

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO LÍQUEN *Ramalina  
usnea* L.**

**AMANDA DE BRITO NUNES**

.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas como  
requisito para a Disciplina Eletiva do Curso de  
Licenciatura em Ciências Biológicas”

Área de Concentração: Microbiologia e Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO – PE  
-2015-**

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

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Nunes, Amanda de Brito.  
Avaliação da atividade antibacteriana do líquen *Ramalina usnea* L./  
Amanda de Brito Nunes – Vitória de Santo Antão, 2015.  
31págs.  
Orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão  
Trabalho de Conclusão de Curso, Licenciatura em Ciências Biológicas –  
Centro Acadêmico de Vitória – CAV / Universidade Federal de Pernambuco -  
UFPE

1. Licenciatura em Ciências Biológicas. 2. Centro Acadêmico de  
Vitória.  
I. Avaliação da atividade antimicrobiana do líquen *Ramalina usnea*  
L.

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO – PE**

**-2015-**

AMANDA DE BRITO NUNES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO LÍQUEN *Ramalina*  
*usnea* L.**

APROVADO EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

AVALIADORES:

---

Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão  
Universidade Federal de Pernambuco  
Centro Acadêmico de Vitória

---

Msc. Tamiris Alves Rocha  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Idjane Santana de Oliveira  
Universidade Federal de Pernambuco  
Centro Acadêmico de Vitória

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO – PE**

**-2015-**

## Resumo

Os líquens são organismos simbióticos formados por fungos e algas unicelulares. São produtores de importantes metabólitos secundários. Diversos destes compostos são descritos por suas atividades biológicas, o que faz com que sejam objeto de intenso estudo. Os metabólitos secundários liquênicos correspondem a compostos notáveis e em sua grande maioria de natureza fenólica. Esse trabalho descreve a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos orgânicos do líquen *Ramalina usnea*. A extração dos metabólitos secundários foi feita por esgotamento a frio, seguindo a série eluotrópica dos solventes: éter dietílico, clorofórmio e acetona. A análise dos fenóis foi feita a partir de cromatografia em camada delgada (CCD). Os testes antibacterianos foram realizados tanto em bactérias gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC-3), *Streptococcus pyogenes* (Cepa clínica-13), *Kocuria rhizophila* (ATCC-8), *Staphylococcus aureus* (ATCC-17) quanto em gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC-01), *Shigella flexneri* (ATCC-4), *Salmonella typhimurium* (ATCC-14), *Enterobacter cloacae* (ATCC-18). Os testes utilizados foram os de difusão em Agar com discos de papel (em duplicata) e teste de poço. Os resultados mostraram a presença de ácido úsnico nos extratos. Os resultados dos ensaios antimicrobianos foram considerados satisfatórios sendo verificado que o extrato mais ativo foi o etéreo frente os microrganismos *Enterococcus faecalis* (28 cm) e *Kocuria rhizophila* (22 cm) todos os extratos foram inativos frente a bactérias gram-negativas.

Palavras-chave: Líquens. Fenóis Liquênicos. Compostos Antibacterianos.

## Abstract

The lichens are simbiotic organisms formed by fungi and unicellular bacterial. They produce important secondary metabolites. Several of these compounds are well described by its biological activities, this make them an object of intense studies. These metabolites are notable compounds. Its chemical nature is phenolic. This work describes the antibacterial activity of the organic extracts of the lichen *Ramalina usnea* L. The extraction of the secondary metabolites were made by the cold extraction method following the eluotropic solvents series diethyl ether, chloroform, acetone. The phenolic evaluation were done in thin layer chromatography (TLC). The antibacterial assays were realized in gram – negative as well as gram – positive bacteria: *Enterococcus faecalis* (ATCC-3), *Streptococcus pyogenes* (clinical-13 strain), *Kocuria rhizophila* (ATCC-8), *Staphylococcus aureus* (ATCC 17) as in gram-negative bacteria: *Escherichia coli* (ATCC 01), *Shigella flexneri* (ATCC-4), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14) *Enterobacter cloacae* (ATCC 18). The methodology used were the solid agar diffusion with paper discs (duplicate) and the well diffusion test. The results showed the presence of the usnic acid in the extracts. The antibacterial results were considered satisfactory were verified that the most active extract were o the diethilic ether against the microorganisms *Enterococcus faecalis* (28 cm) and *Kocuria Rhizophila* (22 cm). Al the extracts were not active against gram - negative bacteria.

Keywords: Lichens. Lichenic phenolic. Antibacterial compounds.

## Lista de Figuras

- Figura 1** – Estrutura Química do ácido úsnico. 13
- Figura 2** - Fungo liquenizado *Ramalina usnea* L. 16
- Figura 3** – Cromatografia em camada delgada, onde a letra E representa o extrato etéreo, C o Clorofórmico, A o Acetônico e U é o padrão de ácido úsnico com os seus RFs. 19
- Figura 4** – Halos de inibição do extrato do líquen *Ramalina usnea* L. frente à *Kocuria rhizophila* no teste em poço. Onde C representa o clorafenicol, E.A extrato acetônico, E.C Extrato clorofórmico e E.E extrato etéreo. 21
- Figura 5** – Halos de inibição dos extratos orgânicos do líquen *Ramalina usnea* frente a *Enterococcus faecalis* pelo teste do disco. Onde C representa clorafenicol, E.A extrato acetônico, E.C extrato clorofórmico e E.E extrato etéreo. 23
- Figura 6** – Estrutura Química do ácido Salazínico. 23

