

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

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE EXTRATOS ORGÂNICOS E ÁCIDO  
BARBÁTICO DE *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.**

**RECIFE  
2005**

**MÔNICA CRISTINA BARROSO MARTINS**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE EXTRATOS ORGÂNICOS E ÁCIDO  
BARBÁTICO DE *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica da Universidade  
Federal de Pernambuco, como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Nicácio Henrique da  
Silva**

**Co-orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Eugênia Cristina  
Gonçalves Pereira**

**RECIFE  
2005**

## FICHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora

**Orientador:**

**Dr. Nicácio Henrique da Silva**

*Nicácio Henrique da Silva*

**(Universidade Federal de Pernambuco)**

**Examinadores:**

1 Examinador

*Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho*

**Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho**

2 Examinador

*Maria da Paz Carvalho da Silva*

**Maria da Paz Carvalho da Silva**

3 Examinador

*Norma Buarque de Gusmão*

**Norma Buarque de Gusmão**

**Data de aprovação** 17 / 02 /2005

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>1.1</b> Os líquens e a substâncias liquênicas	<b>01</b>
<b>1.2</b> Atividade antimicrobiana	<b>04</b>
<b>1.3</b> Atividade citotóxica	<b>06</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b>	<b>07</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>08</b>
<b>3.1</b> geral	<b>08</b>
<b>3.2</b> específico	<b>08</b>
<b>4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>09</b>
<b>5. ARTIGOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>5.1 Capítulo I:</b> Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos orgânicos e ácido barbático purificado de <i>Cladia aggregata</i> (Sw.) Nyl.	<b>15</b>
<b>5.2 Capítulo II:</b> Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do extrato etéreo e ácido barbático de <i>Cladia aggregata</i> (Sw.) Nyl.	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>51</b>
<b>7. PERSPECTIVA</b>	<b>51</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>52</b>
<b>8.1</b> Trabalhos enviados ao 55 <sup>o</sup> Congresso Nacional de Botânica – Viçosa, Minas Gerais	<b>53</b>
<b>8.2</b> Trabalhos enviados a VII <sup>a</sup> Reunião Regional da SBBq e 2 <sup>nd</sup> Internacional Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology – Recife, Pernambuco	<b>55</b>
<b>8.3</b> Normas para publicação dos artigos na Acta Botanica Brasílica	<b>59</b>

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais – Fábio Marques Martins e Maria de Araújo Martins

Ao meu esposo Marcio James Gonçalves de Lima

Aos meus orientadores Profs: Drs: Nicácio Henrique da Silva e Eugênia Cristina Pereira

A Dr<sup>a</sup>: Eulália Ximenes do Departamento de Antibióticos da UFPE

A Dr<sup>a</sup>: Silene Nascimento do Departamento de Antibióticos da UFPE

Aos meus colegas do Mestrado

Aos meus companheiros do Laboratório de Produtos Naturais

Ao técnico do Laboratório de Produtos Naturais – João Virgínio.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES

## LISTA DE FIGURAS

### DISSERTAÇÃO

**Figura 01.** Estrutura química do ácido barbático, segundo Huneck & Yoshimura (1996) **04**

### **CAPÍTULO I: Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos orgânicos e ácido barbático purificado de *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.**

**Figura 01.** Cromatograma demonstrando a presença de fenóis nas extrações a frio e a quente e do ácido barbático de *C. aggregata*. USN-padrão; BAR-padrão; extratos orgânicos- etéreo (Etf), clorofórmico (Clf), acetônico (Acf), extraídos por esgotamento a frio; extratos orgânicos- etéreo (Etq), clorofórmico (Clq), acetônico (Acq), extraídos por esgotamento a quente e, BAR purificado **28**

**Figura 02.** Cromatograma (HPLC) demonstrando. **A-** ácido barbático (BAR) padrão e, **B-** BAR extraído e purificado de *C. aggregata* **29**

**Figura 03.** Cromatograma (HPLC) demonstrando os extratos orgânicos obtidos por esgotamento a frio. **A-** etéreo; **B-** clorofórmico e **C-** acetônico **30**

**Figura 04.** Cromatograma (HPLC) demonstrando os extratos orgânicos obtidos por esgotamento a quente. **A-** etéreo; **B-** clorofórmico e **C-** acetônico **31**

**Figura 05.** Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos extraído de *C. aggregata* obtidos por esgotamento a frio, contra o *S. aureus* – SAIC 155. 1-etéreo; 3- clorofórmico e 5-acetônico **34**

**Figura 06.** Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos extraído de *C. aggregata* obtidos por esgotamento a frio, contra o *S. aureus* – ATCC 6538. 1-etéreo; 3- clorofórmico e 5-acetônico **34**

**Figura 07.** Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos extraído de *C. aggregata* obtidos por esgotamento a quente, contra o *S. aureus* – SAIC 155. 1-etéreo; 3- clorofórmico e 6-acetônico **34**

<b>Figura 08.</b>	Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos extraído de <i>C. aggregata</i> obtidos por esgotamento a quente, contra o <i>S. aureus</i> – ATCC 6538. 1-etéreo; 3- clorofórmico e 6-acetônico	<b>34</b>
<b>Figura 09 -</b>	Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de <i>C. aggregata</i> contra <i>S. aureus</i> – SAIC 155, solubilizado em: 3- éter; 4- água	<b>35</b>
<b>Figura 10 -</b>	Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de <i>C. aggregata</i> contra <i>S. aureus</i> – ATCC 6538, solubilizado em: 3- éter; 4- água	<b>35</b>
<b>Figura 11 -</b>	Biocromatograma indicando a atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos e BAR purificado de <i>C. aggregata</i> , contra <i>S. aureus</i> - SAIC 155. P - BAR; 1- etéreo; 2- clorofórmico e 3-acetônico	<b>36</b>
<b>Figura 12 -</b>	Biocromatograma indicando a atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos e BAR purificado de <i>C. aggregata</i> , contra <i>S. aureus</i> (multi resistente). P – BAR; 1- etéreo; 2- clorofórmico, 3- acetônico	<b>36</b>
<b>Figura 13 -</b>	CMI demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de <i>C. aggregata</i> contra as linhagens de <i>S. aureus</i> . 200µg/mL	<b>37</b>
<b>Figura 14 -</b>	CMI demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de <i>C. aggregata</i> contra as linhagens de <i>S. aureus</i> . 100µg/mL	<b>37</b>
<b>Figura 15 -</b>	CMI demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de <i>C. aggregata</i> contra as linhagens de <i>S. aureus</i> . 50 µg/mL	<b>37</b>
<b>Figura 16 -</b>	CMI demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de <i>Cladia aggregata</i> contra as linhagens de <i>S. aureus</i> . 25µg/mL	<b>37</b>
<b>Figura 17 -</b>	Placa controle com acetona pura	<b>38</b>

**CAPÍTULO II: Atividade citotóxica *in vitro* do extrato orgânico etéreo a quente e ácido barbático purificado de *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.**

<b>Figura 01 -</b>	Cromatograma do <b>BAR padrão</b> – ácido barbático padrão; <b>BAR purificado</b> – ácido barbático extraído e purificado de <i>Cladia aggregata</i> ; <b>Etq</b> – extrato etéreo obtido por esgotamento a quente	<b>47</b>
<b>Figura 02 -</b>	Cromatograma (HPLC), demonstrando a presença do <b>ácido barbático (BAR)</b> no extrato orgânico etéreo a quente e seu percentual de pureza em relação ao padrão	<b>48</b>

<b>Figura 03 -</b>	Percentuais de inibição <i>in vitro</i> sobre as linhagens de células cancerígenas do extrato etéreo obtido de <i>C. aggregata</i>	<b>49</b>
<b>Figura 04 -</b>	Percentuais de inibição <i>in vitro</i> sobre as linhagens de células cancerígenas do ácido barbático purificado de <i>C. aggregata</i>	<b>50</b>

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I: Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos orgânicos e ácido barbático purificado de *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.**

- Tabela 01** – Percentual de rendimento das extrações orgânicas a frio e a quente a partir de 50g do talo *in natura* de *C. aggregata* **27**
- Tabela 02** – *Screening* da atividade antimicrobiana de extratos orgânicos e BAR purificado obtidos de *C. aggregata* **32**
- Tabela 03** – Atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos e BAR purificado de *C. aggregata* contra *S. aureus* **33**
- Tabela 04** – Resultado comparativo entre a CMI de substâncias líquênicas com a do BAR purificado de *C. aggregata* **39**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABS** – absorbância  
**Acf** – extrato acetônico extraído a frio  
**Acq** – extrato acetônico extraído a quente  
**BAR** – ácido barbático  
**BAR padrão** – ácido barbático padrão  
**BAR purificado** – ácido barbático purificado  
**CCD** – cromatografia em camada delgada  
**CI<sub>50</sub>** – concentração que inibe 50%  
**CLAE** – cromatografia líquida de alta eficiência  
**Clf** – extrato clorofórmico extraído a frio  
**Clq** – extrato clorofórmico extraído a quente  
**CMI** – concentração mínima inibitória  
**D-BAR** – ácido D-barbático  
**DMEM** – mínimo essencial médium  
**DMSO** – dimetilsulfóxido  
**EST** – ácido estúptico  
**Etf** - extrato etéreo extraído a frio  
**Etq** – extrato etéreo extraído a quente  
**FUM** – ácido fumarprotocetrárico  
**Hep-2** – adenocarcinoma de laringe  
**IAL** – Internacional Association for Lichenology  
**KB** – carcinoma epidermóide naseofariígeo  
**MDA** – MB231 – adenocarcinoma mamário  
**MTT** – dimetiltiazol, difeniltetrazólio  
**NCI- H292** – carcinoma epidermóide de laringe  
**NOR** – ácido nortístico  
**PC3** – adenocarcinoma prostático  
**Rf** – relação de frente  
**SO<sub>2</sub>** – dióxido de enxofre  
**Tr** – tempo de retenção  
**UFC** – unidade formadora de colônia  
**USN** – ácido úsnico  
**UV** - ultravioleta

## RESUMO

O efeito da atividade biológica *in vitro* dos extratos orgânicos e o ácido barbático purificado de *Cladia aggregata* foi avaliado sobre microrganismos patógenos e células cancerígenas. Os extratos orgânicos foram obtidos a partir de 50g do talo liquênico *in natura*, através de extrações por esgotamento a frio e a quente, obedecendo a série eluotrópica éter, clorofórmio e acetona. Os extratos etéreos apresentaram cromatografia em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE) com menor número de bandas e picos respectivamente com rendimento total de 1,690g para o extrato frio e 2,183g para a quente. O ácido barbático foi purificado a partir do extrato etéreo a quente, através de várias lavagens com clorofórmio, cuja concentração demonstrada na CLAE foi de aproximadamente 96%. A atividade antimicrobiana foi verificada através de *screening* em disco, biocromatograma e concentração mínima inibitória (CMI). O teste em disco foi feito contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo. O biocromatograma e a CMI apenas com Gram-positivas. Os discos de papel foram impregnados com 21µL das soluções dos extratos, a uma concentração de 43mg/mL e, do ácido barbático purificado dissolvido em éter e água na mesma concentração. Os resultados demonstraram atividade contra *Staphylococcus aureus* e o ácido barbático purificado dissolvido em água apresentou o melhor halo de inibição, 13,5mm. Os resultados dos biocromatogramas dos extratos orgânicos e ácido barbático purificado contra *S. aureus*, apresentaram sinergismo entre as substâncias, verificando-se a presença de um único halo de inibição ao redor do cromatograma. O ácido barbático purificado foi submetido a diluições em 9 partes a 2mg/mL e a CMI contra *S. aureus* ficou entre 200 - 50µg/mL. Para os testes citotóxicos foram usados o extrato etéreo a quente a 50; 25; 12,5 e 6,5 µg/mL e o ácido barbático a 20; 10; 5 e 2,5 µg/mL, obtidos conforme metodologia anterior contra as seguintes linhagens de células cancerígenas: Hep-2, NCI-H292 e KB. O extrato etéreo a quente inibiu o crescimento celular em 78; 72; 70 e 60% Hep-2; 63; 61; 36 e 42% NCI- H292; 80; 80; 52 e 47% KB com CI50: < 6,5 µg/mL para Hep-2 e 6,5 - 12,5 µg/mL para NCI- H292 e KB. O ácido barbático purificado inibiu Hep-2 em 61; 66; 54 e 49%; NCI - H292 63,4; 61,1; 36,7 e 42%; KB 77; 71; 53 e 43%, com CI50: 2,5 - 5 µg/mL para Hep-2 e KB e 5 µg/mL para NCI- H292. Os resultados demonstraram que os extratos orgânicos e o ácido barbático purificado apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e atividade citotóxica para as células cancerígenas testadas.

## ABSTRACT

The biological activity *in vitro* of the crude extracts and the purity barbatic acid from *Cladia aggregata* was verified and evaluated against pathogen microorganism and cancerous cells. The crude extracts were obtained starting from 50g *in natura* liquenic thallus, through cold and hot, exhaustion extractions obeying eluotropic series ether, chloroform and acetone. The ethereal extracts introduced chromatographies in thin layer (TLC) and efficiency high liquid (HPLC) with smaller number of bands and peaks respectively with total revenue of 1,690g to the cold extract and 2,183 to the hot. The barbatic acid was purified from the hot ethereal extract, through several washes with chloroform, whose concentration demonstrated in HPLC belonged to about 96%. The antimicrobial activity was verified through disk *screening*, biochromatogram and minimum inhibitory concentration (MIC). The disk test was done against Gram-positive, Gram-negative microorganism and fungi. Biochromatogram and MIC just with Gram-positive. The disks paper were impregnated with 21 $\mu$ L extracts solutions, to a concentration of 43mg/mL and, of purity barbatic acid dissolved in ether and water at the same concentration. The results demonstrated activity against *Staphylococcus aureus* and purity barbatic acid dissolved in water introduced the best inhibition halo, 13,5mm. The results of biochromatograms of the crude extracts organic and purity barbatic acid against *S. aureus*, it introduced synergism between substances, verifying itself the presence of an only inhibition halo around of chromatogram. The purity barbatic acid was submitted the dilutions in 9 parts to 2mg/mL and MIC against *S. aureus* stayed among 200 - 50 $\mu$ g/mL. For the citotoxic tests were used the hot ethereal extract to 50; 25; 12,5 and 6,5  $\mu$ g/mL and barbatic acid to 20; 10; 5 and 2,5  $\mu$ g/mL, obtained as previous methodology front the next cancerous cells lineages: Hep-2, NCI-H292 and KB. The hot ethereal extract inhibited cellular growth in 78; 72; 70 and 60% Hep-2; 63; 61; 36 and 42% NCI- H292; 80; 80; 52 and 47% KB with CI50: < 6,5  $\mu$ g/mL for Hep-2 and 6,5 - 12,5  $\mu$ g/mL for NCI- H292 and KB. The purity barbatic acid inhibited Hep-2 in 61; 66; 54 and 49%; NCI - H292 63,4; 61,1; 36,7 and 42%; KB 77; 71; 53 and 43%, with CI50: 2,5 - 5  $\mu$ g/mL for Hep-2 and KB and 5  $\mu$ g/mL for NCI- H292. These results demonstrated that the organic extracts and the purity barbatic acid introduced antimicrobial activity against *S. aureus* and citotoxic activity for the tried cancerous cells.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Os líquens e as substâncias liquênicas

São várias as opiniões e definições no decorrer do tempo a respeito do que seja um líquen. Porém, durante a Reunião Geral da *Internacional Association for Lichenology* (IAL) em 1981, na Austrália, algumas proposições sobre as definições formais para os líquens foram apresentadas. Entre elas: 1- Líquen é uma associação de fungo e alga (D.L. Harksworth, Commonwealth Agricultural Bureau); 2- Líquen é uma associação estável de fungo e alga ou cianobactéria, ou ambas resultando em estrutura estável (A.L Huber e D. K Kidbey, Dept<sup>o</sup> of Soil Science and Plant Nutrition University of Western Austrália); 3- Líquen é uma associação de um fungo e um simbiote fotossintético, resultando em talos estáveis de ultraestrutura específica (Comitê de Terminologia da IAL) (PEREIRA, 2000).

Embora sejam descritos, classicamente, como uma associação simbiótica entre organismos fotossintéticos e fungos, os líquens são comunidades extremamente complexas (KORTEPETER, 1996; BANFIELD 1999; RAVEN *et al.*, 2001; PIOVANO *et al.*, 2002). O micobionte (fungo), geralmente dominante, é um organismo heterotrófico que obtém sua fonte de carbono do fotobionte (alga). A maioria dos fungos são Ascomycota, ou em menor proporção, Basidiomycota, cujos constituintes determinam a classificação dos líquens (NASH III, 1996). As algas são unicelulares pertencentes às divisões Chlorophycophyta e Cyanophycophyta (SILVA, 1980). Ocupam uma parte muito pequena do talo variando de 5-10% da massa total, estando completamente envolvidas pelas hifas do fungo (HONDA & VILEGAS, 1999).

Sendo assim, a liquenização pode ser considerada uma estratégia pela qual o fungo pode satisfazer sua necessidade de carboidrato para respiração e crescimento. Para algas, os benefícios são relativos à hidratação, onde o micobionte a protege da dessecação e da intensa luminosidade (HONDA & VILEGAS, 1999). Como resultado dessa simbiose, tanto o fotobionte como o micobionte tem se espalhado em muitos habitats, das regiões tropicais às polares, onde separadamente na condição de organismo de vida livre não existiriam, ou seriam raros. Por exemplo, as algas de vida livre e cianofíceas, em sua maioria, ocorrem em ambientes aquáticos ou bastante úmidos, mas como parte de líquen ocorrem abundantemente em ambientes secos (HONDA & VILEGAS, 1999).

Líquens podem se desenvolver sobre os mais variados substratos. Há espécies que crescem somente sobre o córtex de árvores, outras sobre folhas, rochas alcalinas ou ácidas. Outras são mais exigentes quanto ao pH do substrato, presença de partículas no ar, umidade dos ventos e temperatura, estando presente nos mais variados habitats e microclimas dependendo da disponibilidade de fatores

físicos e climáticos que proporcionem as condições necessárias para seu desenvolvimento (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; HONDA & VILEGAS, 1999; PEREIRA, 2000).

Cada espécie tem um talo com forma definida, podendo ser arbustivo (*Usnea*, *Ramalina*, *Cladonia*, *Stereocaulon*), folhoso (*Parmelia*, *Collema*, *Leptogium*) ou crustoso (*Lecanora*, *Pertusaria*, *Graphis*, *Chiodecton*) (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; PEREIRA, 2000). O talo arbustivo caracteriza-se por ser ramificado, no folhoso o corpo vegetativo parece uma folha e os crustosos são circulares e estão aderidos ao material que se encontra habitado, como por exemplo, rochas e árvores (SILVA, 1980).

Os líquens são conhecidos desde a antiguidade sendo indicados como remédios, na medicina popular, baseados na “doutrina de sinais”. Por exemplo, a *Usnea barbata*, por ser filamentosa, era indicada para fortalecer os cabelos; a *Lobaria pulmonaria* cuja superfície é reticulada, era designada para problemas nos pulmões; *Xanthoria parietina*, curava icterícia devido sua cor amarelada e a *Peltigera aphosa* era indicada para erupções presentes na boca das crianças com afta ou estomatite (ABRAHAM & FLOREY, 1949; SILVA *et al.*, 1986). Sendo, portanto, utilizados como plantas medicinais (FALCÃO *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2002).

Segundo a literatura, seus metabólitos são ativos contra fungos e bactérias (VARTIA, 1949; INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1985, 1998; PEREIRA *et al.*, 1991, 1996; ESIMONE & ADIKWU, 1999; PERRY *et al.*, 1999; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; PIOVANO *et al.*, 2002), tumores e células cancerígenas (LIMA *et al.*, 1990; PEREIRA *et al.*, 1994 a, b; PERRY *et al.*, 1999), são antivirais, analgésicos (PERRY *et al.*, 1999; PIOVANO *et al.*, 2002) e anti-inflamatórios (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2002), além de serem considerados bons filtros solares (RANCAN *et al.*, 2002). São eficientes acumuladores de muitos elementos, devido não apresentar sistemas de excreção e por terem a capacidade de manter sua morfologia conservada ao longo do tempo e seu tipo de alimentação, exclusivamente higroscópica. Aparentemente podem refletir um razoável equilíbrio entre suas necessidades e os elementos disponíveis no ambiente, sendo por isso conhecidos por reter uma variedade de contaminantes, particularmente os metais pesados, como, urânio, cobalto, cobre, ferro, níquel, manganês, chumbo e zinco (PIGNATA *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2002; ADAMO *et al.*, 2003; BACKOR *et al.*, 2003; LOPPI *et al.*, 2003), ou ainda hidrocarbonetos provenientes do fluxo de veículos e aquecedores domésticos nas grandes cidades (GUIDOTTI *et al.*, 2003).

