ensayos, \*Valores significativos,  $P < 0.05$ , usando el test de Tukey.

Tabla 3. Valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de los compuestos y el control positivo a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$

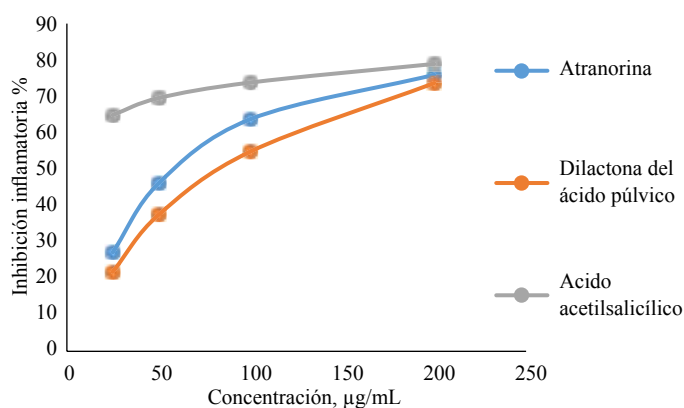


Figura 2. Comportamiento antiinflamatorio de los compuestos aislados y referencia.

la actividad antiinflamatoria y concentración de las sustancias de prueba; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas ( $p < 0.05$  Student t-test). En la Tabla 3, se muestra la actividad antiinflamatoria expresada como  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los compuestos obtenidos (atranorina y dilactona del ácido púlvínico), como del control positivo a una concentración de  $200 \mu\text{g/mL}$ . Finalmente, existe la posibilidad de que las diferencias entre los valores promedio de actividad antiinflamatoria entre los compuestos obtenidos y la referencia (control positivo); muestren una diferencia significativa a la concentración de  $200 \text{ mg/kg}$  ( $p < 0,001$  Tukey test).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos fortalecen las hipótesis planteadas en investigaciones precedentes sobre el potencial efecto antiinflamatorio asociado a la molécula atranorina, dado que según aquellas el efecto positivo de la atranorina sobre la respuesta inflamatoria podría estar relacionado con la inhibición inducida por la atranorina sobre la actividad de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) (6) y el bloqueo de la biosíntesis del leucotrieno B4 (17), lo que podría conducir a un efecto antiinflamatorio (18). Adicionalmente, en un estudio recopilatorio sobre el efecto de varias moléculas para combatir el dolor, se establece que aquel efecto en el caso de la atranorina podría deberse a la inhibición de la liberación de sustancia P o a una acción de bloqueo directo sobre su receptor de neuroquinina 1 (NK-1) (19). Asimismo, se sugiere un posible efecto antinociceptivo de la atranorina para actuar periféricamente sobre los mediadores inflamatorios, especialmente prostaglandinas (4). Los mecanismos precisos a través de los

cuales la atranorina ejerce su acción están actualmente bajo investigación, pero posiblemente podrían estar relacionados con la cascada de ácido araquidónico y/o la modulación de la producción de moléculas proinflamatorias (20-21).

Numerosos líquenes contienen pigmentos amarillos o anaranjados que se componen de dos unidades de fenilpropano, en las que la unidad C3 de estos ácidos derivados de líquenes es isopropilo en lugar de propilo (22). Los derivados de ácido vulpínico, un éster metílico del prototipo de ácido pulvínico, fueron de las primeras moléculas liquénicas en ser evaluadas como agentes antiinflamatorios mediante la prueba de artritis adyuvante en ratas (23). En cuanto a la dilactona del ácido pulvínico la información disponible determina su importancia como una sustancia responsable de efectos fotoprotector y cardiotónico (24). El efecto antiinflamatorio de la dilactona del ácido pulvínico se suma a las actividades demostradas para esta sustancia, sin embargo; son necesarios mayores esfuerzos para determinar los mecanismos mediante los cuales ejerce su acción en términos moleculares. Finalmente, la citotoxicidad de las sustancias aisladas no presentó diferencias estadísticamente significativas, lo cual constituye una medida relativa de la seguridad del uso potencial de estas moléculas para combatir trastornos inflamatorios.

## CONCLUSIONES

Los compuestos atranorina y dilactona del ácido pulvínico fueron satisfactoriamente aislados del líquen *P. tiliacea* mediante extracción con reflujo y técnicas cromatográficas. Los compuestos fueron identificados mediante espectroscopía UV, IR, cromatografías (TLC) y pruebas químicas de identificación para compuestos liquénicos, puesto que los máximos de absorción (nm) del espectro UV y las bandas de absorción en IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) corresponden a investigaciones

preliminares de estas moléculas (8-9) (25-26). Los resultados indican que los compuestos liquénicos aislados de *P. tiliacea* muestran una apreciable actividad antiinflamatoria bajo el modelo experimental. Sin embargo, no alcanzan el mismo nivel de actividad antiinflamatoria que el compuesto de referencia (ácido acetilsalicílico) como se muestra en la Fig.2. A pesar de lo anterior, el potencial de estos compuestos para utilizarlos en el futuro como candidatos a fármacos antiinflamatorios resulta evidente. Además, aunque según el “Catalogue of standardized chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances” publicado por John A. Elix

(9), la identidad de un compuesto liquénico desconocido puede ser confirmada solamente mediante TLC comparativa en al menos tres sistemas de solvente. Se recomienda para posteriores investigaciones realizar estudios de los compuestos aislados mediante HPLC/MS para tener un 100% de confirmación estructural.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por brindar las instalaciones para llevar a cabo esta investigación.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## R eferencias