## SUMÁRIO

|                                                            | Páginas   |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                       | <b>08</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                            | <b>10</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                        | <b>15</b> |
| 3.1 Objetivo Geral                                         | 15        |
| 3.1 Objetivos Específicos                                  | 15        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                              | <b>16</b> |
| 4.1 Coleta do material liquênico                           | 16        |
| 4.2 Obtenção dos extratos                                  | 16        |
| 4.3 Análise dos fenóis liquênicos                          | 17        |
| 4.4 Testes antibacterianos                                 | 17        |
| 4.4.1 Método de difusão em meio sólido com discos de papel | 18        |
| 4.4.2 Método de difusão em poço                            | 18        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                           | <b>19</b> |
| 5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)                  | 19        |
| 5.2 Ensaio de Atividade Antibacteriana                     | 19        |
| 5.2.1 Método difusão em meio sólido                        | 19        |
| 5.2.2 Método de difusão em poço                            | 21        |
| <b>6. CONCLUSÕES</b>                                       | <b>24</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                       | <b>25</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo Harksworth & Hill (1984) líquens são organismos simbiontes formados pela associação de um fungo (micobionte) e um ser fotossintetizante (fotobionte), que pode ser uma alga ou cianobactéria que dão origem a um talo. São organismos produtores de importante metabólitos secundários amplamente descritos na literatura por suas propriedades biológicas, citando-se antinoceptiva (Maia et al. 2002), antitumoral e antimicrobiana (Falcão et al. 2002), antiedematogênica (Pereira et al. 2010), Antiviral (Esimone et al. 2007), entre outras.

A produção de tais compostos varia em função de diversos fatores como a sazonalidade (Pereira 1989), temperatura, umidade e luminosidade (RIBEIRO *et al.*, 2006). Os fatores que podem interferir nessas proporções de síntese são: temperatura, umidade e luminosidade. (HALE, 1983).

Burkholder e colaboradores (1944) foram os pioneiros no estudo da atividade antimicrobiana de substâncias líquênicas. Em 1965 Burkholder et al. avaliaram a atividade antimicrobiana de líquens sobre *Bacillus subtilis*, *Sarcinea lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*. Além destes, diversos outros pesquisadores têm relatado a atividade antimicrobiana de compostos líquênicos.

Esimone e Adikwu (2002) publicaram resultados relevantes em relação às atividades antibacteriana, frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* de *Ramalina farinacea*.

Em 2004, Falcão et al. Publicaram artigo relatando a atividade antibacteriana de extratos de *Ramalina sorediosa*. Os autores atribuíram o efeito observado à presença do ácido úsnico. a estudar as substâncias líquênicas, e desde esse acontecimento, algumas substâncias foram descobertas e utilizadas no controle principalmente de bactérias gram-positivas.

Antibióticos, por definição, são compostos capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento de microrganismos. Fármacos com atividade antimicrobiana são extremamente relevantes na saúde humana. O desenvolvimento de tais moléculas é, sem dúvida, um marco na história científica humana. Desde o descobrimento da penicilina por Fleming, inúmeras vidas foram salvas. Entretanto os antibióticos estão entre os fármacos mais indiscriminadamente prescritos. Uma vez que os microrganismos têm a capacidade de se adaptar uma consequência inevitável é a seleção de microrganismos mais resistentes (Katzung, 2005). Tal fenômeno é chamado de resistência.

Atualmente observa-se um ressurgimento de diversas infecções graves que pensava-se estarem controladas, é o caso da tuberculose. Em adição a isto o surgimento, na década de

1980, da Síndrome da imunodeficiência adquirida - AIDS tem trazido a tona diversas doenças oportunistas que efetivamente são um desafio a médicos, quando tratam um indivíduo imunocomprometido.

Isto posto observa-se a importância da busca por novos compostos com potencial atividade antimicrobiana, em que se destacam os líquens e seus notáveis metabólitos secundários.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## Líquens e seus compostos

Líquens são organismos formados por uma associação simbiótica entre dois organismos: Um fungo (micobionte) e uma alga (fotobionte), onde os membros fotossintetizantes transferem compostos carbônicos ricos em energia e os simbiontes fúngicos propiciam abrigo contra variações ambientais. (RAVEN, et al., 1996). GOWARD et al (1994) e Marcelli (2006), propuseram uma brilhante definição; “Líquens são fungos que cultivam fotobiontes nas hifas do seu micélio.

Uma das principais estratégias adaptativas dos líquens é a capacidade de troca rápida e ativa para um estado de inatividade metabólica quando as condições ambientais encontram-se desfavoráveis (LÓPES, 2006).

Geralmente se estruturam em forma de talo, o que os faz parecer com plantas. Estes possuem várias formas, tamanhos e cores. (DEPRIEST, 2004).

No talo, o tecido periférico é resistente e chamado de córtex (Figura 4), que protege o fotobionte do ressecamento, enquanto o mais interno tem um tecido mais frouxo para facilitar as tocas gasosas (AHMADJIAN, 1993).

Existem quatro tipos de talos que podem ser encontrados: o filamentosos, folioso, crustoso, e fruticosos, e estes variam muito entre eles, obtendo desde morfologias e anatomias simples até as mais complexas, que podem medir entre 1 a 30 cm, o que é mais comum, mas também os que medem poucos milímetros ou os que ultrapassam os quatro metros de comprimento.

Não é um grupo considerado uma unidade taxonômica, e sim um grupo biológico com um modo de nutrição compartilhada, possuindo características ímpares, o que os torna complexos (RAVEN, et al., 1996). Sendo um grande desafio organizar fungos e algas liquenizadas e ao mesmo tempo os organismos não liquenizados (DEPRIEST, 2004). Mas o código de nomenclatura botânica definiu que o nome do líquen deve referir-se sempre ao organismo micobionte e o fotobionte deverá ter a taxonomia própria dentro do grupo das algas (PURVIS, 2000). Pois o fungo é considerado dominante (DEPRIEST, 2004).

Estas substâncias químicas são separadas de acordo com a sua disposição no talo em produtos intracelulares (primários) e extracelulares (secundários). Os metabólitos primários são: aminoácidos e proteínas, carboidratos, carotenoides e vitaminas. Como o talo é uma região composta tanto por fungo quanto alga, estas mesmas substâncias são produzidas por ambos, sendo com frequência solúveis em água e extraídas em água quente (HALE, 1983; HONDAS & VILEGAS, 1998).