Por esta razão poucas espécies podem sobreviver onde os níveis de poluição são relativamente altos, como em áreas urbanas, onde o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), um poluente atmosférico, é resultante da poluição industrial (PURVIS *et al.*, 1993; HONDA & VILEGAS, 1999). Algumas espécies são utilizadas como biomarcadores de nitrogênio e depósitos ácidos (GUZMÁN *et al.*, 1984; WALKER *et al.*, 2003), outras aceleram a degradação de minerais por métodos químicos e físicos (PRIETO *et al.*, 1997;

BANFIELD, 1999). Os líquens são capazes de produzir óleos essenciais aromáticos e substâncias fixadoras de essências de perfume, corante de tecidos, graxas e óleos, podem ser usados na manufatura de cerveja, conhaques e álcool (LLANO, 1951; HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; BANGUET, 2000; PEREIRA, 2000). As substâncias liquênicas têm um importante papel na proteção do talo contra a ação de radicais livres que são tóxicos e podem ser causados por altos níveis de luminosidade, ou pela ação de poluentes (CAVIGLIA *et al.*, 2001).

Um grande número de metabólitos fenólicos e alifáticos é por eles produzidos, sendo quase todos extracelulares, sob a forma de cristais, que podem ser insolúveis em água. Os insolúveis estão depositados sobre as hifas do micobionte e, os solúveis podem estar ligados às paredes celulares e ao protoplasma (HALE-JR, 1983; HONDA & VILEGAS, 1999). Polióis como glicerol, eritrol, arabitol, ribitol, D-volemitol, D-sifulitol e açúcares como glucose, sacarose, trealose e outros são comuns nos líquens. Estes produtos são resultantes da atividade fotossintética do ficobionte e ocorrem também em plantas superiores. Alanina, ácido glutâmico, sarcosina, taurina, citrulina e ácido- $\beta$ -aminobutírico são exemplos de alguns aminoácidos presentes nas proteínas liquênicas (HONDA & VILEGAS, 1999).

Os produtos extracelulares freqüentemente chamados metabólitos secundários, ou ácidos liquênicos, também são encontrados na medula ou no córtex, raramente em ambas camadas. Substâncias que apresentam cor, como a maior parte das antraquinonas, derivados do ácido pulvínico e ácido úsnico, outras incolores como atranorina e liquexantona são exemplos típicos de substâncias presentes no córtex (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; HONDA & VILEGAS, 1999). A concentração de metabólitos secundários pode variar de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo liquênico, embora em alguns casos a concentração possa ser mais alta. A maior parte desses metabólitos são compostos oriundos das seguintes vias: 1- acetato-polimalonato, onde são sintetizadas a maioria das substâncias típicas, como as quinonas, depsídeos, depsidonas e ácidos graxos; 2- ácido mevalônico, onde ocorre a formação dos terpenóides e esteróis; 3- ácido chiquímico, que origina muitos pigmentos amarelos; 4- aminoácidos, que conduzem a formação de compostos alifáticos, como ácidos graxos de cadeia longa e substâncias aromáticas do tipo ácidos fenólicos (HALE- JR, 1983; HONDA & VILEGAS, 1999).

No Brasil são encontradas diversas espécies de líquens. Particularmente no Nordeste, cita-se a *Cladonia substellata* e *Cladia aggregata*, que têm como compostos principais os ácidos úsnico e barbático, respectivamente.

O gênero *Cladia* foi descrito por Nylander em 1870 (PEREIRA *et al.*, 1991, 1997). Neste gênero está incluída a espécie *C. aggregata*, que pode ser reconhecida por apresentar pseudopodécios perfurados, lustrosos cuja coloração varia do amarelo claro a marrom. Suas extremidades são densamente ramificadas com ápices rígidos e encurvados e apotécios agregados. Predomina em áreas abertas, geralmente sobre

solos, ou córtex de árvores (STENROOS, 1988; AHTI *et al.*, 1993). Filson (1981) cita como característica típica da *C. aggregata* sua plasticidade fenotípica que depende, prioritariamente, das condições ambientais.

O ácido barbático ( $C_{19}H_{20}O_7$ ) é um composto típico de *C. aggregata* e, também está presente em outras espécies de *Cladonia*, como: *C. floerkeana*, *C. coccifera*, *C. amaurocrea*, *C. cristatella*, *C. incrassata*, *C. sallzmanii* e *C. salmonea* (ASAHINA & SHIBATA, 1954; KORTEPETER, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 1996; PEREIRA, 1998). Ocorre também em *Rhizocarpon geographicum* (ASAHINA & SHIBATA, 1954) e *Usnea longissima* (MALLAVADHANI *et al.*, 2004).

Este ácido é um depsídeo formado por 2 anéis aromáticos A e B interligados entre si por uma ligação éster. Apresenta uma única diferença no anel B, que contém um grupamento aldeído (PEREIRA, 1998). Possui como propriedades físico-químicas ponto de fusão  $187^\circ$ , dissolve facilmente em éter, etanol, acetona, clorofórmio e benzeno levemente aquecido; dá coloração azul violeta quando adicionado ao cloreto férrico e, reação positiva de homofluorescina com hidróxido de sódio e clorofórmio (ASAHINA & SHIBATA, 1954). Culberson (1969) reporta que o ácido barbático também pode ser chamado de ácido alectórico, rizóico, rizônico, coccelico, coenomicina e cenomicina.

Huneck & Yoshimura (1996) destacam a seguinte estrutura química para o ácido barbático (Figura 01):

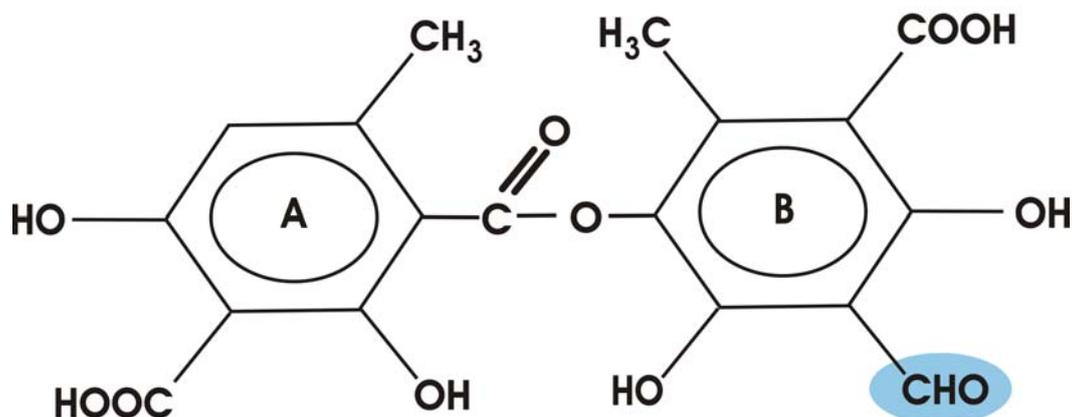


Figura 01. Estrutura química do ácido barbático, segundo Huneck & Yoshimura (1996)

## 1.2 Atividade antimicrobiana

Uma das descobertas terapêuticas mais importantes do século XX foi a dos agentes bacterianos, o que modificou drasticamente o curso de muitas doenças, com redução da mortalidade e morbidade. Porém, os antibióticos estão entre os agentes mais indiscriminadamente prescritos, sendo um fator de

contribuição para o crescimento do problema internacional de resistência bacteriana aos antibióticos (PAGE *et al.*, 1999).

Na busca de novas drogas com potência antibacteriana e antifúngica verifica-se que, além dos microrganismos, outros organismos, tais como algas, fungos, líquens, vegetais superiores e mesmo células animais produzem substâncias antagonistas. Os actinomicetos são responsáveis pela elaboração de mais de 50% de antibióticos; de 10 a 11% são produzidos por bacilos e por fungos imperfeitos (*Aspergillus*); menos de 1% por líquens; 14% por plantas superiores e ainda, cerca de 2% são de origem animal (KURYLOWICZ, 1981).

O uso de líquens na medicina popular não é novidade e pesquisas demonstram que os ácidos liquênicos são ativos contra fungos, bactérias, tumores e células cancerígenas (PEREIRA *et al.*, 1991; 1994 a, b; 1996). São ainda antivirais, analgésicos, antipiréticos (PIOVANO *et al.*, 2002) e antimitóticos (OSWIECIMSKA *et al.*, 1979). Extratos orgânicos de várias espécies de líquens são ativos não somente contra bactérias álcool-ácido resistentes, como *Mycobacterium tuberculosis*, *var. bovis*, *avium* e *hominis* (CAPRIOTTI, 1961; MAIA *et al.*, 2002). Outras espécies são também mencionadas *Ramalina aspera*, por exemplo, produz o ácido úsnico, um potente bactericida (SANTOS *et al.*, 2003).

Vartia (1949) verificou que das 149 espécies de líquens por ele pesquisadas, 75 foram ativas contra o crescimento de várias bactérias Gram-positivas. Relatou que os ácidos pinástrico, pulvínico, divaricático, girofórico, d-protoliquesterínico, d-liquesterínico, atranol, ácido fisódico e ácido úsnico inibiram efetivamente o crescimento de alguns tipos dessas bactérias e fungos.

Linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* foram testados com metabólitos de *Stereocaulon alpinum*, *Peltigera aphthosa* e *Thamnolia subuliformis*. Os metabólitos liquênicos (atranorina, ácidos lobárico, protoliquesterínico, salazínico e úsnico) foram ativos contra *Mycobacterium aurum*, que é um organismo não patogênico, mas possui sensibilidade semelhante ao *M. tuberculosis*. Os resultados foram comparados com drogas antibacterianas como, rifampicina, estreptomicina e isoniazida (INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1985; 1998).

Esimone & Adikwu (1999), utilizaram teste de difusão em disco e Concentração Mínima Inibitória (CMI) para verificar a atividade de compostos liquênicos como, depsídeos, depsídonas, antraceno glicosídeo, proteínas, carboidratos e outros produtos do líquen *Ramalina farinacea* e, obtiveram atividade contra *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans*.

Atividade antimicrobiana, antiviral e citotóxica também foram amplamente analisadas em 69 espécies de líquens da Nova Zelândia, verificando-se a presença de compostos fenólicos nos extratos ativos. Os ácidos úsnico, rangifórmico, estético e atranorina foram testados, pelo método de difusão em

disco, contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, como por exemplo, *Candida albicans*, com extratos orgânicos e substâncias purificadas, com bons resultados para as Gram-positivas. Neste *screening* a *Cladia aggregata* mostrou bons resultados contra o *B. subtilis* (PERRY *et al.*, 1999). Algumas substâncias liquênicas com atividade biológica foram também identificadas em líquens coletados no sul da Espanha, cujos melhores resultados foram obtidos frente a bactérias Gram-positivas (GARCIA *et al.*, 1999).

Piovano *et al.* (2002) testaram os ácidos divaricático, difractáico e lobárico contra 19 microrganismos entre eles *S. aureus* e *E. coli* e vários fungos. Fizeram teste de difusão em disco utilizando 100µL do inóculo ( $10^7$ ) e a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 2.5 a 60mg/mL. Os resultados mostraram que os ácidos foram ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Costa-Filho *et al.* (1991), consideram que o ácido barbático exibiu ação antimicrobiana contra o *B. subtilis*.

A presença de derivados fenólicos nos extratos liquênicos pode ser o determinante na atividade antimicrobiana nos líquens. Shibata *et al.* (1948) estudaram os efeitos da substituição nos anéis A e B do ácido úsnico na ação antibiótica deles. Verificaram que esterificando as duas hidroxilas livres do primeiro anel com o ácido acético, a atividade do ácido úsnico se reduz em 50% sobre *M. tuberculosis avium*. A hidrogenação da dupla ligação, convertendo o ácido úsnico em dihidroúsnico, reduz a ¼ sua capacidade antibiótica. Essas observações indicam que as duas hidroxilas livres (C-8; C-10) no primeiro anel, são fundamentais como suporte da atividade antibiótica do ácido úsnico.

Os mecanismos da ação antibiótica de ácidos liquênicos sugerem que estes compostos modificam a estrutura das proteínas. Essas modificações poderão resultar em alterações de certas capacidades metabólicas das células infectantes (permeabilidade de parede, de membrana e atividade enzimática), causando-lhes, às vezes, alterações irreversíveis e até mesmo conduzindo à morte celular (VICENTE, 1975).

### 1.3 Atividade citotóxica

Os aumentos de câncer no mundo inteiro têm estimulado os pesquisadores a buscar novos caminhos que venham solucionar ou controlar esta patologia. Existem inúmeros produtos farmacêuticos, naturais ou sintéticos, que são destinados ao tratamento do câncer, porém particularidades de cada tipo de tumor e possíveis resistências às drogas quimioterápicas, estimulam os pesquisadores a buscarem novas drogas com atividade antineoplásica (GERAN *et al.*, 1990).

Pesquisas na área da cancerologia experimental são favorecidas através da cultura de células, que é utilizada com sucesso nos testes de citotoxicidade, que permitem investigar a ação direta, bem como os

mecanismos de ação de certas drogas e outros produtos. Este teste é importante, como uma triagem preliminar na pesquisa de drogas antineoplásicas, uma vez que servem de parâmetros para aferir o possível dano causado “*in vitro*”, pois estes experimentos não podem ser aplicados no homem ou em outros animais (CARVALHO, 1996).

Nos experimentos de cancerologia experimental, o teste de citotoxicidade de um certo produto tem como objetivo determinar a concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI<sub>50</sub>), que será utilizada como critério para seleção dos produtos para testes “*in vivo*” (GERAN *et al.*, 1990).

O teste de citotoxicidade permite analisar um elevado número de substâncias naturais, ou de síntese, fornecendo rápidos resultados em um espaço curto de tempo, na pesquisa de fármacos com atividade antitumoral (YOUNG & HALLOWEA, 1973). A aplicação de quimioterápicos liquênicos em culturas de tecidos propiciará a descoberta de análogos, ou mesmo sua produção por via de síntese.

## **2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

Pesquisas para encontrar compostos com propriedades antitumoral e antimicrobiana, produzidos por diversos tipos de organismos vêm sendo conduzidas há mais de 40 anos e, novos compostos têm sido encontrados. Esse interesse aumentou devido ao desenvolvimento de resistência das enfermidades às drogas (COSTAS, 2002).

As pesquisas pioneiras com líquens revelaram sua eficácia medicamentosa no combate à tuberculose pulmonar, úlceras, icterícia e aftas infantis. Posteriormente, detectou-se ação contra o *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* e *Corynebacterium diptheriae* com produtos isolados de várias espécies e com caráter antibiótico (SILVA, 1980).

Além da importância das interações líquen-microrganismo, líquen-planta e líquen-animal, as investigações podem ter significado ecológico sob o ponto de vista comercial, como por exemplo, no desenvolvimento de agentes antimicrobianos, herbicidas e inseticidas (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

No nordeste do Brasil são encontradas diversas espécies de Cladoniaceae, entre elas, *Cladonia substellata*, *C. salzmännii* e *Cladia aggregata*, cujos constituintes podem contribuir para química de produtos naturais, possibilitando o estudo de novos fármacos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

Avaliar o efeito *in vitro* dos extratos orgânicos e substância purificada (ácido barbático) de *Cladia aggregata* (Sw) Nyl sobre microrganismos e células cancerígenas.

#### 3.2 Específicos:

- Verificar as substâncias presentes no talo *in natura* de *C. aggregata*, coletada no município de Bonito – PE.
- Isolar, purificar e identificar o ácido barbático, principal composto de *C. aggregata*.
- Verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos orgânicos e do ácido barbático purificado de *C. aggregata* sobre bactérias Gram-positiva, Gram-negativa e fungo.
- Verificar a atividade citotóxica *in vitro* do extrato etéreo e do ácido barbático purificado sobre células cancerígenas.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAN, E. P.; FLOREY, H. W. Antimicrobial substances from lichen and algae. In: **Antibiotic**. v. 1. p. 566-575, 1949.
- ADAMO, P.; GIORDANO, S.; VINGIANI, S.; COBIANCHI CASTALDO, R.; VIOLANTE, P. Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy). **Environmental Pollution**. v. 122.p. 91-103, 2003.
- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER-FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Byology** . v.7. p. 55-70, 1993.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of lichen substances**, Japan Society for the Promotion of Science, Tokio, 1954. 240p.
- BACKOR, M.; PAULIKOVA, K.; GERALSKA.; DAVIDSON, R. Monitoring of air pollution in kosice (eastern Slovakia) using lichens. **Polish – Journal of Environmental – Studies**. v. 12. p. 141-150, 2003.
- BANFIELD. J. F.; Barker. W. W.; Welch. S. A.; Taunton. A. Biological impact on mineral dissolution: application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. **Proc. Academic Science USA**. v. 30; 96(7). p. 34-3411, 1999.
- BANGUET, B. A. Monograph of foliose lichens. Natural Sciences Research Unit. Monograph. Saint Louis University. 2000.
- CAPRIOTTI, A. The effect of Usno on yeast isolated from the excretion of tuberculosis patients. **Antibiotic Chemotherapy** v. 11(6).p. 409-410, 1961.
- CARVALHO, T. U. M; ATTIAS, M.; CUNHA E SILVA, N. L.; CARVALHO, T. U. **Métodos de estudo da célula. Cultura de células animais**. In: Benchimol, Rio de Janeiro: Editoração eletrônica-Fenorte/VENT. p. 47-58, 1996.
- CAVIGLIA, A. M.; NICORA, P.; GIORDANI; BRUNIALTI, G.; MODENESI, P. Oxidative stress and usnic content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (lichenes). **IL Farmaco**. v. 56. p. 379-382, 2001.
- COSTA-FILHO, L.; OLIVEIRA, A. F. M.; BRASILEIRO, V. L. F.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H. Contribuição ao estudo do controle biológico de *Dysdercus maurus*, através de substâncias líquênicas. **Resumos de IV Congresso Nordeste de Ecologia**, Sociedade Nordeste de Ecologia, Recife. p. 36, 1991.
- COSTAS, M. C. C. D. **Aspectos Farmacológicos de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae: atividade antimicrobiana, citotóxica e antitumoral**. 2002. 124p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Departamento de Ciências Biológicas. UFPE.
- CULBERSON, C. F. **Chemical and botanical guide to lichen products**. The University of North Carolina Press: Chapel Hill. 1969. 348p.

ESIMONE, C. O.; ADIKWU, M. U. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. **Fitoterapia**. v. 70. p. 428-431, 1999.

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 Bonaerense**, v. 21. p. 43-49, 2002.

FILSON, R. B. A revision of the lichen genus *Cladia* Nyl. **J. Hattori Botanic Laboratory**. v. 49. p 1-75, 1981.

GARCIA, R. J.; GARCIA, G. M. D.; SAENS, R. M. T. Some lichen products have antimicrobial activity. **Laboratory of Vegetal Biology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain**. p. 605-609, 1999.

GERAN, R. H.; GREENBERG, G. N. H. Protocol for screening of agent and natural products against animal tumors and other biological system. **Cancer Chemoterapy Reports**, v. 3. p. 1-103, 1990.

GUIDOTTI, M.; STELL, D.; OWCZAREK, M.; DE MARCO, A.; DE SIMONE, C. Lichens as polycyclic bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. **Journal of Chromatography**. v. 985. p. 185-190, 2003.

GUZMÁN.; XAVIER-FILHO.; PEREIRA, E. C. Flujo de nutrientes em comunidades de tundra antártica. **Boletín Antartico Chileno**, Santiago. v. 4. p. 82-84. 1984.

HALE-Jr., M. E. **The biology of lichens**. 3ed. London: Edward Arnold Pub., 1983. 90p.