1. Oukarroum A, El Gharous M, Strasser RJ. Does *Parmelina tiliacea* lichen photosystem II survive at liquid nitrogen temperatures? *Cryobiology* [Internet]. 2017 [citado el 22 Enero 2018]; 74: 160–2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.005>.
2. Cevallos-Solórzano G. Checklist de líquenes y hongos liquenícolas de Ecuador continental. 2012. Conservación de la Diversidad Biológica. Universidad Rey Juan Carlos; 37 p.
3. Bolognese A, Chioccare F, Scherillo G. Phytochemical reports. *Phytochemistry*. 1974; 13: 1989–90.
4. Melo MGD, Araújo AAS, Rocha CPL, Almeida EMSA, Siqueira RDS, Bonjardim LR, et al. Purification, physicochemical properties, thermal analysis and antinociceptive effect of atranorin extracted from *Cladonia kalbii*. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31(10): 1977–80.
5. Melo MGD, dos Santos JPA, Serafini MR, Caregnato FF, de Bittencourt Pasquali MA, Rabelo TK, et al. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicol Vitro*. 2011; 25(2): 462–8.
6. Bugni TS, Andjelic CD, Pole AR, Rai P, Ireland CM, Barrows LR. Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia*. 2009; 80(5): 270–3.
7. Ijima H, Ebizuka Y, Sankawa U, Yamamoto E, Towers GHN. An inducible lactone hydrolase yielding 2,5-diphenyl-3-hydroxy-4-oxo-2hexendioic acid from pulvinic acid. *Phytochemistry*. 1983; 22(2): 371–4.
8. Fernandes RF, Ferreira GR, Spielmann AA, Edwards HGM, De Oliveira LFC. FT-Raman spectroscopy of the *Candelaria* and *Pyxine* lichen species: A new molecular structural study. *J Mol Struct* [Internet]. 2015 [citado el 22 Enero 2018]; 1102: 57–62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.08.040>
9. Elix JA. A catalogue of standardized chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances. Third Edition. Published by the author, Canberra (Australia). 2014. 323 p.
10. Huneck S, Yoshimura I. Identification of Lichen Substances. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1996. 493 p.
11. Siddiqui RA, English D, Harvey K, Cui Y, Martin MI, Wentland J, et al. Phorbol ester-induced priming of superoxide generation by phosphatidic acid-stimulated neutrophils and granule-free neutrophil cytoplasts. *J Leukoc Biol*. 1995; 58(2): 189–95.
12. Choudhary MI, Jalil AS, Rahman A. Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen, *Usnea longissima*. *Phytochemistry*. 2005; 66: 2346–50.

13. Berridge M V, Tan ANS, McCoy KD, Wang RUI. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*. 1996; (4): 14–9.
14. Tan AS, Berridge M V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J Immunol Methods*. 2000; 238: 59–68.
15. Macdonald TM, Beard K, Bruppacher R, Hasford J, Lewis M, Logan RF, et al. The safety of drugs for OTC use: what evidence is required for an NSAID switch? *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2002; (11): 577–84.
16. Martin C, Connelly A, Keku TO, Mountcastle SB, Galanko J, Woosley JT, et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Apoptosis, and Colorectal Adenomas. *Gastroenterology*. 2002; (123): 1770–7.
17. Kumar KC S, Müller K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J Nat Prod*. 1999; 62(6): 821–3.
18. Barreto RSS, Albuquerque-Júnior RLC, Pereira-Filho RN, Quintans JSS, Barreto AS, DeSantana JM, et al. Evaluation of wound healing activity of atranorin, a lichen secondary metabolite, on rodents. *Brazilian J Pharmacogn [Internet]*. 2013 [citado el 22 Enero 2018]; 23(2): 310–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000010>
19. Holanda Pinto SA, Pinto LMS, Guedes MA, Cunha GMA, Chaves MH, Santos FA, et al. Antinociceptive effect of triterpenoid  $\alpha,\beta$ -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phyto-medicine*. 2008; 15(8): 630–4.
20. Siqueira RS, Bonjardim LR, Araújo AAS, Araújo BES, Melo MGD, Oliveira MGB, et al. Antinociceptive activity of atranorin in mice orofacial nociception tests. *Zeitschrift für Naturforsch - Sect C J Biosci*. 2010; 65 C(9–10): 551–61.
21. Siqueira-Lima PS, Silva JC, Quintans JSS, Antonioli AR, Shanmugam S, Barreto RSS, et al. Natural products assessed in animal models for orofacial pain – a systematic review. *Rev Bras Farmacogn [Internet]*. 2017 [citado el 22 Enero 2018]; 27(1): 124–34. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X16301879>
22. Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001; 56(1–2): 9–16.
23. Foden FR, McCormick J, O'Mant DM. Vulpinic Acids as Potential Antiinflammatory Agents. 1. Vulpinic Acids with Substituents in the Aromatic Rings. *J Med Chem*. 1975; 18(2): 199–203.
24. Atta-ur-Rahman. *Studies in Natural Products Chemistry*. First edit. Elsevier B.V.; 2013. 476 p.
25. Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Stanojković T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*. 2012; 19(13): 1166–72.
26. Edwards HGM, Newton EM, Wynn-Williams DD. Molecular structural studies of lichen substances II: Atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. *J Mol Struct*. 2003; 651–53: 27–37.