Polissacarídeos são os carboidratos de alta massa molar, sendo as mais frequentemente usadas por líquens as  $\alpha$  - glucanas e  $\beta$  - glucanas (lineares ou com poucas substituições), galactomananas e galactoglucomananas (GORIN et al., 1993).

Os metabólitos secundários estão localizados na medula ou córtex do talo, nunca nas duas regiões. Elas possuem uma coloração assim como a maioria das antraquinonas, que se derivam de ácido pulvínico e ácido úsnico (NASHIII, 1996), há também as desprovidas de cor como liquenxotana (SMITH, 1987) e atranorina (HAWKSWORTH, 1984). São produzidos exclusivamente pelos fungos, a partir dos carboidratos provenientes da fotossíntese, sendo eliminados na superfície das hifas, tanto em cristais quanto formas amorfas. Estes possuem um peso molecular relativamente baixo e usualmente são insolúveis em água.

Os líquens têm sido considerados as entidades mais estudadas em relação a metabólitos secundários afinal já são cerca de 700 encontrados (MARCELLI, 2006). Devido à especificidade de ocorrência encontrada entre os organismos, eles têm sido utilizados até mesmo para fins taxonômicos (HONDAS e VILEGAS, 1999).

A preferência por habitats e exigências ecológicas são muito frequentes nos líquens. Isso fará com que seja definida a população que irá se desenvolver, pois propriedades físicas e químicas como o Ph do substrato são importantes para essa determinação (PURVIS, 2000).

As espécies que possuem como organismo fotobionte as cianobactérias também possuem a capacidade de fixar o nitrogênio no solo (PURVIS, 2000).

Também são reconhecidos como bioindicadores de poluição (SAIKI et al., 2007). Pois possuem a habilidade de absorver e acumular metais pesados (HONDAS e VILEGAS, 1998).

Possuem uma gama de atividades biológicas, porém muitas vezes têm sido negligenciados por micólogos, e sido bastante usados em indústrias farmacêuticas, pois o seu cultivo não é de fácil reprodução. (BEHERA et al., 2004).

As mais numerosas classes de metabólitos secundários dos líquens são dipsídeos e dipsidonas. Os dipsídeos possuem de 2-4 resíduos de ácido hidroxibenzóico ligadas por grupos éster e estes vem sendo relatados na literatura como elementos antioxidantes a partir de várias espécies de líquens. Porém foi verificado que os dipsidones são melhores antioxidantes que os dipsídeos, isso deve estar ligado à maior incorporação microdomínio lipídicos (HIDALGO et al., 1994).

Há muito tempo vêm sendo utilizados na medicina popular no tratamento de tuberculose pulmonar, como é o caso da *Cetraria islandica*, *Pulmonaria lobaria* e *Cladonia spores*. (VARTIA, 1973). *C. islandica* ainda é utilizada no tratamento de hemorroidas, bronquite, disenteria e tuberculose. (DÜLGER et al., 1998). Na medicina chinesa e tibetana,

*Lethariella cashmeriana* e *L. sernanderi* são muito usadas no preparo de chás para fins medicinais, baixando a pressão arterial e reduzindo inflamações (LEGAZ *et al.*, 2006).

São utilizados na indústria de bebidas alcoólicas, substituindo o lúpulo da cerveja. Porém, pouco utilizados na alimentação humana devido o baixo teor proteico, escassa biomassa e sabor ligeiramente amargo (LEGAZ *et al.*, 2006). Porém, *Cetraria islandica* uma espécie liquênica, é usada na fabricação de uma farinha que é comumente utilizada no preparo de migau, os japoneses usam a *Gyrophora esculenta* no preparo do “iwatake” e *Lecanora esculenta* no maná que alimenta animais e o próprio homem nas estepes semi-áridas (GORIN *et al.*, 1993).

Devido às cores que variam do branco ao negro, já foram muito utilizados como corantes (RAVEN, *et al.*, 1996) e nos últimos dez anos estão sendo usados na indústria de cosméticos, como na confecção de protetor solar (LEGAZ *et al.*, 2006).

Como o surgimento da penicilina criou falsas esperanças de que o controle das infecções causadas por bactérias finalmente havia chegado (LÁZARO & OTEO, 2006). Houve aumento no interesse por pesquisas que buscassem a descoberta de novos compostos com propriedades antimicrobianas.

### **Atividade Antibacteriana**

A descoberta da penicilina, antibiótico de origem fúngica, fez com que os líquens passassem (Fungos liquenizados) a ser alvo de estudos direcionados a descoberta de novos antibióticos de origem natural (VARTIA, 1973). Porém, antes mesmo do surgimento dos antibióticos, os líquens já eram usados como elemento antimicrobiano, sendo parte dos primeiros cuidados para com a saúde em países como Argentina, Etiópia e China. (AKINYEMI *et al.*, 2005).

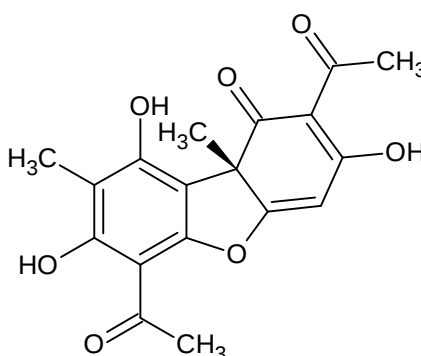
Os produtos de origem natural, sendo eles puros ou extratos padronizados são uma fonte ilimitada de probabilidade de criação de novos fármacos devido a diversidade biológica existente. Além do mais não causam efeitos colaterais ao indivíduo que está fazendo uso, sendo menos tóxicos (GAYATHRI & SWAMY, 2012).