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

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. **Identification of lichen substances**. 1996. 492p.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; BLOOMFIELD, S.; HYLANDS, P. J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 28 p. 289-292, 1985.

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

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

KORTEPETER, S. A. Lichen speciation in the section Cocciferae: *Cladonia incrassata* and *Cladonia cristatella*. **Journal Undergrad Science**. v. 3. p. 71-73, 1996.

KURYLOWICZ, W. **Antibióticos: uma revisão crítica**. Recife, Brasil, Universidade Federal de Pernambuco. 1981. 341p.

LLANO, G. A. **Economic uses of lichens**. Smithsonian Institution Publ. v. 4040. p. 385-422, 1951.

LIMA, R. M. C.; NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. **Boletim da Sociedade Broteriana** v. 63. p. 339-348, 1990.

LOPPI, S.; RICCOBONOA, F.; ZHANGB, Z. H.; SAVICC, S.; IVANOVD, D.; PIRINTSSOSE, S. A. Lichen as biomonitors of uranium in the Balkan area. **Environmental Pollution**. v. 125 (2). p. 277-280, 2003.

MAIA, M. B. S. ; SILVA, N. H.; SILVA, E. F.; CATANHO, M. T. J.; SCHULER, A. R. P.; PEREIRA, E. C. Anticonceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from lichen *Cladina dendroides* (des. Abb) Ahti. **Acta Farm. Bonaerense**. v. 21. p. 259-264, 2002

MALLAVADHANI, U.V.; SUDHAKAR, A. V. S.; MAHAPATRA, A., NARASIMHAN, K.; THIRUNAVOKKARASU, M.; ELIX, J. A. Phenolic and steroidal constituents of the lichen *Usnea longissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 32. p. 95-95, 2004.

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

ÓSWIECIMSKA, M.; SENDRS, J.; JANECZKO, Z. Antimitotic activity of some *Cladonia species* native in Poland. **Herba Polonica**. v. 25. p. 317-322, 1979.

PAGE, C. P.; CURTIS, M. J.; SUTTER, M. C.; WALKER, M. J. A. HOFFMAN, B. B. **Farmacologia integrada**. Ed. Manole Ltda: São Paulo. 1999. 606 p.

PEREIRA, E. C. G.; CAMPOS-TAKAKI, G.; SILVA, N. H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E.;XAVIER-FILHO, L. Fractionation of *C. substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. **Boletim da Sociedade Broteriana Portugal**. v. 64. p. 173-186, 1991.

PEREIRA, E. C.; NESCIAMENTO, S. C.; LIMA, R. M. C. SILVA, N. H.; OLIVEIRA, A. F. M.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENTE, C.; LEGAZ, ME. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tokai Journal of Experimental and Clinic Medicine**. v. 19. n. 12. p. 47-52. 1994a.

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; Alcântara, S. R.; LIMA, R. C. Atividade citotóxica e antitumoral de *Himantormia lugubris* e *Ramalina sp* (liquens). **Resumos do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Fortaleza, CE. p. 168-1994b.

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

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; XAVIER –FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Antimicrobial activity of biologically active compounds from the lichen *Cladonia crispatula*. **Boletín Ecotropical Ecosistema Tropicales**. v. 31, 1997.

PEREIRA, E. C. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae (líquen), a partir de imobilização celular**. 1998. 240f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, 1998.

PEREIRA, E. C. **Biologia de Liquens**. 2000. 22p.

PERRY, N. B.; BENN, M. H.; BRENNAN, N. J.; BURGESS, E. J.; ELLISS, G.; GALLOWAY, D. J.; LORIMER, S. D.; TANGNEY, R. S. Antimicrobial, antiviral and citotóxica activity of New Zeland lichen. **Lichenologist**. v. 31 (6). p. 627-636, 1999.

PIGNATA, M. L.; GUDIÑO, G. L.; WANNAZ, E. D.; PLÁ, R. R.; GONZÁLEZ, C. M.; CARRERAS, H. A.; ORELLANA, L. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. **Environmental Pollution**. v. 120.p. 59-68, 2002.

PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; GIANNINI, F. A.; CORRECHE, E. R.; FERESIN, G.; TAPIA, A.; ZACCHINO, S.; ENRIZ, R. 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.

PRIETO, B.; SILVA, B.; RIVAS, T.; WIERZCHOS, J.; ASCASO, C. Mineralogical transformation and neoformation in granite caused by lichens *Tephromela atra* and *Ochrolechia parela*. **International Biodeterioration e Biodegradation**. v. 40. p. 191-199, 1997.

PURVIS, O. W.; COPPINS, B. J.; JAMES, P. W. Checklist of lichens of Great Britain and Ireland. British Lichen Society **Bulletin NO. 72** (supplement). 1993.

RANCAN, F.; ROSAN, S.; BOEHM, K.; FERNÁNDEZ, E.; HIDALGO, M. E.; QUIHOT, W.; RUBIO, C.; BOEHM, F.; PIAZENA, H.; OLTMANN, U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 68. p. 133-139, 2002.

RAVEN, P.H.; EVERT, R. F & EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.; 2001, p. 323-329.

REIS, M. A.; ALVES, L. C.; FREITAS, M. C.; OS VAN, B.; GOEIJ, J.; WOLTERBEEK, H. TH. Calibration of lichen transplants considering faint memory effects. **Environmental Pollution**. v. 120. p. 87-95, 2002.

RIBEIRO, S. M.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; FALCÃO, E. P.; GUSMÃO, N. B.; HONDA, N. K.; QUILHOT, W. Detection of antibacterial activity of lichen substances through microdilution tests. In: **Lichenology in Latin American II**. S. Calvelo & T. Feuere (Eds.). Hamburg, Alemanha. p. 187-194, 2002.

SANTOS, N. P.; WANDERLEY, M. S. O.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; NASCIMENTO, N. C. HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. In vitro and in vivo antitumoral activity of nanocapsules containing usnic acid. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, 39, p. 238, 2003.

SHIBATA, S.; UKITA, T.; TAMURA, T.; MIURA, Y. Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and derivatives. **Jap. Med. J.** v. 1. p. 152-155, 1948.

SILVA, O. E. **Estudo químico de liquens constituintes do *Teloschistes flavicans***. Dissertação (Mestrado em bioquímica). 1980. 100f. Universidade Federal de Pernambuco, 1980.

SILVA, J. O.; LEITE, J. E. M.; PAULO, M. Q.; FILHO, L. X. Atividade antimicrobiana de liquens brasileiros – I. **Boletim da Sociedade Broteriana**. v. 59. p. 87-96, 1986.

STENROOS, S. The family Cladoniaceae in Melanésia. 4. The genera *Cladia*, *Cladina*, *Calathaspis* and *Thysanothecium*. **Annals Botannici Fennici**. v. 25 p. 207-217, 1988.

VARTIA, K. O. Antibiotics in lichens I. **Annals Medicine Experimental Biologic Fennici** v. 27 (1). p. 46-54, 1949.

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

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; REDDY, M. K.; PARVATHAVARTHIM, S.; KANDU & SUKUMAR, E. Antiinflammatory activity of (+) – usnic acid. **Fitoterapia**, v. 71, p. 564-566, 2000.

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

YAMAMOTO, Y.; MATSUBARA, H.; KINOSHITA, Y.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHAHI, I. Naphthazarin derivatives from cultures of the lichen *Cladonia cristatella*. **Phytochemistry**. v. 43. p. 1239-1242, 1996.

YOUNG, S.; HALLOWEA, R. C. Tumors of mammary glands. In: Pathology of tumors in laboratory animals .v 1. pt. 1 lyon: World Heath. **Organization Archives Scientific Publication**. v.1. n. 5. p. 31-55, 1973.

## **5. Artigos submetidos à publicação**

## **5.1 Capítulo I**

**Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos orgânicos e ácido barbático purificado de *Cladia Aggregata* (Sw.) Nyl.\***

**Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos orgânicos e ácido barbático purificado de *Cladia Aggregata* (Sw.) Nyl.\***

Mônica, C. B. Martins<sup>1</sup>; Marcio. J. G. de Lima<sup>1</sup>; Nicácio, H. da Silva<sup>1</sup>; Eugênia, C. Pereira<sup>2</sup>; Eulália, Azevedo-Ximenes<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica; <sup>2</sup> Departamento de Ciências Geográficas; <sup>3</sup> Departamento de Antibióticos. Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. Cep: 50.740-530, Recife-PE, Brasil.

**RESUMO** – (Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos orgânicos e ácido barbático purificado de *Cladia Aggregata* (Sw.) Nyl.). Com o objetivo de avaliar a atividade biológica *in vitro*, os extratos orgânicos e substância purificada (ácido barbático) de *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. foram testados frente a microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos. Os extratos orgânicos foram obtidos a partir do talo liquênico *in natura*, através de extrações por esgotamento a frio e a quente com éter, clorofórmio e acetona. O ácido barbático foi purificado a partir de 1,421g do extrato etéreo obtido a quente. Os extratos orgânicos e o ácido barbático purificado foram submetidos a cromatografias em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados demonstraram eficácia dos extratos orgânicos e do BAR frente a *Staphylococcus aureus*. O método de extração não (frio e quente) não influenciou na atividade antimicrobiana. Foi observado nos biocromatogramas, sinergismo entre as substâncias. A CMI detectada foi satisfatória, ficando entre 200-50µg/mL, valor inferior a outras substâncias liquênicas bioativas. Esses dados atribuem ao ácido barbático de *C. aggregata* eficácia contra microrganismos patogênicos.

**PALAVRAS – CHAVE:** líquen, atividade biológica, *Staphylococcus aureus*

**ABSTRACT** – (Antimicrobial activity *in vitro* of crude extracts and barbatic acid from *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.). The effect of the biological activity *in vitro* of crude extracts and barbatic acid extracted and purified from *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl about *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* was evaluated. The crude extracts were obtained through cold and hot exhaustion extractions with ether, chloroform and acetone. The barbatic acid, however, was purified starting from 1,421g of ethereal extract obtained from hot extraction. Being, both, the samples were submitted chromatographies in thin layer (TLC) and liquid performance high (HPLC). The results observed through disk test in diffusion, biochromatogram and MIC, demonstrated, both crude extracts and barbatic acid were active against *S. aureus* lineages. The extraction methods did not influence in the antimicrobial activity of the tried samples. There was synergism among substances submitted to biochromatogram. The CMI values stayed input 200-50µg/mL. It was assigned to the barbatic acid the principle enable of the species.

**KEY-WORDS:** biological activity, *Staphylococcus. aureus*, lichen.

## Introdução

Os líquens são conhecidos e usados desde a antiguidade contra diversas enfermidades (Silva *et al.*, 1986). São, portanto, usados como plantas medicinais (Falcão *et al.*, 2002). Seus metabólitos são ativos contra fungos e bactérias (Piovano *et al.*, 2002; Ingólfssdóttir, 2002), tumores e células cancerígenas (Pereira *et al.*, 1994) e antiinflamatórios (Vijayakumar *et al.*, 2000), além de serem considerados bons filtros solares (Rancan *et al.*, 2002).

As pesquisas pioneiras com líquens revelaram sua eficácia medicamentosa no combate a tuberculose pulmonar, úlceras, icterícia e aftas infantis. Posteriormente, detectou-se ação contra o *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* e *Corynebacterium diphtheriae* com produtos isolados de várias espécies e com caráter antibiótico (Silva, 1986).

A presença de derivados fenólicos nos extratos liquênicos pode ser determinante na atividade antimicrobiana nos líquens. Shibata *et al.* (1948) estudaram os efeitos da substituição nos anéis A e B do ácido úsnico, verificando que esterificando as duas hidroxilas livres do primeiro anel com o ácido acético, a atividade do ácido úsnico se reduz em 50% sobre *Mycobacterium tuberculosis avium*. A hidrogenação da dupla ligação, convertendo o ácido úsnico em dihidroúsnico, reduz a ¼ sua capacidade antibiótica. Essas observações indicam que as duas hidroxilas livres (C-8; C-10) no primeiro anel são fundamentais como suporte da atividade antibiótica deste ácido. (Honda & Vilegas, 1999).

Os mecanismos da ação antibiótica de ácidos liquênicos sugerem que estes compostos modificam a estrutura das proteínas. Essas modificações poderão resultar em alterações de certas capacidades metabólicas das células infectantes (permeabilidade de parede, de membrana e atividade enzimática), causando-lhes, às vezes, alterações irreversíveis e até mesmo conduzindo à morte celular (Vicente, 1975).

No nordeste do Brasil são encontradas diversas espécies de Cladoniaceae, entre elas, *Cladonia substellata*, *C. salzmännii* e *Cladia aggregata*, cujos constituintes podem contribuir para química de produtos naturais, possibilitando o estudo de novos fármacos.

Este trabalho objetivou verificar e avaliar a atividade biológica dos extratos orgânicos de *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. procedente do município de Bonito - PE e a substância purificada de seu talo, o ácido barbático, contra microrganismos patógenos ao homem.

## Materiais e Métodos

**Material liquênico: coleta e armazenamento:** cerca de 500g de *C. aggregata* (Sw.) Nyl. foram coletados no município de Bonito -PE, no mês de Novembro de 2003. O líquen foi acondicionado em sacos de papel e conservado à temperatura ambiente (28 ° C ± 3° C) até a realização dos testes. A espécie

foi identificada pela Dr<sup>a</sup> Eugênia Pereira, a partir de caracteres morfológicos e químicos do talo, no laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco. A exsicata se encontra depositada no Herbário da UFP da Universidade Federal de Pernambuco, sob o registro nº 36431.

### **Obtenção dos extratos orgânicos do talo**

**Extração por esgotamento a frio:** 50g do talo de *C. aggregata* limpo, foram triturado em almofariz e, a partir dos solventes orgânicos (250mL) éter, clorofórmio e acetona, foram submetidos a duas extrações sucessivas em agitador mecânico, obedecendo à série eluotrópica. Após 24 horas em repouso no refrigerador, os extratos foram filtrados, concentrados, pesados e mantidos em dessecador (Pereira *et al.*, 1996).

**Extração por esgotamento a quente:** 50g do talo de *C. aggregata* limpo, foram triturados conforme a metodologia anterior e, então foram submetidos a duas extrações sucessivas em aparelho Soxhlet, a temperatura de ebulição dos solventes, durante 8 horas. Os extratos obtidos foram concentrados, pesados e mantidos em dessecador (Pereira *et al.*, 1996).

**Isolamento e purificação do ácido barbático:** o talo da *C. aggregata* apresenta como composto principal o ácido barbático que foi isolado e purificado a partir do extrato etéreo, obtido por extração a quente conforme metodologia anterior. Este depois de concentrado até a secura, foi lavado em funil poroso G-4, com clorofórmio (4x), de acordo com Asahina & Shibata (1954).

**Cromatografia em camada delgada (CCD):** foi utilizada cromatografia em camada delgada (CCD) para detecção qualitativa dos compostos fenólicos predominantes no talo *in natura* e o ácido barbático purificado de *C. aggregata*. Amostras foram diluídas em seus respectivos solventes, sendo aplicadas em placas de sílica Gel 60 F<sub>254</sub> + <sub>366</sub>Merk de 20cm x 20 cm, e desenvolvidos de forma ascendente no sistema de solventes A (tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5, v/v). Após evaporação dos solventes, as bandas foram visualizadas sob luz UV curta (256 nm) e longa (366 nm). Posteriormente as placas foram borrifadas com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 80° C por 40min, para que fossem evidenciadas as bandas por reação de coloração, segundo Culberson (1972). Os resultados foram avaliados mediante cálculo dos valores de R<sub>f</sub>, que foram comparados ao padrão utilizado (ácido barbático).

**Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC):** os extratos orgânicos e o ácido barbático isolado do talo foram submetidos a CLAE. Os extratos orgânicos e o ácido barbático purificado foram diluídos na fase móvel (metanol/água/ácido acético, 80:19,5:0,5 v/v) a 0,1 mg/mL para a substância pura e 1,0mg/mL para os extratos orgânicos, filtrados em filtros millipore (diâmetro do poro-0,45µm) e previamente degaseificado. As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado a um detector de UV a 254nm, sob um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20µL, atenuação de

0,04 e temperatura ambiente de  $25 \pm 3$  °C. Foi utilizada coluna de fase reversa C18, com desenvolvimento isocrático da análise, segundo metodologia de Legaz & Vicente (1983). Foi utilizado o ácido barbático como padrão e os resultados foram avaliados mediante área dos picos e tempo de retenção das substâncias na coluna.

### **Testes *in vitro***

**Preparação dos meios cultura e dos inóculos dos microrganismos:** o meio Mueller – Hinton foi utilizado para o crescimento das bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e o Sabouraud para levedura (*Candida albicans*). Os meios líquidos foram utilizados para os inóculos dos microrganismos e os sólidos para manutenção das culturas e avaliação da atividade antimicrobiana. Ambos foram preparados segundo as instruções dos fabricantes e esterilizados em autoclave por 15 min a 121° C. Essas culturas foram diluídas em 5 mL de água destilada, sendo sua opacidade ajustada segundo o tubo 0,5 da escala de MacFarland, o que equivale a  $10^7$  UFC/mL.

**Preparação das placas e semeio dos microrganismos:** as placas de Petri (90 mm), previamente esterilizadas em estufa a 180° C por 1h:50 min, receberam 18 mL dos meios sólidos Mueller-Hinton ou Sabouraud e colocadas em superfície plana por 24h e verificação de contaminação. Com auxílio de *swabs*, os microrganismos padronizados foram semeados por esgotamento em toda a superfície das placas. Em seguida, os discos de papel foram impregnados com os extratos orgânicos e substância purificada sendo depositados na superfície do meio sólido. As placas foram incubadas por 24 h a 37° C.

**Atividade antimicrobiana:** os testes qualitativos foram realizados através do teste em difusão em disco em meio sólido. Placas de Petri (90 mm) contendo 5mL de meio Agar Mueller – Hinton, para bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e Sabouraud para a levedura (*Candida albicans*), foram inoculadas com 500 µL da suspensão dos microrganismos teste a  $10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup>, segundo Bauer *et al.* (1966). Discos de papel de 6,0 mm foram impregnados com 21 µL das soluções de cada extrato (éter, clorofórmio e acetona) ou a substância purificada, ácido barbático (BAR), a uma concentração de 43mg/mL, sendo depositadas sobre o meio previamente inoculado. As placas foram incubadas a 37° C, para bactérias e leveduras, por 24 horas. Os resultados foram obtidos através da mensuração das zonas de inibição formadas ao redor dos discos, expressos em milímetros (mm).

**Biocromatogramas:** os microrganismos mais sensíveis no teste de disco foram selecionados, sendo inoculados em meio Mueller-Hinton, 20 antes e, em seguida incubados a 37° C, por 24h.

Os extratos ativos e o ácido barbático purificado no ensaio de disco foram submetidos à cromatografia de camada delgada (CCD), desenvolvida segundo a metodologia de Culberson (1972), utilizando o sistema de solventes A (tolueno/dioxano/ácido acético, 180/45/5 v/v). Foi utilizado como padrão o ácido barbático. Os cromatogramas resultantes foram depositados em placas de Petri e, sobre eles, o meio com

microrganismo previamente inoculado, segundo o método de Homans & Fuchs (1970), modificado por Costa-Filho *et al.* (1991).

Os resultados foram avaliados mediante formação de halo inibitório ao redor da substância separada por CCD, que foi ativa contra microrganismo testado.

**CMI:** para os testes quantitativos, os ensaios foram realizados através do teste Concentração Mínima Inibitória (CMI), descrito por Courvalin *et al.* (1985), em linhagens previamente selecionadas no *screening* anterior. As culturas dos microrganismos teste foram incubadas por 18 h em 5mL de meio líquido de Mueller-Hinton, sendo diluídas em novo meio a fim de obter a turbidez adequada, o que equivale ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, ( $10^7$  UFC/ mL). As placas de Petri foram preparadas com 18mL de Mueller-Hinton sólido e com diluições do ácido barbático purificado, em 9 partes, a uma concentração inicial de 2mg/mL. Os microrganismos selecionados foram semeados com *swabs* e, então as placas incubadas por 24 h a 37° C. A CMI foi definida como a menor concentração da droga na qual não foi observado crescimento visível de microrganismo.

