

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS DE *Canoparmelia
texana* (TUCK.) ELIX & HALE (LÍQUEN)**

MESTRANDA: MARIA CATARINA GOMES GADÊLHA DE MOURA

**ORIENTADORES: PROF. DR. NICÁCIO HENRIQUE DA SILVA
CO-ORIENTADORES: PROF. DR^a. EUGÊNIA CRISTINA PEREIRA
PROF. DR^a. NORMA BUARQUE DE GUSMÃO**

**RECIFE,
2008**

MARIA CATARINA GOMES GADÊLHA DE MOURA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS DE *Canoparmelia texana* (TUCK.) ELIX & HALE (LÍQUEN)

**Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de Mestre em Bioquímica
pela Universidade Federal de
Pernambuco**

Aprovado por: _____

Data: ____/____/____

**RECIFE,
2008**

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Maria Catarina Gomes Gadêlha de Moura**, realizada em 24 de janeiro de 2008, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da UFPE.

Às 09:35 horas, do dia vinte e quatro de janeiro de 2008, foi aberto, na Sala de Aulas do Programa de Pós-Graduação, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Maria Catarina Gomes Gadêlha de Moura**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica e Fisiologia /CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes fez a apresentação da aluna, de seu orientador Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva, de seus co-orientadores Profa. Dra. Eugênia Cristina Pereira e Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão, bem como da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Nicácio Henrique da Silva, na qualidade de Presidente, do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, Maria Tereza dos Santos Correia, do Depto. de Bioquímica/UFPE, Emerson Peter da Silva Falcão, do Centro Acadêmico de Vitória/UFPE e Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes, do Depto. de Antibióticos/UFPE. Após as apresentações, o Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Atividade Antimicrobiana de compostos de *Canoparmelia texana* (LÍQUEN)**", e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pela aluna para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Após a apresentação da mestranda, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra a primeira examinadora, Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, o Sr. Presidente passou a palavra para o Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Logo após, o Sr. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários e sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, o Sr. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Dando prosseguimento, o Sr. Presidente passou a palavra para as co-orientadoras que fizeram alguns esclarecimentos. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Coordenadora, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 24 de janeiro de 2008.

Nicácio Henrique da Silva
Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
Maria Tereza dos Santos Correia
Emerson Peter da Silva Falcão
Vera Lúcia de Menezes

A PRESENTE CÓPIA CONFERE
COM O DOCUMENTO ORIGINAL.

RECIFE, 14/02/2008

Djalma Gomes da Silva
Secretário do Curso de
Mestrado em Bioquímica CCB UFPE

ÍNDICE ANALÍTICO

AGRADECIMENTOS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Líquens e seus compostos	12
2.2 Atividade antimicrobiana	15
3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E QUÍMICA DA ESPÉCIE ESTUDADA	17
4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Geral	20
5.2 Específicos	20
6. REFERÊNCIAS	21
7. ARTIGO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	26
8. ANEXOS	43
8.1 Cromatografias Líquida de Alta Eficiência	44
8.2 Resumos publicados em anais de congresso	48
8.2.1 Trabalho publicado ao VIII Encontro do Grupo Latino Americano de Liqueólogos (GLAL), Lima – Perú – Novembro, 2007	49
8.3 Normas para a publicação do artigo na Brazilian Journal of Pharmacognosy	50

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Francisco Xavier

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que me ofertou durante toda minha vida.

Aos meus pais –Leopoldo Gadêlha Malta de Moura e Odilane Gomes Gadêlha de Moura– pelo amor, dedicação, empenho concedidos para a realização de meus objetivos.

Ao meu amor – Luiz Gustavo Borba – por todo apoio, companheirismo, paciência e incentivos concedidos durante a realização deste sonho.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, pelo apoio para a realização do curso de mestrado.

Aos meus orientadores minha eterna gratidão. Dr. Nicácio Henrique da Silva, pela orientação científica, apoio, compreensão, Dra. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira pela competência, paciência, otimismo, confiança, e Dra. Norma Gusmão, pela eterna amizade, dedicação e estímulo.

A todos que fazem parte do Laboratório de Produtos Naturais, pelo companheirismo e auxílios prestados, em especial Mônica Cristina. Bem como, aos colegas de turma do mestrado.

A João Virgínio, pelo apoio dispensado em todos os momentos solicitados.

LISTA DE FIGURAS

3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E QUÍMICA DE *Canoparmelia texana*

Figura 1 – Talo de *Canoparmelia texana* (Tuck.) Elix & Hale

Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido divaricático

Figura 3 - Fórmula estrutural da atranorina

7. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Figura 1- Thin layer chromatogram of organic extracts of *Canoparmelia texana*. Captions: ATR – atranorin; DIV – semi purified divaricatic acid; ER – diethyl ether extract obtained at room temperature; CR – chloroform extract obtained at room temperature; AcR – acetone extract obtained at room temperature; Eh – diethyl ether extract obtained in hot condition; Ch – chloroform extract obtained at hot condition; Ach – acetone extract obtained at hot condition.

Figure 2 – High performance liquid chromatograms of atranorin (a); acetone extract of *Canoparmelia texana* obtained at room temperature (b); diethyl ether extract of *Canoparmelia texana* obtained in hot condition (c); the same diethyl ether extract added to 1 mg of ATR (d).

Figura 3 - Antimicrobial activity of diethyl ether extract of *Canoparmelia texana* obtained at hot conditions - Eh (over) and at room temperature - ER (below), against *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-01).

Figura 4 - Antimicrobial activity of chloroform extract of *Canoparmelia texana*, obtained in hot conditions - CR (below), against *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-01).

Figura 5 - Biochromatography of diethyl ether extract, obtained in hot conditions (Eh) and semi purified divaricatic acid (DIV) of *Canoparmelia texana*, against *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-01).

Figura 6 - MIC of semi purified DIV of *Canoparmelia texana* against the lineage of *Bacillus subtilis* (UFPEDA-16) (15,625µg/mL).

LISTA DE TABELAS

7. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Table 1 - Content of divaricatic acid (DIV) in organic extracts of *Canoparmelia texana*.

Table 2 - Antimicrobial activity of organic extracts and the semi purified divaricatic acid obtained from *Canoparmelia texana* by diffusion disc test (measurement mean of the halo in mm).

Tabela 3- Minimal Inhibitory Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of organic extracts and semi purified divaricatic acid of *Canoparmelia texana*.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a atividade antimicrobiana de *Canoparmelia texana* (Tuck.) Elix & Hale. Extratos orgânicos foram obtidos a partir de 50g do talo liquênico, através de extrações à temperatura ambiente e a quente, obedecendo à série eluotrópica, com éter dietílico, clorofórmio e acetona. Os componentes químicos do líquen foram analisados qualitativamente e quantitativamente, através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O ácido divaricático (DIV) foi semi-purificado a partir do extrato etéreo a quente. As propriedades antimicrobianas foram analisadas através de teste em meio de cultura sólido, biocromatografias e pela concentração mínima inibitória (CMI). Nos testes de difusão em disco, os extratos orgânicos e o ácido divaricático semi-purificado, a uma concentração de $2,5\text{mg.mL}^{-1}$, foram testados contra 14 bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, bem como espécies de *Candida*. Nos testes da CMI, os extratos e o DIV semi-purificado foram submetidos a microdiluições, a partir de uma concentração de $250\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. O extrato mais ativo nos testes em disco, e o ácido divaricático semi-purificado, ambos a 1mg.mL^{-1} , foram utilizados no biocromatograma frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Dos microrganismos testados, 6 bactérias foram sensíveis, dentre as Gram-positivas, a mais sensível foi *S. aureus*, dentre as Gram-negativas as inibidas foram *E. coli* e *Shigella sonnei*. Não se detectou atividade frente às espécies de *Candida*. O ácido divaricático semi purificado apresentou o maior halo de inibição (27,5 mm), quando comparado aos extratos orgânicos. Destes, o que apresentou melhor halo foi o etéreo extraído a quente. A CIM detectada foi de 250 a $15,625\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, valor próximo a outras substâncias liquênicas mencionadas na literatura. O biocromatograma revelou o ácido divaricático como composto majoritário da espécie. Esse resultado pode ser ratificado pelos ensaios de CCD, que revelou a presença do DIV em todos os extratos. Em adição, uma substância não identificada, e inativa frente aos microrganismos, foi detectada nos extratos testados. Por CLAE, o DIV foi registrado em maior teor no extrato etéreo extraído a quente. Este foi o mais ativo dentre os analisados. Dessa forma, é possível indicá-lo como princípio ativo de *Canoparmelia texana*.

UNITERMOS: *Canoparmelia texana*, ácido divaricático, atranorina, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

This study had the aim of studying the antimicrobial activity of the lichen *Canoparmelia texana* (Tuck) Elix & Hale. Organic extracts were obtained from 50g of lichen thallus, through extractions at room temperature and at hot condition, obeying an elutropic serie, with diethyl ether, chloroform and acetone. The lichen chemical compounds were analysed in a qualitative and quantitative form, through Thyn Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The divaricatic acid (DIV) was semi purified from hot ether extract. The antimicrobial properties were analysed through test in solid mean, biochromatographies and minimal inhibitory concentration (MIC). By diffusion disc tests the extracts and semi purified DIV, at 2,5 mg.mL⁻¹, were tested against 14 Gram positive and Gram negative bacteria, as well as the fungi *Candida* spp. In the MIC tests, the organic extracts and semi purified DIV were submitted to micro dillutions, from 250 µg.mL⁻¹. The most active extract in the antimicrobial tests and semi purified DIV, both at 1 mg.mL⁻¹, were submeted the biochromatogram against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Among tested microorganisms, 6 were sensible, being *S. aureus* the Gram positive bacterium most sensible, among the Gram negative, the inhibited were *E.a coli* and *Shigella sonnei*. It was not detected any activity against the tested *Candida* species. The semi purified DIV presented the highest inhibition halo (27,5 mm), when compared to the otganic extracts. Among them, the one who presented the best results was the diethyl ether obtained at hot condition. The detected MIC was from 250 to 15,625 µg.mL⁻¹, next value to other lichen substances mentioned in the literature. The biochromatogram revelead the DIV as species majority compost. This result could ratified through TCL assays, that revealed the DIV presence in all organic extracts. In addition, a non identified substance, and inactive against the microorganisms, was detected the tested extracts. The DIV was registered in highest content in the hot ether extract by HPLC. This one was the most active among analysed ones. This way, it is possible to indicate it as the active principle of *C. texana*.

KEYWORDS: *Canoparmelia texana*, divaricatic acid, atranorin, antimicrobial activity.

1 INTRODUÇÃO

Com a emergência de novas doenças infecciosas, o ressurgimento de infecções que pareciam terem sido controladas e, o aumento da resistência bacteriana às drogas utilizadas na terapêutica, houve a necessidade de pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novos antimicrobianos (VALGAS *et al.*, 2007).

A utilização correta de drogas com ação antimicrobiana na clínica médica tem sido uma das preocupações dos profissionais de saúde, principalmente pelos infectologistas. A temática em questão representa um problema que se agrava, principalmente, pelo desenvolvimento de cepas resistentes conseqüente ao uso indiscriminado de drogas antimicrobianas (FARIAS *et al.*; 1997; NASCIMENTO *et al.*; 2000).

Algas, líquens, fungos e plantas superiores constituem fontes para a síntese de novas moléculas bioativas, seja pelo uso direto de seus metabólitos secundários, ou pela produção de seus compostos derivados biosinteticamente ou semi-sinteticamente (GOMES *et al.*, 2003).

Plantas medicinais são muito conhecidas como fontes naturais para o tratamento de várias doenças desde a antiguidade (GULLUCE *et al.*, 2006). De acordo com o relatório apresentado pela OMS (Organização Mundial de Saúde), espécies de plantas utilizadas com propósitos medicinais se aproximam de 20000 (ASLAN *et al.*, 2002). Cerca de 17.000 espécies de líquens estão disponíveis por todas as partes do mundo (HONNEGER, 1996), o que torna promissor o estudo deste grupo biológico quanto a sua eficiência contra enfermidades.