Os estudos com as substâncias liquênicas são realizados há décadas, tendo como o precursor Burkholder *et al.* Em 1944. Seis anos mais tarde, Vartia testou nove substâncias, os ácidos: pinástrico, girofórico, fisódico, úsnico (Figura 5), liquesterínico, pulvínico, d-

protoliqueterínico, divaricático e atranorina. Todos de origem liquênica, e observou a inibição de bactérias gram-positivas e fungos.

A eficiência dos extratos liquênicos é atribuída aos metabólitos secundários únicos que eles produzem (FANKOS, 2005). Dentre as substâncias encontradas, o ácido úsnico (Figura 1) é um importante agente antimicrobiano (VARTIA, 1973).

**Figura 1** – Estrutura química do ácido úsnico.



Fonte: Honda & Vilegas (1998), modificado.

Em 1985, Ingólfssdóttir *et al.*, fizeram o teste de difusão em disco de papel e métodos turbimétricos a fim de avaliar a atividade antimicrobiana de *Stereocaulon alpinum*, *Peltigera aphthosa* e *Thamnolia subuliformis* contra linhagens das bactérias *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e do fungo *Candida albicans*, comprovando - a.

Foi comprovada também a atividade dos extratos orgânicos de *Heterodermia leucomela*, assim como dos ácidos difráctáico, úsnico, e da atranorina frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, que são bactérias gram-positivas. Os halos de inibição tiveram variação de 10 a 20 mm de diâmetro (FALCÃO *et al.*, 2002).

Gulluce *et al.*, (2006) testaram a atividade antimicrobiana dos extratos de *Ramalina pollinaria* inibiram o crescimento de 11 das 35 bactérias testadas. No mesmo estudo, evidenciaram a atividade antifúngica de *Ramalina pollinari*, *R. polymorpha* e *Umbilicaria nylanderina* frente a *Candida albicans*, *Tricophyton rubrum*.

Nóbrega *et al.*, (2012) Compovaram a atividade antimicrobiana de *Parmotrema andinum* principalmente com o extrato etéreo, contra linhagens de *Micrococcus lutteus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* com halos de inibição entre 8 e 13 mm de diâmetro.

A maior sensibilidade aos compostos liquênicos por parte de bactérias gram-positivas é descrita por vários pesquisadores, é o caso de Hawksworth & Hill (1984) e Fahset (1994). Existem, entretanto, relatos de atividade frente a bactérias gram-negativas como mencionado por Díaz *et al.* (1988).

Em 2013, nano-partículas de prata foram sintetizada a partir do fungo liquenizado *Parmotrema praesorediosum*, sendo testada a sua atividade antibacteriana frente a gram-positivas, obtendo bons resultados (MIE *et al.*, 2013).

### 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo Geral:

- ✓ Avaliar a possível atividade antibacteriana dos extratos orgânicos da espécie liquênica *Ramalina usnea*.

### 3.2. Objetivos Específicos:

- ✓ Obter os extratos orgânicos do líquen *Ramalina usnea*;
- ✓ Caracterizar quimicamente a composição fenólica dos extratos de *R. usnea*;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro*, frente a espécies bacterianas patogênicas ao homem.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Coleta do material líquênico

As amostras do líquen *R. usnea* foram coletadas no município de Rio Negrinho, Santa Catarina, Brasil, localidade Rio Preto, Fazenda Velha. Área rural, sobre ramos de *Podocarpus sp*, a uma Latitude de: 26°17'55.42"S e Longitude de: 49°37'24.16"O. A identificação da espécie foi realizada através da análise morfológica e química do talo pelo Mrc. Emerson Luiz Gumboski, Doutorando em botânica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A *Ramalina usnea* (Figura 2) é uma espécie líquênica que foi inicialmente descrita por Linnaeus como liquen usnea, e é de ampla distribuição em ambientes quentes (IMSHAUG, 1972).

O Material líquênico foi limpo e armazenado em embalagem de papel até o seu uso.

**Figura 2** - Fungo liquenizado *Ramalina usnea* L.



Fonte: Autor

#### 4.2. Obtenção dos extratos

O material previamente limpo e seco foi macerado com o auxílio de um almofariz de porcelana e pistilo, e submetido ao método de extração por esgotamento a frio, e seguindo-se a série eluotrópica dos solventes, éter, clorofórmio e acetona, respectivamente.

À amostra triturada, adicionou-se 100 mL de éter, seguindo-se agitação por 10 min., sendo posteriormente mantido a 6°C por 24 h. Passado este período, o material foi filtrado. Ao resíduo foi adicionado clorofórmio sob as mesmas condições da extração anterior. Após

24h o processo foi repetido com acetona. Os extratos foram evaporados à temperatura ambiente, em seguida mantidos em dessecador até a obtenção do peso constante.

### 4.3. Análise dos fenóis liquênicos

A análise da fração fenólica foi realizada por meio de técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD).

As cromatografias foram realizadas utilizando-se placas de sílica gel Merck F<sub>254</sub>. A fase móvel utilizada foi constituída de tolueno/dioxano/ácido acético (180:45:5 v/v), de acordo com a metodologia descrita por Culberson (1972).

Os extratos orgânicos (éter, clorofórmio e acetona), foram diluídos em seus respectivos solventes e aplicados à placa, com o auxílio de capilares de vidro. Em seguida as placas foram colocadas em cuba apropriada para corrida e foi efetuada a eluição vertical da placa. Posteriormente as bandas foram visualizadas sob luz UV (254 e 366nm) e reveladas através da pulverização de solução de ácido sulfúrico a 10%, e posterior aquecimento a 100°C. As bandas foram identificadas através da análise de seus R<sub>f</sub>s e reação de coloração, com comparação com aqueles do padrão de ácido úsnico.