## Resultados e Discussão

O rendimento em percentual para as extrações orgânicas por esgotamento a frio e a quente está descrito na tabela 01. Nela verifica-se que a extração por esgotamento a quente apresenta um rendimento total superior em relação à outra extração.

O ácido barbático purificado a partir do extrato etéreo a quente mostrou um rendimento de 2,84%. Segundo Hale-Jr (1983) e Nash III (1996), a concentração dos ácidos liquênicos podem variar de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo sendo, em alguns casos, com valores mais altos. Vartia (1949), observou teores diferentes de ácidos em espécies liquênicas, tais como: *Parmelia tinctorum* com 23,5% de ácido lecanórico; *Lepraria chlorina* com 10.5% de ácido pulvínico; *Alectoria ochroleuca* com 5.5% de ácido úsnico; 0,9 de ácido barbático em *Cladonia submedusina* (encontrada na Amazônia) e 14,2 de ácido barbático em *C. hokkaidensis* (Huovinen & Ahti, 1986). Kortepeter (1996), encontrou um percentual de 0.7% de ácido barbático em *C. incrassata*

Segundo Ahti *et al.* (1993) em *C. aggregata* há predominância do ácido barbático, podendo também, ser verificada a presença de outras substâncias, como por exemplo, os ácidos nortístico, estítico, fumarprotocetrárico entre outros, dependendo das áreas de ocorrência. Porém, os autores consideram como quimiotipo dos indivíduos ocorrentes no Brasil espécimes com o ácido barbático, como por exemplo, a *Cladonia didyma* encontrada do Amazonas ao Rio Grande do Sul, a *C. miniata* de Sergipe e a *C. salzmännii* da Paraíba e Pernambuco. Houvinen & Ahti (1986) relatam ainda que líquens do gênero

*Cladonia* apresentam como substância medular mais freqüente os ácidos barbático, esquamático, tamnólico e úsnico.

Nas extrações em éter, clorofórmio e acetona de ambos os extratos orgânicos de *C. aggregata* observa-se a presença dos ácidos barbático (Rf – 29). Os extratos etéreos das duas extrações merecem destaque, uma vez que apresentam bandas quase que exclusivamente deste ácido, além do D-barbático; os extratos clorofórmicos apresentaram além do ácido barbático, duas bandas não identificadas. Os extratos acetônicos apresentaram um maior número de compostos fenólicos, provavelmente os ácidos fumarprocetrário (Rf – 7,5), estítico (Rf -11), nortístico (Rf – 46) e duas não identificadas Rf – 73 e 74), como demonstrados no cromatograma em camada delgada (Fig. 01).

Os extratos orgânicos obtidos por esgotamento a frio e a quente, assim como a substância purificada (BAR), foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e apresentaram picos correspondentes ao ácido barbático padrão (Tr 17min). O BAR extraído e purificado de *C. aggregata* foi detectado pela CLAE em 22.9 min. e seu percentual de pureza foi de 96.3 (Fig.02).

Os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico obtidos a frio e a quente apresentaram-se diversificados, com picos correspondentes a outros compostos fenólicos não identificados. Apesar de estar presente em todos os extratos, o ácido barbático foi extraído com mais eficiência com éter e clorofórmio devido a sua polaridade ser mais adequada a estes solventes (Fig.03 e 04).

Esses métodos de análise são usados com sucesso para detectar todas as classes químicas de substâncias aromáticas, trazendo resultados ótimos e rápidos, detectando, portanto, com eficiência fenóis de líquens. Juntos, CLAE e CCD são geralmente precisos para o *screening* qualitativo e quantitativo, respectivamente, dos principais compostos aromáticos liquênicos, como por exemplo os dos gêneros *Cladina* e *Cladonia* (Huovinen, *et al.*, 1985). O ácido fumarprocetrário de *C. verticillaris* e atranorina, de *C. sandstedei*, por exemplo, foram detectados de suas respectivas espécies por Xavier-Filho (1984; 1985) entre 4.2 e 5.0, respectivamente.

Os extratos orgânicos e o BAR purificado foram submetidos a testes de difusão em disco em meio sólido contra microrganismos. Os resultados demonstraram que os extratos orgânicos e o ácido barbático não apresentaram atividade contra os microrganismos Gram-negativos e os fungos, entretanto formaram halo de inibição contra as linhagens bacterianas Gram-positivas de *S. aureus* (Tab.02).

De acordo com a tabela 03 os extratos orgânicos a frio demonstraram halos de inibição superiores quando comparados com os extratos a quente, destacando-se o extrato clorofórmico a frio (Fig. 05, 06, 07, 08). O ácido barbático purificado parcialmente solubilizado em água apresentou halo de inibição maior que todas as outras amostras testadas (Fig. 09, 10).

Substâncias liquênicas, especialmente os fenóis, são estudadas e testadas há décadas. Vartia (1949), verificou a inibição efetiva do crescimento de microrganismos Gram-positivos e fungos testados com os ácidos liquesterínico, pinástrico, pulvínico, girofórico, d-protoliquesterínico, d-liquesterínico, divaricático, atranol, fisódico e úsnico.

Metabólitos liquênicos de *Stereocaulon alpinum*, *Peltigera aphthosa* e *Thamnolia subuliformis*, com destaque para o  $\beta$ -metil orselinato, foram também ativos contra linhagens de *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *E. coli* e *Aspergillus niger*. Os melhores resultados foram obtidos a partir dos extratos clorofórmico e acetônico contra as bactérias Gram-positivas, e os fungos, *C. candida* e *A. niger* (Ingólfssdóttir *et al.*, 1985).

Exemplos brasileiros de substâncias liquênicas ativas são encontrados nas *Cladonia substellata* e *C. crispatula* de Santa Rita e Alhandra (PB), respectivamente, que possuem grande quantidade de ácido úsnico, um metabólito de importância e relevante atividade contra microrganismos. Este ácido foi ativo não só contra bactérias, mas também contra fungos (Pereira *et al.*, 1991; 1996; 1997). O mesmo aconteceu com algumas espécies predominantemente de Pernambuco, que também apresentaram inibição contra *E. coli*. Outras espécies dos gêneros *Parmelia*, *Ramalina* e *Pseudocyphellaria* tiveram seus extratos testados com comprovada eficácia contra *S. aureus*, através de teste de disco, com um percentual de 92% de inibição e halos variando entre 11 e 25mm (Silva *et al.*, 1986; 1987).

Testes de difusão em disco com substância extraída *Ramalina farinacea*, entre elas, depsídeos, depsidonas, derivado de antraceno, proteínas e carboidratos, dissolvidos em éter, clorofórmio e água apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica (Esimone & Adikwu, 1999). Perry *et al.* (1999) testaram ácidos liquênicos de diversos gêneros e observaram que os ácidos úsnico, rangifórmico, estético e atranorina, além de extratos orgânicos, apresentaram atividade sobre as linhagens de bactérias Gram-positivas e negativas, além de fungos. Os gêneros *Cladia*, *Cladonia*, *Stereocaulon* e *Usnea* foram os que tiveram alta atividade antimicrobiana. A *C. aggregata* procedente da Bahia mostrou resultados satisfatórios contra o *Bacillus subtilis* (Costa-Filho, *et al.*, 1991).

Pesquisas recentes com testes em discos com 19 microrganismos, entre eles *S. aureus* e *E. coli* utilizando 100 $\mu$ L do inóculo ( $10^7$ ), demonstraram que os ácidos divaricático, difractático e lobárico foram ativos contra bactérias Gram-positivas (Piovano *et al.*, 2002). Ingólfssdóttir (2002) também destaca a atividade do ácido úsnico contra microrganismos.

Drogas liquênicas ativas, como atranorina e os ácidos lobárico, protoliquesterínico, salazínico e úsnico já foram comparadas com antibióticos comprovadamente eficazes, tais como rifampicina, estreptomicina e isoniazida (Ingólfssdóttir, *et al.*, 1998).

Os extratos liquênicos, etéreo, clorofórmico e acetônico obtidos por esgotamento a quente, bem como o ácido barbático purificado, foram submetidos a biocromatogramas contra duas linhagens de *Staphylococcus aureus*, SAIC 155 e uma multi resistente. Os resultados observados nas figuras 11 e 12 demonstram o halo de inibição ao redor dos pontos de aplicação, com possível sinergismo das substâncias testadas, tendo em vista que os extratos orgânicos apresentam outras substâncias ativas além do ácido barbático.

Estes resultados são também observados por Falcão *et al.* (2002), cujos extratos etéreos, clorofórmico, acetônico e ácido úsnico e difractáico foram ativos contra microrganismos Gram-positivos. Outros microrganismos Gram-positivos, como *S. aureus* e, Gram-negativos como *E. coli*, assim como *Xanthomonas campestris pv. campestris* e *Ralstonia solonacearum bv.* também foram testados por Ribeiro *et al.* (2002), que observaram atividade dos extratos etéreos e clorofórmicos, atribuindo-se a atividade biológica positiva aos ácidos divaricático e homosequicáico.

Os testes quantitativos, que determinam a concentração inibitória mínima (CMI), foram realizados com as linhagens de *S. aureus* multi resistentes (311, 155 e 404). As diluições da droga purificada (ácido barbático) foram feitas em nove partes (v/v), partindo de uma concentração de 200 - 0,78 µg/mL, dissolvido em acetona pura.

De acordo com as figuras 13 e 14 as concentrações, que variaram de 200µg/mL a 100µg/mL não demonstraram crescimento bacteriano para as linhagens multi resistente, 311 e 155. Apenas a linhagem 404 apresenta um discreto crescimento na concentração de 100 µg/mL (figura 14) e crescimento normal na concentração de 50 µg/mL (Fig. 15). Na concentração de 25 µg/mL foi observado crescimento normal para todas as linhagens de *S. aureus* testadas (Fig. 16). O crescimento bacteriano foi observado na placa controle, o que possibilita dizer que o solvente não influenciou nos resultados obtidos (Fig. 17).

Substâncias isoladas dos líquens *Stereocaulon alpinum* e *Peltigera aphosa*, como o metil-β-orselinato (produto da hidrólise da atranorina), o metil orselinato e o etil orselinato, respectivamente, também foram ativos contra bactérias Gram-positivas, *Candida albicans* e *Arpergillus niger*, onde os resultados da CMI se apresentaram entre 80 e 160 µg/mL para o β-orselinato e 160 a 500 µg/mL para a mistura do etil, metil-orselinato. Para *Pseudomonas aeruginosa*, os valores ficaram entre 30 e 40 µg/mL para o β-metil orselinato e 200 a 260 µg/mL para a mistura (Ingólfssdóttir *et al.*, 1985).

Seleção *in vitro* contra *Mycobacterium aurum* (organismo não patogênico, mas com sensibilidade similar ao *M. tuberculosis*) testado com ácido úsnico de *Cladonia arbuscula* exibiu CMI com valores de 32 µg/mL e atranorina e ácido lobárico, extraídos de *Stereocaulon alpinum*, o ácido salazínico de *Parmelia saxatilis* e ácido protoliquesterínico de *Cetraria islandica* mostraram valores de CMI ≥ 125 µg/mL (Ingólfssdóttir *et al.*, 1998).

Os extratos de *Ramalina farinacea* foram testados contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Salmonella typhi*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, e a CMI variou entre 90 e 650 µg/mL. Os melhores resultados foram contra a *T. mentagrophytes* com CMI de 97.7 µg/mL (Esimone *et al.*, 1999). Também os ácidos divaricático e difractáico, cuja CMI ficou entre 17-15µg/mL e 50µg/mL respectivamente, mostraram-se ativos contra bactérias Gram-positivas (Piovano *et al.*, 2002).

Também recentemente testes com ácido úsnico extraído de *Cladonia substellata* contra várias linhagens de *S. aureus*, demonstraram que a CMI ficou entre 7 e 30µg/mL (Duarte, 2002).

Como esta apresentado na tabela 04, testes antimicrobianos utilizando-se diferentes fenóis são ativos contra vários microrganismos, no entanto, apenas os ácidos úsnico, divaricático e difractáico e β-orselinato demonstraram valores de CMI inferiores ao do ácido barbártico extraído e purificado de *C. aggregata*.

Portanto, os dados demonstram a eficácia dos extratos orgânicos e BAR purificado de *C. aggregata* contra *S. aureus*, inclusive em baixas concentrações.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela realização deste trabalho.

## Referências bibliográficas

Ahti, T.; Stenroos, S.; Xavier-Filho, L. 1993. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Biology** 7: 55-70.

Asahina, Y.; Shibata, S. 1954. **Chemistry of lichen substances**, Japan Society for the Promotion of Science, Tokio.

Bauer, A.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Truck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology** 45: 497-6.

Courvalin, P.; Glodstein, F.; Philippon, A.; Sirot, L. 1985. **L'Antibiogramme**. 1<sup>a</sup> ed: Paris. p. 195-198..

Costa-Filho, L. O.; Oliveira, A. F. M.; Brasileiro, V. L. F.; Pereira, E. C.; Silva, N. H. 1991 Contribuição ao estudo do controle biológico de *Dysdercus maurus*, através de substâncias liquênicas. Resumos do IV Congresso Nordestino de Ecologia. **Sociedade Nordestina de Ecologia** 36.

Culberson, C. F. J. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. **Chromatog.** 72: 133-25.

Duarte, B. R. 2002. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de ácido úsnico com sua forma nanocapsulada**. 40p. (Dissertação Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Pernambuco.

Esimone, C. O.; Adikwu, M. U. 1999. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. **Fitoterapia** 70: 428-431.

- Falcão, E. P.; Silva, N. H.; Gusmão, N. B.; Ribeiro, S. M.; Honda, N. K.; Pereira, E. C. 2002. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farma Bonaerense** **21**: 43-49.
- Hale-Jr., M. E. 1983. **The biology of lichens**. 3ed. London: Edward Arnold Pub.
- Homans, A. L.; Fuchs, A. 1970. Direct bioautography on thin layer, cromatograms as method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography** **51**: 327-329.
- Honda, N. K.; Vilegas, W. 1999. A. **Química de Liquens**. Química Nova **22** (1): 25-55.
- Huovinen, K.; Hiltunen, R.; Schantz, M. 1985. A high performance liquid chromatographic method for the analysis of lichen compounds from the genera *Cladina* and *Cladonia*. **Acta Pharma Fennici** **94**: 99-112.
- Huovinen, K.; Ahti, T. 1986. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia*, section Unciales. **Annais Botanica Fennici**. **23**: 173-188.
- Ingólfssdóttir, K.; Bloomfield, S.; Hylands, P. J. 1985. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **28**: 289-292.
- Ingólfssdóttir, K.; Chung, G. A. C.; Skúlason, V. G.; Gissurarson, S. R.; Vilhelmsdóttir, M. Antimicrobial activity of lichen metabolites in vitro. 1998. **European Journal of Pharmaceutical Science** **6**: 141-144.
- Ingólfssdóttir, K. 2002. Molecules of interest usnic acid. **Phytochemistry** **61**: 729-736.
- Kortepeter, 1996. S. A. Lichen speciation in the section Cocciferae: *Cladonia incrassata* and *Cladonia cristatella*. **Journal Undergrad. Science** **3**: 71-73.
- Legaz, M. E.; Vicente, C. 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prusnastri* thallus. **Plant Physiology** **71**: 300-302.
- Nash III, T. H. 1996. **Lichen Biology**. Cambrige, USA, Cambridge University Press led.
- Pereira, E. C. G.; Campos-Takaki, G.; Silva, N. H.; Vicente, C.; Legaz, M.E.;Xavier-Filho, L. 1991. Fractionation of *C. substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. **Boletim Sociedade Broteriana** **64**: 173-186.
- Pereira, E. C.; Nescimento, S. C.; Lima, R. M. C. Silva, N. H.; Oliveira, A. F. M.; Boitard, M.; Beriel, H.; Vicente, C.; Legaz, M. E. 1994. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tokai Journal of Experimental And Medicine Clinic** **19** (12): 47-52.
- Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Brito, E. S.; Cruz, J.; Silva, M. I. 1996. Atividade antimicrobiana de liquens amazônicos I: *Cladonia corallifera* e *Cladonia substellata*. Ver. UA. Série: **Ciências Biológicas** **1**: 65-77.
- Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Campos-Takaki, G. M.; Xavier –Filho, L.; Legaz, M. E.; Vicente, C. 1997. Antimicrobial activity of biologically active compounds from the lichen *Cladonia crispatula*. **Boletim Ecosystema Tropical** **31**.

Pereira, E. C. 1998. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae (líquen), a partir de imobilização celular 240f.** Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE.

Perry, N. B.; Benn, M. H.; Brennan, N. J.; Burgess, E. J.; Ellis, G.; Galloway, D. J.; Lorimer, S. D.; Tangney, R. S. 1999. Antimicrobial, antiviral and citotóxica activity of New Zealand lichen. **Lichenologist** **31** (6): 627-636.

Piovano, M.; Garbarino, J. A.; Giannini, F. A.; Correche, E. R.; Feresin, G.; Tapia, A.; Zacchino, S.; Enriz, R. 2002. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química** **47** (3): 235-240.

Rancan, F.; Rosan, S.; Boehm, K.; Fernández, E.; Hidalgo, M. E.; Quihot, W.; Rubio, C.; Boehm, F.; Piazena, H.; Olmanns, U. 2002. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** **68**: 133-139.

Ribeiro, S. M.; Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Falcão, E. P.; Guamão, N. B.; Honda, N. K.; Quilhot, W. 2002. Detection of antibacterial activity of lichen substances through microdilution tests. In: **Lichenology in Latin American II**: 187-194.

Shibata, S.; Ukita, T.; Tamura, T.; Miura, Y. 1948. Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and derivatives. **Japan Medicine Journal** **1**: 152-155.

Silva, J. O.; Leite, J. E. M.; Paulo, M. Q.; Filho, L. X. 1986. Atividade antimicrobiana de líquens brasileiros – I. **Boletim da Sociedade Broteriana** **59**: 87-96.

Silva, J. O.; Paulo, M. Q.; Leite, J. E. M.; Xavier-Filho, L. 1987. Atividade antimicrobiana de líquens brasileiros II. **Boletim da Sociedade Broteriana** **60**: 79-86.

Vartia, K. O. 1949. Antibiotics in lichens I. **Annals Medicine Experimental Fennici** **27** (1): 46-54.

Vicente, C. 1975. **Fisiologia de las sustancias líquénicas.** Alhambra, Madrid.

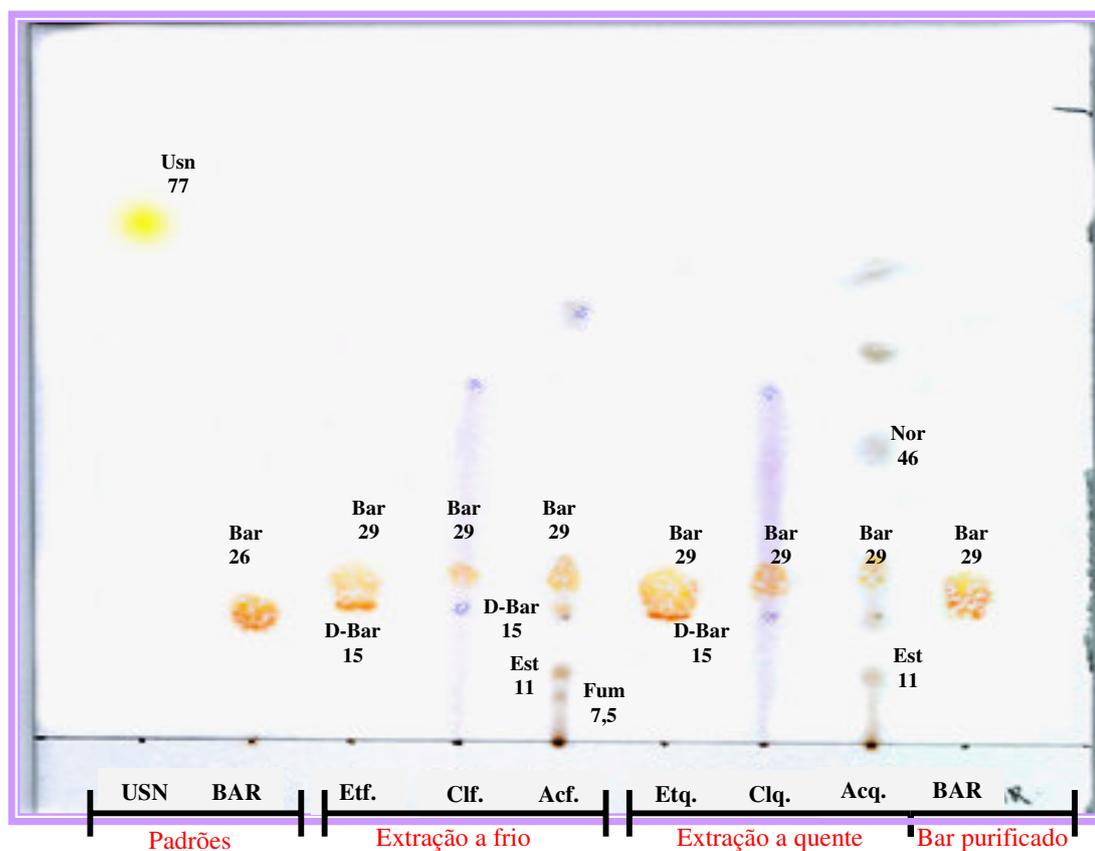
Vijayakumar, C. S.; Viswanathan, S.; Reddy, M. K.; Parvathavarthim, S.; Kandu & Sukumar, E. 2000. Antiinflammatory activity of (+) – usnic acid. **Fitoterapia** **71**: 564-566.