Desde épocas antigas extratos de líquens eram medicinalmente utilizados, e investigações biológicas demonstraram que os metabólitos secundários específicos de líquens exibem atividades interessantes, como analgésicos, antipiréticos, antitumorais (LIMA *et al.*, 1990; PEREIRA *et al.*, 1994), antivirais, antioxidantes (GÜLÇİN *et al.*, 2002; BEHERA *et al.*, 2005) e antimicrobianos (PEREIRA *et al.*, 1996). Em particular, apresentam boa atividade contra bactérias Gram-positivas, e via de regra, pouca eficiência contra bactérias Gram-negativas e fungos (HALE, 1983; INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1985).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Líquens e seus compostos

O termo líquen (*lieken*) foi introduzido pelo grego Teosfrasto, 300 anos antes de Cristo, para descrever as excrescências que apareciam nos troncos das oliveiras (FOLMANN, 1960; HAWKASWORTH & HILL, 1984). Mas foi o botânico francês J. P. de Tournefort, em 1664, o primeiro a usar *lichen* como termo que agrupava vários organismos liquenóides em seu *Lês Élémentes de Botanique*.

Líquens não constituem uma unidade taxonômica, mas sim um grupo biológico que apresenta modo de nutrição comum, com características fisiológicas próprias, sendo um grupo bastante complexo (RAVEN *et al.*, 1996; MARCELLI, 1997). Sua estrutura é formada por um componente fúngico, o micobionte, e outro fotossintetizante, o fotobionte, que pode ser uma alga verde ou uma cianobactéria, que vivem em associação simbiótica (NASH III, 1996). Tal natureza simbiótica é amplamente discutida, pois a maioria dos pesquisadores refere-se aos líquens como um clássico caso de mutualismo. Para outros, são considerados como um exemplo de parasitismo controlado, uma vez que os fungos parecem ter mais benefícios e o fotobionte crescer mais lentamente no estado liquenizado do que no estado de vida livre (AHMADJIAN, 1993).

Esta associação resulta em uma estrutura especializada, o talo liquênico, onde o fungo forma um micélio que envolve as células do fotobionte. O talo é constituído por algas microscópicas e filamentos fúngicos (hifas). O córtex, um tecido periférico resistente, protege as células do fotobionte do ressecamento e excesso de luz. O tecido medular, mais interno, é frouxamente entrelaçado facilitando as trocas gasosas (AHMADJIAN, 1993).

Nos líquens, as algas constituem, com raras exceções, uma parte muito pequena do talo, variando de 5-10% da massa ou volume e são completamente envolvidos pelos tecidos do fungo nos talos. Portanto, toda a organização do talo liquênico se deve ao fungo. As algas podem, ou não, estarem restritas a uma camada especial do talo e responsabilizarem-se totalmente pela fotossíntese (SMITH & DOUGLAS, 1987).

Segundo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, o nome científico do líquen refere-se apenas a espécie do fungo, tendo a alga sua taxonomia própria dentro dos grupos comuns de algas (PURVIS, 2000).

Os líquens apresentam uma distribuição cosmopolita, e devido a sua capacidade de dessecação rápida, conseguem sobreviver em condições ambientais naturais adversas, tais

como, de altas e baixas temperaturas, de escuridão prolongada a luz contínua (GORIN *et al.*, 1993; RAVEN *et al.*, 1996). Sugeriu-se que em resposta a estes estresses, a seleção natural favoreceu a espécie produzindo concentrações elevadas de componentes fenólicos, principalmente depsídeos e depsidonas (PIOVANO *et al.*, 2002).

Líquens produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que podem ser divididos em dois grupos, denominados de metabólitos primários e secundários. Os primários são aminoácidos e proteínas, carboidratos, carotenóides e vitaminas, que estão ligados à parede celular e ao protoplasma liquênico (HALE, 1983; HONDA & VILEGAS, 1999). São essenciais para a estrutura e metabolismo do líquen, sendo frequentemente solúveis em água e extraídos com água quente. Alguns desses metabólitos são produzidos pela porção fúngica e outros pela porção da alga ou cianobactéria (HONDA & VILEGAS, 1999).

Os metabólitos secundários são produzidos unicamente pelo fungo a partir dos carboidratos da fotossíntese, e são secretados sobre a sua superfície da hifa, tanto formas amorfas ou como cristais. São produtos extracelulares de peso molecular relativamente baixo. São usualmente insolúveis em água e podem ser extraídos em solventes orgânicos (TÜRK *et al.*, 2003). Os compostos provenientes do metabolismo secundário são ácidos alifáticos, meta- e para- depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenóides e derivados do ácido pulvínico (ELIX, 1996).

A química de aproximadamente um terço de todas as espécies liquênicas já foram estudadas, sendo esses organismos as entidades biológicas mais pesquisadas do ponto de vista de produção de metabólitos secundários. A estrutura química de aproximadamente 200 dessas espécies já foram estabelecidas (TÜRK *et al.*, 2003). Cerca de 350 metabólitos secundários são conhecidos. Muitos deles vêm sendo utilizados com propósitos taxonômicos, devido a grande especificidade de ocorrência nesses organismos (HONDA & VILEGAS, 1999).

Os líquens são pouco usados na alimentação humana devido ao seu baixo conteúdo protéico, seu sabor geralmente amargo e, sua escassa produção de biomassa. Entretanto os líquens também têm sido empregados para a fabricação de bebidas alcoólicas, substituindo o lúpulo da cerveja por *Lobaria pulmonaria* (LEGAZ *et al.*, 2006).

Devido as suas cores, que variam do branco ao negro, muitos foram utilizados como corantes, entretanto, hoje possuem pequena importância econômica (RAVEN *et al.*, 1996; ELIX, 1996).

São usados como bioindicadores de poluição, devido à capacidade de absorverem e acumularem metais pesados (HONDA & VILEGAS, 1999). Espécies contendo cianobactérias são importantes na fixação de nitrogênio no solo (PURVIS, 2000).

Nos últimos dez anos, diversos metabólitos procedentes desses organismos estão sendo utilizados na fabricação de produtos cosméticos, como protetores solares, por absorverem luz ultravioleta (FERNÁNDEZ *et al.*, 1996; LEGAZ *et al.*, 2006). Também são utilizados na indústria de perfumes, sendo as espécies *Evernia prusnatri* e *Pseudevernia furfuracea* usadas para preparar um extrato, que é empregado como fixador de alguns perfumes (RICHARDSON & DAVID, 1988; HONDA & VILEGAS, 1999).

Os líquens têm sido utilizados pela medicina popular há séculos. Por exemplo, *Lobaria pulmonaria*, *Cetraria islandica* e espécies de *Cladonia* eram consideradas efetivas no tratamento da tuberculose pulmonar. A *Usnea barbata* no tratamento de doenças da pele e a *Usnea longíssima* como expectorante (GORIN *et al.*, 1993).

As pesquisas na área de cancerologia experimental demonstram que substâncias liquênicas apresentam altos percentuais de inibição contra células cancerígenas (LIMA *et al.*, 1990). O ácido úsnico exibiu efeitos antimitóticos (CARDARELLI *et al.*, 1997). O mecanismo ainda não está totalmente esclarecido, porém Al-Bekairi *et al.* (1991) verificaram uma significativa redução no conteúdo de RNA em ratos tratados com diferentes doses de ácido úsnico, que pode interferir no processo da síntese de RNA.

Metabólitos secundários isolados de espécies de *Parmelia* têm apresentado atividade anti-inflamatória, inibindo a biossíntese de leucócitos polimorfonucleares, e efeitos anti-proliferativos contra o crescimento de queratinócitos humanos, em doenças da pele, como a psoríase (KUMAR & MÜLLER, 1999). Derivados do ácido vulpínico foram avaliados como agentes anti-inflamatórios para artrite em ratos (FODEN *et al.*, 1975).

Lethariella cashmeriana e *L. sernanderi* são utilizadas na medicina tradicional chinesa, no preparo de chás medicinais, possuindo a propriedade hipotensora frente à pressão arterial e de agir em processos inflamatórios (LEGAZ *et al.*, 2006).

O ácido difractáico apresentou atividade analgésica e antipirética em um estudo realizado por Okuyama *et al.* (1995). Depsídeos tipo orcinol mostraram serem inibidores da monoamino oxidase B (MAO-B), enzima responsável pela desaminação oxidativa de neurotransmissores. Dessa forma, podem ser úteis no tratamento de síndromes depressivas e, na doença de Parkinson (WILSON *et al.*, 1998).

Os componentes liquênicos da classe das antraquinonas são de interesse como agentes antivirais contra o vírus HIV (SCHINAZI *et al.*, 1990). Antraquinonas derivadas de *Heterodermia obscurata* exibiram atividade contra o vírus herpes simples tipo 1 (COHEN & TOWERS, 1996).

2.2 Atividade antimicrobiana

Os líquens com função antimicrobiana têm sido utilizados em todo o mundo antes mesmo da introdução dos antibióticos. É parte integral dos primeiros cuidados de saúde em países como a China, Etiópia e Argentina (AKINYEMI *et al.*, 2005).

Após a descoberta da penicilina a partir de fungos, os líquens passaram a ser alvo de estudos direcionados ao descobrimento de novos produtos naturais com atividade antimicrobiana (VARTIA, 1973).

Substâncias líquênicas são testadas há décadas, sendo os primeiros estudos iniciados por Burkholder *et al.* em 1944 e, em 1950, Vartia testou nove substâncias de líquens, os ácidos pinástrico, girofórico, físdico, úsnico, liquesterínico, pulvínico, d-protoliquesterínico e divaricático e atranol. Com isso, verificou a inibição efetiva do crescimento de microrganismos Gram-positivos e fungos.

Diversos componentes líquênicos apresentaram atividade contra espécies de *Mycobacterium* e organismos Gram-positivos (STOLL *et al.*, 1950). Devido a pequena solubilidade em água e a baixa eficácia comparada às substâncias de outras fontes naturais com propriedade antimicrobiana, os compostos líquênicos não são considerados agentes antimicrobianos de grande potencial, segundo alguns pesquisadores (INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1998). No entanto, o ácido úsnico é considerado um importante agente antibacteriano (VARTIA, 1973; LAUTERWEIN *et al.*, 1995).

Ingólfssdóttir *et al.* (1985), utilizaram teste de difusão em disco e métodos turbidimétricos para verificar a atividade de extratos líquênicos de *Stereocaulon alpinum*, *Peltigera aphthosa*, *Thamnolia subuliformis* contra linhagens de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, comprovando atividade antimicrobiana dos mesmos.

Falcão *et al.* (2002), comprovaram a atividade de extratos orgânicos de *Heterodermia leucomela*, bem como dos ácidos úsnico, difractáico e atranorina contra microrganismos Gram-positivos. Os halos de inibição no teste de difusão em disco, variaram de 8 a 20mm de diâmetro.

Muitas correntes de pesquisa da atividade antimicrobiana de líquens têm demonstrado boa atividade contra bactérias Gram-positivas, e com poucas exceções, contra algumas bactérias Gram-negativas (notavelmente espécies de *Pseudomonas*). Lauterwein *et al.* (1995), verificaram que ácidos líquênicos de diferentes espécies eram inativos contra bactérias Gram-negativas, entretanto, apresentavam atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus*

faecalis. O mesmo autor investigou a atividade antimicrobiana *in vitro* dos ácidos vulpínico e úsnico contra alguns microrganismos aeróbicos e anaeróbicos.

Porém, com o aumento de pesquisas utilizando diferentes espécies liquênicas, pode-se observar que algumas já demonstram boa atividade frente a bactérias Gram-negativas. Türk *et al.* (2003), avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos étereos e acetônicos de *Cetraria aculeata*, contra 12 bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, sendo ativo frente a 9. O ácido protolisquerínico isolado desta espécie apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Mais recentemente, Gulluce *et al.* (2006) ao estudarem a atividade antimicrobiana dos líquens, evidenciaram que os extratos de *Ramalina pollinaria* inibiram o crescimento de 11 de 35 bactérias testadas. Na mesma pesquisa evidenciaram a atividade antifúngica de *Ramalina pollinaria*, *R. polymorpha* e *Umbilicaria nylanderina* contra *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*.

Extratos liquênicos de *Usnea gatthensis* e *Arthothelium awasthii* foram efetivos contra *Bacillus lechiformes*, *B. subtilis*, *B. megaterium* e *S. aureus*, em uma pesquisa realizada por Behera *et al.* (2005).

Alterações metabólicas, das atividades enzimáticas e de permeabilidade celular das bactérias, decorrentes de alterações protéicas pelos compostos liquênicos, podem conduzir à morte celular. Alguns ácidos liquênicos, como o L-úsnico, interferem nos processos de fosforilação oxidativa, bem como inibem a fusão nuclear de células animais, ao atuar sobre o metabolismo do DNA (VICENTE, 1975).

3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E QUÍMICA DE *Canoparmelia texana*

O Brasil é um dos países com poucos dados de prospecção do ponto de vista liquenológico (MARCELLI, 1996). O estudo químico de líquens tem sido pouco explorado, quando comparado com o de plantas superiores e fungos. As poucas estimativas da diversidade existente vêm de observações pessoais (MARCELLI, 1997), e os números apresentados podem ser igualmente subestimados.

Através do levantamento de espécies de Parmeliaceae no Parque Estadual do Cerrado do Paraná e, para o Estado de São Paulo, verificou-se que há apenas um trabalho sobre um pequeno grupo de 30 espécies Parmeliaceae (MARCELLI, 1993).

No Brasil são citadas oito espécies de *Canoparmelia*. Dentre algumas, podem-se citar *C. caroliniana*, *C. crozalsiana* e a *C. texana* (SPIELMANN, 2005).

Canoparmelia texana (Tuck.) Elix & Hale, é um líquen pertencente à família Parmeliaceae. Diversos sinônimos já foram atribuídos a essa espécie, como por exemplo, *Parmelia texana* e *Pseudoparmelia texana*.

C. texana possui hábito folhoso, podendo ser destacada de seu substrato com facilidade (Figura 1). É caracterizada pela presença de sorais orbiculares, de submarginais a laminais; talo cinza-esverdeado, lobos com ramificação irregular, sobrepostos lateralmente, ápice redondo; superfície é negra, lisa ou rugosa; margem de castanha a bege, ou com rizinas. Estas são negras, abundantes e distribuídas homogeneamente (WALKER *et al.*, 2003; SPIELMANN, 2005).

A *C. texana* se concentra em cerrados, além de ocorrerem sempre em áreas expostas a excesso de luminosidade e ventos. Comumente espalham-se por ambientes urbanos, que possuem características climáticas semelhantes (MARCELLI, 1997).

Possui em sua composição o ácido divaricático (Figura 2) e a atranorina (Figura 3) como principais componentes (WALKER & LINTOTT, 1997). Estes compostos aromáticos são formados pela esterificação de duas unidades fenólicas (ligações éster, geralmente nas posições 1 e 4'). O ácido divaricático pela esterificação do ácido orsenílico, e a atranorina pelo ácido β -metil-orosenílico (pois, há uma reação de metilação na posição 1 e 3') (HONDA & VILEGAS, 1999).



Figura 1 – *Canoparmelia texana* (Tuck.) Elix & Hale

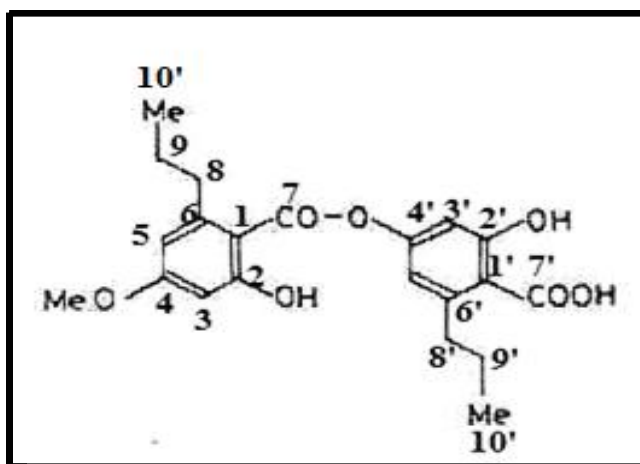


Figura 2 – Fórmula estrutural do ácido divaricático (WALKER & LINTOTT, 1997).

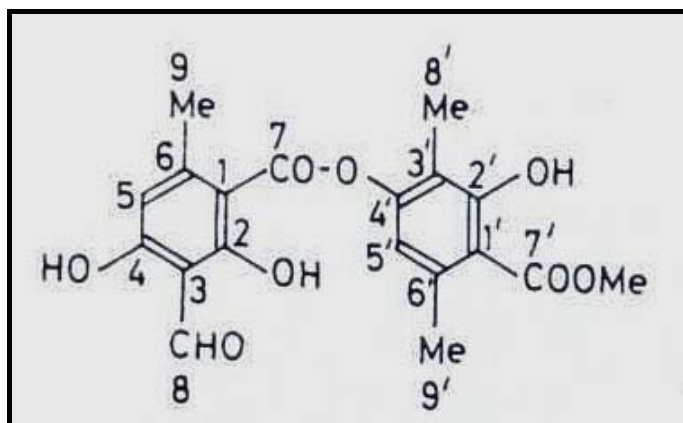


Figura 3 – Fórmula estrutural da atranorina (WALKER & LINTOTT, 1997).

4 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Durante o ano de 1970, espécies de *Staphylococcus aureus* multi-resistentes a antibióticos, incluindo meticilina e gentamicina, foram os grandes responsáveis por infecções nos Estados Unidos. Em 1980, as cepas multi-resistentes foram consideradas de maior patogenicidade epidemiológica e clínica em hospitais devido ao uso indiscriminado das drogas, e assim, o desenvolvimento da resistência bacteriana (THOMSBERRY & MCDOUGAL, 1983; KLOOS & BANNERMAN, 1995).

As pesquisas de antimicrobianos têm recebido atenção devido à crescente incidência de micoses associadas primariamente com AIDS e tratamento com drogas imunossupressivas. Existem poucos agentes antifúngicos e de eficácia limitada indicados para o tratamento de micoses sistêmicas (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991).

Assim, na tentativa de encontrar novas moléculas bioativas, com atividade antimicrobiana, muitos pesquisadores têm se concentrado na investigação de produtos naturais com atividade potencial contra patógenos, em especial os líquens.

A investigação da imensa flora do Brasil e do resto do mundo é de grande importância, visando à busca de novas drogas que possam trazer benefícios para todos (MONTE, 1998).

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

- Avaliar a atividade antimicrobiana de substâncias presentes no talo *in natura* de *Canoparmelia texana* coletada no município de Curitiba-PR.

5.2 Específicos

- Verificar e avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos orgânicos e do ácido divaricático semi-purificado de *C. texana* frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*) e fungos (*Candida albicans*, *C. tropicalis*).

- Extrair, isolar e purificar o ácido divaricático, composto principal de *C. texana*.

- Identificar o composto majoritário da espécie.

6. REFERÊNCIAS

AHMADJIAN, V. **The lichen symbiosis**. New York: Jonh Wiley & Sons, 1993. 250 p.

AL-BEKAIRE, A. M.; QURESHI, S.; CHAUDHRY, M. A.; KRISHNA, D. R.; SHAH, A. H. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice. **J. Ethnopharmacol.** v. 33, p. 217-220, 1991.

ASLAN, A.; APTROOT, A.; YAZICI, K. New records for the lichen flora of Turkey. **Mycotaxon**, v. 84, p. 277-280, 2002.

AKINYEMI, K. O.; OLADAPO, O.; OKWARA, C. E.; IBE, C. C.; FASURE, K. A. Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 6, 2005.

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

BURKHOLDER, P. R.; EVANS, A. W.; McVEIGH, I.; THORTHON, H. K. Antibiotic activity of lichens. **Pro. Nat. Acad. Sci. Wash.**, v. 30 (9), p. 250-255, 1944.

CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, P.; NARDONNE DE CICCIO, F.; ALESIANI, O.; ROSSIELO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 667-672, 1997.

COHEN, P. A.; TOWERS, G. H. N. Biosynthetic studies om chlorinated anthraquinones in the lichen *Nephroma laevigatum*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1352-1329, 1996.

ELIX, J. A. Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH III, T.H. **Lichen Biology**. Cambridge: University press, p. 154-180, 1996.

FALCÃO, E. P.; 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 Farma Bonarense**, v. 21, p. 43-49, 2002.

FARIAS, W. V. L.; SADER, H. S.; LEME, I. L.; PIGNATARI, A. C. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isolados em 12 hospitais. **Rev. Ass. Med.**, v. 43, p. 199-204, 1997.

FERNÁNDEZ, E.; QUILHOT, W.; GONZÁLEZ, I.; HIDALGO, M. E.; MOLINA, X.; MENESES, I. Lichen metabolites as UV-B filters. **Cosmetic and Toiletries**, v. 111, p. 69-74, 1996.

FODEN, F. R.; McCORMIK, J.; O'MANT, D. M. Vulpinic acids as potencial antiinflammatory agents. 1. Vulpinic acids with substituents in the aromatic rings. **J. Med. Chem.**, v. 18, p. 199-203, 1975.

FOLMANN, G. **Flechten (Lichenes)**. Kosmos-Gesellschaft der naturfreunde Francker sche Verlagshandlung. Sterttgast, 1960. 67p.

GOMES, A. T.; SMÂNIA JR, A.; SEIDEL, C.; SMÂNIA, E. F. A.; HONDA, N. K.; ROESE, F. M.; MUZZI, R. M. Antibacterial activity of orsellinates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 194-196, 2003.

GORIN, P. A.; BARON, M.; SILVA, M. L. C.; TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M. Lichens carbohydrates. **Ciência Cultura**, v. 45, n. 1, p. 27-36, 1993.

GÜLÇİN, I.; OKTAY, M.; KUFREVIOGLU, O. I.; ASLAN, A. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 325-329, 2002.

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

HALE-JR., M. E. **The Biology of Lichens**. 3ed. London. Edward Arnold pub., 1983. 90p.

HAMBURGER, M. O.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. T. **The Lichen Forming Fungi**. Chapman & Hall, New York, 1984, 158 p.

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

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

INGÓLFSDÓTTIR, K.; BLOOMFIELD, S. F.; HYLANDS, P. J. In Vitro of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potencial preservatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Aug., p. 289-292, 1985.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G. A. C.; SKÚLASON, V. G.; GISSURARSON, S. R.; VILHELMSDÓTTIR, M. Antimicrobial activity of lichens metabolites in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 141-144, 1998.

KLOSS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; ROLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**, Edited. ASM Press, Washington, d. C.; p. 282-298, 1995.

KUMAR, S.; MÜLLER, K. Lichens metabolites, 2, Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acids on human keratinocyte growth. **J. Nat. Products**, v. 62, p. 821-823, 1999.

LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETERS, T.; MARRE, R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, p. 2541-2543, 1995.

LEGAZ, M. E.; CÓRDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C.; XAVIER-FILHO, L.; RODRIGUES, S. A. Importância Econômica dos Líquens para o Homem. In: XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p.581-619, 2006.

LIMA, R. M. C.; NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. **Bol. Soc. Brot.**, v. 63. p. 339-348, 1990.

MARCELLI, M. P. Pequenas Parmelias ciliadas dos cerrados brasileiros. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 25-70, 1993.

MARCELLI, M. P. Biodiversity assessment in lichenized fungi: the necessary naive roll maters. In: BICUDO, C. E. M.; MENEZES, N. A. **Biodiversity in Brazil a first approach**. São Paulo: CNPQ, p. 93-107, 1996.

MARCELLI, M. P. Estudo da diversidade de espécies de fungos liquenizados do Estado de São Paulo. In: JOLY, C. A. (Org.). **Biota**, São Paulo: Fundação André Toselo, v. 1, p. 1-12. 1997.

MONTE, F. J. Q. Produtos naturais vale investigar. **Jornal da Ciência**, Rio de Janeiro. v. 387. p. 4-5, 1998

NASH III, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge, USA, Cambridge, University Press. led. 1996. 303p.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, p. 247-256, 2000.

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.**, v. 61, p. 113-115, 1995.

PEREIRA, E. C.; NASCIMENTO, S. C.; LIMA, R. M. C.; *et al.* Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tokai. J. of Exp. And Clin. Madicine.** v. 19(12). p. 47-52, 1994.

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; BRITO, E. S. CRUZ, L.; SILVA, M. I. Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos I: *Cladonia corallifera* e *Cladonia substellata*. Ver. UA. Série: **Ciências Biológicas**, Manaus, v. 1, p. 65-77, 1996.

PIOVANO, M; GARBARINO, J. A.; GIANNINI, F. A.; CORRECHE, E. R.; FERESIN, G.; TAPIA, A.; ZACCHINO, S.; ENRIZ, R. D. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química.** v. 47, n. 3, p. 235-240, 2002.

PURVIS, W. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C., in association with the Natural History Museum, London. U. K. 112p. 2000.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHLORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 724 p.

RICHARDSON, S.; DAVID, L. Medicinal and other economic aspects of lichens. In: Galun, M. Ed., **Handbook of Lichenology**, v. 3. CRC Press, England, p. 93-105, 1988.

SCHINAZI, R. F.; CHU, C. K.; BABU, J. R.; OSWALD, B. J.; SAALMANN, V.; ERIKSSON, B. F. H.; NASR, M.; CANNON, D. L. Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. **Antiviral Res**, v. 13, p. 265-272, 1990.

SMITH, D. C.; DOUGLAS, A. E. **The Biology of Symbiosis**. London: Edward Arnold.1987.

STOLL, A.; BRACK, A.; RENZ, J. Die Wirkung von Flechtenstoffen auf Tuberkulbakterien und auf einige andere Mikroorganismen. **Schweiz Z. Path. Bakt.**v. 13, p. 729-751, 1950.

SPIELMANN, A. A. **A Família Parmeliaceae nos barrancos e peraus da encosta da Serra Geral, no Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil**. 204f. Dissertação (Mestrado-Instituto de Botânica) Secretaria do Estado. São Paulo, 2005.

THOMSBERRY C.; McDOUGAL, L. K.; Successful use of broth microdilution in susceptibility of tests for methicillin resistance (heteroresistent) *Staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 18, p. 1084-1091, 1983.

TOURNEFORT, J. P. **Eléments de Botanique**. Paris: Imprimerie Royale, 1964. 558p.

TÜRK, A. O.; YILMAZ, M.; KIVANÇ, M.; TURK, H. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria acuelata* and its protolichesterinic acid constituent. **Z. Naturforsch.**, v.58, p.850-854, 2003.

VARTIA, K. O. Antibiotics in lichen II. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, v. 28, p. 7-19, 1950.

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

VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; Jr. SMÂNIA, A. Screening methods to determine antibacterial activity of Natural Products. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 369-380, 2007.

VICENTE, C. **Fisiologia de las substancias liquénicas**. Alhambra, Madrid. 1975.

WALKER, J. R. L.; LINTOTT, E. A. A phytochemical register of New Zealand lichens. **New Zealand Journal of Botany**. v. 35. p.369-384, 1997.

WALKER, T. R.; CRITTENDEN, P. D.; YOUNG, S. D. Regional variation in the chemical composition of winter snow pack and terricolous lichens in relation to sources of acid emissions in the USA river basin northeast European Russia. **Environmental Pollution**. v. 125 (3). p. 401- 412, 2003.

WILSON, C. O.; GISVOLD, O.; DELGADO, J. N.; REMERS, W. A. **Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry**. Philadelphia: Lippincott Raven, 1998. 1000p.

7. ANTIMICROBIAL PROPERTY OF SENCONDARY METABOLITES
***Canoparmelia texana* (LICHEN)**

ANTIMICROBIAL PROPERTY OF SECONDARY METABOLITES *Canoparmelia texana* (LICHEN)

Maria Catarina G. G. de Moura¹, Eugênia Cristina G. Pereira^{2*}, Norma Buarque de Gusmão³, Sionara Eliasaro⁴, Nicácio Henrique da Silva¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Ciências Geográficas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Acadêmico Hélio Ramos, Cidade Universitária, 50740-530, Recife, PE, Brasil

³Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo, 135, 50670-901, Recife, PE, Brasil

⁴Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, 81531-980, Curitiba, PR, Brasil

RESUMO: “Propriedades antimicrobianas de metabólitos secundários de *Canoparmelia texana*”. Extratos orgânicos (etéreo, clorofórmio e acetônico), e o ácido divaricático (DIV), obtido do líquen *Canoparmelia texana*, foram testados contra bactérias e fungos. Estes foram ativos tanto contra bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas. A CIM detectada foi de 15,625 a 250 µg.mL⁻¹, valor próximo à outras substâncias liquênicas. O biocromatograma revelou ao ácido divaricático como composto majoritário da espécie. Estes resultados puderam ser ratificados por ensaios cromatográficos, onde o DIV foi detectado em maior teor nos extratos avaliados.

Unitermos: *Canoparmelia texana*, ácido divaricático, atranorina, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT: Organic extracts and divaricatic acid (DIV) obtained from the lichen *Canoparmelia texana* were tested against bacteria and fungi. These products were active as well against Gram positive bacteria as Gram negative ones. The detected CMI was 15.625 to 250 µg.mL⁻¹, near value to other lichen substances. The biochromatogram indicated the DIV as active principle of the species. Those results could be ratified by chromatographic assays, where the DIV was detected in major content in the evaluated extracts.

Keywords: *Canoparmelia texana*, divaricatic acid, atranorin, antimicrobial activity.

* E-mail: eugenia.pereira@pesquisador.cnpq.br, Fax: 55-81-2126.8275

INTRODUCTION

The search of new products active against resistant bacteria, without damage cells and organs is objective of several pharmaceutical industries. The production of new antibiotics, or structural modifications of some existent drugs that already exist, but is not satisfactory (FARIAS *et al.*, 1997).

Lichens produce biologically-active compounds. Some of them inhibit the growth of microorganisms, particularly Gram positive bacteria, and have less effectiveness against the Gram negative ones (HALE, 1983; INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1985).

Brazilian lichens have been studied in this subject with satisfactory results (PEREIRA *et al.*, 1991; 1996; RIBEIRO *et al.*, 2002; FALCÃO *et al.*, 2002). Thus, the investigation of antimicrobial properties of Brazilian species can contribute to the knowledge of lichen compounds with antimicrobial activity.

Canoparmelia texana, Parmeliaceae family, is a foliose lichen found in Savannah vegetation, or in areas exposed to high amounts of luminosity and wind (WALKER *et al.*, 2003; SPIELMANN, 2005). The species is referred as producer of divaricatic acid (DIV) and atranorin (ATR). The DIV is mentioned by Piovano *et al.* (2002) as active against dermatophyte fungi, responsible to skin infections, and by Ribeiro *et al.* (2002) as effective to *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-02) and *Escherichia coli* (UFPEDA-224), this one a Gram negative bacteria.

The atranorin, besides its low toxicity, shows a remarkable antiinflammatory action (MAIA *et al.*, 2002).

Due to the biological properties of DIV and ATR, in this paper the antimicrobial activity of *C. texana* occurred in Curitiba, Paraná, Brazil, was evaluated, and its active principle indicated from biological and chemical assays.

MATERIAL AND METHODS

Lichen material

Canoparmelia texana (Tuck.) Elix & Hale lichen, collected in the city of Curitiba – PR/Brazil, was used during the development of this experiment.

Collection and storage

About 200g of *C. texana* were stored in paper bags and kept at room temperature ($28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) until the experiments were carried out.

The material was identified by one of the authors (Sionaro Eliasaro) and part of the sample was deposited at UFP Herbarium, from Departament of Botany, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, voucher nº 44627.

Obtention of organic extracts from thallus *in natura*

From the dry thallus (50g) at room temperature ($28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), organic extracts of *C. texana* were obtained with of diethyl ether, chloroform and acetone through a exhaustive system. The same procedure was obeyed for obtention of hot extracts, using bath at 40°C , for 1h. The solvents were evaporated, and obtained hot and room temperature organic extracts.

Isolation and purification divaritic acid (DIV)

The DIV was isolated and purified from the hot ether extract. This one, after concetration until dryness, was washed in a G-4 funnel, with chloroform. The crystals were repeated times washed by this procedure, according to Asahina & Shibata (1954).

Thin Layer Chromatography (TLC)

The TLC was used to detect presence of the organiccompounds and the DIV from *C. texana*. Dissolved samples of organic extracts were applied in silica gel 60 F₂₅₄ + 366 Merck de 20 x 20 cm plates, and developed in the A solvent system (toluene/dioxane/acetic acid, 180:45:5, v/v). After the solvents evaporation, the spots were visualized under UV short

(254nm) and long (366nm) wavelengths. Then, the plates were sprayed with sulphuric acid (10%) and heated at 100°C for 1 h, in order to evidence the spots through color reaction (Culberson, 1972). The results were compared to Rf values and color of purified atranorin and divaricatic acid.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The organic extracts (1mg.mL⁻¹) and the DIV (0,1mg.mL⁻¹) were dissolved in spectroscopic methanol. The analysis were developed in a HITACHI liquid chromatograph, coupled to an UV detector (CG-435-B), at 254nm, using a reverse phase C18 column, flow 1,0 mL. min⁻¹, volume of injection 20μL, attenuation 0,16 at room temperature (28°C ± 3°C), using isocratic mobile phase methanol/acetic acid/deionized water (80:19.5:0.5, v/v) according to Legaz & Vicente (1983). The semi purified DIV and ATR were used as standard. The results were analysed by peak areas and retention time (RT) of the substances in the column.

Microorganisms test

For antimicrobial assays the selected test microorganisms were: *Staphylococcus aureus* (Collection microorganisms of the Department of Antibiotics, University of Pernambuco - UFPEDA-01, 02; and isolated clinical - IC 11 of the Hospital Sao Marcos – Recife-PE), *Bacillus subtilis* (UFPEDA-16), *Micrococcus luteus* (UFPEDA-100), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA-138) as representative of Gram-positive bacteria; *Escherichia coli* (UFPEDA-224), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA-39 e 416), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA-14 e 396), *Shigella sonnei* (UFPEDA-413), as Gram-negative bacteria, and *Candida albicans* (Municipal Public Health Laboratory of the Recife-SPRLM-32), *C. albicans* (SPRLM-38), *C. albicans* (SPRLM-39), *C. tropicalis* (SPRLM-21), as fungi.

Antimicrobial activity

The tests were carried out through test in solid condition, in duplicate. Petri dishes (90 mm) with 25mL of Agar Müller-Hinton medium were inoculated with 100 μ L of the suspension of tested microorganisms (10^7 UFC. mL⁻¹), according to Bauer *et al.* (1966). Discs of paper were impregnated with 50 μ L of solutions of each extract, or purified substances, with concentration of 2,5mg.mL⁻¹ (in solvent sulfoxid dimetyl - DMSO) and, after that, they were deposited in the previously inoculated medium, and incubated at 37°C for bacteria. For fungi, the medium GL was used, and the plates incubated at 30 °C. The solvent DMSO were used as negative control, and as positive control were realized antibiogram with ampicillin and ciprofloxacin. The results were expressed through the measurement mean of the inhibition zones formed around the discs (halo), and expressed in milimeters (mm).

Biochromatographic assays

This test was developed according to Homans and Fuchs (1970), modified by Costa-Filho *et al.* (1991). The most active extracts in the antimicrobial tests and the semi-purified DIV were applied on silica Gel F254+366 Merk plates (5x10 cm), concentration 1 mg.mL⁻¹, and developed in the A solvent system (Culbertson, 1972). As reference the substances atranorin (ATR) and divaricatic acid (DIV) were applied. The plates were stored for 24 hours, in aseptic conditions, until the complete evaporation of the eluent. Afterwards, the plates were placed into a Petri dish (180 mm), and over it deposited a layer of Agar Müller-Hinton (25 mL), inoculated with a suspension (100 μ L) of the Gram-positive or Gram-negative microorganisms, whose inhibition was remarkable in discs assays, *S. aureus* and *E. coli* respectively, at of 10^7 UFC.mL⁻¹. After 24 h, solution of TTC (2,3,4 Triphenyl Tetrazolium Chloride) at 0,1mg.mL⁻¹, was sprayed on the plates for a pink reaction over the

area of bacteria growth. The absence of color reaction around the spots, indicated the active principle of the studied specie.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericid Concentration (MBC)

Tests of MIC were developed according to Courvalin *et al.* (1985), using all inhibited microorganisms, previously selected by screening. The test microorganisms were incubated for 18h in 5 mL of liquid Müller-Hinton medium, and dilluted in a new medium in order to obtain the appropriate turbity, equivalent to the tube 0,5 in the MacFarland scale (10^7 UFC.mL⁻¹). Microdisolution plates were used, with 70 µL of liquid Müller-Hinton in each well, and added 20 µL of active extracts, or DIV. The extracts and DIV were dissolved in 8 parts of DMSO, in a concentration from 2,5 mg.mL⁻¹. The microorganisms were inoculated in the wells, and the plates were incubated for 24 h, at 37°C. After this time, each microdissolution was seeded in Petri dishes containing 18 mL of Müller-Hinton medium, and incubated for more 24 h, at 37°C. The MIC have been defined as the smallest concentration of the drug in which the microorganism have not been grown; and the MBC defined as the smallest concentration of the drug in which the 99,9% of the grown colony were inhibited.

RESULTS AND DISCUSSION

The TLC assays showed the presence of two spots, whose R_f are similar to DIV and ATR (Figure 01). Other side, the color reaction demonstrates a yellow spot for DIV, similar to semi purified substance from *C. texana*. Thus, the spot with R_f value near to ATR showed a pinkish color, while this compound exhibit a strong orange in color reaction.

The assays made by HPLC revealed the presence of DIV, as the main compound of *C. texana*. The diethyl ether showed to be the most capable solvent for extracting this

compound, whose extracts obtained at room temperature, or in hot conditions, registered higher content of DIV, mainly the hot one (Table 01).

According to Walker & Lintott (1997), *C. texana* is a foliose species whose major compound is the DIV, also occurring the ATR.

The chromatograms revealed the DIV, but the different contents were due to the extraction capacity of used solvents.

In attempt of verifying the presence of this compound on organic extracts of *C. texana*, 1 mg of ATR was added to 1 mg of hot ethereous extract, and dilluted in 1 mL of spectroscopy methanol. The only extract that exhibited a peak similar to ATR (Figure 2a) was the acetonic (room temperature), but discrete, and its low content did not allow its register in the chromatogram (Figure 2b). It was also possible that ATR could be linked to another compound, due to its polarity. Thus, when added to ether extract obtained in hot condition, an additional peak, similar to standard ATR was visualized (Figure 2c; 2d).

The idea of changing the retention time (RT) of ATR in the column is supported by Falcão *et al.* (2002). The authors suggest that ATR in organic extract of *Heterodermia leucomela* decreases its RT, due to be capable of linking to other extract compounds. The pinkish compound, detected by TLC can be a non mentioned substance by literature, or ATR in low content, probably linked to other substance. Anyway, this product was inactive against the tested microorganisms. The extracts with highest content of DIV were the most active.

Antimicrobial tests with organic extracts of *C. texana* and the DIV, through disc diffusion tests in solid medium, showed action of such extracts against Gram positive and Gram negative bacteria (Table 02).

Most of the studies show large activity of lichen substances against Gram positive bacteria (CAPRIOTTI, 1961; SILVA *et al.*, 1986; PERRY *et al.*, 1999; FALCÃO *et al.*, 2004; MARTINS, 2005), and little activity against Gram-negative bacteria (HALE, 1983). The

result of this research demonstrates activity for both classes of bacteria, similarly to the study by Gollapudo *et al.* (1994). These authors, also reported the action of the methyl and ethyl orselinate, and the methyl β -orsenilate against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.

According to the table 02, all bacteria that were inhibited by organic extracts obtained at room temperature, differently from the hot extracts, from which only the ether showed this activity (Figure 03). This fact may be justified, because this extract presented highest content of DIV in the liquid chromatograms. This was not observed in the hot chloroform (Figure 04) and acetic extracts.

The semi purified DIV showed inhibition halo superior to demonstrated by the extracts (Table 02). The most efficient one was the hot ether (Figure 03), whose content of DIV was the highest, according to HPLC assays (Table 01).

In the study developed by Nóbrega *et al.* (2002), among organic extracts obtained with ether, chloroform and acetone of *Parmotrema andinum*, that also produce the DIV, the most active was the chloroform, followed by the ethereal. Both extracts were active against *S. aureus* and *B. subtilis*.

Observing more data Table 02, it was observed that the most sensible microorganism was the *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-01), in which the inhibition varied from 25 to 27.5mm. Extracts of *Ramalina solediosa* against the same strain of *S. aureus*, was used by Falcão *et al.* (2004), and the inhibition zone was about 16.7mm. Species of *Parmelia* had their extracts tested with efficiency against the *S. aureus*, with halos that vary from 11 to 25mm (SILVA *et al.*, 1986).

The antimicrobial tests showed that the extracts of *C. texana* were inactive against the tested *Candida* strains.

Türk *et al.* (2003) tested extracts of *Cetraria aculeata* against 9 different fungi, as *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium solani* and *Cladosporium sp.* Antifungi activity of the extracts was not detected. According to Piovano *et al.* (2002), the divaricatic, difractaic and the lobaric acids demonstrated moderate activity against dermatophytes fungi, that caused skin infections.

The most efficient lichen extract in the disc test, hot ether, and the semi purified DIV were submitted to TLC and tested against the most sensible microorganisms, *Staphylococcus aureus* UFPEDA-01 (Gram positive) and *Escherichia coli* UFPEDA-224 (Gram negative) through biochromatographic assays. It was observed that, through a colour reaction with TTC, no bacterial development around the semi purified DIV, as well as the DIV contained in the hot diethyl ether extract (Figure 05). The inhibition capacity of DIV was remarkable, since that the halo formed around this compound intercepted the neighbors substances.

The result is according to Ribeiro *et al.* (2002), which conduted assays of microdissolution with several lichen acids, such as the DIV. The authors also observed activity against the Gram positive bacteria *S. aureus*, and the Gram negative bacteria *E. coli*.

Thee data are also confirmed by Perry *et al.* (1999), who tested and observed that the rangiformic and usnic acids were efficient against *Bacillus subtilis*, whereas the atranorin were inactive agaisnt this bacterium, *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*.

The table 03 demonstrates MIC of each extract and the purified substance against the selected microorganisms. The MBC varied from 15.625 to 250 µg.mL⁻¹. The extracts with small value of MIC were the ether and the semi purified DIV, against the *B. subtilis* (Figure 06) e *S. sonnei*.

Gulluce *et al.* (2006) obtained similar results by MIC in quantitative analysis. In antimicrobial activity from extracts of *Parmelia saxatalis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina*

pollinaria, *R. polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*, against 35 bacteria, among them Gram positive and Gram negative ones, the MIC varied from 15.62 to 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ingólfssdóttir *et al.* (1998), analysed the MIC of lichen secondary metabolites against *Mycobacterium aurum*. The atranorin, the lobaric, protolisquasterinic, salazinic and the usnic acids exhibited MIC that ranged from 32 to 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. It was concluded that the MIC of these acids, when compared to commercial antibiotics, such as the rifampicin and streptomycin, was considered low.

CONCLUSIONS

The DIV of *Canoparmelia texana* is active against Gram positive and Gram negative bacteria, but inefficient against *Candida* spp.

Biochromatographic assays indicated the DIV as active principle of the species, ratified by chromatographic tests, that comprove to be the most efficient extracts those ones who belong highest content of DIV.

REFERENCES

- ASAHINA Y, SHIBATA S 1954. *Chemistry of lichen substance*. Tokio: Japan Society for the Promotion of Science.
- BAUER AW, KIRBY WMM, SHERRIS JC, TRUCK M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a Standardized Single Disk Method. *The American Journal of Clinical Pathology* 45: 493-496.
- BEHERA BC, VERMA N, SONONE A, MAKHIJA U 2005. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* *in vitro*. *Biotechnology Letters* 27: 991-995.
- CAPRIOTTI A 1961. The effect of Usno on Yeast isolated from the excretion of tuberculosis patients. *Antibiotic and Chemotherapy* 11: 409-410.
- COSTA-FILHO LO, OLIVEIRA AFM, BRASILEIRO VLF, PEREIRA EC, SILVA NH 1991. Contribuição ao estudo do controle biológico de *Dysdercus maurus*, através de

substâncias liquênicas. *Resumos do IV Congresso Nacional de Ecologia*. Sociedade Nordestina de Ecologia Recife-PE, 36.

COURVALIN P, GLODSTEIN F, PHILIPPON A, SIROT L 1985. *L'Antibiogramme*. Paris: MPC – Videom.

CULBERSON, CF 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thinlayer-chromatographic method. *Journal of Chromatography* 72: 113-125.

FALCÃO EP, SILVA NH, GUSMÃO NB, RIBEIRO SM, HONDA NK, PEREIRA EC 2002. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. *Acta Farma Bonarense* 21: 43-49.

FALCÃO EP, SILVA NH, GUSMÃO NB, RIBEIRO SM, PEREIRA EC 2004. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina solediosa* (B. de Lesd.) Laudron. *Acta bot. bras.* 18: 911-918.

FARIAS WVL, SADER HS, LEME IL, PIGNATARI AC 1997. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isolados em 12 hospitais. *Rev. Ass. Med.* 43: 199-204.

GROOVE DC, RANDAL WA 1955. *Assay Methods, Antibiotic activity: a laboratory manual*. New York: Medical Encyclopedia.

GULLUCE M, ASLAN A, SOKMEN M, SAHIN F, ADIGUZEL A 2006. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Plastimatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine* 13: 515-521.

HALE-JR, ME 1983. *The Biology of Lichens*. London: Edward Arnold pub.

HOMANS AL, FUCHS A 1970. Direct bioautography on thin layer, cromatograms as method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Cromatography* 51: 327-329.

INGÓLFSDÓTTIR K, BLOOMFIELD SF, HYLANDS PJ 1985. In Vitro of the Antimicrobial Activity of Lichen Metabolites as Potencial Preservatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Aug.: 289-292.

INGÓLFSDÓTTIR K, CHUNG GAC, SKÚLASON VG, GISSURARSON SR, VILHELMSDÓTTIR M 1998. Antimicrobial activity of lichens metabolites in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 6: 141-144.

LEGAZ ME, VICENTE C 1983. Endogeneous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prusnastri* thallus. *Plant Physiol* 71: 300-302.

MAIA MBS, SILVA NH, SILVA EF, CATANHO MTJ, SCHULER ARP, PERAIRA EC 2002. Anticonceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from lichen *Cladina dentroides* (des. Abb) Ahti. *Acta Farm. Bonarense* 21: 259-264.

MARTINS MC 2005. *Atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos orgânicos e ácido barbático purificado de Cladia aggregata*. Pernambuco, 62p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciências Biológicas (Bioquímica), Universidade Federal de Pernambuco.

NÓBREGA NA 2002. *Produção de compostos fenólicos por células imobilizadas do líquen Parmotrema andinum (Müll. Arg.) Hale*. Dissertação de Mestrado – Departamento de Ciências Biológicas (Bioquímica), Universidade Federal de Pernambuco.

PEREIRA EC, CAMPOS-TAKAKI GM, XAVIER-FILHO L, SILVA NH, VICENTE C, LEGAZ ME 1991. Fraciation of *Cladonia substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. *Bol. Soc. Brot.* 64: 173-186.

PEREIRA EC, SILVA NH, BRITO ESA, CRUZ J, SILVA MIL 1996. Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos. *Revista da Universidade do Amazonas* 1: 65-77.

PERRY NB, BENN MH, BRENNAN NJ, BURGESS EJ, ELLIS G, GALLOWAY DJ, WORIMMER SD, TANGENEY RS 1999. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenologist* 31: 627-636.

PIOVANO M, GARBARINO JA, GIANNINI FA, CORRECHE ER, FERESIN G, TAPIA A, ZACCHINO S, ENRIZ RD 2002. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química.* 47: 235-240.

RIBEIRO SM, PEREIRA EC, SILVA NH, GUSMÃO NB, HONDA N, QUILHOT W 2002. Detection of antibacterial activity of lichen substances through microdilution tests. *Lichenology in Latin America II*. S. Cavelo & T. Feuere (Eds.) Hamburg, Alemanha, 187-194.

SILVA JO, LEITE JEM, PAULO MQ, XAVIER-FILHO L 1986. Atividade antimicrobiana de líquens brasileiros I. *Boletim da Sociedade Broteriana* 59: 87-96.

SPIELMANN AA 2005. *A Família Parmeliaceae nos barrancos e peraus da encosta da Serra Geral, no Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil*. São Paulo, 204p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Botânica, Secretaria do Estado de São Paulo.

TÜRK AO, YILMAZ M, KIVANÇ M, TURK H 2003. The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Cetraria acuelata* and Its Protolichesterinic Acid Constituent. *Z. Naturforsch.* 58: 850-854.

WALKER JRL, LINTOTT EA 1997. A phytochemical register of New Zealand lichens. *New Zealand Journal of Botany* 35: 369-384.

WALKER TR, CRITTENDEN PD, YOUNG SD 2003. Regional variation in the chemical composition of winter snow pack and terricolous lichens in relation to sources of acid emissions in the USA river basin northeast European Russia. *Environmental Pollution.* 125:401- 412.

Table 01: Content of divaricatic acid (DIV) in organic extracts of *Canoparmelia texana*.

Extracts	RT (min.)	Content (mg/mg)
ER	16.71	0.0173
CR	16.332	0.0126
AcR	16.020	0.0116
Eh	17.238	0.35
Ch	~ 15	0.0006
Ach	~ 14	0.0005

Legend: ER – hot ether; CR – hot chloroform; AcR – hot acetonic; Eh – room temperature ether; Ch – room temperature chloroform; Ach – room temperature acetonic.

Table 02 – Antimicrobial activity of organic extracts and the semi purified divaricatic acid obtained from *Canoparmelia texana* by diffuson disc test (measurement mean of the halo in mm).

Microorganism	Eh	ER	Ch	CR	Ach	AcR	DIV
<i>S. aureus</i> IC 11	13	10	-	9	-	10	14
<i>S. aureus</i> 2	17.5	15	-	14	-	14.25	18
<i>S. aureus</i> 1	25	27	-	25.5	-	26	27.5
<i>B. subtilis</i> 16	13	13.5	-	12.75	-	12,5	14.25
<i>E. coli</i> 224	14.25	13	-	13	-	13.75	15
<i>S. sonnei</i> 413	14.75	12.35	-	14.5	-	14.75	15

Legend: ER – hot ether; CR – hot chloroform; AcR – hot acetonic; Eh – room temperature ether; Ch – room temperature chloroform; Ach – room temperature acetonic.

Table 03 – Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of organic extracts and semi purified divaricatic acid of *Canoparmelia texana*.

Microorganism	Eh	ER	CR	AcR	DIV
<i>S. aureus</i> IC 11	125	62.5	125	125	62.5
<i>S. aureus</i> 2	31.25	62.5	250	250	31.25
<i>S. aureus</i> 1	125	62.5	250	250	31.25
<i>B. subtilis</i> 16	15.625	15.625	62.5	31.25	15.625
<i>E. coli</i> 224	125	62,5	125	250	31.25
<i>S. sonnei</i> 413	31.25	15.625	31.25	62.5	15.625

Legend: ER – hot ether; CR – hot chloroform; AcR – hot acetonic; Eh – room temperature ether; Ch – room temperature chloroform; Ach – room temperature acetonic.

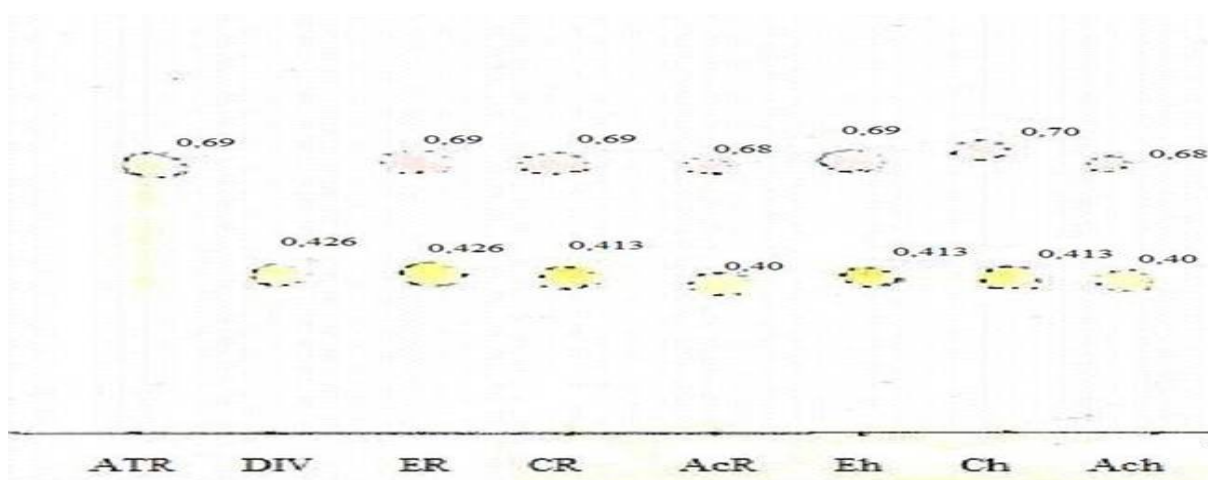


Figure 01: Thin layer chromatogram of organic extracts of *Canoparmelia texana*. Captions: ATR – atranorin; DIV – semi purified divaricatic acid; ER – diethyl ether extract obtained at room temperature; CR – chloroform extract obtained at room temperature; AcR – acetone extract obtained at room temperature; Eh – diethyl ether extract obtained in hot condition; Ch – chloroform extract obtained at hot condition; Ach – acetone extract obtained at hot condition.

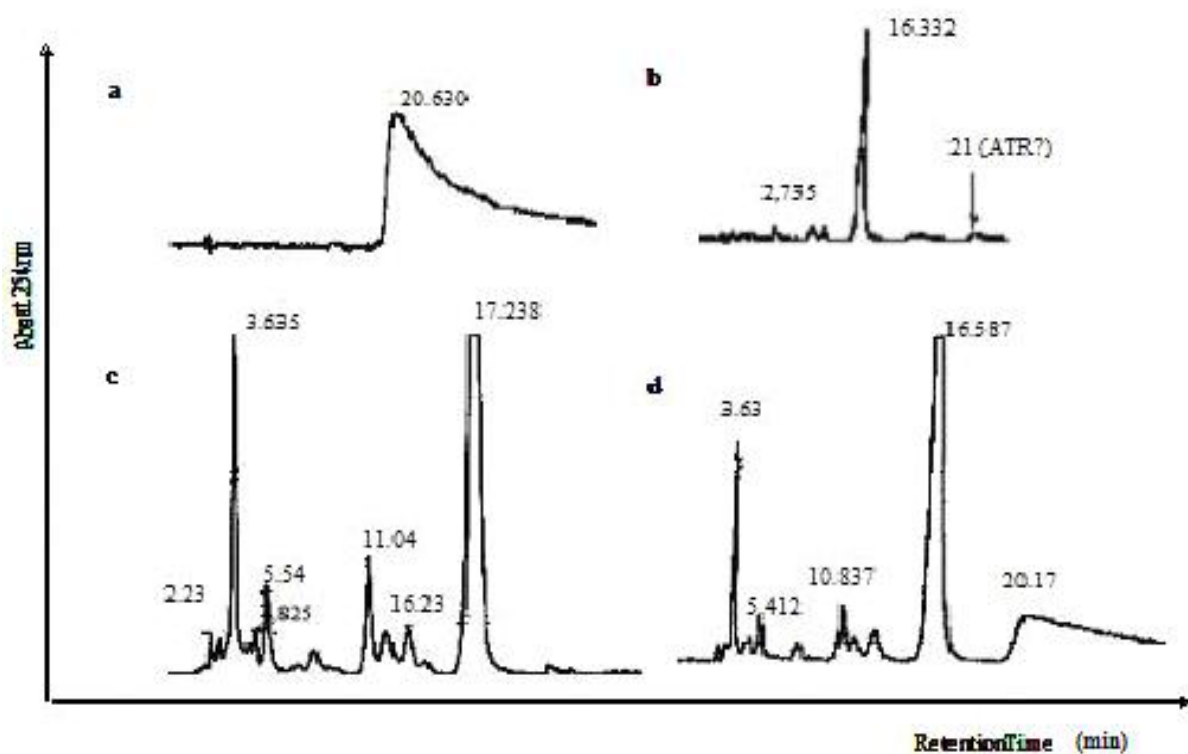


Figure 02 – High performance liquid chromatograms of atranorin (a); acetone extract of *Canoparmelia texana* obtained at room temperature (b); diethyl ether extract of *C. texana* obtained in hot condition (c); the same diethyl ether extract added to 1 mg of ATR (d).



Figure 03: Antimicrobial activity of diethyl ether extract of *Canoparmelia texana* obtained at hot conditions - Eh (over) and at room temperature - ER (below), against *S. aureus* (UFPEDA-01).



Figure 04: Antimicrobial activity of chloroform extract of *Canoparmelia texana*, obtained in hot conditions – CR (below), against *S. aureus* (UFPEDA-01).

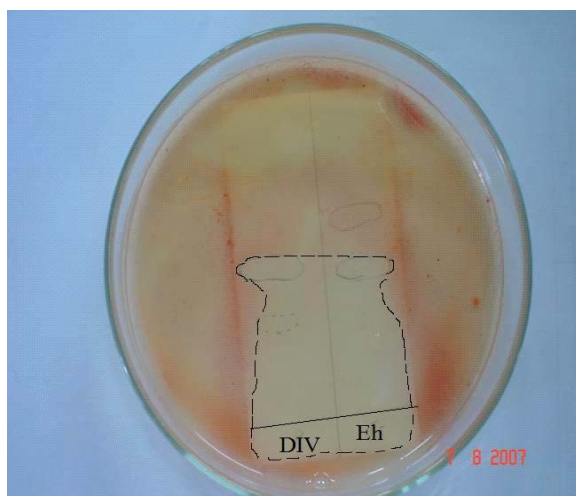


Figure 05: Biochromatography of diethyl ether extract, obtained in hot conditions (Eh) and semipurified divaricatic acid (DIV) of *Canoparmelia texana*, against *S. aureus* 1. Dotted lines indicates area without *S. aureus* growth.

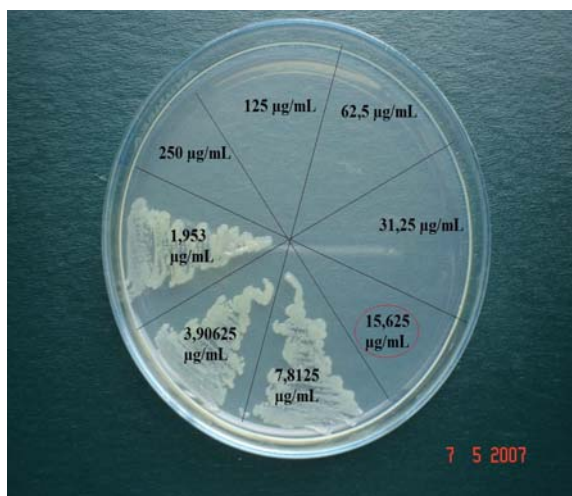


Figure 06: MIB of semi purified DIV of *Canoparmelia texana* against the lineage of *B. subtilis* (UFPEDA-16) ($15,625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

8. ANEXOS

8.1 Cromatografias Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

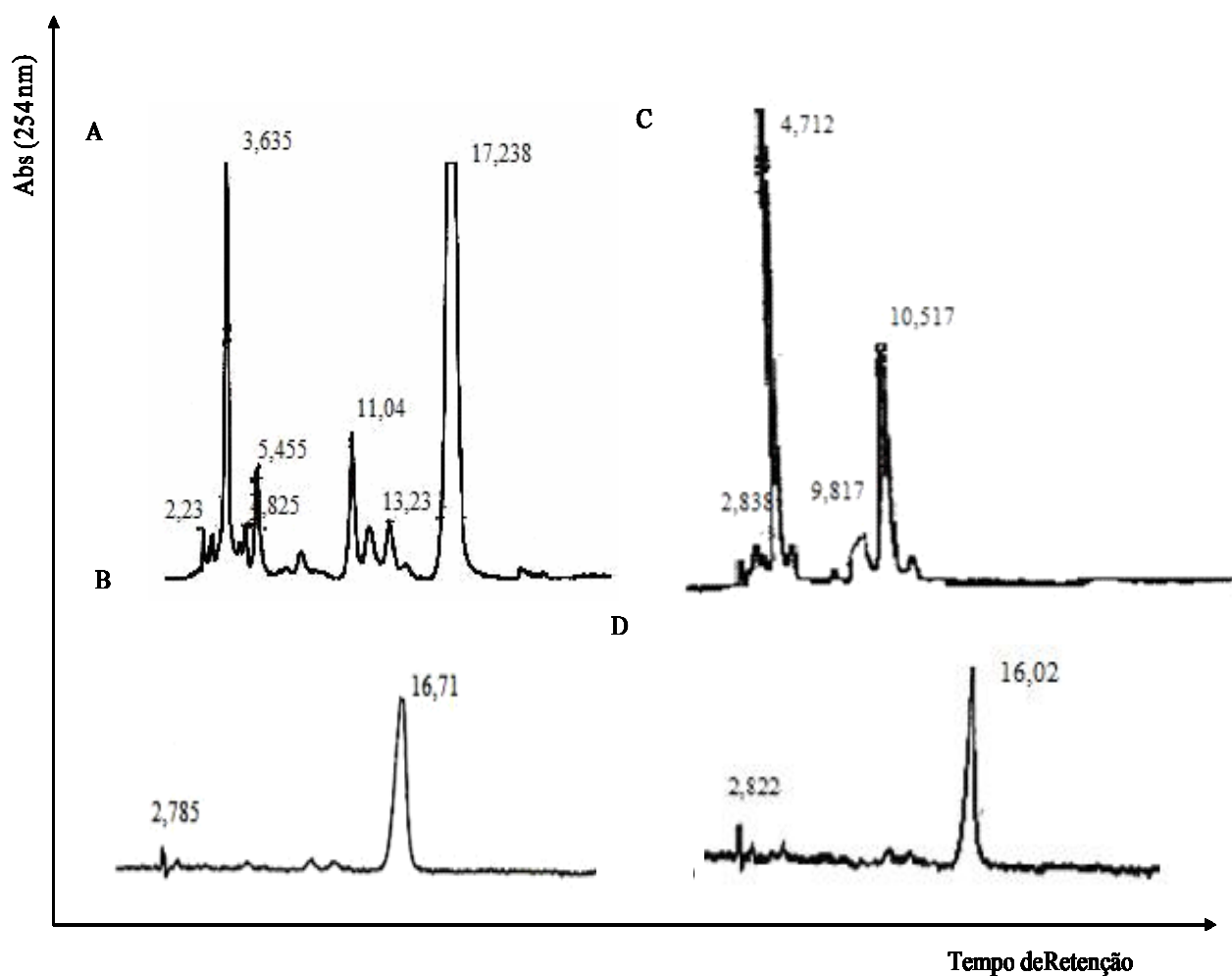


Figura 1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato etéreo obtido a quente (A) e a temperatura ambiente (B) em metanol a 1mg.mL^{-1} , e do extrato clorofórmio obtidos a quente (C) e a temperatura ambiente em metanol a 1mg.mL^{-1} (D).

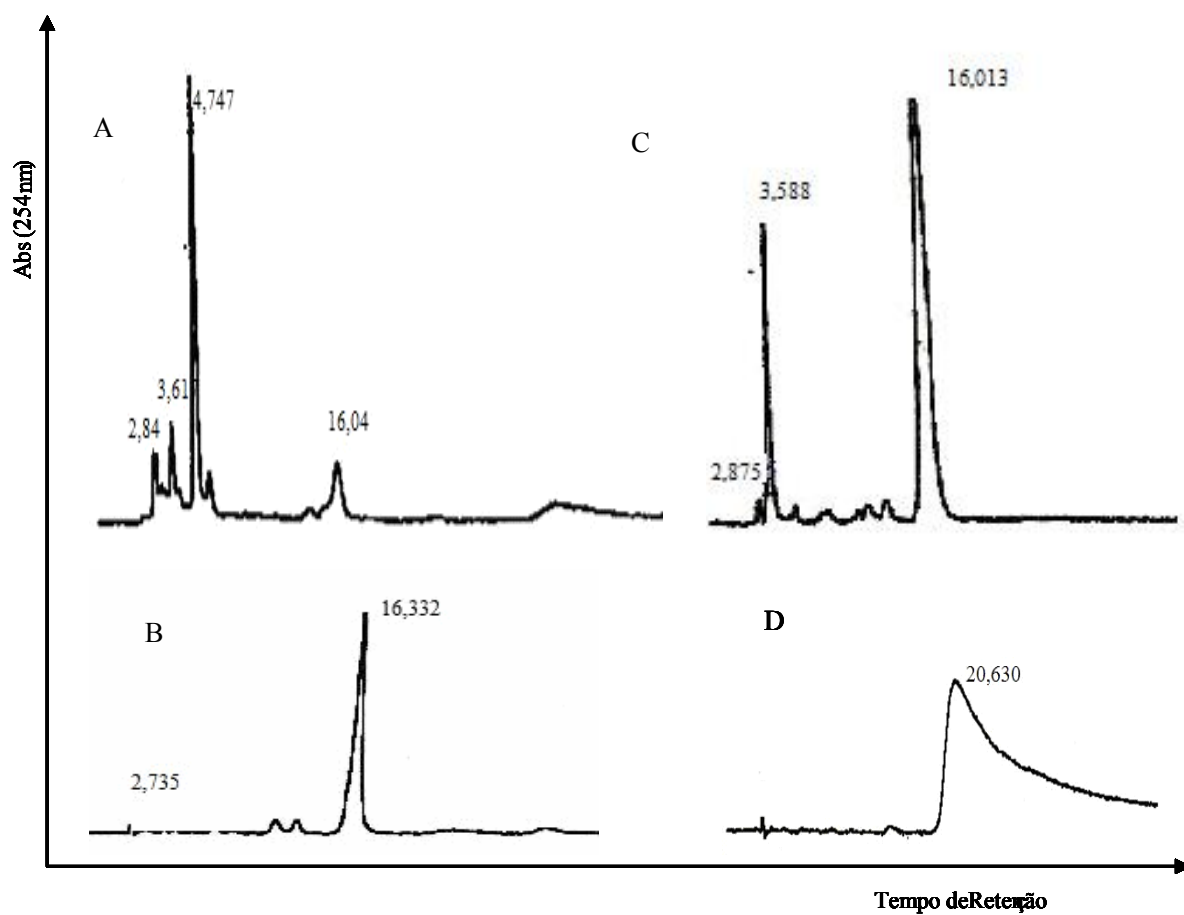


Figura 2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato acetona obtido a quente (A) e a temperatura ambiente (B) em metanol a 1mg/mL, e do ácido divaricático (DIV) semi-purificado (C) em metanol a 0,1mg/mL, e do padrão atranorina (D) em metanol a 0,1mg/mL.

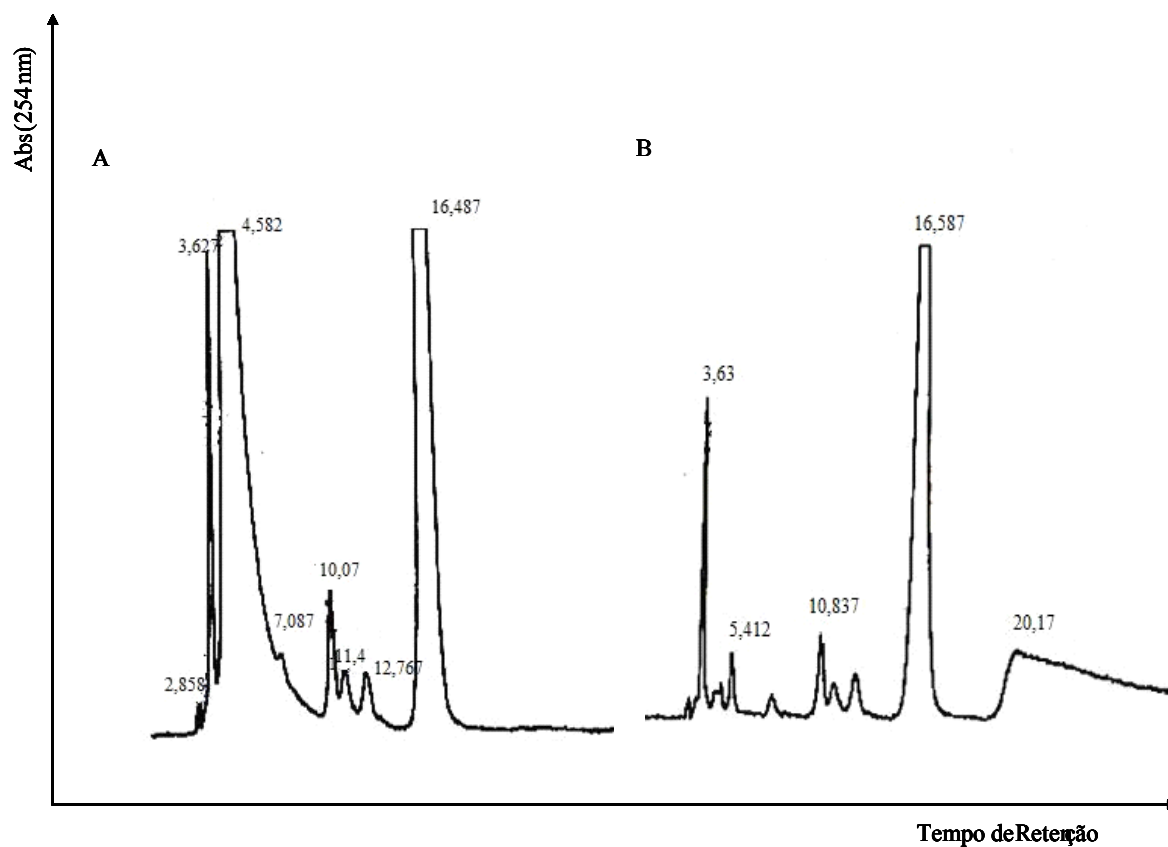
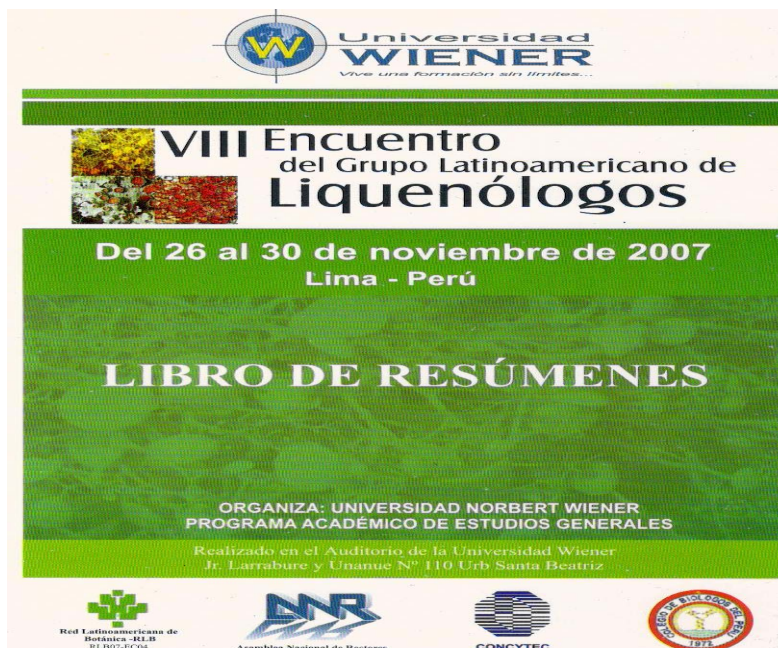


Figura 3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato etéreo obtido a quente adicionado a 0,5 mg.mL⁻¹ (A) e 1 mg.mL⁻¹ de atranorina (B).

8.2 Resumos publicados em anais de congressos

8.2.1 Trabalho publicado no VIII Encontro do Grupo Latino Americano de Liqueenólogos (GLAL), Lima – Perú – Novembro, 2007.



5. ESTUDO QUÍMICO E DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DA *Canoparmelia texana* (TUCK.) ELIX y HALE

¹Moura, C.; ⁴Eliasaro, S.; ²Pereira, E.; ¹Silva, N. y ³Gusmão, N.
Depto. de Bioquímica¹, de ²Ciências Geográficas, de ³Antibióticos, CCB/ Universidade Federal de Pernambuco. Depto. de ⁴Botânica, Universidade Federal do Paraná, Brasil.
eugenia.pereira@pq.cnpq.br; eliasaro@ufpr.br; nhsilva@uol.com.br

A emergência de novas doenças infecciosas, o ressurgimento de infecções que pareciam antes controladas e, o aumento da resistência bacteriana têm influenciado novos estudos de desenvolvimento de antimicrobianos. Desde épocas antigas alguns extratos de líquens eram utilizados na terapêutica, e metabólitos secundários exibem atividades em particular, contra bactérias. Neste sentido, este trabalho objetivou verificar e avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos orgânicos da *Canoparmelia texana*, e o seu composto principal o ácido divaricático, frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.

Os extratos orgânicos foram obtidos a partir do talo líquênico *in natura*. O ácido divaricático foi purificado a partir do extrato etéreo a quente. A seleção dos extratos ativos foi realizada através do teste de difusão discos de papel e os resultados avaliados de acordo com o tamanho dos halos formados, sendo os microrganismos mais sensíveis submetidos a ensaios de Biocromatografia. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada através do método de microdiluição, e os extratos orgânicos e o ácido divaricático foram submetidos à Cromatografia de Camada Delgada (CCD).

Os resultados demonstraram atividade antimicrobiana do ácido divaricático e dos extratos etéreos obtidos a quente e à temperatura ambiente, e do clorofórmio e do acetônico apenas extraídos à temperatura ambiente, frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e nenhuma atividade frente a espécies diferentes de *Candida*. A bactéria mais sensível foi a *Staphylococcus aureus*. A CIM detectada foi de 250 a 15,625 µg/mL, valor inferior a outras substâncias líquênicas. Através da CCD pode-se observar a presença do ácido divaricático e da atranorina nas amostras de *C. texana* estudadas.

O biocromatograma revelou o ácido divaricático como princípio ativo da espécie, podendo a ele se atribuir a eficiência contra microrganismos patógenos testados.

Palabras clave: Atranorina, ácido divaricático, *Canoparmelia texana*, atividade antimicrobiana.

Fuente de financiamiento: Cnpq

8.3 Normas para a publicação do artigo na Brazilian Journal of Pharmacognosy

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Form and preparation of manuscripts

Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy) is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews and divulgation in the field of Pharmacognosy ("The study of biologically active natural products").

Original Articles (in Portuguese, English or Spanish): it refers to unpublished research works. They must follow the usual presentation form, containing Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, etc, according to the peculiarities of each work.

Review Articles (in Portuguese, English or Spanish): they are directed to the presentation of the progress in a specific area of Pharmacognosy, containing a critical view, with the main objective of benefiting the group formed by post graduating students and non-specialists in the area. The RBFAR Editors can, fortuitously, invite qualified researchers to submit review article. It is desirable that the author has publications in the refereed area.

Divulgation Articles (in Portuguese, English or Spanish): presentation of some aspect or area of Pharmacognosy, written down in a didactic way, with the objective of benefiting the group formed by graduating and post graduating students, non-specialists in the area, pharmacists and professors of alike areas.

1. GENERAL RULES

1.1 All submitted manuscripts must be unpublished. The simultaneous publication of manuscripts describing the same work in different journals is not acceptable. The rights of publication are of **Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy**, including translations; subsequent publications are allowed since the source is cited.

1.2 The **Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy** receives for publication original scientific work, reviews and divulgation articles written in Portuguese, Spanish or English. The content of the works is of entire responsibility of the author(s), and does not necessarily reflect the opinion of the Editor-in-Chief nor of the Editorial Board members.

1.3 The **Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy** will submit all received manuscripts to ad hoc referees, whose names will be kept confidential and who will have the authority to decide on the pertinence for acceptance, and they can even send the manuscripts back to the author(s) with suggestions so that necessary alterations are done and/or the manuscripts fit in the editorial rules of the journal.

1.4 Every idea and conclusion presented in the published works are of total responsibility of the author(s), and do not necessarily reflect the opinion of the Editor-in-Chief nor of the members of the Editorial Board.

1.5 Every article involving studies with human beings or animals might have the Opinion of the Ethics Committees on Research on Human Beings or on Animals of the institutions to which the author(s) belong, authorizing such studies.

1.6 All plant material used in the described research must have the indication of its site (including GPS coordinates, if it is possible), the origin country, the name of the person responsible for the identification of the plant material and the location of the voucher specimen. Authors might be prepared to provide documentary evidence that the approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection.

2. RULES FOR THE ELABORATION OF THE CONTRIBUTIONS

2.1 The author(s) should retain a copy (electronic and printed) of the submitted manuscript, in the event of loss or damage of the original sent to the journal.

2.2 The figures (photographs, charts, drawings, etc.) should be presented in separate pages and consecutively numbered in Arabic numerals. The respective captions should be clear, concise, without abbreviations, and located below the figures. Their respective position in the text must be indicated preferentially just after their citation in the body of the manuscript. In the case of photographs or hand-made drawings, they might be sent in separate envelopes, in a perfect state and identified overleaf, by pen.

2.3 Tables and charts must be presented on separate sheets and consecutively numbered using Arabic numerals. The tables (numeric data) can not be closed by side lines. The respective captions should be clear, concise, without abbreviations and located above the tables. There should be an indication of the approximate position in the text where tables and charts should be placed, preferentially, just after their citation in the body of the manuscript.

3. TEXT FORMATTING AND CONTENTS OF THE WORK

3.1 The originals must be written down and typed on A4 or letter size paper, double spaced using Times New Roman font, font size 12, fully justified, and with margins of 2 cm in each one of the four sides. They should have a maximum of 15 and a minimum of 5 pages including figures, tables and charts.

3.2 Title and subtitle: They should be in accordance with the contents of the article, considering the scope and objectives of the Journal. They should be written in lower case, boldface, using Times New Roman font, font size 14. For the works written in Portuguese or Spanish, the English version of the title, which will accompany the Abstract, must case, boldface, using Times New Roman font, font size 14. For the works written in Portuguese or Spanish, the English version of the title, which will accompany the Abstract, must be provided.

3.3 Authors: The authors' names must appear below the title, centered. The first and last names must appear in the correct order, being obligatory that the former (name) and the latter (last name) appear in full (i.e. Carlos N.U. Silva or Carlos N. Ubiratan Silva). In the case of several authors, their names should be separated by commas.

3.4 Authors' affiliation: After each author name there should be a superscript Arabic numeral indicating the institution to which they are affiliated and it must appear immediately

below the list of authors, centered and with complete addresses, including the ZIP CODE of the city. The name of the main author should be identified with a superscript asterisk, to which all correspondence might be sent. The electronic address, telephone, and fax of the main author will appear as a footnote at the first page.

3.5 Abstract in Portuguese: It must present the work in a concise way, highlighting the most important information, exposing the methodology, the results, and the conclusions. This will allow the readers to evaluate their interest in the article and thus avoid having to read the full work. The Abstract must be highlighted as a topic of the work (maximum 200 words).

3.6 Keywords: They must identify/represent the content of the article. Observe the maximum limit of 6 (six) keywords. The latter are very important for data base searches, with the objective of locating and valorizing the article. The keywords must be separated by commas.

3.7 Abstract: The works written in the Portuguese and Spanish languages must be accompanied by the English version of the abstract. Literal translations must be avoided. When there is no dominion of this idiom, qualified people must be consulted. The Abstract must be headed by the English version of the title.

3.8 Keywords: Keywords in English. They must have a maximum number of 6 (six) and be separated by commas.

3.9 Introduction: The Introduction should clearly establish the objective of the work and its relationship with other works in the same field. Extensive literature reviews should be replaced by references to more recent publications, where these reviews have been published and are available.

3.10 Material and methods: The description of the used material and methods must be brief, but sufficiently clear to make the comprehension and the reproducibility of the work possible. Processes and techniques already published, unless they have been extensively modified, should be referenced.

3.11 Results: They must be presented with minimum discussion or personal interpretation, and whenever possible, be accompanied by adequate tables and figures. The data, when pertinent, should be submitted to statistical analysis.

3.12 Discussion: It must be restricted to the significance of the obtained data and to the achieved results, avoiding conclusions that are not based on them. Alternatively, Results and Discussion could be presented in only one section.

3.13 Acknowledgements: This is an optional item and should appear before the Bibliographic References.

4. REFERENCES

The formatting of the references must be standardized according to the requirements of the journal as outlined:

4.1 References inside the text:

- At the beginning of the citation: author in lower case, followed by the year between parenthesis. E.g. Pereira (1999).
- In the end of the citation: author in lower case and year - both between parenthesis. E.g. (Silva, 1999) or (Silva; Souza, 1998) or (Silva; Souza; Dias, 2000) or (Silva et al., 1999) or (Silva et al., 1995a,b).
- Textual citation: provide also the page. E.g. (Silva, 1999, p.24)

4.2 The Bibliographic References will be presented in alphabetical order by the last name of the first author, in lower case in ascending order of the publication date. Consider the following possibilities:

4.2.1 Journal:

The italics abbreviated title of the periodical defined in the Chemical Abstracts Service Source Index must be used (see <http://www.cas.org/sent.html>). In the case of the authorized abbreviation of a certain periodical cannot be located and it is not obvious, the title must be complete cited.

- Vargas TOH 1996. Fatores climáticos responsáveis pela morte de borboletas na região sul do Brasil. *Rev Bras Assoc Entomol* 11: 100-105.

In the case of the cited journal can not be easily accessible, it is recommended to present its Chemical Abstract number, as follows:

- Qu W, Li J, Wang M 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22: 203-206, apud Chemical Abstracts 116: 124855r.

In a citation in a citation, the sources must be shown in italics.

- Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23: 588-593, 1978.

4.2.2 Book:

- Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Book chapter:

- Farias CRM, Ourinho EP 1999. Restauração dentária. In: Goldaman, G.T. (org.) *A nova odontologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.95-112.

4.2.4 Thesis and Dissertation:

- Lima N 1991. *Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem*. Campinas, 755p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

- Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Produtos naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Congresses:

- Thomas G, Selak M, Henson PM 1996. Estudo da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* em neutrófilos humanos. *XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Florianópolis, Brasil.

4.2.6 Patents:

They must be identified as indicated below, and whenever possible the Chemical Abstracts number must be informed.

- Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396*, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

4.2.7 Internet Pages:

- <http://www.mobot.org/>, accessed on May 2006.

5. COSTS

The Journal will entirely cover the costs of publication of papers of up to 15 pages, including tables and figures. Above this number of pages, the expenses will be charged by the author(s). Colored pictures will not be published in the printed version because it is financially very expensive, unless the author(s) covers the extra expenses for their publication, independently of the number of pages of the article. Nevertheless, when a work has colored picture(s) two files will be produced, one to black-and-white printing (Graphic) and a colored one to the Web which will be available on Scielo Home Page and on the journal site.

Submission of manuscripts

The manuscripts must be sent, initially, as three printed copies using the Word for Windows program. After the acceptance of the article, and after the necessary corrections, a CD with the electronic file and a printed copy of the manuscript must be sent. All correspondence must be addressed to the Editor-in-Chief of the journal, according to the address below:

Revista Brasileira de Farmacognosia

Prof. José Maria Barbosa Filho - Editor Chefe
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
Universidade Federal da Paraíba
Caixa Postal 5072
58051-970, João Pessoa - PB - Brasil

On the submitting of the manuscripts, it is required the indication of five (5) potential referees, from other institutions, with their mail and electronic addresses. The qualification of the manuscript will be certified by at least two referees indicated by the Editorial Board.

Moura, Maria Catarina Gomes Gadêlha de
Atividade antimicrobiana de compostos de *Canoparmelia texana* (Tuck.)
Elix & Hale (Líquén) / Maria Catarina Gomes Gadêlha de Moura . – Recife: O
Autor, 2007.

52 folhas : il., fig. tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB.
Bioquímica, 2008.

Inclui bibliografia.

1. *Canoparmelia texana* - atividade antimicrobiana–2 Líquens I. Título.

615.33
615.329

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCB – 2008- 055