### 4.4. Testes antibacterianos

#### 4.4.1. Microrganismos teste

Foram selecionadas oito bactérias para os ensaios: *Escherichia coli* (ATCC-01), *Shigella flexneri* (ATCC-4), *Salmonella typhimurium* (ATCC-14), *Enterobacter cloacae* (ATCC-18), como bactérias Gram-negativas; *Enterococcus faecalis* (ATCC-3), *Streptococcus pyogenes* (Cepa clínica-13), *Kocuria rhizophila* (ATCC-8), *Staphylococcus aureus* (ATCC-17), como bactérias Gram-positivas. Os testes foram feitos em duplicata e realizados no laboratório de Microbiologia do Centro Acadêmico de Vitória – UFPE.

#### 4.4.2. Teste de difusão em meio sólido com discos de papel

Os ensaios de atividade bacteriana foram efetuados seguindo-se a metodologia descrita por Bauer (1968). Sendo utilizado o meio de Muller-Hinton (HC) em placas de petri. O inóculo foi preparado de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland em solução salina a 0,9%, e posteriormente semeado com swab sobre o meio de cultivo.

Após isso os discos de papel foram aplicados sobre o meio, previamente embebidos com  $20\mu\text{l}^{-1}$  de soluções a  $1,0\text{ mg.mL}^{-1}$  de cada extrato orgânico. Os discos foram preparados e mantidos em ambiente estéril até a evaporação dos solventes. Então as placas foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h. Discos de clorafenicol ( $30\mu\text{g}$ ) foram utilizados como controle positivo.

Os resultados foram analisados pela mensuração dos halos de inibição ao redor dos discos, sendo expressos em milímetros (mm), onde de 0-10 são considerados com pouca atividade, 10-20 atividade média e a partir de 20mm, é considerada de boa atividade. Os ensaios foram feitos em duplicata.

#### **4.4.3. Método de difusão em poço**

Foram usadas placas de petri contendo meio Muller-Hinton (HC), e posteriormente semeadas com suspensão bacteriana preparada de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland em solução salina a 0,9%.

Após isso, foram feitos 4 furos na placa, em ângulos de  $90^{\circ}$ , com o auxílio de um canudo estéril, sendo retirado o bloco de gelose e parcialmente preenchido com gelose fluida. Formando assim quatro poços para cada placa.

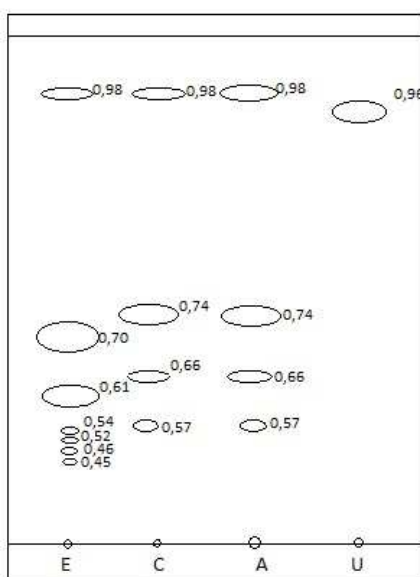
Em cada orifício (poço) foi depositado  $30\mu\text{l}$  dos extratos e o controle Clorafenicol (CLO-30mG). As placas foram então incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24horas.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Ao analisar a cromatografia (Figura 3), pôde ser observado que a *R. usnea* possui o ácido úsnico, porém a uma quantidade inferior a outras substâncias, pois os extratos tiveram um dos valores de Rf muito parecidos com o padrão.

As demais substâncias não foram identificadas. Imshaug (1972) identificou em espécimes de *R.usnea* a presença de ácido salazínico e úsnico, confirmando os achados deste trabalho. Entretanto os demais composto permanecem não identificados.



**Figura 3** – Cromatografia em camada delgada, onde a letra E representa o extrato etéreo, C o Clorofórmico, A o Acetônico e U é o padrão de ácido úsnico com os seus Rf.

## 5.2 Ensaios de atividade antibacteriana

### 5.2.1 Método de difusão em meio sólido

Os halos de inibição são apresentados na tabela 1 na forma de média. para *Enterococcus faecalis* (Figura 4), mostraram-se sempre superiores a 10mm. O extrato acetônico apresentou a melhor capacidade de inibição, com um halo médio de 26 mm, e na sequência os extratos clorofórmicos e etéreo com 18 e 20 mm respectivamente.

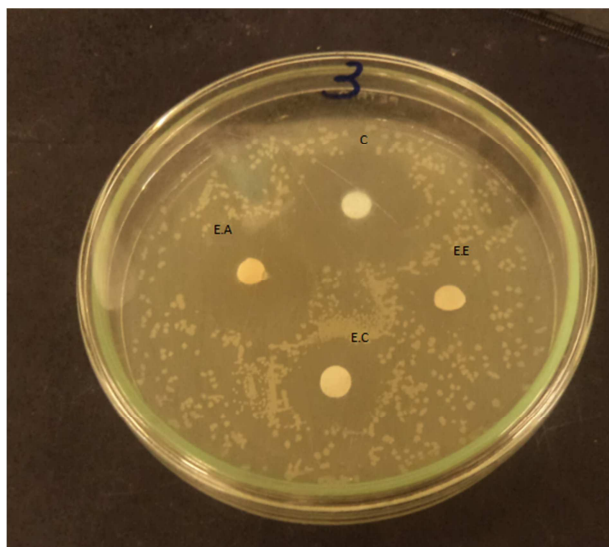
Frente à bactéria *Streptococcus pyogenes*, o extrato etéreo mostrou-se mais eficaz, com halo de inibição médio de 20 mm, seguindo - se o acetônico com 15mm e o clorofórmico com 10mm.

Frente à *Kocuria rhizophila* o etéreo teve um halo de inibição médio de 23mm e o acetônico 10mm. O extrato acetônico também não teve halo de inibição em *Staphylococcus aureus*, mas teve halos de inibição média superior a 20mm com o extrato etéreo, apresentando 21mm e o extrato clorofórmico apresentou 5mm.