Xavier-Filho, L.; Arruda, E. C.; Paulo, M. Q.; Legaz, M. E.; Vicente, C. 1984. Chemotaxonomical study on *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. 2 and *Cladonia calycantha* (Del.) Nyl. **Phyton** **44**: 11-119.

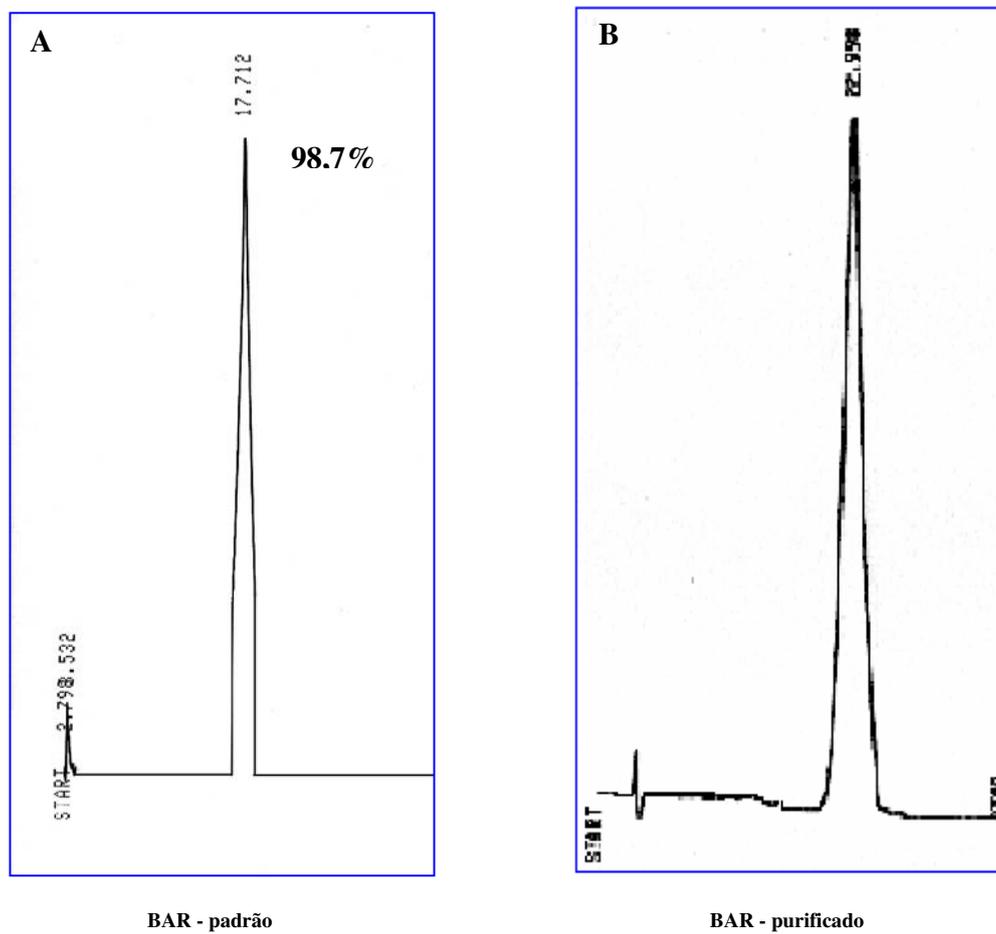
Xavier-Filho, L.; Paulo, M. Q.; Vicente, C.; Legaz, M. E. 1985. Phenols from *Cladonia sandstedei* analyzed by high performance liquid chromatography. **Cryptogamie Bryol. Lichénol** **6**: 143-149.

**Tabela 01. Percentual de rendimento das extrações orgânicas a frio e a quente a partir de 50g do talo *in natura* de *C. aggregata***

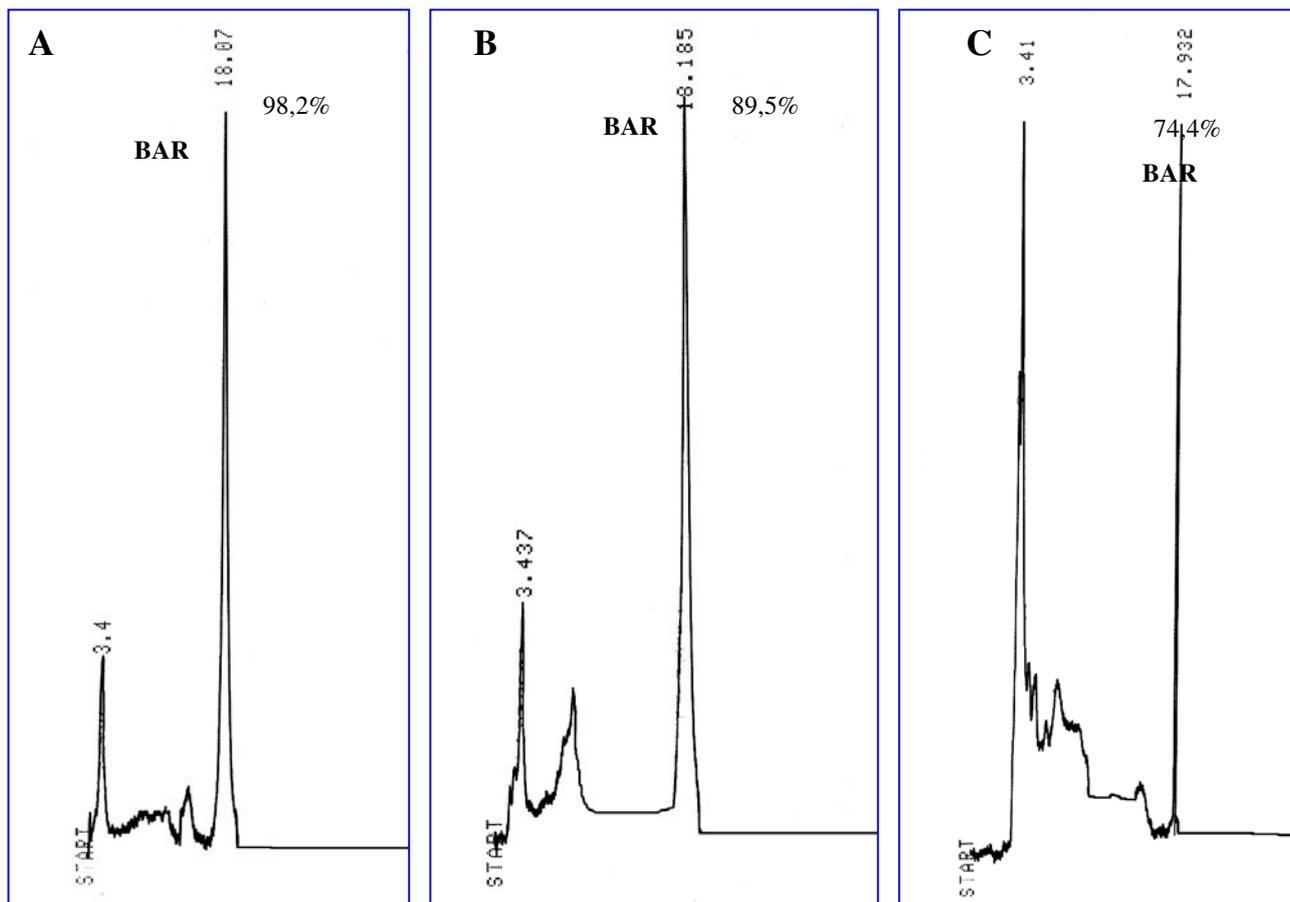
Solventes	Extração a frio (g)	Rendimento %	Extração a quente (g)	Rendimento %
Éter	1,443	2,88	1,421	2,84
Clorofórmio	0,084	0,17	0,533	1,06
Acetona	0,163	0,33	0,229	0,46
Total	1,69	3,38	2,183	4,36



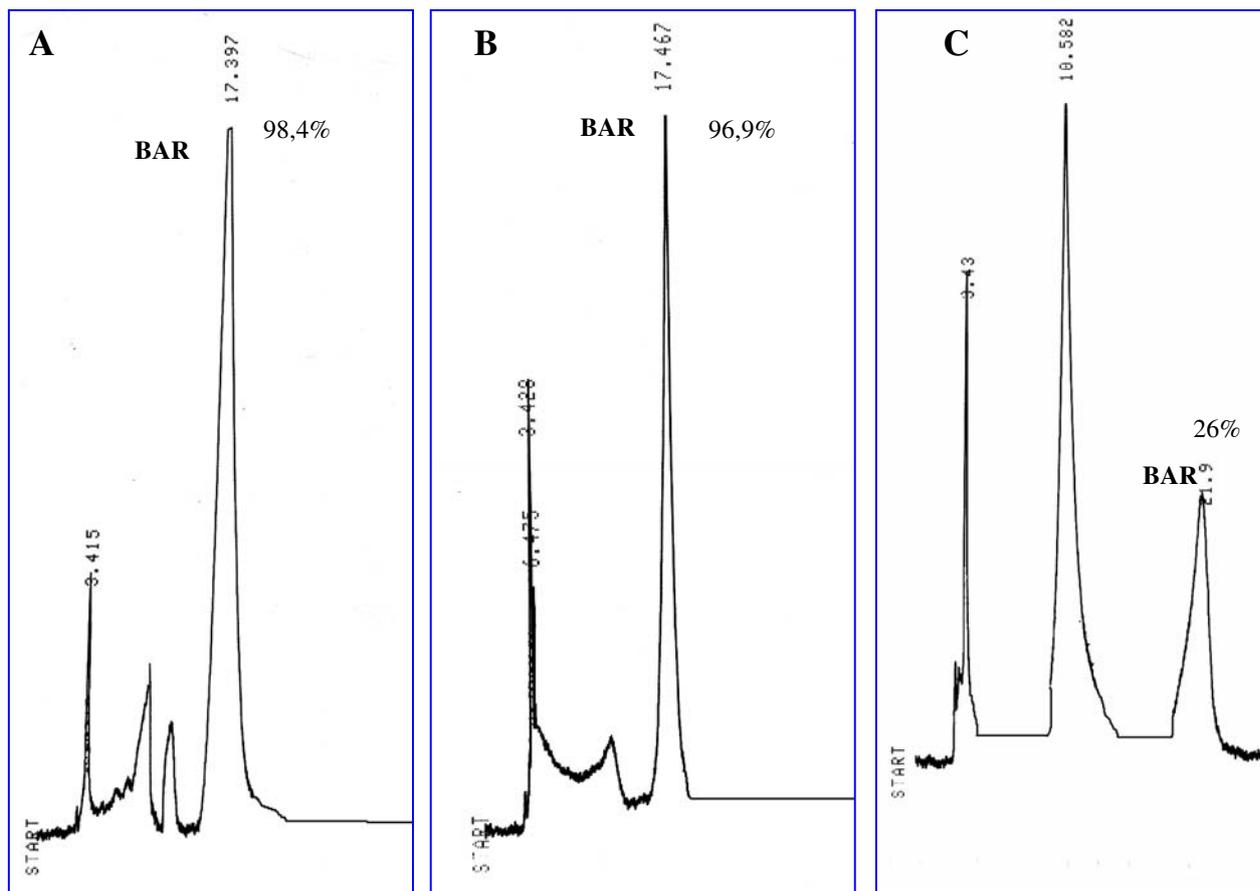
**Figura 01.** Cromatograma demonstrando a presença de fenóis nas extrações a frio e a quente e do ácido barbático de *C. aggregata*. USN-padrão de acordo com os Rf; BAR-padrão; extratos orgânicos etéreo (Etf), clorofórmico (Clf) e acetônico (Acf), extraído por esgotamento a frio; extratos orgânicos etéreo (Etq), clorofórmico (Clq) e acetônico (Acq), extraídos por esgotamento a quente e, BAR purificado



**Figura 02.** Cromatograma (HPLC) demonstrando: **A-** ácido barbático (BAR) padrão e, **B-** BAR extraído e purificado de *C. aggregata*



**Figura 03.** Cromatograma (HPLC) demonstrando os extratos orgânicos obtidos por esgotamento a frio. **A-** etéreo; **B-** clorofórmico e **C-** acetônico



**Figura 04.** Cromatograma (HPLC) demonstrando os extratos orgânicos obtidos por esgotamento a quente. **A-** etéreo; **B-** clorofórmico e **C-** acetônico

**Tabela 02** - Atividade antimicrobiana de extratos orgânicos e BAR purificado obtidos de *C. aggregata*

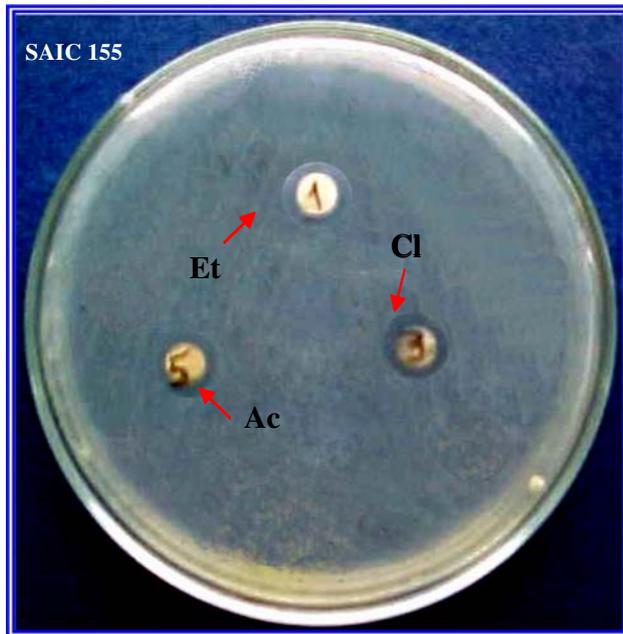
Microorganismos	Extratos Orgânicos 43mg/mL			Ácido Barbático 43mg/mL
	Étereo	Clorofórmico	Acetônico	
<i>Staphylococcus aureus</i> <b>MH ATCC 6538</b>	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> <b>SAIC 155</b>	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> <b>Multi resistente</b>	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> <b>Multi resistente 311</b>	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> <b>Multi resistente 404</b>	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> <b>IC - 84</b>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> <b>IC - 2366</b>	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> <b>IC - 3</b>	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> <b>DAUFPE 1007</b>	-	-	-	-

+ presença de halos de inibição

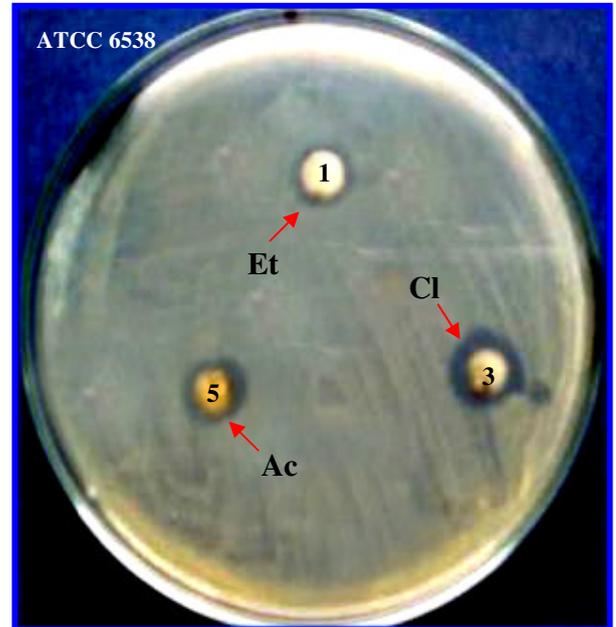
- ausência de halos de inibição

**Tabela 03** Atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos e BAR purificado de *C. aggregata* contra *S. aureus*

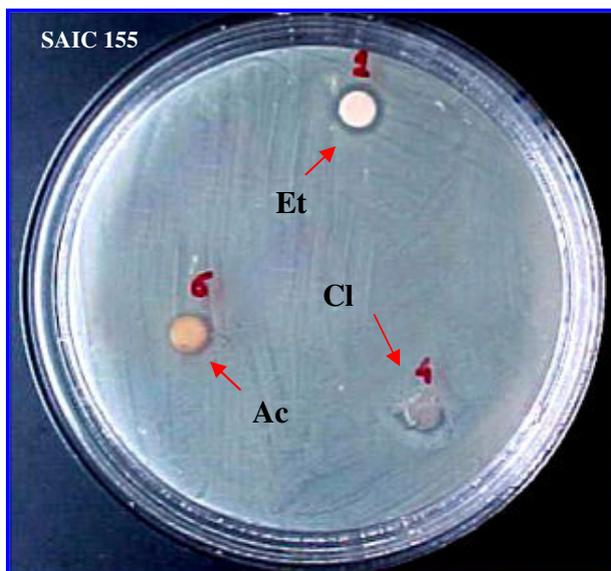
Microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i>	.Halos de inibição (mm)						Ác. Barbático purificado 43mg/mL. Halos (mm)	
	Extratos Orgânicos 43mg/mL							
	Extração por esgotamento a frio			Extração por esgotamento a quente			Éter	Água destilada
	Éter	Clorofórmio	Acetona	Éter	Clorofórmio	Acetona		
<b>SAIC 155</b>	12	12	04	09	07	06	09	13,5
<b>ATCCC 6538</b>	11	12	12	07	10	06	09	11



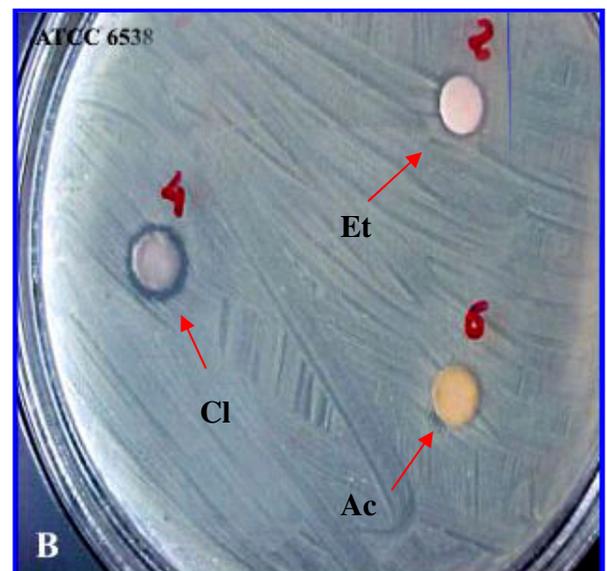
**Figura 05:** Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos extraído de *C. aggregata* obtidos por esgotamento a frio, contra o *S. aureus* – SAIC 155. 1-etéreo; 3-clorofórmico e 5-acetônico