Os extratos não apresentaram atividade frente a bactérias Gram-negativas, estes resultados estão de acordo com o observado por Hale (1983), que verificou baixa eficiência dos compostos liquênicos frente a bactérias Gram-positivos.

**Tabela1.** Atividade antibacteriana em disco do líquen *Ramalina usnea*

| Espécies bacterianas          | Diâmetro dos halos de inibição em milímetros dos extratos orgânicos. |             |      |              |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------|------|--------------|
|                               | Acetona                                                              | Clorofórmio | Éter | Clorafenicol |
| <i>Escherichia coli</i>       | 0                                                                    | 0           | 0    | 25           |
| <i>Enterococcus faecalis</i>  | 26                                                                   | 18          | 20   | 30           |
| <i>Shigelle flexneri</i>      | 0                                                                    | 0           | 0    | 30           |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 15                                                                   | 10          | 20   | 30           |
| <i>Kocuria rhizophila</i>     | 10                                                                   | 0           | 23   | 40           |
| <i>Salmonella typhimurim</i>  | 0                                                                    | 0           | 0    | 30           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | 0                                                                    | 5           | 21   | 25,5         |
| <i>Enterobacter cloacae</i>   | 0                                                                    | 0           | 0    | 28           |



**Figura 4** - Halos de inibição dos extratos orgânicos do líquen *Ramalina usnea* frente a *Enterococcus faecalis* pelo teste do disco. Onde C representa clorafenicol, E.A extrato acetônico, E.C extrato clorofórmico e E.E extrato etéreo.

### 5.2.2. Método de difusão em poço

Os resultados obtidos através do teste em poço (Tabela 2) mostraram um padrão semelhante àquele mostrado nos testes de difusão em meio sólido com discos de papel, sendo eficaz apenas em bactérias Gram-positivas. Frente à bactéria *Enterococcus faecalis*, todos os extratos tiveram halo médio de inibição superior a 20 mm. Destes o extrato etéreo apresentou melhores resultados, com halo de inibição médio igual a 28 mm, e os extratos clorofórmico e acetônico, ambos com 22 mm.

Frente à *Streptococcus pyogenes*, o extrato que teve um halo médio de inibição maior foi o etéreo, com 21 mm, e os extratos clorofórmico e acetônico com 18 mm. O extrato etéreo também foi mais eficaz frente à *Kocuria rhizophila* (Figura 5), com halo de inibição médio igual a 22 mm, o acetônico com 13mm e clorofórmico 12mm.

A bactéria *Staphylococcus aureus* foi mais sensível ao extrato etéreo, apresentando um halo de inibição médio igual a 20 mm, na sequência o extrato clorofórmico com 12 mm e acetônico com 11 mm.

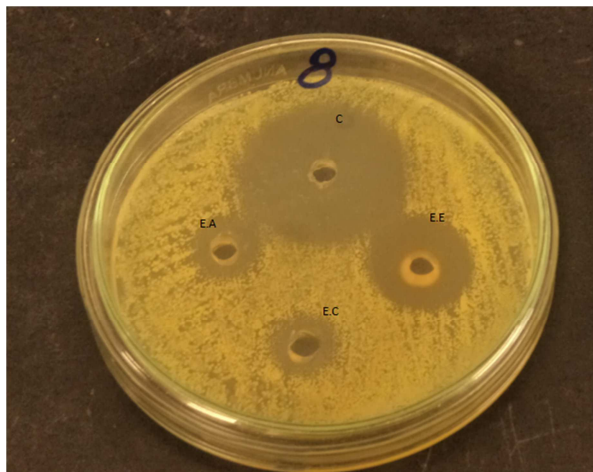
Hale (1983) em seus estudos, que mostrou que as substâncias presentes nos líquens são de eficiência inferior nas bactérias gram-negativas em relação às gram-positivas. O mesmo também é mostrado por Bustinza (1951), Capriotti (1961), Silva et al. (1986) e Xavier-Filho & Rizzini (1976), que apontaram resultados satisfatórios frente a inibição de bactérias gram-positivas.

Em nenhum dos testes foram observados halos de inibição para as bactérias gram - negativas: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, confirmando as citações bibliográficas que mencionam baixa atividade dos compostos líquênicos frente bactérias gram-negativas.

Na tabela 2, pode-se observar que no teste em poço, o halo de inibição causado pelo extrato etéreo frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, mostrou-se satisfatório, pois o tem um diâmetro equivalente ao fármaco clorafenicol, ambos possuindo 20 mm.

**Tabela 2.** Atividade antibacteriana do extrato do líquen *Ramalina usnea* L. através do teste em poço.

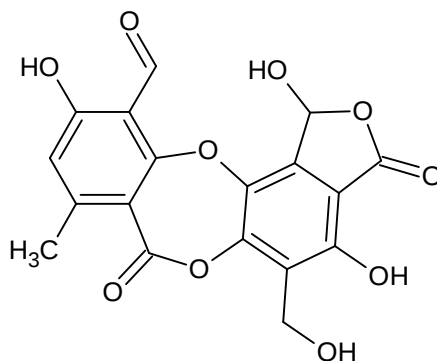
| Espécies bacterianas          | Extratos orgânicos                           |             |      |              |
|-------------------------------|----------------------------------------------|-------------|------|--------------|
|                               | Diâmetro dos halos de inibição em milímetros |             |      |              |
|                               | Acetona                                      | Clorofórmio | Éter | Clorafenicol |
| <i>Escherichia coli</i>       | 0                                            | 0           | 0    | 25           |
| <i>Enterococcus faecalis</i>  | 22                                           | 22          | 28   | 30           |
| <i>Shigelle flexneri</i>      | 0                                            | 0           | 0    | 28           |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 18                                           | 18          | 21   | 28           |
| <i>Kocuria rhizophila</i>     | 13                                           | 12          | 22   | 40           |
| <i>Salmonella typhimurim</i>  | 0                                            | 0           | 0    | 30           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | 11                                           | 12          | 20   | 20           |
| <i>Enterobacter cloacae</i>   | 0                                            | 0           | 0    | 25           |



**Figura 5** - Halos de inibição do extrato do líquen *Ramalina usnea* L. frente à *Kocuria rhizophila* no teste em poço. C clorafenicol, E.A extrato acetônico, E.C Extrato clorofórmico e E.E extrato etéreo

Os resultados demonstraram relevante atividade antibacteriana dos extratos líquênicos. Uma vez que observa-se a presença de ácido úsnico na espécie (Figura 3), pode ser atribuída a atividade à presença deste importante composto, semelhante aos dibenzofuranos. Entretanto, como mencionado por Falcão et al. (2002 e 2004), é possível uma ação sinérgica entre os constituintes do líquen. Estudos de Imshaug (1972) já mencionavam a presença de ácidos importantes como o ácido salazínico, uma depsidona (HONDA & VILEGAS, 1998) (Figura 6). É possível que esta seja a primeira descrição de uma ação sinérgica entre tais compostos. Estudos posteriores poderão esclarecer com maior precisão a composição química dos extratos e eventual ação sinérgica de tais compostos.

**Figura 6** – Estrutura química do ácido divaricático.



Fonte: Honda & Vilegas (1998), modificado.

## 6. CONCLUSÕES

Diante dos dados obtidos podemos concluir que:

- O processo de extração foi adequado sendo considerado satisfatório.
- Foi identificado, através da análise cromatográfica o ácido úsnico, entretanto este não seria o composto majoritário da espécie.
- Os extratos foram considerados ativos frente a bactérias gram-positivas.
- A atividade observada pode ser atribuída à presença de ácido úsnico, entretanto, uma vez que sua concentração é baixa na espécie, possivelmente a atividade observada relaciona-se à ação sinérgica entre outros compostos encontrados no extrato.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADJIAN, V. 1993. The Lichen Symbiosis. John Wiley & Sons, New York.
- AKINYEMI, K. O.; OLADAPO, O.; OKWARA, C. E.; IBE, CC.; FASURE, K. A. Screening of crude extractus 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.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TRUCK, M. Aantibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method, *The American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BEHERA, B. C.; VERMA, N.; SONONE, A.; MAKHIJA, U. Deterrmination of Atioxidative of Potencial of Lichen *Usnea ghattensis in vitro*. *LWT*, v. 39, p. 80-85, 2006.
- BURKHOLDER, P.R.; Evans, A.W.; McVEIGH, I.; THORTON, H.R. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Washington*. v. 30(9), p. 250-255, 1944.
- BURKHOLDER, P.R.; DODGE, C.W.; BURKHOLDER, L.M.; Estudio de los liquenes de Tierra del fuego con especial consideración de su actividad antibiótica. Centro de Investigación de Biología Marina, Laboratório Algologico Rawson, *Contribución Científica*, v. 21 p 1-23; 1965.
- CAPRIOTTI, A. The effect of Usno on Yeast isolated from the excretion of tuberculosis patients. *Antibiotic and Chemotherapy*. V. 11(6), p. 409-410, 1961.
- CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardize thin layer chromatographic method. *Journal of chromatography*, v. 72, p 113-125, 1972.

- CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L. Supplement to 'Chemical and Botanical Guide to Lichen Products.' *Bryologist*, v. 73, p. 177-377, 1970. & JONHSON, A.; Geneti and Environmental effects on Growf and Production of Secondary Compounds in *Cladonia cristatella*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 11; p. 78 – 84.
- DEPRIEST, P. T. Early Molecular Investigatin of Lichen Forming Simbiosis. *Annu. Rev. Microbiology*, v. 58, p. 273-301, 2004.
- DÍAZ, B.; UGARTE, R. & QUILHOT, W. Actividad antibacteriana *in vitro* de la depsidona clorada l' cloropannarina. *Revista Latino-americana de Microbiologia*, v. 30, 70-83.
- DÜLGER, B., GÜÇİN, F., ASLAN, A. *Cetraria islandica* (L) Ach. Likeninin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Turkish Journal of Biology*, v. 22, p. 11–118, 1998.
- ESIMIONE, C. O.; ADKWU, M.U. Susceptibility of some clinical isolates of *Staphylococcus aureus* to bioactive column fractions from the lichen *Ramalina farinace* (L). *Ach. Phytotherapy Research* v. 16, p 494-496; 2002.
- ESIMIONE, C. O.; OFOCANSI, K.C.; ADKWU, M.U.; IBEZIM, E.C.; ABONYI, D.O.; ODAIBO, G.N.; OLALEYE, D.O.; In vitro evaluation of the antiviral activity of extracts from the lichen *Parmelia perlata* (L.) Ach. Against three RNA viruses. *J. Infect. Developing Countries*, v. 1 (3), p. 315-320, 2007.
- FAHSET, D. Secondary biochemistry of lichens. *Symbiosis* v.16; p. 117 – 165; 1994.
- FALCÃO, E.P.S.; SILVA, N.H.; PEREIRA, E.C.; GUSMÃO, N.B. & RIBEIRO, S.M. Atividade antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. *Acta Farmaceutica Bonarense*, v. 21(1), p. 43-49, 2002.
- FALCÃO, E.P.S.; SILVA, N.H.; GUSMÃO, N.B., Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron1. *Acta bot. Bras*, v. 18(4), p. 911-918, 2004.