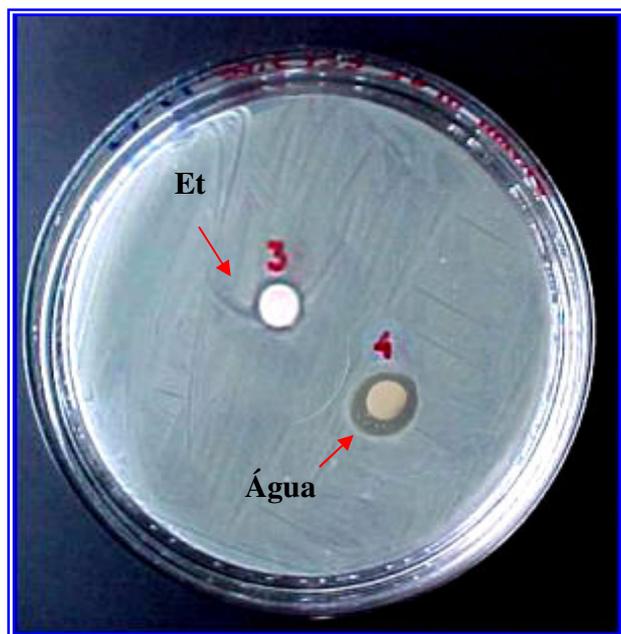
**Figura 06:** Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos extraído de *C. aggregata* obtidos por esgotamento a frio, contra o *S. aureus* – ATCC 6538. 1-etéreo; 3-clorofórmico e 5-acetônico



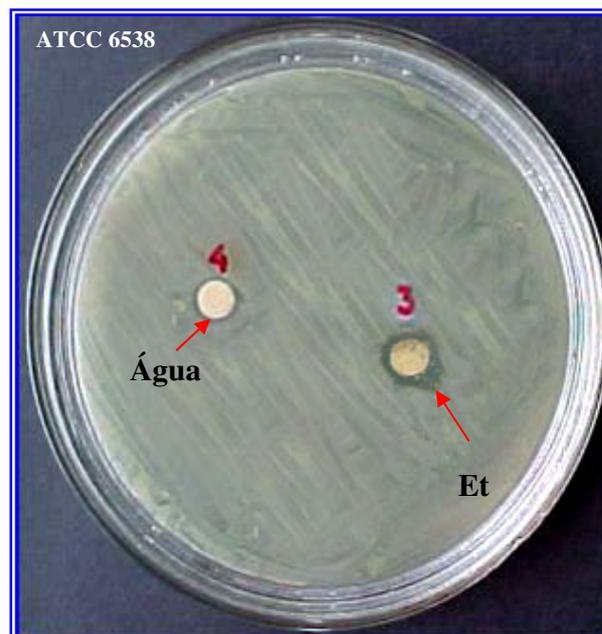
**Figura 07:** Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos extraído de *C. aggregata* obtidos por esgotamento a quente, contra o *S. aureus* – SAIC 155. 1-etéreo; 4-clorofórmico e 6-acetônico



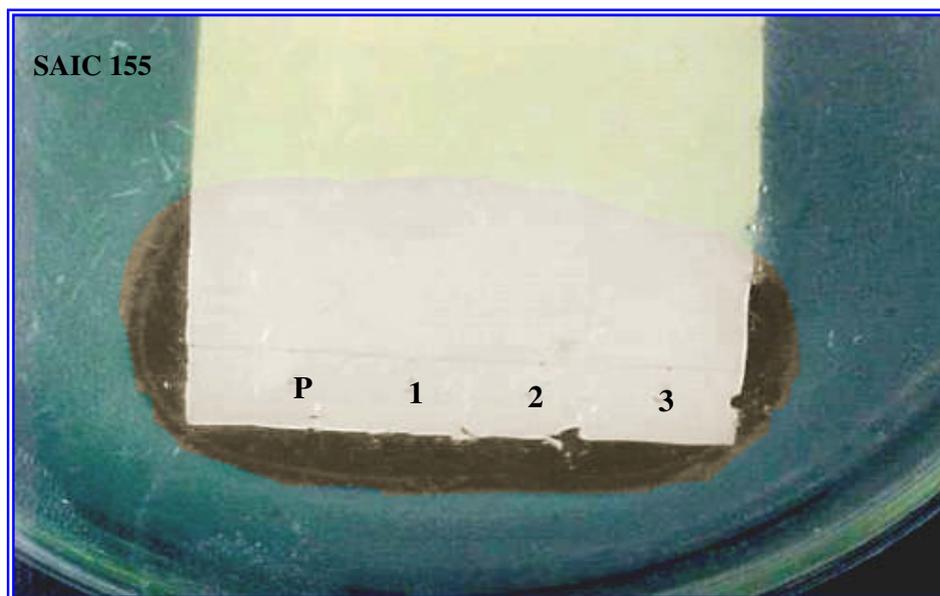
**Figura 08:** Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos extraído de *C. aggregata* obtidos por esgotamento a quente, contra o *S. aureus* – ATCC 6538. 2-etéreo; 3-clorofórmico e 6-acetônico



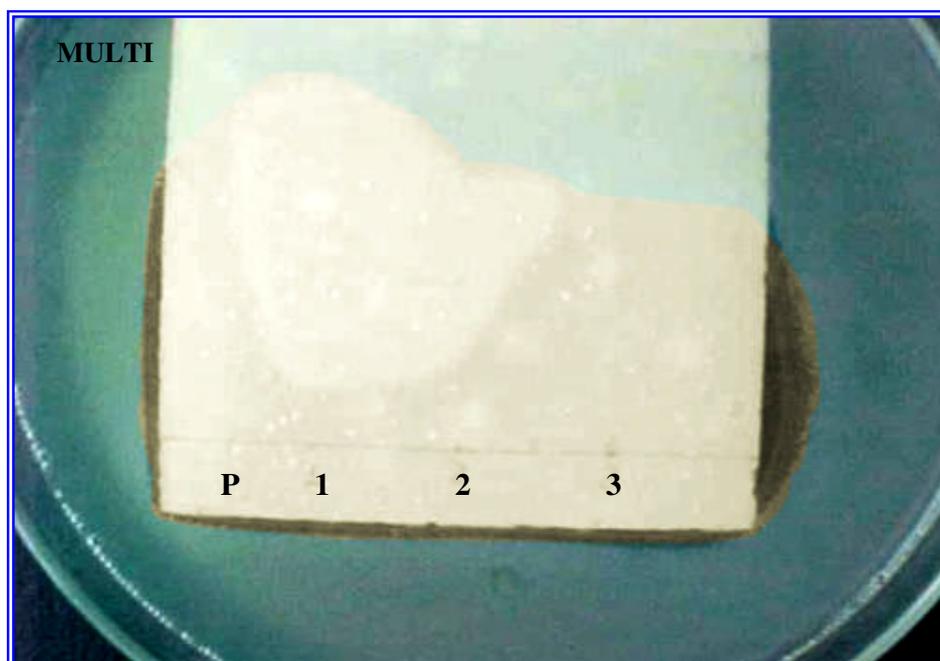
**Figura 09:** Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de *C. aggregata* contra *S. aureus* – SAIC 155, solubilizado em: 3- éter; 4- água



**Figura 10:** Teste de difusão em disco demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de *C. aggregata* contra *S. aureus* – ATCC 6538, solubilizado em: 3- éter; 4- água



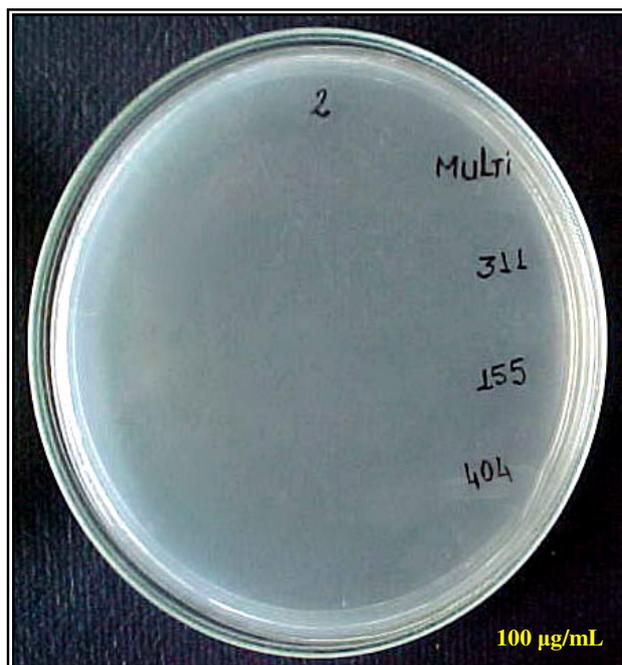
**Figura 11.** Biocromatograma indicando a atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos e BAR purificado de *C. aggregata*, contra *S. aureus* - SAIC 155. P - BAR; 1- etéreo; 2- clorofórmico e 3-acetônico



**Figura 12.** Biocromatograma indicando a atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos e BAR purificado de *C. aggregata*, contra *S. aureus* (multi resistente). P – BAR; 1- etéreo; 2- clorofórmico, 3- acetônico



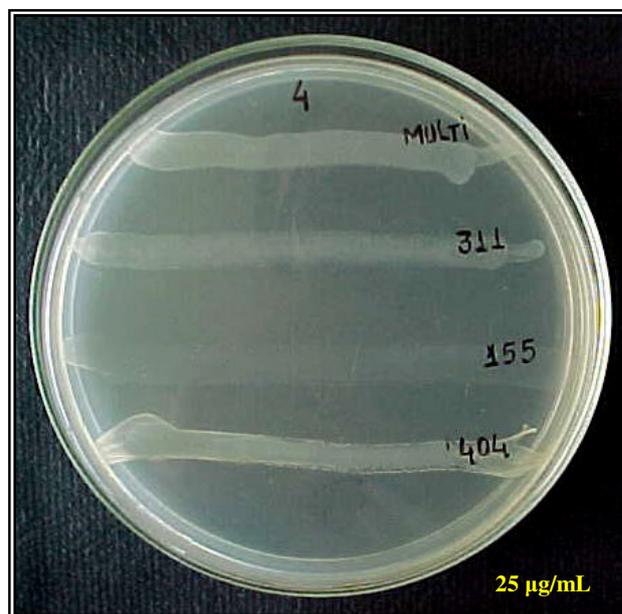
**Figura 13.** CMI demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de *C. aggregata* contra as linhagens de *S. aureus*. 200µg/mL



**Figura 14.** CMI demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de *C. aggregata* contra as linhagens de *S. aureus*. 100µg/mL



**Figura 15.** CMI demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de *C. aggregata* contra as linhagens de *S. aureus*. 50 µg/mL



**Figura 16.** CMI demonstrando atividade antimicrobiana do BAR purificado de *Cladia aggregata* contra as linhagens de *S. aureus*. 25µg/mL



**Figura 17.** Placa controle com acetona pura

**Tabela 04 Resultado comparativo entre a CMI de substâncias liquênicas com a do BAR purificado de *C. aggregata***

Substâncias liquênicas	Microrganismos	CMI $\mu\text{g/mL}$	Referências
<b><math>\beta</math>- orselinato</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i>	80 - 160	Ingólfssdóttir <i>et al.</i> , 1985
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	30 - 40	
<b>Etil e metil orselinato</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i>	160 - 500	
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	200 - 260	
<b>Ácido úsnico</b>	<i>Mycobacterium aurum</i>	32	Ingólfssdóttir <i>et al.</i> , 1998
<b>Atranorina, ac. Lobárico, salazínico e protoliquesterínico</b>	<i>Mycobacterium aurum</i>	$\geq 125$	
<b>Ex. orgânicos de <i>Ramalina farinacea</i></b>	<i>Trichohyton mentagrophytes</i>	90 - 650	Esimone <i>et al.</i> , 1999
<b>Ac. Divaricático e difractáico</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	17-15	Piovano <i>et al.</i> , 2002
<b>Ácido barbático</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> Multi resistente, 311, 155 e 404	50 - 200	Presente trabalho

## Capítulo II

**Atividade citotóxica *in vitro* do extrato etéreo e ácido barbático de *Cladia aggregata* (SW.) Nyl.**

**Atividade citotóxica *in vitro* do extrato etéreo e ácido barbático de *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.**

Mônica, C. B. Martins<sup>1-2</sup>; Marcio. J. G. de Lima<sup>1-2</sup>; Nicácio, H. da Silva<sup>2</sup>; Eugênia, C. Pereira<sup>3</sup>; Silene, Carneiro. Do Nascimento.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestrado em Bioquímica; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica; <sup>3</sup>Departamento de Ciências Geográficas; <sup>4</sup>Departamento de Antibióticos. Universidade Federal de Pernambuco. Av. Conceição Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. Cep: 50.740-530, Recife-PE, Brasil.

**RESUMO** - (Atividade citotóxica *in vitro* do extrato etéreo e ácido barbático purificado de *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.). O extrato etéreo e o principal fenol (ácido barbático) de *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. foram utilizados para verificar a atividade citotóxica *in vitro* sobre células cancerígenas. O extrato orgânico foi obtido a partir de 50g do talo líquênico *in natura* sendo extraído por esgotamento a quente. O ácido barbático foi obtido a partir de um extrato etéreo. Os testes citotóxicos foram realizados com as linhagens de células cancerígenas: Hep-2 (adenocarcinoma de laringe), NCI-H292 (carcinoma muco epidermóide de pulmão) e KB (carcinoma epidermóide nasofaríngeo). O extrato orgânico foi testado nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,5 µg/mL e o ácido barbático purificado com 20; 10; 5 e 2,5 µg/mL. Os percentuais de inibição do crescimento celular foram os seguintes: Hep-2, 78; 72; 70 e 60%; NCI-H292, 63; 61; 36 e 42% e KB, 80; 80, 52 e 47% para os extratos orgânicos e, Hep-2, 61; 66; 54 e 49%; NCI-H292, 63,4; 61,1; 36,7 e 42% e KB, 77; 71; 53 e 43% para o ácido barbático purificado nas respectivas concentrações anteriormente citadas. A CI<sub>50</sub> para a substância purificada ficou em: 2,5 – 5 µg/mL para Hep-2; 5 µg/mL, NCI-H292 e 2,5 - 5 µg/mL, KB. E a CI<sub>50</sub> do extrato etéreo ficou aproximadamente em: 6,5 – 12,5 µg/mL para NCI- H292 e KB e < 6,5 µg/mL para Hep-2. Portanto, o extrato orgânico e o BAR purificado demonstraram citotoxicidade contra as células cancerígenas, tornando-se adequados estudos mais aprofundados com as substâncias de *C. aggregata* contra células e tumores cancerígenos.

**PALAVRAS – CHAVES:** células cancerígenas, líquen, fenol

**ABSTRACT** – (Citotoxic activity *in vitro* of the ethereal extract and purity barbatic acid from *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.). The purity barbatic acid and hot ethereal extract, extracted each one starting from 50g of *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl were tried against the cancerous cells of the lineages Hep-2 (larynx adenocarcinoma), NCI- H292 (lung epidermoid carcinoma) and KB (naseopharynx carcinoma). For the crude extract in the concentrations of 50, 25, 12,5 and 6,5µg/mL, the rate of inhibition and CI<sub>50</sub> went of about: Hep-2, 78; 72; 70 and 60% with CI<sub>50</sub> de NCI-H292, 63; 61; 36 and 42%, with CI<sub>50</sub> of and KB, 80; 80; 52 and 47%, with CI50 of. The acid barbático purified purified in the concentrations of 20, 10, 5 and 2,5µg/mL demonstrated the inhibition rate next: Hep-2, 61; 66; 54 and 49%; NCI- H292, 63,4; 61,1; 36,7 and 42% and KB, 77; 71; 53 3 43% and CI<sub>50</sub> input 2,5 - 5mL to Hep-2 and KB and 5µg/mL for NCI-H292. Both the substances demonstrated citotoxicidad on cancerous cells. The ethereal extract introduced sinergism.

**KEY – WORDS:** cancer cells, lichen, phenol.

## Introdução

Os líquens são importantes sob o ponto de vista ecológico, uma vez que são utilizados como bioindicadores e biomonitores de grande qualidade (Loppi *et al.*, 2003). Suas substâncias extracelulares, sob a forma de cristais, são também utilizadas contra diversas afecções, sendo conhecidos e usados desde a antiguidade como plantas medicinais (Falcão *et al.*, 2002).

As aplicações farmacológicas das substâncias extraídas de líquens envolvem, entre outras, pesquisas contra fungos, bactérias, tumores e células cancerígenas (Pereira *et al.*, 1994; Ingólfssdóttir, 2002). Os resultados são promissores, pois o ácido úsnico extraído de *Cladonia substellata*, demonstrou um percentual de inibição de 80% sobre o sarcoma-180 (Lima *et al.*, 1990).

As pesquisas na área da cancerologia experimental, utilizam testes de citotoxicidade, que permitem investigar a ação direta de certas drogas, como uma triagem preliminar, visto que servem de parâmetros para aferir o possível dano causado *in vitro* (Young & Hallowea, 1973).

Portanto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica do extrato etéreo e ácido barbático (BAR) purificado de *Cladia aggregata*, a fim de fornecer resultados em curto espaço de tempo na pesquisa de novos fármacos com atividade antitumoral.

## Material e Método

**Material liquênico: coleta e armazenamento:** cerca de 500g de *C. aggregata* (Sw.) Nyl. foram coletados no município de Bonito –PE, no mês de Novembro de 2003. O líquen foi acondicionado em sacos de papel e conservado à temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) até a realização dos testes. A espécie foi identificada pela Dr<sup>a</sup> Eugênia Pereira, a partir de caracteres morfológicos e químicos do talo, no laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco. A excisata se encontra depositada no Herbário da UFP da Universidade Federal de Pernambuco, sob o registro nº 36431.

### Obtenção do extrato etéreo a partir do talo

**Extração por esgotamento a quente:** 50g do talo de *C. aggregata* limpo, foram triturados em almofariz e, submetidos a duas extrações sucessivas com éter em aparelho Soxhlet, a temperatura de ebulição do solvente, durante 8 horas. O extrato obtido foi concentrado até a secura, pesado e mantido em dessecador (Pereira *et al.*, 1996).

**Isolamento e purificação do ácido barbático:** o ácido barbático foi isolado e purificado a partir de um extrato etéreo a quente. Este depois de concentrado até a secura, foi lavado em funil poroso G-4, com clorofórmio (4x), de acordo com Asahina & Shibata (1954).

**Cromatografia em camada delgada (CCD):** foi utilizada cromatografia em camada delgada (CCD) para detecção qualitativa dos compostos fenólicos predominantes no talo *in natura* e o ácido barbático purificado de *C. aggregata*. Amostras foram diluídas em éter, sendo aplicadas em placas de sílica Gel 60 F<sub>254</sub> + 366Merk de 20cm x 20 cm, e desenvolvidos de forma ascendente no sistema de solventes A (tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5, v/v). Após evaporação do solvente, as bandas foram visualizadas sob luz UV curta (256 nm) e longa (366 nm). Posteriormente as placas foram borrifadas com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 80° C por 40min, para que fossem evidenciadas as bandas por reação de coloração, segundo Culberson (1972). Os resultados foram avaliados mediante cálculo dos valores de R<sub>f</sub>, que foram comparados ao padrão utilizado (ácido barbático).

**Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):** o extrato orgânico e o ácido barbático isolado do talo foram submetidos a CLAE. O extrato orgânico e o ácido barbático purificado foram diluídos na fase móvel (metanol/água/ácido acético, 80:19,5:0,5 v/v) a 0,1 mg/mL para a substância pura e 1,0mg/mL para o extrato orgânico, filtrados em filtros millipore (diâmetro do poro-0,45µm) e previamente degaseificado. As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado a um detector de UV a 254nm, sob um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20µL, atenuação de 0,04 e temperatura ambiente de 25 ± 3 °C. Foi utilizada coluna de fase reversa C18, com desenvolvimento isocrático da análise, segundo metodologia de Legaz & Vicente (1983). Foi utilizado o ácido barbático como padrão e os resultados foram avaliados mediante área dos picos e tempo de retenção das substâncias na coluna

**Atividade citotóxica:** os testes de citotoxicidade foram realizados com células das linhagens HEp-2 (adenocarcinoma de laringe), NCI-H292 (carcinoma muco epidermóide de pulmão) e KB (carcinoma epidermóide nasofaríngeo), provenientes do Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

**Meios de cultura e manutenção das células:** As células foram mantidas em DMEM – Minimum Essencial Medium, Eagle modificado Dulbecco's (SIGMA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de solução antibiótico (penicilina 1000 U/mL + estreptomicina 250mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 Mm (Carvalho *et al.*, 1996).

**Viabilidade celular:** suspensões celulares (10<sup>5</sup> células/mL) foram distribuídas em placas de cultura com 96 poços (220 µL/ poço). As placas foram incubadas a 37° C em estufa (Sedas, Milão-Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 h de incubação foram adicionados 22µL/poço do extrato orgânico, ou do ácido, diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido), nas concentrações finais de 50; 25; 12,5 e 6,5 µg/mL para o extrato orgânico e 20; 10; 5 e 2,5µg/mL para o ácido barbático purificado. Foi realizado controle com DMSO. Após 72h do tratamento, os efeitos citotóxicos das amostras testes foram avaliados pelo método colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazólio). A viabilidade

celular foi determinada utilizando o corante vital Azul de Tripán (Merck) 0,4%. Os resultados foram avaliados pela determinação da inibição celular em relação ao controle, que permite verificar a percentagem de células vivas e mortas (Geran *et al.*, 1990).

## Resultados e discussão

O ácido barbático que foi purificado a partir de um extrato etéreo, por apresentar um menor número de bandas no cromatograma e o extrato orgânico, foram submetidos a cromatografias em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE). A figura 01 representa o CCD do extrato orgânico, com uma das bandas correspondente ao ácido barbático (Rf-29) e a outra ao D-barbático (Rf-15), além do ácido barbático purificado (Rf-29), ambas em relação ao padrão. A figura 02 representa a CLAE, confirmando a presença do ácido barbático no extrato orgânico a uma concentração de 98,4% e, o percentual de pureza deste ácido extraído de *C. aggregata*, 96,3%.

As linhagens de células cancerígenas submetidas ao extrato orgânico etéreo extraído a quente nas concentrações de 50; 25; 12 e 6,5µg/mL, apresentaram os seguintes percentuais de inibição: Hep-2, 78; 72; 70 e 60%; NCI-H292, 63; 61; 36 e 42% e KB, 80; 80; 52 e 47% respectivamente (figura 03). O ácido barbático purificado apresentou percentuais de inibição inferiores aos anteriores, sugerindo-se sinergismo entre as substâncias presentes no extrato orgânico, sendo Hep-, 61; 66; 54 e 49%; NCI-H292, 63,4; 61,1; 36,7 e 42% e KB, 77; 71, 53 e 43% nas concentrações de 20; 10; 5 e 25 µg/mL (figura 04).

A  $CI_{50}$  da substância purificada ficou aproximadamente entre 2,5 - 5µg/mL para Hep-2 e KB; 5µg/mL -10µg/mL, NCI-H292, e o extrato orgânico apresentou os valores de > 6,5 µg/mL, Hep-2; 6,5 - 12,5 µg/mL, KB; e 12,5 - 25µg/mL NCI-H292 para a  $CI_{50}$ .

Outras espécies de Cladoniaceae (*Cladonia substellata*, *Cladonia crispatula* e *Cladina dendroides*) ocorrentes em solos arenosos de tabuleiros (cerrado, Estado da Paraíba – Brasil), também foram testados contra adenocarcinomas, observando-se maior eficácia dos extratos de *C. substellata*, atribuída à presença dos ácidos úsnico e estíptico deste líquen. Os extratos orgânicos de *C. substellata* na concentração de 50µg/mL apresentaram inibição acima de 80% sobre os adenocarcinomas prostático (PC3) e mamário (MDA – MB 231) e acima de 90% sobre leucemia (P388 e L1210) (LIMA *et al.*, 1990). Estes autores também verificaram a atividade de líquens coletados em Alhandra e Santa Rita (Paraíba) e, notadamente a *C. substellata* e *C. verticillaris*, inibiram 80% o sarcoma – 180, além de inibirem, respectivamente, em 73% e 64% o carcinoma de Ehrlich. A atividade foi atribuída aos ácidos úsnico, fumarprotocetrárico e atranorina presente nestas espécies (LIMA *et al.*, 1990). Santos *et al.* (2003) também trabalharam com sarcoma - 180 e, o ácido úsnico desta vez sob a forma nanoencapsulada demonstrou não só a redução do

tumor, como também uma considerável diminuição de ações tóxicas ao nível dos hepatócitos quando comparado com sua forma livre.

Portanto estes dados indicam a citotoxicidade do extrato orgânico e do ácido barbático extraído e purificado de *C. aggregata* sobre as linhagens das células cancerígenas testadas, o que possibilita novos estudos na cancerologia experimental.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Departamento de Bioquímica, ao Laboratório de Cultura de Células da UFPE e CAPES pela realização deste trabalho.

### **Referências bibliográficas**

Asahina, Y.; Shibata, S. 1954. **Chemistry of lichen substances**, Japan Society for the Promotion of Science, Tokio.

Carvalho, T. U. M; Attias, M.; Cunha e Silva, N. L.; Carvalho, T. U. 1996. **Métodos de estudo da célula. Cultura de células animais**. In: Benchimol, Rio de Janeiro: Editora eletrônica-Fenorte/ VENT: 47-58.

Culberson, C. F. J. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. **Chromatog.** 72: 133-25.

Falcão, E. P.; Silva, N. H.; Gusmão, N. B.; Ribeiro, S. M.; Honda, N. K.; Pereira, E. C. 2002. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farma Bonaerense** 21: 43-49.

Geran, R. H.; Greenberg, G. N. H. 1990. Protocol for screening of agent and natural products against animal tumors and other biological system. **Cancer Chemotherapy Reports** 3: 1-103.

Ingólfssdóttir, K. 2002. Molecules of interest usnic acid. **Phytochemistry** 61: 729-736.

Legaz, M. E.; Vicente, C. 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant Physiology** 71: 300-302.

Loppi, S.; Riccobono, F.; Zhang, Z. H.; Savic, S.; Ivanov, D.; Pirintsos, S. A. 2003. Lichen as biomarkers of uranium in the Balkan area. **Environmental Pollution** 125 : 277-280.

Lima, R. M. C.; Nascimento, S. C.; Pereira, E. C.; Campos-Takaki, G. M. 1990. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos líquênicos. **Boletim da Sociedade Brasileira** 63: 339-348.

Pereira, E. C.; Nascimento, S. C.; Lima, R. M. C. Silva, N. H.; Oliveira, A. F. M.; Boitard, M.; Beriel, H.; Vicente, C.; Legaz, M. E. 1994. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine** 19: 47-52.

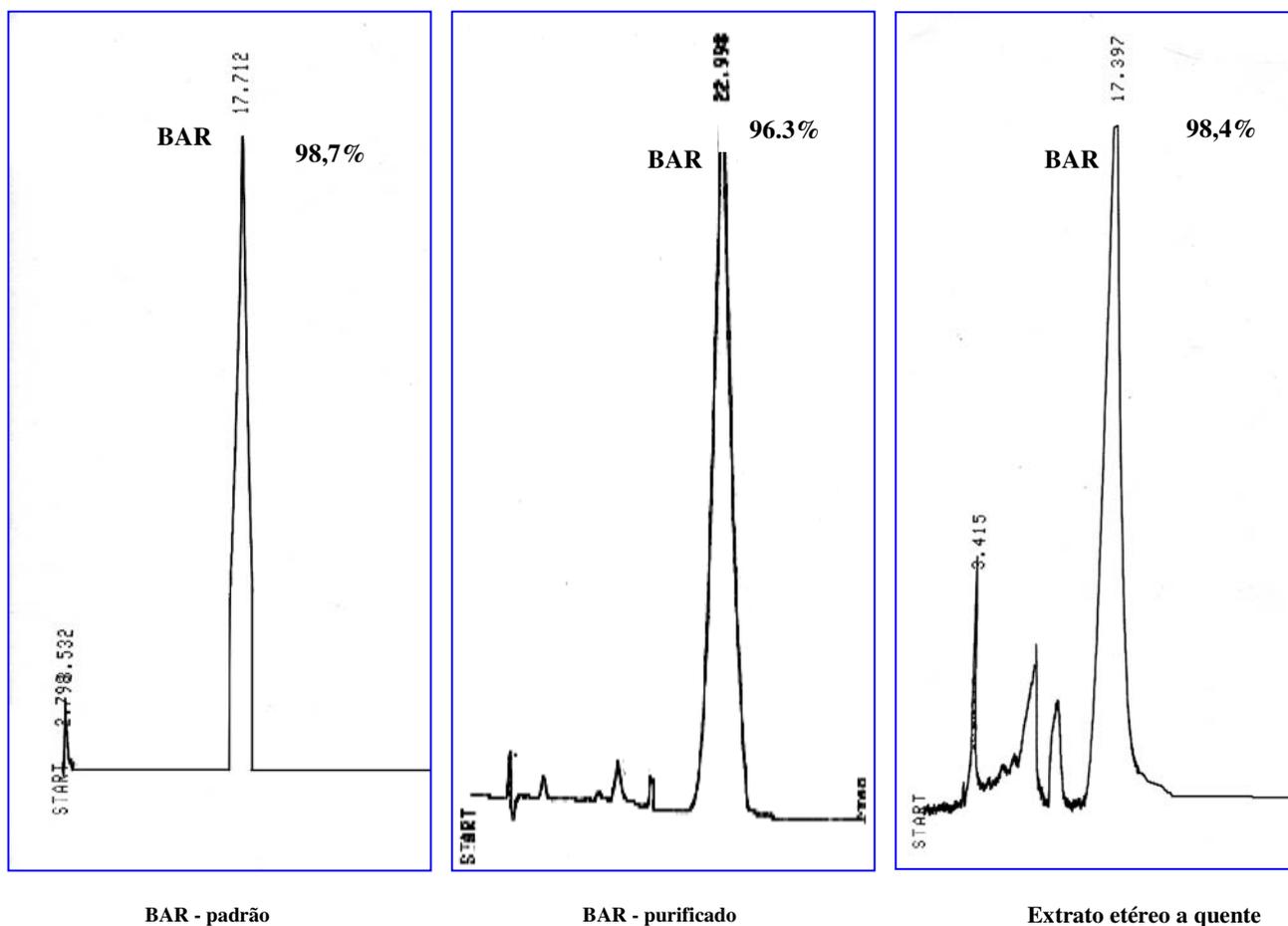
Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Brito, E. S.; Cruz, J.; Silva, M. I. 1996. Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos I: *Cladonia corallifera* e *Cladonia substellata*. Ver. UA. Série: **Ciências Biológicas 1**: 65-77.

Santos, N. P.; Wanderley, M. S. O.; Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Nascimento, N. C. Honda, N. K.; Santos-Magalhães, N. S. 2003. *In vitro* and *in vivo* antitumoral activity of nanocapsules containing usnic acid. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science 39**: 238.

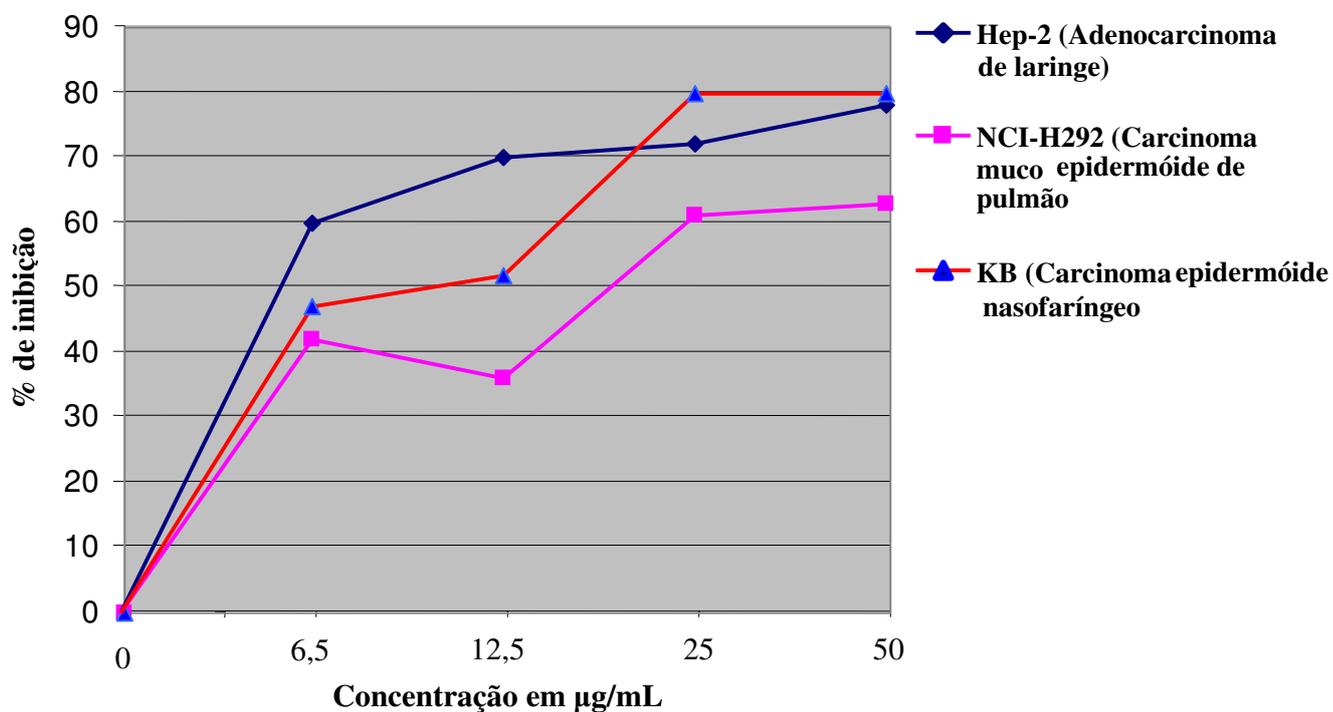
Young, S.; Hallowea, R. C. 1973. Tumors of mammary glands. In: Pathology of tumors in laboratory animals .v 1. pt. 1 lyon: Wordd Heath. **Organization Archives Scientific Publication 1**: 31-55.



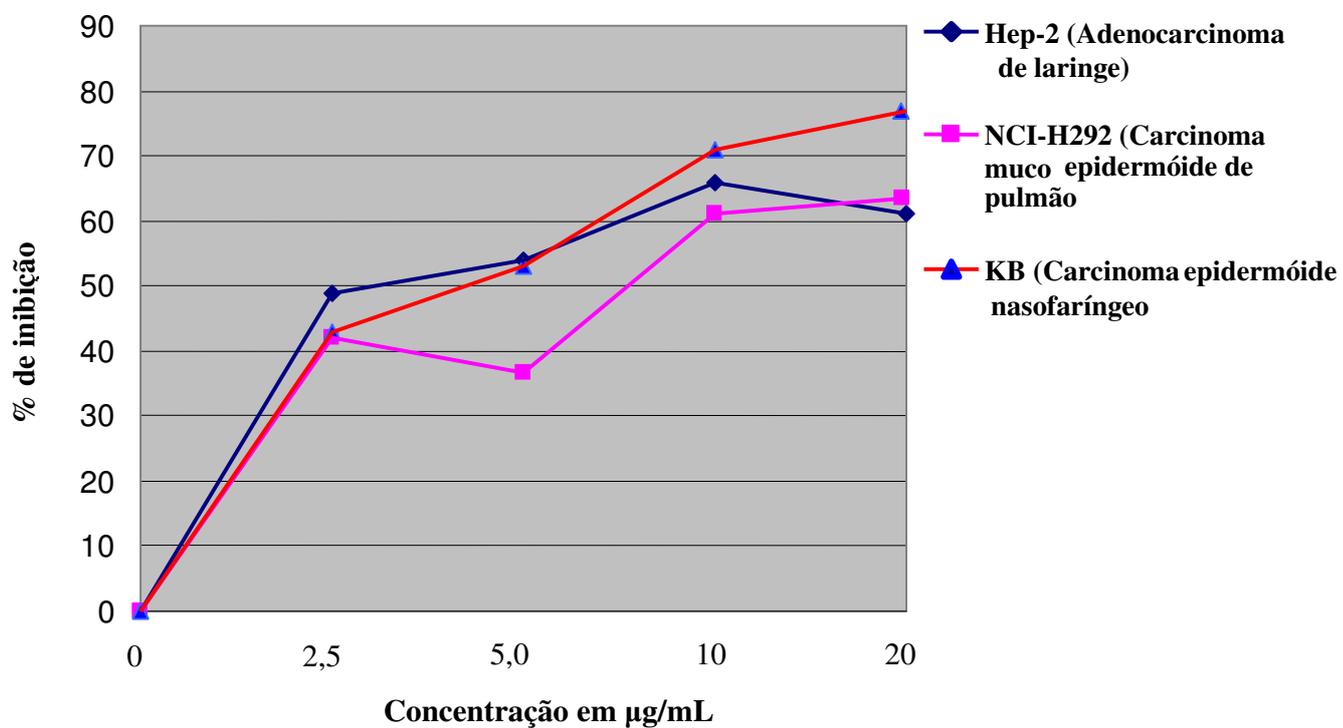
**Figura 01.** Cromatograma do **BAR padrão** – ácido barbático padrão; **BAR purificado** – ácido barbático extraído e purificado de *Cladia aggregata*; **Etq** – extrato etéreo obtido por esgotamento a quente



**Figura 02.** Cromatograma (HPLC), demonstrando a presença do **ácido barbático (BAR)** no extrato orgânico e seu percentual de pureza em relação ao padrão



**Figura 03.** Percentuais de inibição *in vitro* sobre as linhagens de células cancerígenas do extrato etéreo obtido de *C. aggregata*



**Figura 04.** Percentuais de inibição *in vitro* sobre as linhagens de células cancerígenas do ácido barbático purificado obtido de *C. aggregata*

## **6. CONCLUSÕES**

- 1- De acordo com os dados obtidos foi possível concluir que as substâncias presentes em *Cladia aggregata* possuem ação antimicrobiana
- 2- O ácido barbático apresentou baixa CMI, melhor que outras substâncias liquênicas bioativas.
- 3- Os microrganismos mais sensíveis foram às linhagens de *S. aureus*.
- 4- O extrato orgânico etéreo e o BAR apresentaram citotoxicidade
- 5- As células KB tiveram o maior percentual de inibição do crescimento celular
- 6- O ácido barbático foi considerado o princípio ativo da espécie.

## **7. PERSPECTIVAS**

Torna-se interessante um estudo mais aprofundado com substâncias bioativas de *C. aggregata*, tanto contra microrganismos como contra tumores e células cancerígenas.

## **8. ANEXOS**

## **8.1 Trabalhos enviados ao 55<sup>o</sup> Congresso Nacional de Botânica – Viçosa, Minas Gerais**

### **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA "IN VITRO" DE EXTRATOS BRUTOS E ÁCIDO BARBÁTICO DE *Cladia aggregata* (SW). NYL.**

MARTINS, Mônica Cristina Barroso<sup>1-3</sup>; LIMA, Marcio James Gonçalves de<sup>1-3</sup>; AZEVEDO-XIMENES, Eulália<sup>2-4</sup>; SILVA, Nicácio Henrique da<sup>2-3</sup>; PEREIRA, Eugênia Cristina<sup>2-5</sup>. 1 Pós-Graduando; 2 Docente; 3-Departamento de Bioquímica; 4- Departamento de Antibióticos; 5- Departamento de Ciências Geográficas/ CFCH. Universidade Federal de Pernambuco PE (nhsilva@UOL.com.br).

No século XX, uma das descobertas terapêuticas importantes foi a dos agentes bacterianos, o que modificou drasticamente o curso de muitas doenças. Porém, os antibióticos estão entre os agentes mais indiscriminadamente prescritos, sendo um fator de contribuição para o crescimento internacional de resistência bacteriana. A literatura relata que o uso de líquens na medicina popular vem desde a antiguidade e pesquisas demonstram que os ácidos liquênicos são ativos contra grande variedade de microrganismos. Assim, este trabalho objetivou verificar e avaliar a atividade biológica dos extratos orgânicos etéreo, clorofórmico e acetônico e do ácido barbático de *Cladia aggregata* (Sw). Nyl, coletada no município de Bonito – PE, "in vitro" frente a microrganismos Gram-positivos – *Staphylococcus aureus*; Gram-negativos – *Escherichia coli* e fungos – *Candida albicans*. Os *screenings* foram feitos através do teste de disco e os resultados avaliados de acordo com o tamanho dos halos formados medidos em mm. Os extratos orgânicos e o ácido barbático foram analisados em cromatografia em camada delgada (CCD). A concentração do ácido barbático foi analisada em HPLC. A *C. aggregata* ocorre, via de regra, em áreas de cerrado e/ou de vegetação rupestre em distintas regiões geográficas do Brasil. É comprovada a variação de sua composição química, sobretudo das substâncias acessórias. Na amostra estudada houve predominância do ácido barbático e traços e ácido úsnico. Os resultados obtidos demonstraram que o ácido barbático e os extratos orgânicos foram responsáveis pela atividade contra *Staphylococcus aureus*, e inativos para os demais.

### **ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS BRUTOS E ÁCIDO BARBÁTICO DE *Cladia aggregata* (SW). NYL.**

MARTINS, Mônica Cristina Barroso<sup>1-3</sup>; LIMA, Marcio James Gonçalves de<sup>1-3</sup>; NASCIMENTO Silene Carneiro<sup>2-4</sup>; SILVA, Nicácio Henrique da<sup>2-3</sup>; PEREIRA, Eugênia Cristina<sup>2-5</sup>. 1 Pós-Graduando; 2 Docente; 3-Departamento de Bioquímica; 4- Departamento de Antibióticos; 5- Departamento de Ciências Geográficas/ CFCH. Universidade Federal de Pernambuco PE (nhsilva@UOL.com.br).

Desde a antiguidade os líquens são usados na medicina popular. As pesquisas demonstram que os ácidos liquênicos são ativos não só contra microorganismos, mas também, contra tumores e células cancerígenas. Por isso, este trabalho objetivou avaliar a ação citotóxica do extrato orgânico e do ácido barbático (BAR) de *Cladia aggregata* (SW). Nyl., procedente de Bonito, brejo de altitude de Pernambuco. O extrato orgânico etéreo, extraído por esgotamento a frio foi utilizado nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,5 µg/mL. A substância pura, o ácido barbático, foi usada nas concentrações de 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL. Ambas as amostras foram aplicadas contra as seguintes linhagens de carcinomas: HEP-2 (adenocarcinoma de laringe), NCI-H292 (carcinoma muco epidermóide de pulmão) e HB (carcinoma epidermóide nasofaríngeo), provenientes do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os resultados foram obtidos através do percentual de inibição do crescimento celular em relação ao grupo controle. O extrato orgânico apresentou os seguintes percentuais de inibição: HEP-2 – 78, 72, 70, 60%; NCI-H292 – 63, 61, 36, 42% e KB – 80, 80, 52, 47% nas concentrações acima citadas respectivamente. O ácido barbático mostrou os seguintes resultados: HEP-2 – 61, 66, 54, e 49%; NCI-H292 – 63,4, 61,1, 36,7 e 42% e KB - 77, 71, 53 e 46%, também nas concentrações citadas acima. Esses resultados demonstram a eficiência do extrato bruto de *C. aggregata* sobre as linhagens celulares empregadas, mostrando que provavelmente houve um sinergismo, tendo em vista, que o ácido barbático teve um percentual de inibição inferior. Segundo o protocolo utilizado extratos são tidos bons para re-teste quando a inibição de 50% da proliferação celular em torno de 30µg/mL.

**8.2 Trabalhos enviados a VII<sup>a</sup> Reunião Regional da SBBq e 2<sup>nd</sup>  
Internacional Symposium in Biochemistry of Macromolecules and  
Biotechnology – Recife, Pernambuco**



## EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Cladia aggregata* (SW.) NYL. (LICHEN)



**Mônica C. B. Martins<sup>1-3</sup>; Marcio J. G. de Lima<sup>1-3</sup>; Eulália A. Ximenes<sup>2-4</sup>; Nicácio H. da Silva<sup>2-3</sup>; Eugênia C. Pereira<sup>2-5</sup>. 1 Pós-Graduando; 2 Docente; 3-Departamento de Bioquímica; 4- Departamento de Antibióticos; 5- Departamento de Ciências Geográficas/ CFCH. Universidade Federal de Pernambuco PE (mjgl3@hotmail.com).**

*Universidade Federal de Pernambuco – Email: [mjgl3@hotmail.com](mailto:mjgl3@hotmail.com) – Rua da Amizade 156, 33B – Graças, Recife – PE, CEP – 52011-260*

During the XX Century, one of the most important therapeutic discovering was the antibacterial product. This had modified the development of several diseases. Thus, the antibiotics used in an inadequate way, causing the bacterial resistance. These lichens are used since thousand years ago, and the research shows that the lichen substances are active against a large microorganism spectrum. This way, the objective of this work was evaluate and verify the antimicrobial activity (*in vitro*) of organic extracts and barbatic acid obtained from *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl., occurred in Bonito County, Pernambuco State, NE of Brazil. There were used strains of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*), and fungi (*Candida albicans*). The screening were realized through paper discs tests and the results expressed in millimeters of inhibition halos. The organic extracts and barbatic acid were analysed by Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Due to the diversified occurrence area of *C. aggregata*, its chemical composition also varies in accordance with the geographical area, mainly in its accessory substances. In the studied samples the major compound was the barbatic acid, with little amount of usnic acid. The organic extracts and the barbatic acid were active against *Staphylococcus aureus*, but did not show any activity against the other tested microorganisms.

Supported by: CAPES (MSc Grant)



## Atividade citotóxica do ácido barbático de *Cladia aggregata* (SW.) NYL. (LICHEN)



Mônica, C. B. Martins<sup>1</sup>; Marcio, J. G. de Lima<sup>1</sup>; Nicácio, H. Da Silva<sup>1</sup>; Eugênia, C. G. Pereira<sup>2</sup>; Silene, C. Nascimento<sup>3</sup>

1-Departamento de Bioquímica; 2- Departamento de Ciências Geográficas/ CFCH; 3- Departamento de Antibióticos; Universidade Federal de Pernambuco Av. Conceição Moraes Rego, s/n, 50730, Recife, PE, Brasil. (mjgl3@hotmail.com)

### *Cytotoxic activity of barbatic acid from Cladia aggregata (Sw.) Nyl.*

*In this paper barbatic acid was tested against cancer cells in vitro, Hep2 (larynx adenocarcinoma), NCI-H292 (lung epidermoid carcinoma), KB (naseopharynx carcinoma). The obtained results, regarding the growth rate (%), should inhibition barbatic acid, at 2,5 µg/mL, of 49% for Hep-2, 42% NCI-H292 and 43% for KB cells. The findinds suggest futher investigations with the substances, that exhitied good results.*

### Introdução

Pesquisas para encontrar compostos com propriedades antitumoral e antimicrobiana, produzidos por diversos tipos de organismos vêm sendo conduzidas há mais de 40 anos e, novos compostos têm sido encontrados. Esse interesse aumentou devido ao desenvolvimento de resistência das enfermidades às drogas (COSTAS, 2002).

Os ácidos liquênicos são comprovadamente ativos contra fungos, bactérias, tumores e células cancerígenas. São ainda antivirais, analgésicos, antipiréticos (PIOVANO *et al.*, 2002).

O teste de citotoxicidade permite analisar um elevado número de substâncias naturais, ou de síntese, fornecendo rápidos resultados em um espaço curto de tempo, na pesquisa de fármacos com atividade antitumoral (YOUNG & HALLOWEA, 1973). A aplicação de quimioterápicos liquênicos em culturas de tecidos propiciará a descoberta de análogos, ou mesmo sua produção por via de síntese.

No nordeste do Brasil são encontradas diversas espécies de Cladoniaceae, entre elas, *Cladonia substellata*, *C. salzmannii* e *Cladia aggregata*, cujos constituintes podem contribuir para química de produtos naturais, possibilitando o estudo de novos fármacos.

Portanto este trabalho objetivou avaliar a citotoxicidade do ácido barbático extraído de *C. aggregata* frente a linhagens de células cancerígenas.

### Experimental

*Isolamento e purificação do ácido barbático (BAR):* o ácido barbático foi isolado e purificado a partir do extrato etéreo de acordo com Asahina & Shibata (1954), modificado por Pereira (1998)

*Atividade citotóxica:* os testes de citotoxicidade foram realizados com células das linhagens HEp-2 (adenocarcinoma de laringe), NCI-H292 (carcinoma epidermóide de laringe) e KB (carcinoma epidermóide nasofaríngeo), provenientes do Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. As suspensões celulares ( $10^5$  células/mL) foram distribuídas em placas de cultura com 96 poços (220 µL/ poço). As placas foram incubadas a 37° C em estufa (Sedas, Milão-Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 h de incubação foram adicionados 22µL/poço do BAR diluídos em DMSO, nas concentrações finais de 20; 10; 5 e 2,5µg/mL. Após 72h do tratamento, os efeitos citotóxicos das amostras teste foram avaliados pelo método colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazólio) (MASSON, 1956). A viabilidade celular foi determinada utilizando o corante vital Azul de Tripan (Merck) 0,4%. Os resultados foram avaliados pela determinação da inibição celular em relação ao controle, que permite verificar a percentagem de células vivas e mortas (GERAN *et al.* 1972).

## Resultados e Discussão

A tabela 1 apresenta o percentual de inibição do ácido barbático frente as linhagens celulares, com 49% de inibição para Hep-2; 42% para NCI-H292 e 43% para KB, a uma concentração de 2,5µg/mL.

Tab. 1 Percentuais de inibição do ácido barbático de *C. aggregata* frente a linhagens de células cancerígenas *in vitro*

Linhagem celular	Conc. µg/mL			
	% de inibição			
	20	10	5	2,5
Hep-2 (Adenocarcinoma de laringe)	61	66	54	49
NCI - H 292 (carcinoma epidermóide de laringe)	63	61,1	36	42
KB (Carcinoma epidermóide nasofaríngeo)	77	71	53	43

Outras espécies de Cladoniaceae (*Cladonia substellata*, *C. crispatula* e *Cladonia dendroides*) ocorrentes em solos arenosos de tabuleiros (cerrado, Estado da Paraíba - Brasil), também foram testadas contra adenocarcinomas, observando-se maior eficácia dos extratos de *C. substellata*, atribuída a presença dos ácidos úsnico e estético neste líquen. Os extratos orgânicos de *C. substellata* na concentração de 50µg/mL frente aos adenocarcinomas prostático (PC3) e mamário (MDA - MB 231) apresentaram inibição acima de 80% e para leucemia (P388 e L1210) acima de 90% (LIMA *et al.*, 1992).

Estes autores também verificaram a atividade de líquens coletados em Alhandra e Santa Rita (Paraíba) e, notadamente a *C. substellata* e *C. verticillaris*, inibiram 80% o sarcoma - 180, além de inibirem, respectivamente, em 73% e 64% o carcinoma de Ehrlich. A atividade foi atribuída aos ácidos úsnico, fumarprotocetrárico e atranorina presente nestas espécies (LIMA *et al.*, 1990). Santos *et al.* (2003) também trabalharam com sarcoma - 180 e, o ácido úsnico desta vez sob a forma nanoencapsulada demonstrou não só a redução do tumor, como também uma considerável diminuição de ações tóxicas ao nível dos hepatócitos quando comparado com sua forma livre.

## Conclusão

O ácido barbático presente em *C. aggregata* apresenta citotoxicidade frente às linhagens das células cancerígenas testadas.

## Agradecimentos

CAPES e ao Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da UFPE.

## Referências Bibliográficas

- E. C. Pereira. Tese Doutorado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, 1998.
- M. C. C. D. Costas Aspectos Farmacológicos de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae: atividade antimicrobiana, citotóxica e antitumoral. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Departamento de Ciências Biológicas. UFPE. 2002, 124p.
- M. Piovano; J. A. Garbarino; F. A. Giannini; E. R.; G. Feresin; A. Tapia; S. Zacchino; R. Enriz. 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.
- N. P. Santos; M. S. O. Wanderley; E. C. G. Pereira; N.H. Silva; N. C. Nascimento; N. K. Honda; N. S. Santos-Magalhães. *In vitro* and *in vivo* antitumoral activity of nanocapsules containing usnic acid. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39 (supl., 2), p. 328, 2003.
- R. M. C. Lima; S. C. Nascimento; E. C. Pereira; G. M. Campos-Takaki. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos líquênicos. *Bol. Soc. Brot.* v. 63. p. 339-348, 1990.
- R. I. Geran; N. H. Grenberg; M. M. Macdonald; A. M. Shumacher; B. J. Abbott. *Cancer chemotherapy reports*. v. 3. 1972. 88p.
- S. Young; R. C. Hallowa. Tumors of mammary glands. In: Pathology of tumors in laboratory animals. v. 1. pt. 1 Lyon: World Health Organization. *Arch. Scientific Publication*. v.1. n. 5. p. 31-55, 1973.
- Y. Asahina; S. Shibata. *Chemistry of lichen substances*, Japan Society for the Promotion of Science, Tokio, 1954.

### **8.3 Normas para publicação dos artigos na Acta Botanica Brasílica**



**ISSN 0102-3306 printed version**  
**ISSN 1677-941X online version** **INSTRUCTIONS TO AUTHORS**

- [Scope](#)
- [Preparation of manuscripts](#)

### Scope

The **Acta Botânica Brasileira**, publishes in Portuguese, Spanish and English, original papers, short communication and abstracts of dissertations and thesis in Botany.

### Preparation of manuscripts

The articles should be concise with at the most 30 typed pages (equivalent to 15 printed pages) including illustrations and tables. Four copies of the paper should also be included with the 3.5" diskette, for revision by the [Editorial board](#). Their format must be in Times New Roman, size 12, 1.5 spacing between lines on letter sized paper, with all margins 1.5 cm, using the Wordprocessing package Microsoft Word for Windows, version 6 or above. All pages should be numbered consecutively. Longer papers might be accepted but the extra-cost should be sponsored by the authors.

Latin or Greek words in the title or text, such us *in vivo*, *in vitro*, *in loco*, *et al.*, should be in italics.

The title should be written in capital letters and centralized.

The names of the authors should have the first letter only capitalized, below the title, and justified to the right. References to footnotes should be in Arabic numerals, after the authors names, indicating the complete address and data and information about the work (part of a thesis, congress presentation, etc.), where necessary, after the title. The footnote should be separated from the main text by a horizontal line.

The manuscript format should contain:

- **RESUMO and ABSTRACT** (Use capitalized letters and bold for these subtitles): It should occupy a single paragraph with about 200 words, followed by up to five keywords. It should be a concise summary in Portuguese, of the objectives, material and methods, results and conclusions. One should not cite bibliographic references, or information not found in the manuscript. A short title should come before the summary. The same rules apply to the abstract, written in English and followed by the keywords. The English abstract is obligatory and should follow the same rules.

- **Introduction:** It should have the first letter only capitalized, in bold, justified to the left and give a clear and concise view of: a) revision of studies relevant to the objective of the work; b) issues that lead the author to conduct the research; c) objectives.

- **Material and Methods:** It should have the first letter only capitalized, in bold, justified to the left and should contain brief descriptions of the work, enough to permit the research to be repeated, and any techniques published should be cited and not described.

- **Results and discussion:** It should have the first letter only capitalized, in bold, justified to the left and could contain tables and figures (charts, photographs, drawings, maps and illustrations) only when essentially needed to understand the text. Depending on the work, results and discussion can be joined or presented separately.

Tables and Figures should be numbered in independent series, in Arabic numerals placed at the bottom right and should be presented on separate sheets at the end of the text (original plus three copies). The Figures should be no more than twice the size that in press. The area available for them, including the legend is 15 cm wide and 21 cm high. They could be drawn in Indian ink or from a Windows program , with a scale placed at the left side of the figure. Botanical illustrations should be draw in Indian ink on tracing paper or cardboard.

Numbers and letters should be sufficiently large to be easily legible when reduced. Letters should be placed below and to the right of the drawing.

Photographs should be on glossy black and white paper. **Color photos can be accepted by the Editorial Board but the authors should sponsor the costs.**

Tables and Figures must be referred to in the text in abbreviated form (singular) with the initial letter in capitals (Fig., Tab.).

Abbreviations and symbols, when used for the first time, should be proceeded by their meaning in full. eg: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Measures should be abbreviated. eg: 11 cm; 2,4  $\mu\text{m}$ .

Only numbers from one to ten should be written in full unless it is a unit of measure or is in combination with other numbers. eg.: four trees; 2,0 mm; 1-4 $\mu\text{m}$ ; 125 vouchers.

For taxonomic and flora work only the botanical vouchers examined which are representative of the taxon in question should be cited in the following order:

**COUNTRY** (capitalized and bold), state (bold), municipality, date (the month in roman numerals), phenology (where possible), collectors name and number (italics), and the herbarium code. Eg: **BRASIL, São Paulo:** Santo André, 03/XI/1997, fl. fr., Milanez 435 (SP).

In the case of more than 3 collectors cite the first followed by *et al.* Ex: *Silva et al.*

Character keys should be indented and the author names of the taxa should not appear. The taxa in the keys when cited in the text, should be numbered in alphabetic order. Example:

1. Terrestrial plants
2. Folhas orbiculares, mais de 10cm diâm .... **4. *S. orbicularis***
2. Folhas sagitadas, menos de 8cm compr. .... **6. *S. sagittalis***
1. Aquatic plants
3. Nervuras paralelas
4. Flores brancas ..... **1. *S. albicans***
4. Flores roxas ..... **5. *S. purpurea***
3. Nervuras furcadas
5. Frutos oblongos ..... **2. *S. furcata***
5. Frutos esféricos ..... **3. *S. nanuzae***

The taxonomic treatment should use italics and bold together only for valid names. Basonyms and synonymes should be in italics only. Authors of the scientific names should be abbreviated, according to the current taxonomic list of the group (eg. Brummit & Powell, 1992, for plant names).

1. *Sepulveda albicans* L., Sp. pl. 2: 25. 1753.

*Pertencia albicans* Sw., Fl. bras. 4: 37, t. 23, f. 5. 1870.

*Cabralia zeleyensis* Anisio, Hoehnea 33(2): 65. 1995.

Fig. 1-12.

Subtitles within Materials and Methods and Results should be written with the initial letter in capitals, followed by a dash and the text in the same line. Eg. Study area - localized....

Results and discussion should include the conclusions.

- **Acknowledgements** (with the initial letter in capitals, bold, and left justified): should be succinct.

- **Bibliographic references**

- Within the text: first author, then date. eg. Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva *et al.* (1997) or Silva (1993;1995), Santos (1995;1997) or Silva 1975;Santos 1996; Oliveira 1997).

- At the end of the article: the initial letter in capitals, and left justified; in alphabetical and chronological order of the authors; the names of the journals and book titles should be written in bold and in full. Examples:

Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva *et al.* (1997) ou Silva (1993; 1995), Santos (1995; 1997) ou (Silva 1975; Santos 1996; Oliveira 1997).

- ao final do artigo: em caixa alta e baixa, deslocado para a esquerda; seguir ordem alfabética e cronológica de autor(es); nomes dos periódicos e títulos de livros devem ser grafados por extenso e em negrito. Exemplos:

Santos, J. 1995. Estudos anatômicos em Juncaceae. Pp. 5-22. In: **Anais do XXVIII Congresso Nacional de Botânica**. Aracaju 1992. HUCITEC Ed. V. I. São Paulo.

Santos, J.; Silva, A. & Oliveira, B. 1995. Notas palinológicas. Amaranthaceae. **Hoehnea** 33(2): 38-45.

Silva, A. 1996. **A família Urticaceae no Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Paraná, Londrina.

Silva, A. 1997. O gênero *Pipoca* L. no Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 2(1): 25-43.

Silva, A. & Santos, J. 1997. Rubiaceae. Pp. 27-55. In: F. C. Hoehne (Ed.). **Flora Brasilica**. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, São Paulo.

Congress summaries will not be accepted as bibliographic references. Citations of dissertations and theses should be avoided where possible.

For more details consult the [most recent volumes](#) of the journal or the internet link [www.botanica.org.br](http://www.botanica.org.br).

© 2002-2004 Sociedade Botânica do Brasil

**Caixa Postal 4005**  
**01061-970 São Paulo SP Brasil**  
**Tel.: +55 61 347-5349**  
**Fax: +55 61 307-2786**



[sbb@botanica.org.br](mailto:sbb@botanica.org.br)