- FRANKOS , V.H. Nomination for Usnic Acid and *Usnea barbata* Herb. (NTP) *Us National Toxicology Program*, 2005.
- GAYATHRI, D.; SWAMY, C. T. Lichens: A novel potential source as antimicrobials for human use. *J. Phytol*, v. 4, p. 38-43, 2012.
- GOWARD, T. ; McCUNE, & MEIDINGER, D. The lichens of British Columbia. Illustrated Keys, Part 1 – Foliose and Squamulose Species. Victoria: Ministry of Forests Research Program. p 181; 1994.
- 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.
- HALE-JR., M. E. The Biology of Lichens. 3ed. London. *Edward Arnold Pub.*, 1983, 90p.
- HALE-JR., M. E. The biology of Lichens. In: HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos liquens. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p.110-125, 1988.
- HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J.; The lichen forming fungi. *Blackie & Sons. ltd.* Glasgow, 1984.
- HIDALGO, M. E.; FERNANDEZ, E.; QUILHOT, W., LISSI, E.; *Phytochemistry*, v. 6, p. 1994.
- HONDA, N. K.; VILEGAS, W.; A química dos liquens. *Quimica Nova* v. 21 (6), 1998.
- HOWE, R. H. North American species of the genus *Ramalina*. *Bryologist*, v. 17, p. 81-86, 1914.
- KATZUNG, B.G.; *Farmacologia Básica e Clínica* 9ª Ed. Guanabara Koogan, 2006.
- IMSHAUG, H. A. Typification of *Ramalina usnea* (L.). *Lichenologist*, v. 5, p. 317-318, 1972.

- INGÓLFSDÓTTIR, K.; HYLANDS, P. J. *In Vitro* of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potencial preservatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Aug., p. 289-292, 1985.
- VIDYALAKSHMI, A.; KRUTHIKA, K. Antibacterial activity of *Parmelia perlata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Tamil Nadu, Índia, p. 892-894, 2012.
- LANDRON, I. The lichen genus *Ramalina* in the West Indies. *Michigan State University (in preparation)* Ph.D. thesis. , 1972.
- LÁZARO, O.; OTEO, J.; Evolución del consumo y de la resistência a antibióticos en España. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud*, v. 30, p. 10-19, 2006.
- LEGAZ, M. E.; CÓROBA, 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.
- LYNFIELD, R.; DUMYATI, G.H. ; TOWNES, J.M. ; CRAIG, A.S.; ZELL, E.R; FOSHEIM, G.E.;MCDUGAL, L.K. ; CAREY, R.B. ; FRIDKIN, S.K. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Journal of the American Medical*, p.1763–1771, 2007.
- MAIA, MBS ; SILVA, N. H. ; SILVA, E. F. ; CATANHO, M. T. J. ; GONÇALVES, E. C. P. Antinociceptive Activity of Crude Extracts and Atranorin Obtained from the Lichen *Cladina dendroides* (des Abb.) Ahti. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, Argentina, v. 21, n.4, p. 259-264, 2002.
- MACIAG-DORSZYNSKA, M.; WEGRZYN, G.; GUZOW-KRZEMINSKA, B. Antibacterial Activity of lichen secondary metabolite usnic acid primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 353(1), p. 57-62, 2014.

- MARCELLI, M. P. Fungos Liqueenizados. In: XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. *Biologia de Liquens*. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006(a). p.25-74.
- MOORE, B. J. The macrolichen flora of Florida. *Bryologist*, v. 71, p. 161-266, 1968.
- MIE, R.; SAMSUDIN, M. W.; DIN, L. B.; AHMAD, A.; IBRAHIM, N.; ADNAN, S. N. Synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using the lichen *Parmotrema praesorediosum*. *Int. J. Nanomedicine*, v. 9, p. 121-127, 2013.
- 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. Microbiolog.*, v 31, p. 247-256, 2000.
- NASH III, T. H. Introduction In: Nash III, T. H. *Lichen Biology*. Cambridge: University Press, p. 1-7, 1996.
- NÓBREGA, N. A.; RIBEIRO, S.M.; PEREIRA, E.C.; MARCELLI, M.; MARTINS, M.C.B.; FALCÃO, E.P.S.; GUSMÃO, N.B.; SILVA, N.H. Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale e avaliação de atividade antimicrobiana,' *Acta Bot. Bras.* v. 26 n.1, Feira de Santana Jan./Mar. 2012
- PEREIRA, E. C. G. ; SILVA, N. H. ; SANTOS, RA ; SUDARIO, APP ; SILVA, A. A. R. ; MAIA, MBS . Determination of *Teloschistes flavicans* (sw) norm anti-inflammatory activity. *Pharmacognosy Research*, v. 2, p. 205, 2010.
- 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. 724p.

- RIBEIRO, S.M.; PEREIRA, GUSMÃO, N. B.; FALCÃO, E. P.; SILVA, N.E.C. Produção de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio, *Acta Botânica Brasilica*, v. 20(2), p. 265-272, 2006.
- SAIKI, M., FUGA, A., ALVES, E.R., VASCONCELLOS, M.B.A. & MARCELLI, M.P. Biomonitoring of the atmospheric pollution using lichens in the metropolitan area of São Paulo city, Brazil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2007, 127 (1):213-219.
- SILVA, J.O.; Leite, J.E.M.; Paulo, M.Q. & Xavier-Filho, L. 1986. Atividade antimicrobiana de líquens brasileiros I. Boletim da Sociedade Broteriana 59(2): 87-96.
- SMITH, D. C.; DOUGLAS, A. E.; *The Biology of Symbiosis*; Edward Arnold, London, 1987.
- VARTIA, K.O., 1973. Antibiotics in lichens. In: Ahmadjian, V., Hale, M.E. (Eds.), *The lichens*. Academic Press, New York, p. 547.
- XAVIER-FILHO, L. & RIZZINI, C.T. 1976. Manual de Liquenologia Brasileiro. Recife, Universidade Federal de Pernambuco.
- XAVIER-FILHO, L. 1989. Inibição Fotooxidativa de b-Caroteno por Cloroatranorina de *Parmelia tinctorum* Nyl. João Pessoa: UFPB. Tese de Titular - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB.