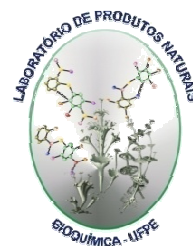




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**



MÔNICA CRISTINA BARROSO MARTINS

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE COMPOSTOS OBTIDOS DOS LIQUENS

RECIFE

2013

MÔNICA CRISTINA BARROSO MARTINS

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE COMPOSTOS OBTIDOS DOS LIQUENS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Bioquímica e Fisiologia da
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. D^r. Nicácio Henrique da Silva

RECIFE

2013

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Martins, Mônica Cristina Barroso

Aplicações biotecnológicas de compostos obtidos dos líquens/ Mônica Cristina Barroso Martins– Recife: O Autor, 2013.

300 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Nicácio Henrique da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Líquens 2. *Biomphalaria glabrata* 3. Biotecnologia I. Silva, Nicácio Henrique da (orientadora) II. Título**

579.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 220

MÔNICA CRISTINA BARROSO MARTINS

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE COMPOSTOS OBTIDOS DOS LIQUENS

Tese apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva (Presidente)

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima (Membro Interno)

Prof. Dr. Francisco Fernandes Amâncio (Membro Externo)

Profa. Dra. Meiriana Xavier Vila Nova (Membro Externo)

Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão (Membro Externo)

Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva (Suplente Interno)

Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva (Suplente Externo)

Data: 27/09/12

“Homens que se unem em favor da palavra do Senhor celebram sempre a paz, cultivam a justiça, abrigam os corações dos fracos, suportam as dores dos infelizes e fortificam os dignos. Juntos, eles fazem crescer o brilho da luz do Cristo na Terra”

Autora desconhecida, em 04.07.2009

À minha família, esposo e filhos; especialmente aos meus pais pelo apoio e incentivo durante toda a minha caminhada, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Nosso Senhor Jesus Cristo, representante único e legítimo do amor incondicional, agradeço de todo o coração por ainda hoje não ter desistido de me colocar no caminho certo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva agradeço por me acolher durante todos esses anos com carinho, paciência, incentivo e confiança.

Aos Profs. Drs. Eugênia Pereira, Emerson Falcão, Jorge Torres, Eulália Azevedo, Ana Mendonça de Melo e Vera Menezes pela colaboração e orientação no desenvolvimento dos projetos que fizeram parte desta Tese.

Aos Técnicos de Laboratório, os Srs. João Virgínio e Albérico Real. Obrigada por serem incansáveis. As suas experiências nos trabalhos de bancada foram de fundamental importância no decorrer das dificuldades encontradas no desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos e companheiros, de todas as horas, do Laboratório de Produtos Naturais. Lourdes, Bruno, Pâmella, Rafaela, Leninha, Glicia, Mozar, Tiago, Cleopatra, Bruninha, Antônio, Aline, Isabelle, Raissa, Maria Catarina, Cinthya Lima e Cintia Wessen. Agradeço especialmente aquelas que arregaçaram as mangas e junto comigo investiram e acreditaram nos projetos. São elas: Rayane, Monique e Patrícia. Obrigada por todos os momentos que rimos e produzimos.

Aos amigos de fé e para todos os tipos de trabalhos, do Laboratório de Lipídios. Bianka, Tiago, Caique, Tairine, Priscila, Chrisjacele, Adenor, Luciana, Rosineide, Cleideana, Luís Artur e Janaína. Obrigada pelo apoio, fossem com palavras, fossem com atitudes.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico, da UFRPE. Itilio, Martindo, Andresa, Wellington, Eduardo, Filipe, Roberta, Robério, Aline, Maurício e Agna. Obrigada pela companhia em longos e intermináveis finais de semana que passávamos trabalhando no laboratório.

A companheira de trabalho do Laboratório de Radiobiologia da UFPE, Luanna Ribeiro. Obrigada pela paciência e lições em todos os momentos dos experimentos.

Aos amigos do Departamento Ciências Geográficas. Talita, Alice, Andreza, Ana Catarina, Iwelton, Herika e Patryk. Obrigada pela companhia no trabalho e na diversão.

A Secretaria e a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia pelo apoio durante o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Comitê de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES) e ao Fundo de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro durante o período do curso de Pós-Graduação.

RESUMO

Os líquens são estruturas biológicas formadas pela associação entre um micobionte e um fotobionte. Produzem substâncias exclusivas, denominadas substâncias líquênicas que apresentam grupamentos fenólicos, hidroxílicos e carboxílicos em suas estruturas químicas, que exercem importantes funções ecológicas e biológicas, podendo ser encontrados no Nordeste do Brasil. Amostras de *Cladonia verticillaris*, *C. substellata* e *Cladia aggregata* foram coletadas (200 g) e submetidas a extrações sucessivas com éter dietílico e acetona, para obtenção dos extratos orgânicos e dos ácidos fumarprotocetrárico, barbático, úsnico e usnato de potássio. As substâncias purificadas foram analisadas quimicamente por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, ressonância magnética nuclear de prótons e infravermelho e posteriormente testadas quanto ao seu potencial biológico contra bactéria, células tumorais, molusco e inseto. O ácido barbático apresentou atividade bactericida contra o *Staphylococcus aureus* (CIM de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), citotoxicidade para as células tumorais NCI-H292 (CI₅₀ de 19.06 $\mu\text{g mL}^{-1}$), KB (CI₅₀ de 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e HEp-2 (CI₅₀ de 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com DL₅₀ foi de 75, 69 mg kg^{-1} e inibição do crescimento tumoral (sarcoma 180) de 46.3%. Também demonstrou atividade moluscicida para a *Biomphalaria glabrata* (25 ppm) e baixa toxicidade para *Artemia salina*. O usnato de potássio foi a substância moluscicida e embriotóxica mais potente, com 100% de mortalidade após 24 h do tratamento em 1 ppm, sem efeitos sobre a *Artemia salina* na mesma concentração. Quanto a atividade inseticida, os ácidos fumarprotocetrárico, o barbático e o úsnico foram ativos contra o *Nasutitermes corniger* nas concentrações de 5, 7 e 10 mg mL^{-1} . O efeito sobre o *Alabama argillacea* (lagartas) tratados topicamente com o ácido úsnico foi demonstrado na concentração de 2 mg mL^{-1} , cuja sobrevivência foi de 1% das lagartas após 5 dias do tratamento, sem nenhum efeito significativo sobre o seu predador *Podisus nigrispinus*. Portanto, as substâncias líquênicas são promissoras fontes de produtos bioativos com ação farmacológica e inseticida que pode ser explorada em diferentes áreas de pesquisas.

Palavras-chave: Atividade Biológica, Bioinseticida, *Biomphalaria glabrata*, Substâncias líquênicas

ABSTRACT

Lichens are biological structures formed by association between a micobiont and photobiont. Lichens product exclusive substances, named lichenics substances that have phenolic, carboxylic and hydroxyl groups in their chemical structures, which have important ecological and biological functions can be found Northeastern Brazil. Samples of *Cladonia verticillaris*, *C. substellata* and *Cladia aggregata* were collected (200 g) and subjected to successive extractions with diethyl ether and acetone to obtain the organic and fumarprotocetraric, barbatic, usnic acids and potassium usnate. The purified substances were chemically analyzed by thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, proton nuclear magnetic resonance and infrared and subsequently tested for their biological potential against bacteria, tumor cells, mollusks and insects. The barbatic acid showed bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* (MIC of 50 mg mL⁻¹), cytotoxicity to tumor cells NCI-H292 (IC₅₀ of 6.19 mg mL⁻¹), KB (IC₅₀ of 12 mg mL⁻¹) and HEp-2 (IC₅₀ 6.25 ïg mL⁻¹), LD₅₀ was 75.69 mg kg⁻¹ and tumor growth inhibition (Sarcoma 180) of 46.3%. He also showed molluscicidal activity to *Biomphalaria glabrata* (25 ppm) and low toxicity to *Artemia salina*. The potassium usnate substance was more potent molluscicide and embryotoxic, with 100% mortality after 24 h of treatment at 1 ppm, no effect on the brine at the same concentration. As the insecticidal activity, acids fumarprotocetraric, barbatic and usnic acids were active against *Nasutitermes corniger* at concentrations of 5, 7 and 10 mg mL⁻¹. The effect on *Alabama argillacea* (caterpillars) treated topically with usnic acid was shown at a concentration of 2 mg mL⁻¹, whose survival was 1% of the larvae after 5 days of treatment, without any significant effect on its predator *Podisus nigrispinus*. Therefore, liquenic substances are promising sources of bioactive products with pharmacological action and insecticide that can be exploited in different research areas

Keywords: Biological activity, Bioinsecticide, *Biomphalaria glabrata*, Liquenics substances

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 -	<i>Daohugouthallus ciliiferus</i> nov. gen. et spec., do período Jurássico, cujas características morfológicas indicam semelhança com as espécies de líquens atuais. Eixo primário e ramificação terminal, extentendo-se em forma de cone; a seta indica um cílio. bar = 2.0 mm	27
Figura 2 -	Ascomiceto (A); clorofícea <i>Trebouxia</i> (B); filamentos do gênero <i>Nostoc</i> (C).	30
Figura 3 -	Corte transversal do talo estratificado do líquen folioso <i>Umbilicaria mammulata</i>	31
Figura 4 -	Tipos de talo do líquen. (A) talo crostoso; (B) talo folioso; (C) talo fruticoso; (D) talo filamentoso; (E e F) talo dimórfico.	35
Figura 5 -	Conjunto de sorédios (sorais) de <i>Hypotrachyna endochlora</i> (Leight.) Hale. Ilhas Canárias.	37
Figura 6 -	Conjunto de isídios de <i>Parmotrema tinctorum</i> (Despr. ex Nyl.) Hale. São Paulo. www.tropicallichens.net . Acesso em 04.01.2011	38
Figura 7 -	Apotécio de <i>Tephromela atra</i> (Huds.) Hafellner. Austrália.	39
Figura 8 -	Peritécio de <i>Strigula nitidula</i> Mont. Singapura.	39
Figura 9 -	Lirela de <i>Graphis geraënsis</i> Redinger Brasil.	40
Figura 10 -	Principais metabólitos primários e secundários obtidos dos líquens	41
Figura 11 -	Corte transversal do talo do líquen folioso <i>Hypogymnia physodes</i> . Destaque para as hifas cobertas por cristais de metabólitos secundários, na porção extracelular	43
Figura 12 -	Estruturas típicas dos metabólitos liquênicos	46
Figura 13 -	Picnídio (C), apotécio (D) e região apical do talo (E). Imagem do ácido úsnico gerada através de microespectroscopia (→)	50
Figura 14 -	Imagem representativa da coleta da <i>Aspicilia esculenta</i> , o Maná do deserto segundo o Livro do Êxodo.	52
Figura 15 -	Tribo <i>Tarahumara</i> fabricando a cerveja chamada <i>tesguino</i> artesanalmente.	53

Figura 16 -	Garam-masala, componente do curry	54
Figura 17 -	<i>Cladonia rangifera</i> . Alimento para renas e caribús nas regiões de frio intenso	54
Figura 18 -	Extrator (A) e destiladores (B) para obtenção de óleos e fixadores de perfumes obtidos dos líquens	55
Figura 19 -	A- <i>Pseudoevernia furfuracea</i> ; B- <i>Evernia prusnatri</i>	56
Figura 20 -	Exemplo do uso dos líquens na perfumaria francesa	56
Figura 21 -	Exemplo do uso dos líquens na indústria de cosméticos. A- composição da henna; B: composição de loção após barba; C e D: na composição de colônias	57
Figura 22 -	Tingimento de lã com corantes obtidos de algumas espécies de líquens	58
Figura 23 -	Mantos utilizados em rituais folclóricos pela tribo <i>Chilkat Tinglit</i> e <i>Ramah Navaho</i> do México tingidos com líquens	58
Figura 24 -	Peça de vestuário confeccionada com líquen, exposta no museu de História Natural em Nova York	58
Figura 25 -	Papel indicador utilizado no teste de litmus	59
Figura 26 -	————→ Líquen utilizado no processo de mumificação	60
Figura 27 -	Exemplo de medicamentos obtidos dos líquens usados como anti-inflamatórios e anti-asmáticos	61
Figura 28 -	Estrutura química do ácido úsnico.	83
Figura 29 -	Estrutura química dos enantiômeros l (-) e d (+) do ácido úsnico	84
Figura 30 -	A- <i>Cladonia substellata</i> e B- Cristais do ácido úsnico extraído, isolado e purificado de <i>C. substellata</i> no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE	84
Figura 31 -	<i>Cladonia verticillaris</i> do Vale do Catimbau/PE	94
Figura 32 -	Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico	95
Figura 33 -	Talo da <i>Cladia aggregata</i> , coletada no Município de Bonito – PE	97
Figura 34 -	Cristais do ácido barbático obtido da <i>Cladia aggregata</i> , extraído, isolado e purificado no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE	97

Figura 35 -	Estrutura química do ácido barbático	98
Figura 36 -	Fêmea do <i>Podisus</i> no momento da postura	100
Figura 37 -	Plantação de algodão predada por <i>Alabama argillacea</i>	103
Figura 38 -	Lagartas e mariposa adulta de <i>Alabama argillacea</i>	104
Figura 39 -	Castas da colônia de cupins de acordo com a função na sociedade	106
Figura 40 -	(A) soldado e (B) operário.	107
Figura 41 -	Ciclo de vida dos cupins	107
Figura 42 -	Métodos de controle dos cupins	108
Figura 43 -	<i>Biomplalaria glabrata</i>	111
Figura 44.	Ciclo da esquistossomose	111

CAPÍTULO 1

Cladia aggregata (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity

Figura 1 -	Thin layer chromatogram of organic extracts of <i>Cladia aggregata</i> (Sw.) Nyl. Captions: UNS – standard usnic acid; BAR – standard barbatic acid; ET – ether extract; CHLO – chloroform extract; AC – acetone extract; PUR BAR - purified barbatic acid. Numbers means the spots' Rf values	149
Figura 2 -	Liquid chromatogram of purified barbatic acid (A) and organic extracts: ether (B), chloroform (C) and acetone (D) from <i>Cladia aggregata</i> (Sw.) Nyl	150
Figura 3 -	Structure of barbatic acid (C ₁₉ H ₂₀ O ₇), according to spectroscopic analysis. Molecular weight 360.36; melting point 185-186°C. Numbers 1 to 9 and 1' to 9' refer to carbon of the molecule	151

CAPÍTULO 2

IN VITRO AND IN VIVO ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF BARBATIC ACID

Figura 1 -	Chromatogram (TLC): BAR standard – standard barbatic acid; BAR purified – purified barbatic acid extracted from <i>Cladia aggregata</i> ; Et – ether extract	170
Figura 2 -	Chromatogram (HPLC): (A) – standard barbatic acid; (B) – purified barbatic acid; (C) – ether extract	170
Figura 3 -	Chemical structure of barbatic acid isolated from <i>Cladia aggregata</i>	170
Figure 4 -	<i>In vitro</i> % inhibition; 6.5, 12.5, 25 and 50 µg/mL; of adenocarcinoma of larynx (HEp-2), squamous cell lung carcinoma (NCI-H292) and nasopharyngeal squamous cell carcinoma (KB) by ether extract from <i>Cladia aggregata</i>	171
Figure 5 -	<i>In vitro</i> % inhibition; 2.5, 5.0, 10 and 20 µg/mL; of adenocarcinoma of larynx (HEp-2), squamous cell lung carcinoma (NCI-H292) and nasopharyngeal squamous cell carcinoma (KB) by barbatic acid from <i>Cladia aggregata</i>	171
Figure 6 -	Photomicrographs showing sarcoma-180 tumor cells; AgNOR expression in (A) and (B), silver staining, (C) Sheets of cells with marked nuclear atypia and irregular nuclear contours; HE; magnification 400 x	172

CAPÍTULO 3

Embryotoxic and molluscicidal activity of potassium usnate

Figura 1 -	Chemical structure of usnic acid (Huneck and Yoshimura, 1996) obtained from <i>Cladonia substellata</i> . R = OH usnic acid, R = OK potassium usnate	186
5Figura 2 -	Thin layer chromatogram showing: 1- Merck usnic acid standard (R _f 0.64); 2- usnic acid purified from <i>Cladonia substellata</i> (R _f 0.64); 3- ether extract from <i>C. substellata</i> (R _f 0.64, 0.52, 0.34)	186
Figura 3 -	High performance liquid chromatograms showing: A- usnic acid purified from <i>Cladonia substellata</i> (RT- 14.59); B- Merck usnic acid standard (RT- 14.93)	187

Figure 4 -	A- Embryos of treated with potassium usnate at concentrations of 10 ppm for 24 h; B- Living embryos of control group (-) treated with filtered water	187
Figure 5 -	<i>Biomphalaria glabrata</i> embryo survival (%) following treatment with potassium usnate at concentrations of 1, 5, 2.5 and 10 ppm. Ctrl+ (positive control); Ctrl- (negative control)	187
Figure 6 -	Survival (%) of adult specimens of <i>Biomphalaria glabrata</i> treated with potassium usnate at concentrations of 0.25, 0.5, 0.9 and 1 ppm. Ctrl+ (positive control); Ctrl- (negative control)	187
Figure 7 -	Survival (%) of <i>Artemia salina</i> treated with potassium usnate at concentrations of 1, 5 and 10 ppm. Ctrl- (negative control)	187

CAPÍTULO 4

EFFECT OF USNIC, BARBATIC AND FUMARPROCETRARIC ACIDS ON *Nasutitermes corniger* SURVIVAL

Figura 1 -	Thin Layer Chromatogram (TLC). 1- fumarprocetraric acid standard (R_f 0.18); 2- fumarprotocetraric acid purified (R_f 0.18); 3- acetonc extract of <i>Cladonia verticillaris</i> (R_f 0.12); 4- usnic acid standard (R_f 0.50); 5- usnic acid purified (R_f 0.50); 6- ethereal extract of <i>Cladonia substellata</i> (R_f 0.50); 7- barbatic acis standard (R_f 0.31); 8- barbatic acid purified (R_f 0.31); 9- ethereal extract of <i>Cladia aggregata</i> (R_f 0.31)	203
Figura 2 -	High Performance Liquid Chromatogram. A- fumarprotocetraric acid purified (R_T 5.14 min); B- usnic acid purified (R_T 14.93 min); C- barbatic acid purified (R_T 22.99 min)	203
Figura 3 -	Chemical structures of purified lichen substances. A- Fumarprotocetraric acid; B- Usnic acid; C- Barbatic acid	203

CAPÍTULO 5

Substâncias liquênicas e seu potencial moluscicida e embriotóxico sobre a *Biomphalaria glabrata*

Figura 1:	Cromatograma em camada delgada (CCD): A- (1) Ácido barbático padrão Rf 0,43; (2) Extrato etéreo Rfs 0,43 e 0,69; (3) Ácido barbático purificado Rf 0,43	212
Figura 2:	Cromatograma líquido de alta eficiência (CLAE): ácido barbático padrão TR 17.712 min; ácido barbático purificado TR 22.993 min; extrato etéreo TR 17.397 min	213
Figura 3:	Estrutura química do ácido barbático isolado e purificado da <i>Cladia aggregata</i>	213
Figura 4:	Percentual de sobrevivência da <i>Biomphalaria glabrata</i> submetidas ao tratamento com o extrato etéreo e o ácido barbático purificado da <i>Cladia aggregata</i> . * P<0.0001 para todas as análises quando comparado com o grupo controle tratado com água filtrada e etanol a 0,5%. Legenda: CTRL+: carbonato cúprico 50 ppm; Et.: etanol; CTRL: água filtrada	214
Figura 5:	Percentual de sobrevivência dos embriões da <i>Biomphalaria glabrata</i> tratados com o extrato etéreo da <i>Cladia aggregata</i> . *P<0.0001 para concentrações acima de 1 ppm quando comparado com o grupo controle tratado com água filtrada e **P<0.0001 para os grupos tratados com 50 e 100 ppm quando comparado com o controle etanol 0.5%. Legenda: C+: controle positivo com carbonato cúprico a 50 ppm; Et.: etanol; C-: controle negativo com água filtrada	216
Figura 6 (A):	Percentual de sobrevivência da <i>Artemia salina</i> tratada com o extrato etéreo da <i>Cladia aggregata</i> . *P<0.0001 para concentrações de 750 e 1000 ppm quando comparado com o grupo controle tratado com água do mar. Legenda: Et.: etanol; C-: controle negativo com água do mar	217
Figura 6 (B):	Percentual de sobrevivência da <i>Artemia salina</i> tratada com o ácido barbático purificado da <i>Cladia aggregata</i> . *P<0.0001 para concentrações de 100, 250, 500 e 750 ppm quando comparado com o grupo controle tratado com água do mar. Legenda: Et.: etanol; C-: controle negativo com água do mar	217

CAPÍTULO 6

Efeito do extrato orgânico e do ácido úsnico obtido da *Cladonia substellata* sobre o *Alabama argillacea* e o *Podisus nigrispinus*

Figura 1:	Cromatograma em camada delgada (CCD). P- Ácido úsnico padrão Merck (R_f 0,89); 1- Extrato orgânico reunido (R_f 0.42; 0.55; 0.62; 0.88; 0.89); 2- Ácido úsnico purificado (R_f 0,89)	230
Figura 2:	Cromatograma líquido de alta eficiência (CLAE). A- Ácido úsnico purificado (TR 14.59); B- Ácido úsnico padrão Merk (TR 14.93)	230
Figura 3:	Percentual de sobrevivência do <i>Alabama argillacea</i> tratado com o ácido úsnico nas purificado concentrações de 0.25($\circ$), 0.50 ($\square$), 1(Δ), 1.5(∇) e 2($\diamond$) mg mL^{-1} e (*) controle. A- tratamento com ácido úsnico purificado e B- tratamento com o extrato orggânico reunido da <i>Cladonia substellata</i>	231
Figura 4:	Percentual de sobrevivência do <i>Podisus nigrispinus</i> tratado como extrato reunido da <i>Cladonia substellata</i> nas concentrações de 1($\circ$), 1.5($\square$) e 2(Δ) mg mL^{-1} e (∇) controle	233

ANEXOS

ANEXO A – MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1 -	Cromatogramas em camada delgada - CCD A- <i>Cladonia substellata</i> . P- padrão USN Merck; 1- extrato reunido; 2- ácido úsnico purificado. B- <i>Cladonia verticillaris</i> . 1- padrão do FUM; 2- FUM purificado; e 3- extrato acetônico C- <i>Cladia aggregata</i> . 1- padrão do BAR; 2- extrato etéreo; 3- ácido barbático purificado	240
Figura 2 -	Cromatogramas líquido de alta eficiência. <i>Cladonia substellata</i> . A- Ácido úsnico padrão Merck® TR 14.93 min e B- Ácido úsnico purificado TR 14.59 min; <i>Cladia aggregata</i> . C- Ácido barbático purificado TR 19.745 min e D- extrato etéreo TR 19.745 min; <i>Cladonia verticillaris</i> . E- ácido fumarprotocetrárico purificado TR 5.147 min	241
Figura 3 -	RMN ^1H do ácido úsnico isolado da <i>Cladonia substellata</i>	243

Figura 4 -	RMN ^1H do ácido fumarprotocetrário isolado da <i>Cladonia verticillaris</i>	244
Figura 5 -	Espectroscopia de infravermelho do ácido úsnico isolado da <i>Cladonia substellata</i>	245
Figura 6 -	Espectroscopia de infravermelho do usnato de potássio	246
Figura 7 -	Espectroscopia de infravermelho do ácido fumarprotocetrário isolado da <i>Cladonia verticillaris</i>	247
Figura 8 -	Espectroscopia de infravermelho do ácido barbático isolado da <i>Cladia aggregata</i>	248
Figura 9 -	Estrutura química do ácido úsnico purificado obtida a partir dos dados de RMN ^1H	249
Figura 10 -	Estrutura química do usnato de potássio modificado a partir do ácido úsnico isolado e purificado da <i>C. substellata</i>	249
Figura 11-	Estrutura química do ácido fumarprotocetrário purificado obtida a partir dos dados de RMN ^1H	250
Figura 12 -	Estrutura química do ácido barbático obtida a partir dos dados de RMN ^1H	250

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 -	Principais elementos químicos contido no talo liquênico, mg/kg do peso seco do talo	33
Tabela 2 -	Principais classes de compostos originados das três principais vias de produção de metabólitos secundários de líquens	48
Tabela 3 -	Atividade antibactericida dos líquens	63
Tabela 4 -	Atividade antifúngica dos líquens	68
Tabela 5 -	Outras Atividades Biológicas das Substâncias Liquênicas	80
Tabela 6 -	Trabalhos de revisão sobre o papel biológico das substâncias liquênicas	99

CAPÍTULO 2

IN VITRO AND IN VIVO ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF BARBATIC ACID

Tabela 1 -	IC ₅₀ of ether extract and purified barbatic acid from <i>Cladia aggregata</i> , expressed as µg/mL	169
Tabela 2 -	Mean weight (g) of tumors and organs; control group and group treated with purified barbatic acid from <i>C. aggregata</i>	169

CAPÍTULO 4

EFFECT OF USNIC, BARBATIC AND FUMARPROCETRARIC ACIDS ON *Nasutitermes corniger* SURVIVAL

Tabela 1 -	Percentage survival of termite workers treated with usnic acid (USN), fumarprotocetraric (FUM) and barbatic (BAR) acids at a concentration of 5 mg ml ⁻¹	205
Tabela 2 -	Percentage survival of termite workers treated with usnic acid (USN), fumarprotocetraric (FUM) and barbatic (BAR) acids at a	205

concentration of 7 mg ml⁻¹

Tabela 3 -	Percentage survival of termite workers treated with usnic acid (USN), fumarprotocetraric (FUM) and barbatic (BAR) acids at a concentration of 10 mg ml ⁻¹	205

CAPÍTULO 5

Substâncias líquênicas e seu potencial moluscicida e emmbriotóxico sobre a *Biomphalaria glabrata*

Tabela 1 -	Percentual de viabilidade e inviabilidade dos embriões após as posturas obtidas dos caramujos que sobreviveram ao tratamento com o BAR purificado e o extrato etéreo	215

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Fungos e fungos liquenizados	25
1.2 Metabólitos primários e secundários obtidos dos liquens	41
1.2.1 Metabólitos secundários dos liquens	44
1.3 Importância econômica e biológica das substâncias liquênicas	51
1.3.1 Uso dos liquens na alimentação	51
1.3.2 Uso das substâncias liquênicas na indústria de perfumes e cosméticos	55
1.3.3 Uso das substâncias liquênicas como corantes	57
1.3.4 Uso dos liquens na medicina popular e indústria farmacêutica	60
1.3.5 Atividade antibacteriana	61
1.3.6 Atividade antifúngica	67
1.3.7 Liquens como bioindicadores e biomonitores da qualidade do ar	71
1.3.8 Substâncias liquênicas: potencial fonte fotoprotetora e atividade antioxidante	72
1.3.9 Atividade Antitumoral dos Liquens	74
1.3.10 Herbivoria e atividade inseticida dos liquens	77
1.4 Os ácidos liquênicos, insetos e molusco utilizados nos bioensaios	83
1.4.1 O ácido úsnico e sua importância biológica	83
1.4.1.1 Histórico da atividade biológica do ácido úsnico	85
1.4.2 Ácidos fumarprotocetrárico e barbático	93
1.4.3 <i>Podisus nigrispinus</i> (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae)	100
1.4.4 <i>Alabama argillacea</i> (Hübner, 1818) (Lepdoptera: Noctuidae)	102
1.4.5 <i>Nasutitermes corniger</i> (Isoptera: Termitidae), cupins ou térmites	105
1.4.6 A <i>Biophalaria glabrata</i> e a esquistossomose	109

2 REFERENCIAS	115
3 OBJETIVOS	145
3.1 Geral	145
3.2 Específicos	145
CAPÍTULO 1. <i>Cladia aggregata</i> (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity	146
ABSTRACT	147
INTRODUCTION	147
MATERIAL AND METHODS	148
Lichen material	148
Occurrence area description	148
Preparation of organic extracts and extraction/purification of barbatic acid (BAR)	148
Chemical characterization of <i>C. aggregata</i> and identification of barbatic acid (BAR)	149
Antimicrobial activity biochromatography	149
Determination of minimal inhibitory concentration (MIC)	149
RESULTS AND DISCUSSION	149
Chemical characterization of <i>C. aggregata</i> and identification of barbatic acid (BAR)	149
Antimicrobial assays	151
ACKNOWLEDGEMENTS	152
RESUMO	152
REFERENCES	152
CAPÍTULO 2. <i>IN VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF BARBATIC ACID	155
Abstract	156
Introduction	156
Material and Methods	157
Collection and storage of lichen	157
Isolation and purification of barbatic acid	158
Chemical characterization of <i>C. aggregata</i> and indentification of barbatic acid	158
Cytotoxic activity and cell viability	158
Lethal dose (LD ₅₀) determination antitumor activity	159
Antitumor Activity	160
Histopathological analysis and argyrophilic necleolar organizer regions (AgNOR) proteins staining procedure	160
Results	161
Discussion	162
Acknowledgments	164
References	165
Figure Captions	167
Table Captions	168

CAPÍTULO 3. Embryotoxic and molluscicidal activity of potassium usnate	173
Abstract	174
1. Introduction	175
2. Material and Methods	176
2.1 Lichen collection and storage	178
2.2 Isolation, purification, identification of usnic acid and acquisition of potassium usnate	178
2.3 Bioassays with <i>B. glabrata</i> embryos and adults	179
2.4 Environmental toxicity – <i>Artemia salina</i> test	179
2.5 Statistical analysis	179
3. Results and Discussion	180
Acknowledgments	181
4. References	182
Figure Captions	185
 CAPÍTULO 4. EFFECTS OF LICHEN SUBSTANCES ON SURVIVAL OF <i>Nasutitermes corniger</i> (Motschulsky)	 188
 SUMMARY	 189
INTRODUCTION	189
MATERIALS AND METHODS	191
Harvesting and storage of lichens	191
Obtaining organic extracts and purified substances	192
Compounds: detection and characterization	192
Thin layer chromatography (TLC)	192
High performance liquid chromatography (HPLC)	193
Statistical analysis	194
RESULTS	194
DISCUSSION	195
ACKNOWLEDGMENTS	198
REFERENCES	199
Figure captions	202
Table captions	205
 CAPÍTULO 5. Substâncias e seu potencial moluscicida e embriotóxico sobre a <i>Biomphalaria glabrata</i>	 206
 Resumo	 207
1. Introdução	208
2. Materiais e Métodos	209
2.1 Coleta e armazenamento do material líquênico	209
2.2 Obtenção do extrato orgânico etéreo do talo <i>in natura</i> da <i>C. aggregata</i> através de extração por esgotamento, isolamento e purificação do ácido barbático (BAR)	209
2.3 Análise química do BAR purificado e do extrato etéreo	209
2.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN¹H) e infravermelho (IV)	209
2.4 Obtenção. Manutenção dos caramujos, atividade embriotóxica e moluscicida	210

do extrato etéreo e do BAR purificado	
2.5 Ensaio de toxicidade ambiental com <i>A. salina</i>	211
2.6 Análise estatística	211
3. Resultados	211
3.1 Análises químicas	211
3.2 Atividade moluscicida do extrato etéreo e BAR purificado sobre <i>B. glabrata</i>	213
3.3 Embriotoxicidade do extrato etéreo e BAR purificado sobre os embriões na fase de blástula	215
3.4 Toxicidade do extrato etéreo e do BAR purificado sobre <i>A. salina</i>	216
4. Discussão	218
Agradecimentos	220
5. Referências	221
 CAPÍTULO 6. Efeito do extrato orgânico e do ácido úsnico obtido da <i>Cladonia substellata</i> sobre o <i>Alabama argillacea</i> e <i>Podisus nigrispinus</i>	224
 Resumo	225
1 Introdução	226
2 Materiais e Métodos	227
2.1 Coleta e herborização do material liquênico	227
2.2 Obtenção do extrato orgânico a partir do talo <i>in natura</i> da <i>C. substellata</i> . Isolamento, purificação e identificação do ácido úsnico	227
2.3 Análise química do ácido úsnico purificado	228
2.3.1 Cromatografias em camada delgada (CCD), líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ¹ H) e infravermelho (IV)	228
2.4 Armazenamento e criação dos insetos	228
2.5 Ensaio biológico com o <i>A. argillacea</i> e o <i>P. Nigrispinus</i>	229
2.6 Análise estatística	229
3. Resultado e Discussão	229
Agradecimentos	234
4. Referências bibliográficas	235
 4 CONCLUSÕES	237
 ANEXOS	238
 ANEXO A - MATERIAIS E MÉTODOS	239
A 1 Coleta e armazenamento do material liquênico em herbário	239
A 2 Reação de coloração e análise química do talo <i>in natura</i> para identificação dos fenóis presentes nas amostras coletadas	239
A 3 Obtenção dos extratos orgânicos do talo <i>in natura</i> através de extração por esgotamento	239
A 4 Isolamento e purificação dos ácidos liquênicos	240
A 5 Análises químicas	241
A 5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	241
A 5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	242
A 5.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ¹ H), ¹³ C e infravermelho (IV) das substâncias purificadas	243
A 5.3.1 Ressonâncias magnéticas nucleares de prótons (RMN ¹ H) dos ácidos úsnico (USN), fumarprotocetrárico (FUM) e barbático (BAR)	244

A 5.3.1.1 USN	244
A 5.3.1.2 FUM	244
A 5.3.1.3 BAR	244
A 5.3.2 Ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ¹³ C) do ácido barbático	245
A 5.3.3 Infravermelho das substâncias utilizadas nos bioensaios	246
A 5.3.3.1 Espectroscopia de infravermelho do ácido úsnico (USN)	246
A 5.3.3.2 Espectroscopia de infravermelho do usnato de potássio	247
A 5.3.3.3 Espectroscopia de infravermelho do ácido fumarprotocetrárico (FUM)	248
A 5.3.3.4 Espectroscopia de infravermelho do ácido barbático (BAR)	249
A 5.4 Ultravioleta (UV) do ácido barbático purificado	249
A 5.5 Análise elementar do usnato de potássio	249
A 5.6 Estruturas químicas das substâncias purificadas dos líquens utilizados nos bioensaios	250
A 5.6.1 Estrutura química do ácido úsnico purificado (Figura 9)	250
A 5.6.2 Estrutura química do usnato de potássio (Figura 10)	250
A 5.6.3 Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico purificado (Figura 11)	251
A 5.6.4 Estrutura química do ácido do barbático (Figura 12)	251
A 6 Atividade antimicrobiana	251
A 6.1 Preparação dos meios de cultura e dos inóculos dos micro-organismos	251
A 6.2 Preparação das placas e semeio dos micro-organismos	252
A 6.3 Teste de difusão com disco em meio sólido	252
A 6.4 Biocromatograma	252
A 6.5 Concentração Mínima Inibitória (CMI)	252
A 7 Atividade antitumoral	252
A 7.1 Atividade citotóxica e viabilidade celular	253
A 7.2 Determinação da dose letal a 50% (DL ₅₀)	254
A 7.3 Teste com o sarcoma-180	254
A 8 Atividade moluscicida e embriotoxicidade com o usnato de potássio e o ácido barbático purificado	255
A 8.1 Obtenção e bioensaio com adultos da <i>Biomphalaria glabrata</i>	255
A 8.2 Embriotoxicidade	255
A 8.3 Teste com a <i>Artemia salina</i> ou teste de toxicidade ambiental	256
A 9 Atividade termiticida como <i>Nasutitermes corniger</i>	256
A 9.1 Coleta e ensaios de toxicidade com os cupins	256
A 10 Atividade inseticida sobre o <i>Alabama argillacea</i> e o <i>Podisus nigrispinus</i>	257
A 10.1 Armaazenamento e criação do <i>A. argillacea</i> e o <i>P. nigrispinus</i>	257
A 10.2 Ensaios de toxicidade em laboratório com o <i>A. argillacea</i> e o <i>P. nigrispinus</i>	257
A 11 Análise estatística	258
 ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	 259
 ANEXO C- NORMAS DAS REVISTAS	 260
C 1 Brazilian Journal of Medical and Biological Research	262
C 2 Acta Tropica	281
C 3 International Biodeterioration and Biodegradation	291
C 4 International Journal of Parasitology	292
C 5 Entomologia Experimentalis et Applicata	293

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fungos e fungos liquenizados

Os fungos são organismos que não possuem clorofila, portanto não realizam fotossíntese, sendo denominados de seres heretotróficos, que desenvolvem várias estratégias nutricionais para adquirir o carbono. Obtêm seus nutrientes por absorção, ou seja, lançam enzimas aos substratos onde colonizam e absorvem os elementos essenciais através da parede e da membrana celular. Nas suas células existe um fluxo citoplasmático o qual permite a difusão dos nutrientes solúveis favorecendo o metabolismo entre elas (SILVA; COELHO, 2006). Através da degradação da matéria orgânica, os fungos sapróbios obtêm cerca de 45-50% do carbono. Quando em simbiose parasítica com outros organismos, tais como cianobactérias, algas, plantas, animais, e humanos fixa 20%, com organizações mutualistas, 8% com micorrizas, 1% com mixomicetos e 21% quando liquenizados. Da mesma forma que o parasitismo e o saprofitismo, a liquenização pode ser considerada uma estratégia nutricional que tem sido adotada com êxito por numerosos e distintos fungos que estão totalmente adaptados a co-habitação com a alga (HAWKSWORTH; HILL, 1984).

Na natureza cerca de 20% das espécies de fungos encontradas estão associadas a algas ou a cianobactérias (LUTZONI; PAGEL; REED, 2001). Os micobiontes têm alto grau de especificidade com os padrões fotossintéticos, raramente restritos a um grupo de monofilético. Enquanto que os fotobiontes têm baixa especificidade, ou seja, são generalistas. Assim, o micobionte é mais dependente do fotobionte que vice-versa. Muitos estudos mostraram que um grande número de espécies de líquens podem estar associados com dois ou mais diferentes tipos de fotobionte, como acontece, por exemplo, com o gênero *Nostoc* (OTÁROLA et al., 2010). Os fungos liquenizados ou líquens na maioria pertencentes ao Filo Ascomycota que são encontrados na natureza em associação simbiótica, compreendem entre um quinto a um quarto das espécies de fungos conhecidas, o que coloca o processo de liquenização como regra para varias ordens dentro do Reino Fungi, tais como metade das espécies de Ascomycetos (BENATTI; MARCELLI, 2007).

Os mecanismos de reconhecimento entre o fungo e alga durante o processo de liquenização são promovidos por duas classes de lectinas: a ABP (proteína algal ligante) e a SAX (arginase secretada por *Xanthoria*), ambas são caracterizadas como arginases

glicosiladas. A primeira (ABP) promove a interação física entre o fungo e a alga específica, a segunda (SAX) é responsável por promover o recrutamento das células das algas nas vizinhanças do micélio do fungo. Estes mecanismos são absolutamente importantes, não só para formação de novas associações, como também para manter o equilíbrio entre a simbiose. Acredita-se que as relações simbióticas entre o micobionte e o fotobionte implicam na sincronização da divisão celular com a produção da lectina, provavelmente como consequência da percepção de fatores ambientais, como luz e temperatura (SACRISTÁN et al., 2007).

A esta associação simbiótica, entre estes dois organismos distintos, dá-se o nome de liquenização e a estrutura biológica resultante é chamada de líquen. As características que os diferem dos outros fungos são a formação de um talo exposto na superfície do ar, os corpos de frutificação, a baixa taxa de crescimento e a longevidade (SIPMAN; APROOT, 2001). Estas últimas características têm sido exploradas pelos geólogos, que desenvolveram métodos de datação (liquenometria) para verificar a idade das rochas (especificamente as rochas de geleiras), movimentos glaciais, frequência de terremotos, deslizamentos e transporte de sedimentos. São usados ainda para datar artefatos humanos, como gravuras rupestres nas paredes das cavernas pré-históricas e os monumentos da Ilha de Páscoa (Costa Oeste do Chile) (ARMSTRONG; SMITH, 2009; EISENREICH; KNISPEL; BECK, 2011).

Os líquens são organismos muito antigos. Evidências sugerem que esta associação existe desde o período Devoniano, ou talvez muito antes. Alguns autores têm registrado a presença de talos no período Cenozóico (TAYLOR et al., 2004; KARATYGIN, SNIGIREVSKAYA; VIKULIN, 2009). As pesquisas apontam para características morfológicas íntimas dos fósseis com espécies modernas; em alguns casos se pode sugerir famílias e gêneros as quais pertencem. Wang, Krings e Taylor (2010), descrevem uma espécie de talóide oriunda da China, *Daohugouthallus ciliiferus* nov. gen. et spec., como um organismo proveniente da metade do período Jurássico, cujas características morfológicas indicam semelhança com as espécies liquênicas atuais (Figura 1).

Figura 1 - *Daohugouthallus ciliiferus* nov. gen. et spec., do período Jurássico, cujas características morfológicas indicam semelhança com as espécies de líquens atuais. Eixo primário e ramificação terminal, extendendo-se em forma de cone; a seta indica um cílio. bar = 2.0 mm



Fonte: Wang; Krings; Taylor (2010)

O nome das espécies de líquens refere-se ao micobionte e não ao sistema simbiótico, uma vez que 90% do volume do líquen é constituído pelo micobionte. O Filo Ascomycota representa mais de 98% dos fungos liquenizados. Aproximadamente 21% de todos os líquens são capazes de agir como um micobionte. Somente 40 generos que apresentam padrões fotossintéticos estão envolvidos na sua formação: 25 algas e 15 cianobactérias, porem, aproximadamente 98% deles não são conhecidos no nível de espécie (MOLNÁR; FARKAS, 2010). Os fotobiontes liquênicos possuem nomes e filogenias próprios e, a maioria deles não são dependentes fisiológicos do meio de vida simbiótico, ou seja, podem ser cultivados axenicamente sob condições estéreis, de forma apossimbiótica, ou seja, separada do fungo (GREUTER, 1988).

Estilos de vida diferenciados podem ser observados nos fungos liquenizados: a) líquens parasitas: iniciam seu desenvolvimento dentro ou sobre o talo de outras espécies de líquens. Dependendo do grau colonização, o talo hospedeiro é completamente destruído; b) briófilos: aproximadamente 40 espécies são parasitas de briófitas. Alguns são utilizados como bioindicadores e biomonitores das mudanças climáticas nos ecossistemas de florestas, relacionados com alterações na qualidade do ar; c) liquenícolas: crescem sobre outros líquens,

são conhecidos por serem saprófitas ou parasitas de algas não simbióticas. As características fenotípicas específicas da espécie só são expressas, quando no fungo liquenizado o fotobionte associado é compatível com este (HAWKSWORTH, 1998; 2001).

Os fungos liquenizados apresentam talos complexos com estruturas morfológicas e anatômicas de importância taxonômica reconhecida, que não estão presentes nos fungos não liquenizados. Quando em associação liquênica, os fotobiontes não se reproduzem sexualmente e sofrem uma série de alterações na forma, tamanho e estrutura de suas células, devido ao estresse nutricional imposto pelo fungo. A perda da habilidade sexual do fotobionte pode ser uma resposta fenotípica para o estado da simbiose, pois as algas se reproduzem normalmente quando em estado não liquenizado (HILL, 2009). Por se assemelharem a alguns tipos de vegetais o corpo do líquen, isto é, o conjunto do micobionte e o fotobionte é denominado talo, cuja cor varia entre o branco e cinza quando o fotobionte é uma alga verde e entre o preto, marrom e cinza-chumbo quando o fotobionte está associado a uma cianobactéria (SMITH; DOUGLAS, 1987). De acordo com as estimativas recentes, os líquens compreendem 18 500 espécies descritas (MOLNÁR; FARKAS, 2010).

Ao longo do tempo tem se estabelecido várias tentativas de definir os líquens. Linné (1753) em sua obra clássica *Species Plantarum* inclui algumas espécies, e as chamou de “*Rustici pauperimi*”. Por sua aparência ele as considerou como uma forma de planta. Somente no século XIX foi que se descobriu a verdadeira natureza destas estruturas biológicas. Linné incluiu todas as espécies conhecidas em um só gênero o *Lichen*, pois antes do uso do microscópio, os caracteres principais para separação dos taxa eram basicamente morfológicos, tais como, a forma de crescimento, o tipo de frutificação e a cor. Somente após a chegada do microscópio, os liquenólogos passaram a utilizar a anatomia dos ascomas e o tipo de ascósporos como caracteres importantes (NASH III, 2008). Acharius (1803, 1810, 1814) foi o primeiro a conceber os líquens como um grupo a parte e a criar um sistema de classificação. Em 1858, Nylander ordenou os líquens em categorias diferentes, aqueles que se assemelhavam aos fungos e aqueles que lembravam as algas, constituindo, portanto, um grupo intermediário. O primeiro a expressar a idéia que os líquens poderiam ser realmente constituídos por dois organismos diferentes foi De Bary (1866), confirmado por Schwendener (1868) a quem na atualidade se atribuiu haver estabelecido pela primeira vez a correta natureza dos líquens (SCHWENDENER, 1969).

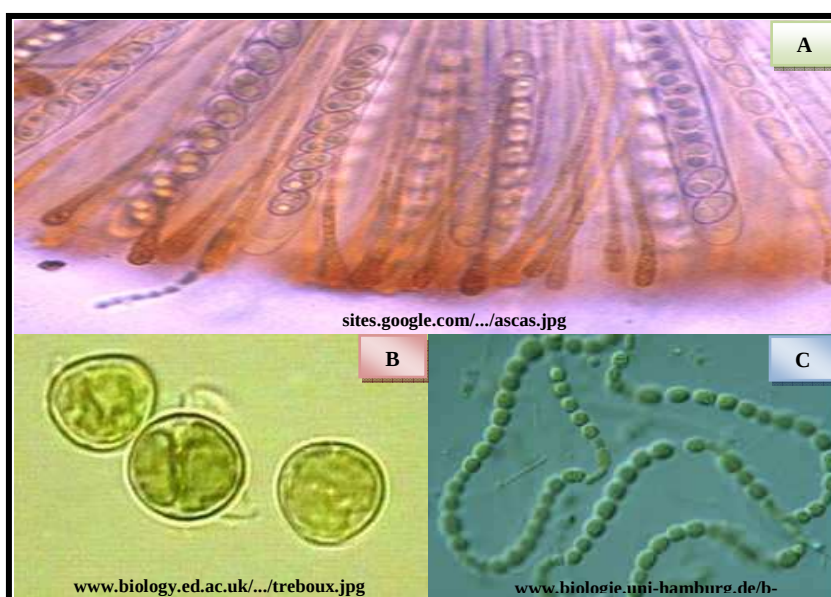
Segundo a International Association Lichenology (IAL, 1981), os líquens são associações simbióticas entre os fungos e algas e/ou cianobactérias que resultam em talos de ultraestrutura específica. Ahmadjian (1993), os descreve como uma associação entre um fungo, usualmente um ascomiceto, mas em poucos casos um basidiomiceto ou deuteromiceto, e um ou mais coadjuvantes fotossintetizantes, geralmente alga verde ou cianobactéria. Honneger (1991) definiu os líquens da seguinte forma: simbióticos de fungos nutricionalmente especializados, que vivem como um “biotrofo” (organismos que obtêm nutrientes de um hospedeiro vivo) ecologicamente obrigatório em simbiose com uma alga e/ou cianobactéria”. Após, o ano de 1994, Hawksworth e Honegger descreveram os líquens como um mutualismo estável, ecologicamente obrigatório entre um exhabitante fúngico (micobionte) e uma população inabitante de células de algas ou cianobactérias (fotobionte) unicelulares ou filamentosas de localização extracelular.

Marcelli e Seaward (1998) dizem que o líquen é um fungo que cultiva fotobiontes entre as hifas de seu micélio. Este conceito é compartilhado com outros autores que consideram os líquens como um tipo de parasitismo controlado por parte do micobionte que “mantém” o fotobionte a fim de obter alimento. Ao seu entender, parece que os fungos (micobiontes) obtêm muito mais benefícios que as algas (fotobiontes), pois esta última em condições liquenizadas tem seu crescimento muito mais lento, do que quando estão em vida livre (AHMADJIAN, 1993). Alguns especialistas já concordam que a associação varia desde o parasitismo até o mutualismo estrito (AHMADJIAN; JACOBS, 1981). Entretanto, existe um equilíbrio delicado nesta associação e qualquer distúrbio que altere a taxa de crescimento e/ou mortalidade dos componentes envolvidos, pode levar a morte da associação. Além disso, a simbiose líquênica é uma estratégia evolucionária bem sucedida, capaz de resultar em uma rica diversidade de espécies fúngicas (GRUBE; KROKEN, 2000).

Os líquens são classificados de acordo com o tipo de micobionte (organismo heterotrófico) que compõem seu talo, geralmente ascomicetos (48%), deuteromicetos (1.6%) e basidiomicetos (0.4%). Nos ascomicetos se incluem as classes Chaetothyriomycetes e Lecanoromycetes, ambas do subfilo Peizomycotina e as espécies liquenizadas estão presentes em quase metade de suas ordens, o que é igual a 46% das espécies conhecidas. As ordens Graphidales, Gyalectales, Peltigerales, Pertusariales e Teloschistales são exclusivamente formadas por líquens (HAWKSWORTH; HILL, 1984).

As algas encontradas nos líquens constituem o grupo das clorófitas (algas verdes) unicelulares ou filamentosas ou ainda cianobactérias bastante comuns, encontradas em caules e folhas de plantas, no solo e poças de água. Mais de 20 gêneros podem ser encontrados formando líquens, A *Trentepohlia*, alga filamentosa dos líquens tropicais e a unicelular *Trebouxia* e *Pseudotrebouxia* são as mais comuns, cerca de 85% do total das espécies. A *Trebouxia* ocorre na natureza quase que exclusivamente liquenizada. As cianobactérias mais conhecidas pertencem ao gênero *Nostoc* e *Scytonema*, estão em menor proporção no talo, cerca de 5-10% da massa total (Figura 2, A; B e C). As algas permanecem completamente envolvidas pelas hifas do fungo, com estruturas chamadas haustórios que facilitam a transferência dos carboidratos para o micobionte (HONEGGER, 1991).

Figura 2 - Ascomiceto (A); clorófitas *Trebouxia* (B); filamentos do gênero *Nostoc* (C)



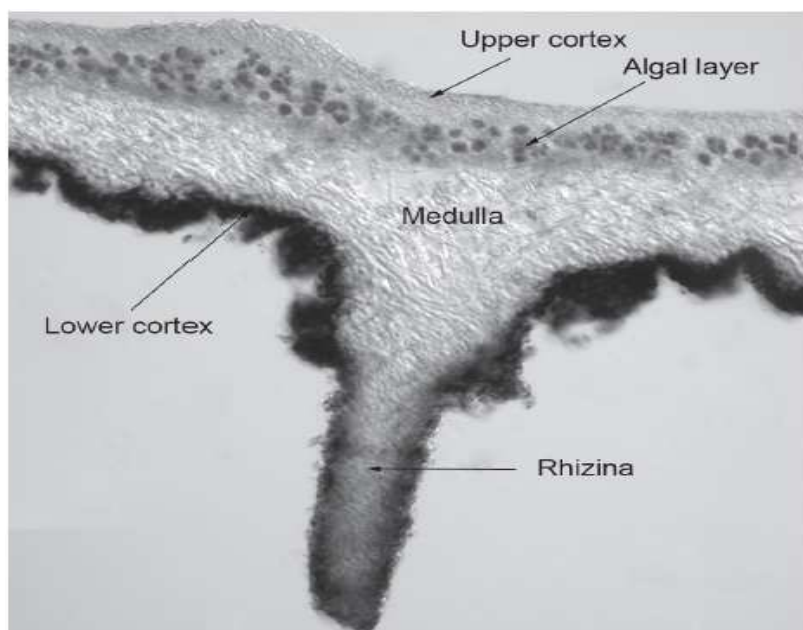
Fonte: A: sites.google.com/.../ascas.jpg; B: www.biology.ed.ac.uk/.../treboux.jpg; C: www.biologie.uni-hamburg.de/b-

Nas condições de simbiose, o fotobionte fornece energia, na forma de polióis acíclicos como ribitol (*Trebouxia*), sorbitol (*Myrmecia* e *Coccomyxa*), eritritol (*Trentepohlia*) e glicose (*Nostoc*) através da fotossíntese, para respiração e crescimento do micobionte, permitindo dar continuidade a sua rota metabólica primária e secundária. Os fungos, por sua vez, aparentemente contribuem de forma secundária, mas possuem uma camada onde ficam alojadas as células das algas promovendo proteção contra o dessecação (desidratação), abrigo de intensa luminosidade e minerais, favorecendo para que estes organismos possam se

desenvolver em ambientes livres e nos mais diversos substratos onde individualmente seria impossível a sobrevivência; as algas de vida livre e cianofíceas, por exemplo, se desenvolvem em ambientes aquáticos ou bastante úmidos (KRANNER et al, 2005; NASH III, 2008).

A maioria dos líquens desenvolve internamente um talo estratificado, dividido em córtex superior composto de uma camada de hifas compactadas; camada algal (7% do volume total do talo) onde estão inseridos os fotobiontes de forma frouxa; medula cujas hifas estão mais ou menos compactadas formando grande parte do talo, onde está inserida a maioria dos ácidos liquênicos; córtex inferior que anatomicamente pode ser semelhante ao córtex superior e estrutura de fixação (rizinas) que podem estar presentes ou ausentes, dependendo das espécies e gêneros. Em alguns talos há uma divisão nítida entre as camadas sendo chamados de talos heterômero, em outras há uma distribuição uniforme da camada do fotobionte, neste não há medula sendo chamados de homômeros (Figura 3) (AHMADJIAN, 1993).

Figura 3 - Corte transversal do talo estratificado do líquen folioso *Umbilicaria mammulata*



Fonte: Molnár; Farkas (2010)

A associação simbiótica dá aos líquens *status* de seres cosmopolitas, ou seja, podem ser encontrados nos mais diversos lugares, desde as áreas geladas nos campos polares da Antártica, até as crateras inóspitas de vulcões. Desenvolvem-se sobre a casca de árvores (corticólicas), folhas (folícolas), rochas alcalinas ou ácidas (saxícolas), solo (terrícolas), lenho (lignícolas) e nos mais variados substratos desde que encontre as condições necessárias para

seu crescimento, como por exemplo, 18 espécies de líquens são encontradas colonizando telhas de alumínio (MOLNÁR; FARKAS, 2010). Outras espécies são mais exigentes quanto ao pH do substrato, a presença de partículas no ar, a umidade dos ventos e temperatura; algumas ocorrem em águas doces (*Peltigera hydrothyria*) e zonas de maré (*Verrucaria tavaresiae*); dependendo da disponibilidade de fatores físicos e climáticos que proporcionem as condições necessárias para seu desenvolvimento (VRÁBLÍKOVÁ et al., 2006).

Uma das principais características do ciclo de vida dos líquens é sua capacidade de trocar rápida e frequentemente de estado ativo a um estado de inatividade metabólica, quando as condições ambientais estão adversas. Fatores como luminosidade, temperatura, disponibilidade de água, pH e nutrientes controlam a abundância dos líquens epifíticos em floretas de coníferas. A presença da luminosidade na parte superior do tronco das árvores favorece o surgimento das espécies, algumas adaptadas a temperaturas tão baixas, que o ganho de carbono através da fotossíntese só ocorre a temperaturas abaixo do ponto de congelamento. Algumas espécies de *Trebouxia* (alga) do grupo *Asterochloris* que ocorre em *Cladonia* exibe um balanço positivo do carbono em temperaturas abaixo de 0° C (HAUCK, 2011).

Quando em associação os líquens conseguem manter suas trocas gasosas em temperaturas até 0 °C, enquanto que para os fungos ou algas não liquenizados a temperatura ótima deve estar acima de 15 °C. A água líquida encontrada dentro do talo combinada com poliois, açúcares ou oxalatos de cálcios mantém a respiração a temperaturas -20 °C. As estruturas celulares internas e externas, que estão expostas a ciclo de gelo e degelo são preservadas por poliois, polissacarídeos, nucleotídios e lipídios de membranas. Por outro lado, durante os períodos de dessecação do talo, processos metabólicos envolvendo o ciclo redox da glutatona e o acúmulo do gluconato 6-P, são fundamentais para manter o talo vivo. Este mecanismo, também pode estar envolvido na proteção do talo contra a radiação UV. Outras estratégias podem estar envolvidas, como a absorção desta radiação através das xantofilas, carotenóides, antraquinonas, melaninas, depsídeos e depsídonas, acumulados em formas de cristas na superfície da hifa (BOUSTIE; TOMASI; GRUBE, 2010).

A capacidade de retenção de água pelo substrato ao qual se encontra o líquen pode exercer papel significativo na disponibilidade de água para as espécies epifíticas. A maioria estão adaptados a substratos com pH neutros ou com pouca acidez, portanto, líquens que contem os

ácidos fumarprotocetrárico, perlatólico ou tamnólico que toleram baixos valores de pH (3.0) no substrato ou na precipitação são mais aptos a se estabelecerem neste ecossistema. A plasticidade dos líquens parece ser resultado da ação conjunta de vários fatores ambientais (precipitação, neblina, umidade ambiental entre outros) tanto quanto do substrato que se desenvolve (HAUCK, 2011). Por serem seres poiquilohídricos, devido à falta de um complexo sistema radicular, ausência de cutícula ou estômato, os líquens absorvem e retêm muitos de seus nutrientes diretamente da atmosfera na mesma proporção que são acumulados no ar (Tabela 1), sendo, portanto, incapazes de regular seu conteúdo hídrico (YUN WADLEIGH; MAYER, 2010).

Tabela 1 - Principais elementos químicos contidos no talo liquênico, mg/kg do peso seco do talo

Elemento	Conteúdo	Elemento	Conteúdo
N	8470	Cl	100
P	770	Fe	1050
K	3330	Mn	89
Na	815	Zn	40
Ca	3600	Cu	8.4
Mg	820	B	4.0
Si	3770	Mo	0.39
S	870	Co	0.48

Fonte: Podterob (2008)

Em muitas espécies a captação do vapor de água é provavelmente o mecanismo mais comum para reativar sua atividade fotossintética. Nas algas verdes a fotossíntese pode ser ativada pela precipitação (orvalho), nevoeiros e umidade, porém nos micobiontes cujo fotobionte é uma cianobactéria a água líquida é indispensável para ativar a fotossíntese (EISENREICH, KNISPEL; BECK, 2011). Sendo assim, a nutrição dos líquens está limitada a períodos curtos, quando o talo está encharcado de água, seja pela chuva ou pela neblina. Nesta ocasião, os minerais são depositados ao longo do talo através da precipitação ou pela deposição das partículas na sua superfície. Todos os líquens possuem numerosos sítios de ligação de troca de cátions no apoplasto (grupos carboxílicos e hidroxílicos, ou ainda os cátions podem estar ligados a polissacarídeos na matriz extracelular), que facilita a ligação de metais e amônia (KAPPEN, 2000). Além disso, algumas espécies de líquens, como a *Evernia*

mesomorpha, são capazes de captar certos nutrientes, como o cobre (Cu) na concentração de 6.46 ppm (BENNETT, 2008).

A aparência do talo líquênico é primariamente determinada pelo micobionte. No entanto, as características do talo só serão definidas quando a simbiose se estabelece. Sendo assim, baseado nas características morfológicas e no habitat onde se encontram, os líquens estão tradicionalmente divididos em crostosos ou crustáceos (Figura 4A), foliosos ou foliáceos (Figura 4B), fruticosos ou arbustivos (Figura 4C), filamentosos (Figura 4D) e compostos ou dimórficos (cladoniforme) (Figura 4E e F) (ALMBORN, 1965).

Figura 4 - Tipos de talo do líquen. (A) talo crostoso; (B) talo folioso; (C) talo fruticoso; (D) talo filamentososo; (E e F) talo dimórfico.



Caloplaca cinnabarina (Ach.) Zahlbr. Chile



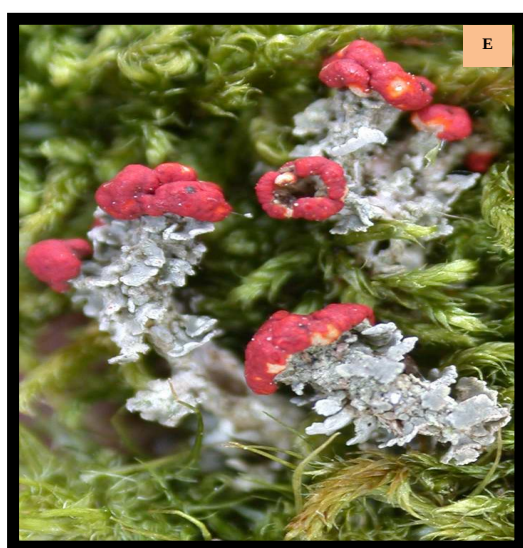
Pseudocyphellaria aurata (Ach.) Vain.
Brasil, Caraça, Minas Gerais



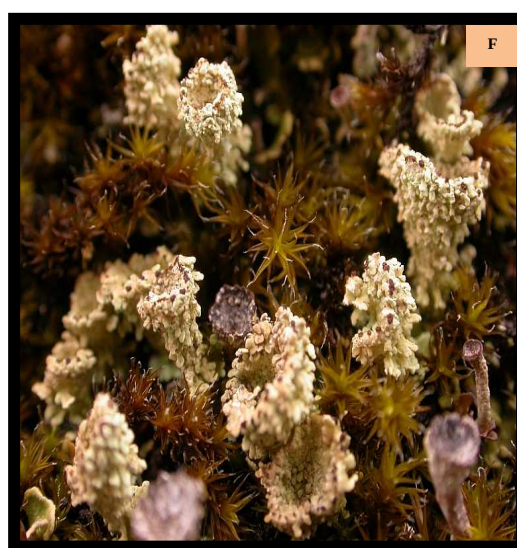
Teloschistes capensis (L. f.) Müll. Arg. Namibia



Usnea. Inglaterra



Cladonia vulcanica Zoll. & Moritzi. Taiwan



Cladonia coccifera (L.) Willd. Butão

Os crostosos estão intimamente ligados ao substrato sobre o qual estão se desenvolvendo, não têm a camada do córtex inferior e se prendem ao substrato pelas hifas da camada medular. Neste tipo de talo, a perda de água é restrita primariamente a camada superficial, sendo esta característica que lhe permite se desenvolver em ambientes extremos (*Lecanora*, *Pertusaria*, *Graphis*, *Chiodecton*). Os foliosos são semelhantes a folhas, estando parcialmente ligados ao substrato quando não desenvolvem o córtex inferior, caso contrário é comum apresentar estruturas de fixação (*Parmelia*, *Collema*, *Leptogium*). Os fruticosos ou arbustivos, lembram pequenos arbustos, cujos lóbulos podem ser achatados ou cilíndricos, não há diferenciação entre o córtex inferior e superior. Quando seccionados apresentam distintamente uma camada circular de algas, a medula e córtex. Variam de tamanho e são encontrados em vários tipos de substratos (*Usnea*, *Ramalina*, *Cladonia*, *Stereocaulon*) (HALE-JR, 1983; NASH III, 2008).

Os líquens apresentam uma intimidade morfológica e anatômica tão grande entre seus simbiontes, que existem estruturas que garantem a disseminação da espécie como um todo, ou seja, apresentam em sua estrutura tanto as hifas dos fungos como as células das algas ou de cianobactérias. No entanto, o fotobionte não se reproduz sexuadamente, este tipo de reprodução diz respeito apenas ao micobionte. Independente dos fotobiontes, os fungos podem se reproduzir assexuadamente por meio de esporos que deverão encontrar o fotobionte específico na natureza, a fim de compor a associação. Quando o líquen está no seu estado fértil, quer dizer que o fungo está produzindo ascomas, isto é, estruturas produtoras de esporos. A reprodução propriamente dita ocorre de maneira direta ou indireta. A perpetuação das características de uma espécie liquênica de geração em geração se dá provavelmente à informação genética de ambos os simbiontes e não somente do fungo (SEYMOUR; CRITTENDEN; DYER, 2005; GAUSLAA, 2006).

A forma direta de reprodução ocorre através da produção de estruturas que contém tanto o micobionte como o fotobionte, tradicionalmente conhecida e divulgada como reprodução assexuada. Em geral, uma determinada espécie apresenta apenas um tipo de estrutura de reprodução direta, o que favorece a separação taxonômica, mesmo que as outras características sejam semelhantes. Neste tipo de reprodução ocorre à formação de pequenas estruturas denominadas sorédios e isídios, a maioria. Os sorédios são estruturas muito pequenas (25-100 μm) de aspecto granuloso formado por algumas hifas envolvendo algumas células do fotobionte, não apresentam qualquer diferenciação em camadas internas. A

presença e a localização dos sorédios têm grande importância taxonômica ao nível de espécie (Figura 5) (BÜDEL; SCHEIDEGGER, 2008; SCHEIDEGGER; WERTH, 2009).

Os isídios são pequenas projeções de forma cilíndrica podendo ser simples ou ramificados, retos ou contorcidos, eretos ou procumbentes. Apresentam a mesma organização do talo, ou seja, córtex, camada de algas e medula (Figura 6). Outras estruturas de reprodução direta são os blastídios, goniocistângios (líquens epífilos), hormocistângios (produzem hormocistos – cadeias de células da cianobactéria *Nostoc*) e conidiomas. Há ainda outros tipos de reprodução direta, como a fragmentação do talo e morte das partes velhas (FAHSELT; MAYCOCK; WONG, 1989).

Figura 5 – Conjunto de sorédios (sorais) de *Hypotrachyna endochlora* (Leight.) Hale. Ilhas Canárias



Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em 04.01.2011

Figura 6 - Conjunto de isídios de *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale. São Paulo.



Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em 04.01.2011

A reprodução indireta ocorre através da produção de esporos pelo micobionte de forma assexuada ou não. Nos ascomicetos a reprodução é feita através dos conidiomas (produtores de conídios) e dos ascomas (produtores de ascósporos). Aproximadamente 59% das espécies de fungos liquenizados produzem conídios, que por serem haplóide (esporos) podem atuar tanto na reprodução direta associando-se ao fotobionte, como na indireta atuando como célula sexual masculina (gameta), portanto desempenham dupla função. Vários tipos de conidioma podem ser encontrados: picnídio ou conidioma picnidial, conidioma acervulóide, campilídio e hifóforo (SEYMOUR; CRITTENDEN; DYER, 2005).

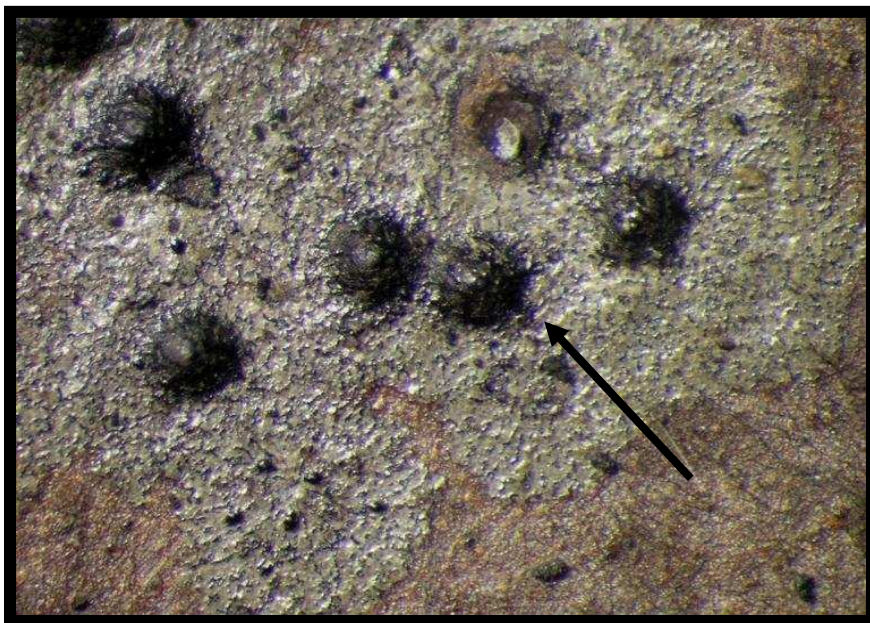
Os ascomas também se apresentam de diversas formas: apotécio (Figura 7), peritécio (Figura 8), mazélio, lirela (Figura 9) e pseudolirela. Tanto podem ser formados de estruturas fúngicas como contar com a participação dos fotobiontes do talo liquênico. Os ascósporos variam de forma desde a esférica até a filiforme passando por um grande número de formas intermediárias que são características das famílias, gêneros e espécies. O tamanho pode variar de 5-50 μm . Os ascósporos dos ascomicetos podem ser unicelulares, bicelulares e multicelulares, uma vez que podem sofrer várias divisões celulares antes da sua liberação no ambiente (SEYMOUR; CRITTENDEN; DYER, 2005).

Figura 7 - Apotécio de *Tephromela atra* (Huds.) Hafellner. Austrália.



Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em 04.01.2011

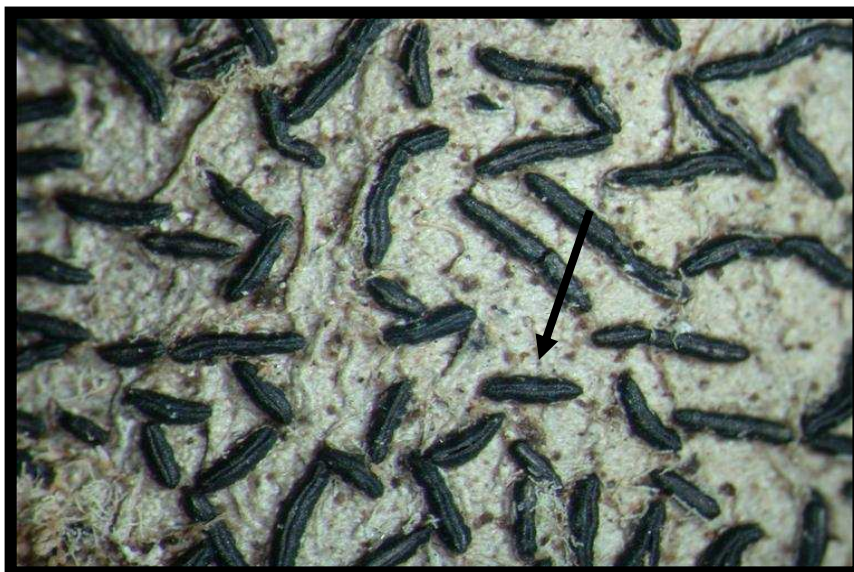
Figura 8 - Peritécio de *Strigula nitidula* Mont. Singapura



Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em 05.01.2011

Figura 9 - Lirela de *Graphis geraënsis* Redinger Brasil.

www.tropicallichens.net. Acesso em 05.01. 2011

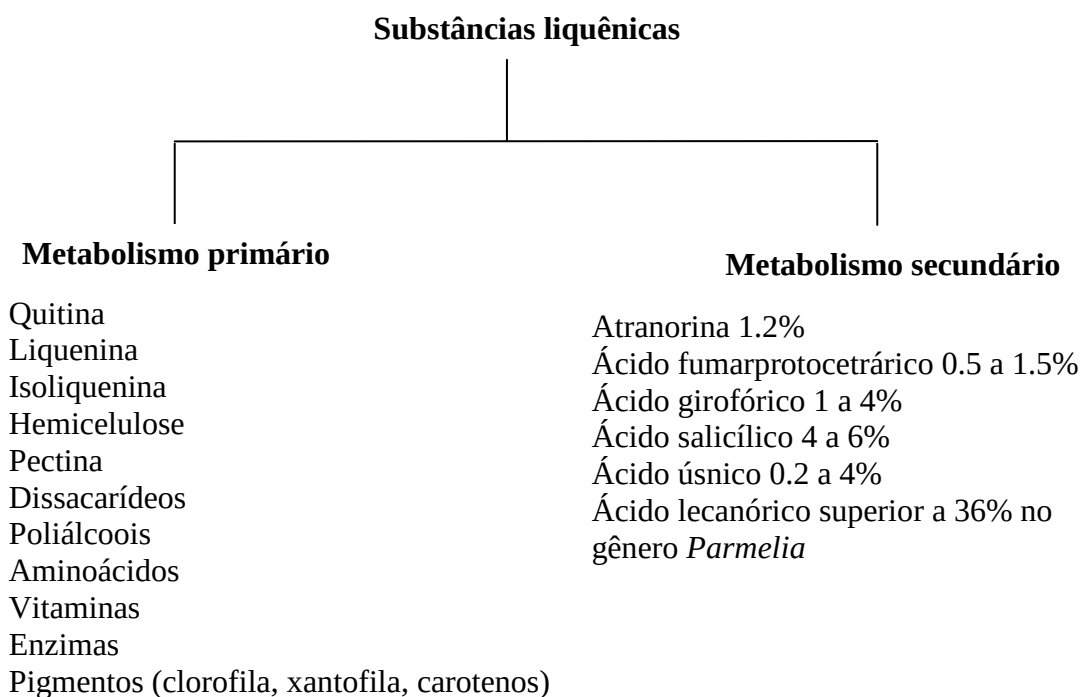


Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em 05.01. 2011

1.2 Metabólitos primários e secundários obtidos dos líquens

Varias são as substancias produzidas pelos líquens, podendo ser divididas didaticamente em metabólitos primários e secundários (Figura 10) (PODTEROB, 2008)

Figura 10 - Principais metabólitos primários e secundários obtidos dos



Fonte: Podterob

Os metabólitos primários, intracelular, como as proteínas, aminoácidos, polióis, carotenóides, polissacarídeos e vitaminas, geralmente são encontrados na parede do protoplasto, sendo freqüentemente solúveis em água, como as α -glucanas, que tem uma estrutura linear com ligações glicosídicas tipo α -[1-3] e α -[1-4], e ainda outros, tais como, ribitol, arabitol, manitol, sucrose e trealose, galactomananas, heteroglicanos, pustulanas e tamnolana (ARMSTRONG; SMITH, 2009; BOUSTIE; TOMASI, GRUBE, 2010). Os aminoácidos, como por exemplo, a micosporina serinol e ácido L-glutâmico 5-[(2,4-dimetoxifenil) hidrazina] foram descritos na literatura como sendo bons filtros solares (UVB) e apresentaram atividade antioxidante podendo ser isolados do líquen *Lichina pygmaea* (ROULLIER et al., 2010).

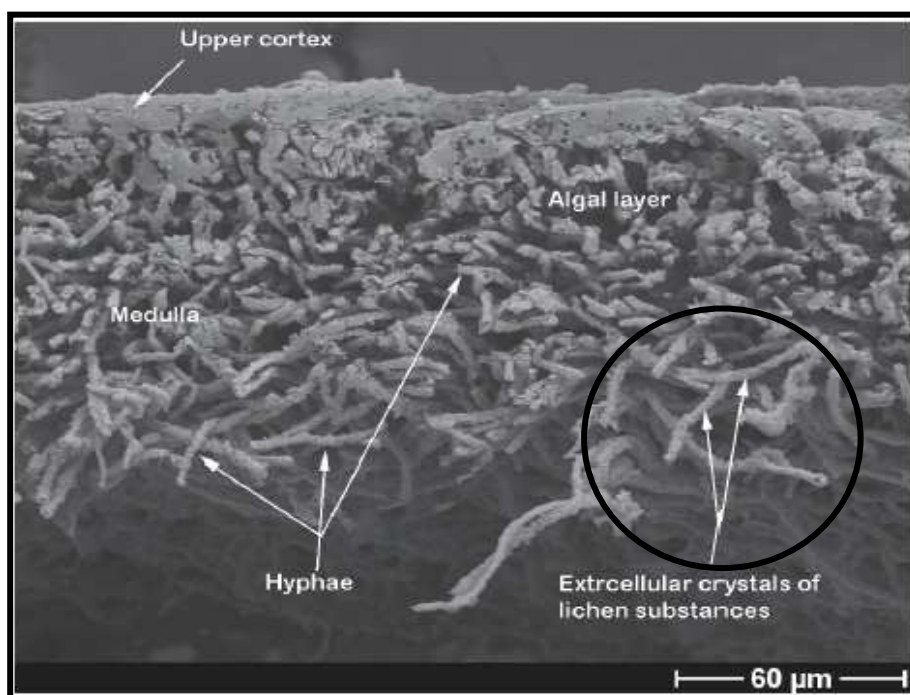
Os líquens, também, produzem *n*-alcanos, betaine (glicolipídios compostos de diacilglicerol e *d-n* permetilado hidroxiaminoácidos, encontrados em arbustos e algas), glicolipídios e ácidos graxos insaturados, oxigenados, ramificados e halogenados. O gênero *Collema* apresenta 62.1% de ácidos polienóicos, 43.9% de ácidos trienóicos. Entre os ácidos de interesse observou-se a presença do 4,7,10,13-hexadecatetraenóico, característico de algas verdes e o ácido estearidônico, característico de algas pardas, indicando serem produzidos pelo fotobionte. O conteúdo dos lipídios betaine, fosfolipídios e fosfatidilcolina variam entre 71.5 e 83% do total dos lipídios polares, neste gênero (TEMINA et al., 2010). Compostos, como o brassicasterol, liquesterol, poriferaterol e β -sitosterol podem ser obtidos de *Ramalina africana* (SHUKLA, JOSHI; RAWAT, 2010).

Até o ano de 2008, 1050 substâncias secundárias tinham sido identificadas nos líquens. Estes metabólitos secundários, encontrados na porção extracelular do talo, também são conhecidos como substâncias liquênicas e são produzidas pelo micobionte (exceção dos basidiomicetos liquenizados, que não produzem estas substâncias) através de um conjunto de genes na rota das policetídios sintases (PKSs) do tipo I e II. Estas substâncias estão descritas na literatura como exclusivas dos líquens, como, por exemplo, os ácidos nortístico (HAUCK; JUNGENS; LEUSCHNER, 2010) e o úsnico (BAZIN et al., 2008). Entretanto, aproximadamente 10% dessas substâncias podem ser encontradas em fungos de vida livre e plantas superiores (LAWREY, 2008).

Algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, como por exemplo, o *A. flavus*, *A. parasiticus* e o *A. Ochraceus* produzem os ácidos fumarprotocetrárico, lobárico, protocetrárico, salazínico, esquamático e estístico quando cultivados em meio de cultura contendo extrato de malte enriquecido com azeite de oliva (ZAIN, 2009). O micobionte isolado de *Parmelinella simplicor* produziu a atranorina e o ácido salazínico cujo potencial antimicrobiano foi testado com sucesso contra o *Staphylococcus aureus* (DHARMADHIKARI; JITE; CHETTIAR, 2010). Além da parietina (antraquinona), extraída de Teloschistales, e das plantas superiores do gênero *Rumex*, bem como, o ácido lecanórico obtido do fungo do gênero *Pyricularia* (BEDNAR; SMITH, 1965; SILVA; GORIN; IACOMINI, 1993; ARMSTRONG; SMITH, 2009). Estes dados indicam que o micobionte sozinho é capaz de produzir estas substâncias acima citadas.

As substâncias liquênicas são insolúveis em água, com peso molecular relativamente baixo que se acumulam no córtex (atranorina, parietina, ácido úsnico e as melaninas do fungo), ou na camada medular (ácidos fisódico, fisodálico e protocetrárico). Elas se depositam na porção extracelular em forma de cristais e/ou sobre a superfície das hifas, sendo restritas a áreas específicas do talo estando relacionados a diferentes funções (Figura 11). A distribuição do padrão dos metabólitos secundários são geralmente táxon-específicas sendo amplamente utilizadas na taxonomia e sistemáticas dos líquens (MOLNÁR; FARKAS, 2010).

Figura 11 - Corte transversal do talo do líquen folioso *Hypogymnia physodes*. Destaque para as hifas cobertas por cristais de metabólitos secundários, na porção extracelular



Fonte: Molnár; Farkas (2010)

Alguns dos metabólitos secundários dos líquens, como o ácido úsnico, podem regular a população dos fotobiontes através da inibição da divisão celular (BACKOR, 2010). Em *Hypogymnia physodes* (ácido fisódico, hidroxifisódico e atranorina) a alta concentração das substâncias liquênicas nas estruturas sexuais e assexuais estão associadas com a defesa dessas estruturas. Podem funcionar como agentes alelopáticos, denominados aleloquímicos, que podem afetar o desenvolvimento de líquens vizinhos, musgos, plantas vasculares (reduz a concentração de nitrogênio e fósforo das sementes de coníferas – *Pinus banksiana*) e micro-organismos (MOLNÁR; FARKAS, 2010). Capacitam os líquens a tolerar altas concentrações

de dióxido de enxofre (SO₂), estando esta capacidade fortemente influenciada pela hidrofobicidade da estrutura em escala nano e micrométrica da parede celular (HAUCK; JÜNGENS, 2008).

Portanto, o papel biológico das substâncias liquênicas pode ser resumido da seguinte forma: 1- eles podem ter papel antibiótico contra os micro-organismos; 2- aumentam a permeabilidade da membrana do fotobionte; 3- inibem o crescimento ou germinação de planta com sementes e musgos; 4- são capazes de absorver luz ultravioleta, protegendo o fotobionte do excesso de luminosidade; 5- são a base de defesa contra herbívoros e insetos; 6- previnem contra o excesso de água no talo, permitindo a contínua troca de gases (PÖYKKÖ et al., 2010).

1.2.1 Metabólitos secundários dos líquens

Mesmo estando incluídos no Reino Fungi, os líquens são organismos únicos, pois apresentam características peculiares; entre elas a produção de substâncias exclusivas da classe, que são derivados fenólicos correspondentes a quatro estruturas distintas, bem diferenciadas quimicamente conhecidas como depsídeos, depsídonas, dibenzofuranos, ácidos úsnicos e ainda o ácido picrolíquênico de *Pertusaria amara*, que é uma depsona. Estes compostos são denominados genericamente de substâncias liquênicas ou ácidos liquênicos (Figura 12) (HONDA; VILEGAS, 1998; HOWELL; NEWTON; WILLIAMS-WYNN, 2003; EISENREICH; KNISPEL; BECK, 2011).

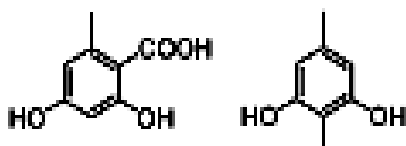
As substâncias liquênicas são formadas por unidades fenólicas, que se originam a partir dos ácidos carboxílicos policetônicos derivados do ácido acético. Estes ácidos de cadeia aberta ciclizam de formas distintas para dar origem às unidades fenólicas básicas, geralmente associadas através de ligações do tipo éster no caso dos depsídeos e éster e éter para as depsídonas (CORDOBA, 1975). Devido aos seus grupamentos fenólicos as substâncias liquênicas tem a habilidade de eliminar os radicais livres, a exemplo, da esferoforina e a panarina que inibem a formação do ânion superóxido *in vitro*. O primeiro tipo de ciclização segue o modelo do ácido orselínico, que é a base estrutural dos depsídeos, depsídonas, dibenzofuranos e, o segundo tipo que segue o modelo do floroglucinol, constituinte do ácido úsnico. Porém, nem todas as espécies de líquens apresentam derivados fenólicos. Em muitas

espécies cujo fotobionte é uma cianobactéria, não há produção desses derivados (GALUN; SHOMER – LLAN, 1988).

Principais classes químicas dos fenóis liquênicos

Figura 12 - Estruturas típicas dos metabólitos liquênicos

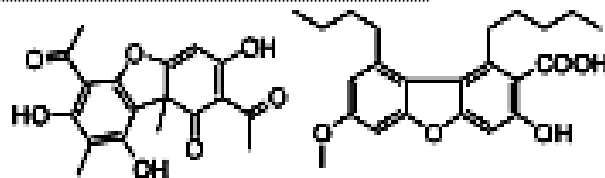
Substâncias fenólicas



Ácido orselínico

β-orsinol

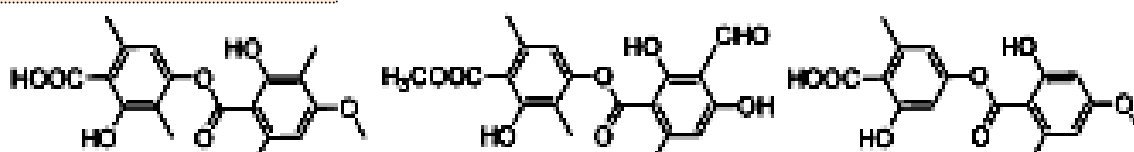
Dibenzofurano e ácido úsnico



Ácido úsnico

Ácido didímico

Depsídeos (policetídeos)

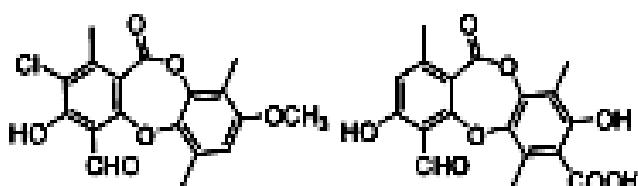


Ácido barbático

Atranorina

Ácido evérnico

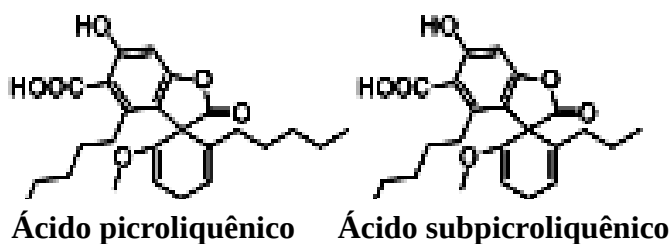
Depsidonas (policetídeos)



Panarina

Ácido virensico

Depsonas (policetídeos)



Ácido picrolíquênico

Ácido subpicrolíquênico

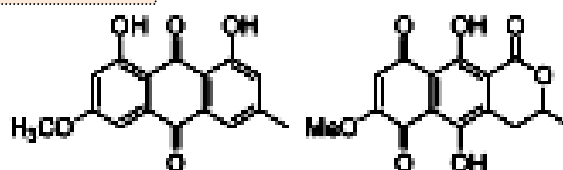
Lactonas



Ácido protoliquesterínico

Ácido nefrosterínico

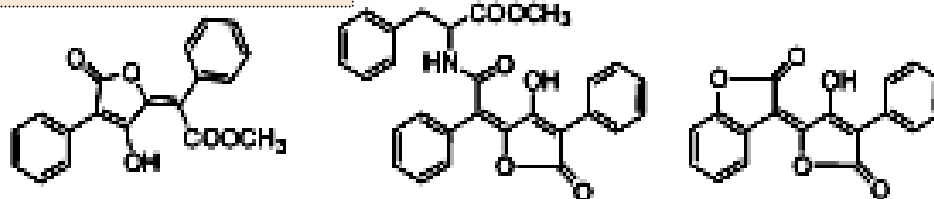
Quinonas



Parietina

Hemoventosina

Derivados do ácido pulvínico



Ácido vulpínico

Ácido rizocárpico

Calicina

Fonte: Eisenreich; Knispel; Beck (2011)

Em 1831, Bebert deu início as pesquisas com as substâncias líquênicas provenientes do seu metabolismo secundário, seguido de Alms em 1832 e Knop em 1944, que isolaram os ácidos vulpínico, picrolíquênico e úsnico, respectivamente de diferentes espécies de líquens. A primeira revisão sobre o assunto surgiu com Gmelin em 1858. No entanto, o marco inicial da liquenologia aconteceu em 1907 quando o botânico Friedrich Wilhelm Zopf publicou uma das mais importantes obras na área da liquenologia, o livro *Die Flechtenstoff in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung*, no qual descreve fórmulas empíricas, propriedades e a ocorrência de 150 compostos (HUNECK; YOSHIMURA, 1996). Na década de 1930, o químico japonês Asahina identificou diversas substâncias de líquens. Em 1954, Asahina e Shibata, publicaram outro clássico da liquenologia, o livro *Chemistry of Lichen Substances*, que compila seus trabalhos e apresentam as estruturas elucidadas de vários compostos, suas sínteses, métodos de isolamento e purificação bem como, algumas propriedades físicas destas substâncias.

Muitas das estruturas moleculares das substâncias líquênicas e rotas biossintéticas foram descritas por Asahina e Shibata (1954). Os autores dividiram as substâncias líquênicas em alifáticas e aromáticas. Na série alifática incluíram os ácidos graxos, polióis e triterpenos, e na série aromática os derivados do ácido tetrônico (ácido pulvínico), depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos e derivados da dicetopiperazina. Atualmente, o sistema de classificação mais utilizado é proposto por Culberson e Elix (1989), onde as substâncias são ordenadas de acordo com a sua provável origem biossintética, indicando que a maioria dos metabólitos secundários é derivada da rota do acetato-polimalonato, outras da rota do ácido chiquímico ou ainda da rota do ácido mevalônico (Tabela 2) (RUNDEL, 1978; HUNECK, 1999; IVANOVA; IVANOV, 2009).

As substâncias cíclicas com grupos hidroxila (OH) livres são geralmente tóxicas para os seres vivos e sua formação nos líquens provavelmente deve-se a mecanismos de controle metabólico como respostas frente a ataques externos. Tem-se atribuído as substâncias líquênicas o papel de protetores contra fenômenos de foto-oxidação causados pelo excesso de luz (CORDOBA, 1975), uma vez que muitos compostos liquenicos absorvem fortemente a radiação UV (400-320 nm), UVB (315-400 nm) e UVC (100-280 nm) (LAWREY, 2008). Outro papel fisiológico importante das substâncias líquênicas, é sua contribuição na nutrição mineral, baseada na sua capacidade de quelação com cátions inorgânicos. A habilidade das

substâncias liquênicas de formar complexos com os íons metálicos é fortemente dependente o pH (HAUCK; JUNGENS; LEUSCHNER, 2010).

Tabela 2 - Principais classes de compostos originados das três principais vias de produção de metabólitos secundários de líquens.

Via do acetato-polimalonato	• Ácidos alifáticos secundários, ésteres e derivados relacionados. • Antraquinonas, xantonas, cromonas, naftoquinonas. • Compostos aromáticos derivados dos policetídios: a) compostos fenólicos mononucleares; b) derivados de unidades fenólicas, depsídeos, tridepsídeos e éteres benzílicos; depsidonas e éteres difenílicos, depsonas, dibenzofuranos, ácidos úsnicos e seus derivados.
Via do ácido mevalônico	Mono, di, sesqui e triterpenos, esteróides
Via do ácido chiquímico	Terfenilquinonas e derivados do ácido pulvínico.

Fonte: Ivanova; Ivanov (2009)

Para identificar um líquen, tradicionalmente os liquenólogos utilizam várias combinações dos caracteres morfológicos dos apotécios. Porém, as presenças de certas substâncias encontradas nos talos têm sido usadas como recurso extra para caracterizar os fungos liquenizados. Na segunda metade do século XIX, a análise das substâncias químicas secundárias dos líquens exerceu uma grande influência na taxonomia, muitos gêneros foram reconhecidos, principalmente com base nos seus compostos químicos presentes no talo. A análise química para fins taxonômicos faz uso de reação de coloração do talo e de procedimentos de microcristalização (HALE-JR, 1983).

Nas reações de coloração, reagentes como o hidróxido de potássio (KOH) e o hipoclorito de cálcio, quando aplicados sobre o talo desencadeiam uma reação de coloração característica das várias substâncias. O hidróxido de potássio promove a hidrólise da ligação éster de depsídeos (atranorina e ácido difractáico) e depsidonas (ácido salazínico e protocetrárico), dando origem a substâncias cuja coloração varia do amarelo ao vermelho intenso. A reação com hipoclorito de cálcio é positiva para as substâncias que apresentam hidroxilas fenólicas livres. Os ácidos lecanórico, anziaico e olivetórico dão coloração vermelha intensa. A ação combinada do hipoclorito de cálcio e o KOH sobre as depsidonas podem fazer surgir uma

coloração vermelha, como ocorre nos ácidos alectorônico e graiânico. Solução de benzidina, p-fenilenodiamina, anilina, e o-toluidina são utilizadas para detecção do grupamento aldeído nas moléculas. A reação de coloração é amarela, laranja ou vermelha. A solução de cloramina T e o reagente Dimroth são utilizados para detectar o ácido úsnico e xantonas, respectivamente (VICENTE, 1975; HALE-JR, 1983).

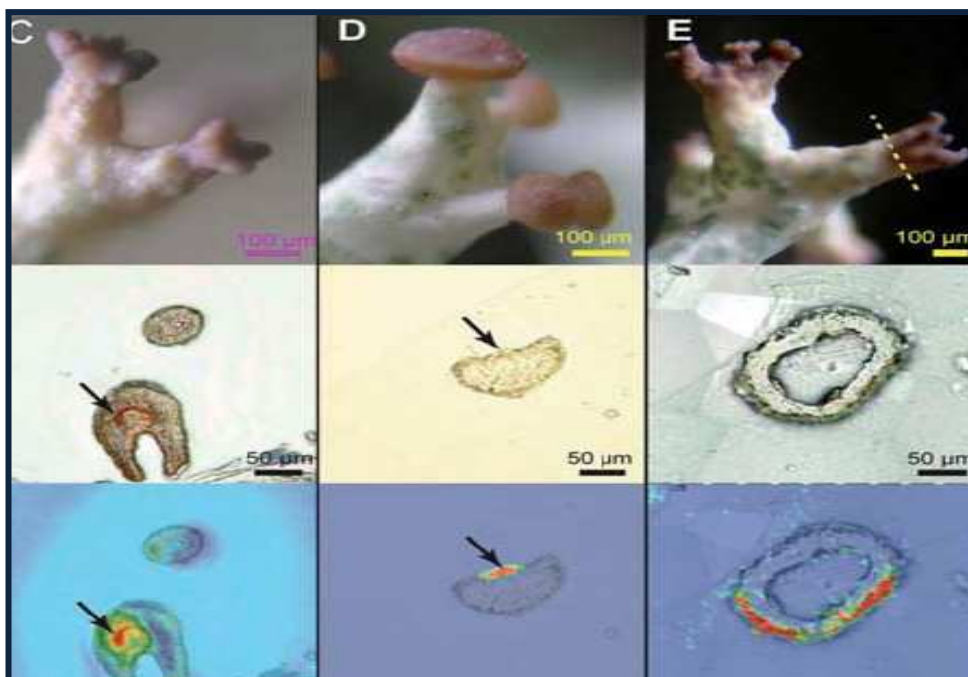
Outra técnica para identificação das substâncias líquênicas é a microcristalização, uma vez que sob condições adequadas estes compostos apresentam formas cristalinas que são obtidas através da fragmentação de pequena porção do talo que é submetido à extração com solvente orgânico. O extrato obtido é depositado sobre uma lâmina de microscópio de maneira a formar uma mancha de resíduo após a evaporação do solvente. Em seguida adiciona-se uma gota da solução para cristalização, tais como: GE-glicerina: ácido acético glacial (3:1 v/v), GAW- glicerina: etanol: água (1:1:1 v/v/v), GAoT- glicerina: etanol: o-toluidina (2:2:1 v/v/v), GWPy- glicerina: água: piridina (1:3:1 v/v/v), GAQ- glicerina: etanol: n-quinolina (2:2:1 v/v/v), GAAAn- glicerina: etanol: anilina (2:2:1 v/v/v) e finalmente cobre-se com uma lamínula. Dependendo da solução a formação da estrutura cristalina pode ocorrer imediatamente, após alguns minutos ou após algumas horas. Através desta técnica é possível identificar um grande número de substâncias líquênicas das séries dos depsídeos, depsídonas e dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos alifáticos e terpenos por comparação a padrões descritos na literatura (CULBERSON, 1963).

Atualmente métodos mais modernos estão sendo utilizados para detectar e identificar as substâncias presentes no talo líquênico. Durante as últimas décadas grandes progressos foram alcançados no desenvolvimento de instrumentos e ferramentas baseadas em software para análise multivariada destas substâncias, baseados na análise quantitativa de compostos de baixo peso molecular. Equipamentos como o cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrofotômetro de massa (GC-MS) e cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (LC-MS) são mais sensíveis que o RMN ^1H , embora as análises por RMN ^{13}C e ^{31}P sejam bastante utilizadas em cultivos de fotobiontes, a fim de mapear a rota de transferência dos compostos, a taxa de frequência e o destino de cada composto produzido pela alga (EISENREICH; KNISPEL; BACK, 2011).

Muito recentemente, a microscopia tem contribuído com os estudos *in vivo*, através de equipamentos modernos e técnicas de microespectroscopia vibracional que permitem detectar

e visualizar as substâncias líquênicas *in situ* dentro do talo intacto. Na *Cladonia uncilais*, o ácido úsnico foi detectado no picnídio, no apotécio e na região apical do talo, respectivamente (Figura 13 C, D e E). Esta informação poderá ajudar a identificar o gene responsável pela produção do ácido úsnico nestas regiões específicas do talo e então, com técnicas de clonagem e expressão do gene em fungos não liquenizados, poderão contribuir para a produção do ácido úsnico em culturas com fungos isolados. Todos estes métodos poderão estar associados a genômica e a proteômica. Juntos eles podem contribuir substancialmente para compreensão da rota metabólica nos líquens que leva a formação dos compostos secundários, bem como seu papel no estabelecimento e na manutenção da simbiose (LIAO et al., 2010).

Figura 13 - Picnídio (C), apotécio (D) e região apical do talo (E). Imagem do ácido úsnico gerada através de microespectroscopia (→)



Fonte: Liao et al. (2010)

1.3 Importância econômica e biológica das substâncias liquênicas

1.3.1 Uso dos líquens na alimentação

Na superfície da Terra estima-se que a flora liquênica domina cerca de 8% do total da vegetação, fazendo parte, portanto, da cadeia alimentar de vertebrados, invertebrados e humanos. Existe registro do uso dos líquens na alimentação humana em diferentes culturas na América, Europa, Ásia e África. Há séculos atrás já se dizia que os líquens são boa fonte de alimentação, principalmente na forma de massa; por serem baratos, de fácil aquisição e por ter propriedades nutritivas. No entanto, para o consumo humano alguns problemas são relatados. Os compostos, geralmente de caráter ácido apresentam sabor amargo, seus carboidratos são complexos, tais como, a evernina, usnina, celulose, inulina, liquenina (solúvel em água quente α -(1-3)(1-4)-D-glucana) e isoliquenina (solúvel em água fria β -(1-3)(1-4)-D-glucana), o que dificulta a digestão podendo causar irritação no trato digestivo. Porém em 1874 Külz sugeriu que eles poderiam ser consumidos como açúcares alternativos para os diabéticos (IVANOVA; IVANOV, 2009).

Tradicionalmente, existem vários métodos de preparação para remoção dos compostos secundários e a posterior hidrólise dos carboidratos, a fim de serem consumidos. As técnicas de fervura, infusão e lavar o talo com água e cinza (por ser alcalina, acredita-se que auxilia na remoção dos compostos tóxicos), são bastante utilizadas na América do Norte (em períodos de extremo frio, os líquens tornam-se uma das poucas fontes de alimento disponíveis), Europa e Índia. A fervura pode ajudar a hidrolizar os polissacarídeos liquênicos em formas mais digeríveis. Os líquens são ainda, boa fonte de cálcio e algumas espécies, como a *Peltigera sp* e a *P. canina* tem alto conteúdo de proteínas, cerca de 17 e 21%, respectivamente. Porém, há outra desvantagem para o uso dos líquens na alimentação humana é a sua capacidade de acumular toxinas do meio ambiente (IVANOVA; IVANOV, 2009).

O uso dos líquens são tão antigos quanto às dinastias egípcias, pois é conhecido desde a antiguidade, quando um fragmento de líquen identificado como *Evenia furfuracea*, espécie que não ocorre naquela região foi encontrado em um vaso de 18^a. dinastia, entre os anos de 1700 a 1600 a. C (ABRAHAN e FLOREY, 1949); ou mesmo o “*Manah*” dos desertos (Figura 14) citado na Bíblia, que se supõe ser a *Aspicilia esculenta*, líquen comum nas dunas dos desertos e utilizado por habitantes da área, sob forma de farinha para pão e bolo (LLANO,

1951). Richardson (1988) relata o uso de talos secos de *Cetraria islandica* para suplementar as farinhas durante o período de fome na Noruega que se estendeu desde 1807 até 1814. Sendo também, estas farinhas suplementadas utilizada na Islândia e Finlândia, no preparo de biscoitos, bastante resistentes a umidade e ao consumo pelos insetos. Durante a segunda Guerra Mundial (1939-45), na União Soviética foi desenvolvido um método para extração de glicose “molasses” obtida de *Flavocetraria nivalis* e *C. islandica*.

Figura 14 - Imagem representativa da coleta da *Aspicilia esculenta*, o Maná do deserto segundo o Livro do Êxodo



Fonte: www.ut.ee/.../pages/Aspicilia%20esculenta.htm. Acesso em 15.01.2011

Na província de Yunnan, na China, os habitantes utilizam a *Lobaria isidiophora* e *L. kurokawae* no preparo para guarnição que acompanha carne de veado. Espécies como *Ramalina condoplicans* e *R. sinensis* servem também para acompanhar pratos frios, tradicionalmente, em banquetes nupciais. Acredita-se que a ingestão desta iguaria garante aos noivos a união por toda a vida. No Tibete, as espécies *Lethariella cashmeriana* e *L. sernanderi* são utilizados como chás, cujas propriedades anti-inflamatórias e anti-hipertensivas são bastante conhecidas. Estas espécies são facilmente encontradas nos mercados étnicos da província, a preços populares (WANG et al, 2001).

Na história da indústria alimentícia, consta que Gmelin (1752) relata que em sua viagem a Sibéria bebeu cerveja preparada pelos monges do monastério de Ussolka, onde o lúpulo havia sido substituído por líquen (*Lobaria pulmonaria*) e as características do sabor permaneceram

inalteradas. Em 1921, Smith em seus documentos menciona que o Prof. Stone Stenberg, radicado em Estocolmo em 1883, dedicou-se a fabricação de uma bebida chamada “brandy”, feita com *Cladonia rangifera*, *C. islandica* e *Alectoria jubata*. No entanto, ao final do ano de 1884, por falta de matéria prima, as destilarias que utilizavam líquens para fabricação do “brandy” foram fechadas. No México, a tribo *Tarahumara*, é especializada na manufatura de cerveja, chamada *tesguino* (*Lobaria pulmonaria*), de forma artesanal (Figura 15).

Figura 15 - Tribo *Tarahumara* fabricando a cerveja chamada *tesguino* artesanalmente.



Fonte: www.cobisimages.com/Enlargement/PS003212.html. Acesso em 15.01.2011

Na Índia e no Norte do Nepal, espécies como *Parmelia tinctorum* e *P. astrosinensis* são utilizadas para realçar o sabor dos condimentos. Em mercados de Poopa e Aurangabad, na Índia, pode-se obter um preparado chamado “dagaful” (garam-masala, componente do curry) cuja mistura contém *P. tinctorum*, *P. nigherrense*, *P. reticulata* e *P. sancti-algelia*, que adicionada a outros preparados dá um sabor picante (Figura 16) (DONKIN, 1981).

Figura 16 - Garam-masala, componente do curry.



Fonte: www.penzeys.com/cgi-bin/penzeys/p-penzeyscerryypowder.html/. Acesso em 15.01. 2011

A *Lecanora esculenta* é bastante apreciada por homens e animais, principalmente ovelhas, nas estepes semi-áridas do Irã e da Turquia. Conta-se que durante a guerra na Argélia, o exército Frances misturava este mesmo líquen com cevada, a fim de alimentar os cavalos das tropas. Algumas espécies de *Cladonia* (Figura 17) servem, ainda, de alimentos para renas e caribús nas regiões geladas da América no Norte (DONKIN, 1981).

Figura 17 - *Cladonia rangifera*. Alimento para renas e caribús nas regiões de frio intenso.



Fonte: www.shutterstock.com/pic-34502482/stock-photo-reindeer-lichen-cladonia-rangiferina-background.html. Acesso em 16.01.2011

1.3.2 Uso das substâncias liquênicas na indústria de perfumes e cosméticos

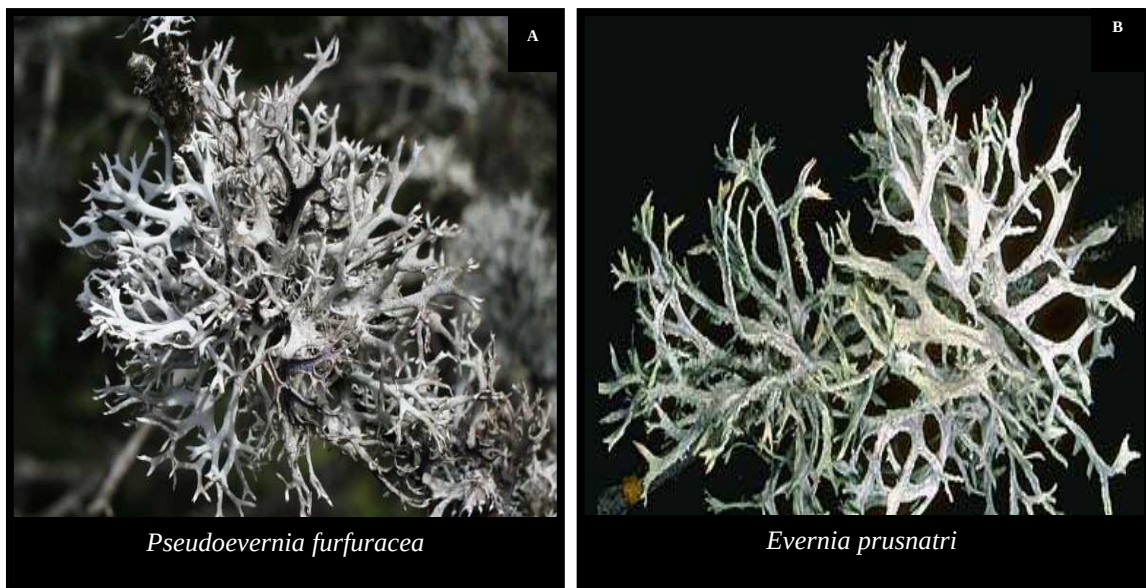
O Oakmoss ou *Evernia prunastri*, também conhecido como musgos de carvalho ou musgo de encina (em português), é comercialmente produzido em países do Sudeste da Europa Central e exportado para França, onde seus compostos aromáticos são extraídos com benzeno ou éter de petróleo por sucessivas vezes, incluindo filtração e destilação a fim de se obter um líquido viscoso (Figura 18 A e B). Este é o componente chave, utilizado como fixadores de perfumes formando a “base nota” de muitas fragrâncias (Figura 19 A e B). O odor do extrato é geralmente distinto e complexo, descrito usualmente, como amadeirado, acentuado e ligeiramente doce. Aqueles líquens que crescem em pinheiros têm pronunciado odor de terebentina, sendo bastante valorizado na composição de certos perfumes (Figura 20). Outras espécies como, *Pseudoevernia* e *Usnea* são também amplamente usadas nas indústrias de perfumaria (SEU-SALERNO; BLALEWAY, 1987; JOULAIN; TABACCHI, 2009).

Figura 18 - Extrator (A) e destiladores (B) para obtenção de óleos e fixadores de perfumes obtidos dos líquens.



Fonte: www.lichens.com. Acesso 23.01.2011

Figura 19 – A: *Pseudoevernia furfuracea*; B: *Evernia prunastri*.



Fonte: www.lichens.com. Acesso 23.01.2011

Figura 20 - Exemplo do uso dos líquens na perfumaria francesa.



Fonte: www.google.com.br/images. Acesso em 23.01.2011

Na indústria de cosméticos, os líquens são amplamente usados em diversos produtos (Figura 21 A, B, C e D).

Figura 21 - Exemplo do uso dos líquens na indústria de cosméticos. A- composição da henna; B: composição de loção após barba; C e D: na composição de colônias.



Fonte: www.lichens.com. Acesso em 23.01.2011

1.3.3 Uso das substâncias liquênicas como corantes

Os metabólitos secundários obtidos das diferentes espécies de líquens também são conhecidos desde a antiguidade por produzirem compostos coloridos bastante utilizados em tecidos. Theophrastus (371-287 A.C), em “De Causis Plantarum” descreve que as algas marinhas utilizadas no tingimento da lã e da seda, na verdade eram espécies de *Rocella tinctoria*, *Usnea* ou ainda *Alectoria* (Figura 22). Segundo Hale-Jr (1983) os índios californianos da tribo Klamath utilizavam extratos de *Letharia pulvina*, como corante para fabricação de cestas, bem como veneno uma vez que o corante amarelo do ácido pulvínico é um potente veneno para os animais carnívoros, com exceção dos ratos e coelhos (GALUN; SHOMER-LLAN, 1988). As tribos *Chilkat Tinglit* e *Ramah Navaho*, localizada no Novo México também, utiliza os corantes naturais obtidos de *Xanthoparmelia chlorochroa* para tingir os mantos utilizados em rituais folclóricos (Figura 23); também algumas peças de vestuários confeccionadas com líquens podem ser observadas no museu de História Natural em Nova York (Figura 24).

Figura 22 - Tingimento de lã com corantes obtidos de algumas espécies de líquens.



Fonte:

www.allfiberarts.com/library/aa05/aa090105.html.

<http://ecologicalartist.worldpress.com>.

<http://ocid.nacse.org/lichenland/html/meeting.html>.

Acesso em 05.02.2011

Figura 23 - Mantos utilizados em rituais folclóricos pela tribo *Chilkat Tinglit* e *Ramah Navaho* do México tingidos com líquens.



Fonte: www.lichens.com. Acesso em 05.02..2011

Figura 24 - Peça de vestuário confeccionada com líquen, exposta no museu de História Natural em Nova York

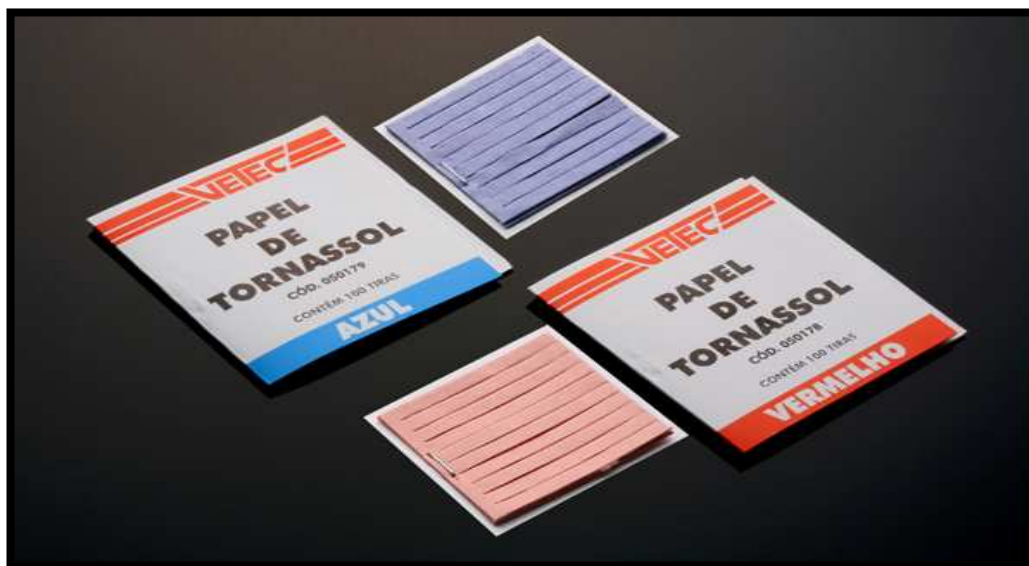


Fonte:

www.sharnoffphotos.com/lichensNH/human_uses_misc.html. Acesso em 15.02.2011

Na época do Renascimento, Francesco di Marco Datini, importava líquens coletados do Marrocos para obter um tipo de corante, chamado de “orchila” - urzela em português. O conhecimento da arte de tingir com a urzela é muito antigo, possivelmente desde a civilização mesopotâmica (SMITH, 1921). A urzela foi introduzida nos Açores/Portugal no século XV, sendo sua exploração econômica uma importante fonte de renda para região, atingindo seu apogeu no século XIX, onde era conhecida como “púrpura francesa”. Porém, após a introdução do corante sintético malveína, a urzela passou a ser pouco utilizada (FARRAR, 1974). O princípio do corante extraído da urzela ou ervinha é a orceína, uma substância cristalina de cor vermelho acastanhado, que produz um corante de cor púrpura ou azul violáceo, obtida por extrações em soluções de amoníaco. Antigamente a urina era utilizada como fonte de amoníaco. Na atualidade a urzela é chamada de orceína ou azul de tornassol que tem ampla aplicação na microscopia e como base para indicadores químicos e bioquímicos, como por exemplo, o papel indicador que em inglês deu origem ao teste de “litmus” (Figura 25), fabricado nos Países Baixos que consomem cerca de 0,7 a 1,4 t de *Rocella* por ano (MOXHAM, 1982).

Figura 25 - Papel indicador utilizado no teste de litmus.



Fonte: www.casaamericana.com.br. Acesso em 23.03.2011

Alguns usos e costumes interessantes com líquens ainda podem ser relatados: a) *Pseudoevernia furfuracea* era utilizada no processo de embalsamamento de múmias no Egito Antigo, há aproximadamente 5.000 anos atrás, por suas propriedades aromáticas, conservantes, altamente absorventes e leves eram de grande utilidade neste processo (Figura 26); b) *Dictyonema sericeum* é utilizada, pelo xamã, de algumas tribos do Equador para

invocar espíritos malévolos a fim de amaldiçoar as pessoas. Ainda nestas mesmas tribos é utilizado para causar esterilidade em mulheres; c) tribos do Planalto Índico utilizam líquens para fazer cataplasma de inchaço, hematomas, feridas, furúnculos e em forma de chás para estancar sangramento (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000); d) a espécie *Nephroma arcticum*, cujo fotobionte é uma cianobactéria, contém uma proteína anti-congelante que mantém homogeneizada a textura dos alimentos no freezer, estando já patenteada pela Unilever (OKSANEN, 2006).

Figura 26 - Líquen utilizado no processo de mumificação.



Fonte:

www.solarnavigator.net/egyptian_cat_mummies.htm.

Acesso em 23.03.2011

1.3.4 Uso dos líquens na medicina popular e indústria farmacêutica

Os líquens sempre foram utilizados em várias partes do mundo, especialmente na medicina popular, através do uso de chás e preparações contra diversas enfermidades. Na Índia, os líquens do gênero *Parmelia* são utilizados para o tratamento de diversas enfermidades, como dor de cabeça, doenças de pele, infecção urinária, vômito, diarreia e lepra (TIWARI et al., 2011). Na China, a *Thamnolia vermicularis* é utilizada comumente em forma de chá, conhecido como “snow tea”, utilizado no tratamento de hipertensão e inflamações do sistema respiratório. Os povos que formam diferentes tribos na província de Yunnan também utilizam esta mesma espécie como alimento (MANOJLOVIĆ et al., 2010b).

O uso como medicamento só foi descrito pela primeira vez no século XVI. Porém, as propriedades terapêuticas dos compostos liquênicos são conhecidas desde a antiguidade, quando se tratava as doenças baseado na “doutrina dos sinais”, ou seja, a *Usnea barbata* por ser filamentosa, era utilizada para tratar cabelos enfraquecidos, a *L. pulmonaria* cuja superfície é reticulada, era designada para problemas nos pulmões; a *Xanthoria parietina*, curava icterícia devido a sua cor amarelada e a *P. apthosa* era indicada para erupções presentes na boca das crianças com afta ou estomatite (ABRAHAM; FLOREY, 1949; SILVA et al., 1986; MUGGIA; SCHMIT; GRUBE, 2009; SHUKLA; JOSHI; RAWAT, 2010).

A *Cetraria islandica* (líquen islandicus) é um dos raros líquens que entra na fórmula de medicamentos para resfriado (Broncholind fabricado pela MCM Klosterfaru, Köln, Alemanha e o Isla-Moos fabricado pela Engelhard Arzneimittel, Alemanha) (Figura27). A atividade do extrato é descrita por causa da presença de polissacarídeos, como a liquenana e ajuda a manter a hidratação e diminuir a irritação das mucosas no sistema respiratório (BOUSTIE et al. 2010).

Figura 27 - Exemplo de medicamentos obtidos dos líquens usados como anti-inflamatórios e anti-asmáticos.



Fonte: www.eczanegulden.com/main/iceland_moss. Acesso em 23.03.2011

1.3.5 Atividade antibacteriana

A partir das observações empíricas do uso das substâncias liquênicas na medicina popular, pesquisas foram desenvolvidas e já em 1948, Asahina et al. estudaram os efeitos da substituição nos anéis A e B do ácido úsnico na ação antibiótica. 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 para ¼ sua capacidade antibiótica. Essas

observações indicam que as duas hidroxilas livres (C-8; C-10) no primeiro anel (A), 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, indicando que a presença de derivados fenólicos nos extratos liquênicos pode ser o determinante na atividade antimicrobiana nos líquens (VICENTE, 1975).

Em 1949, Vartia 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-liqueterínico, fisódico, úsnico e a atranorina inibiram efetivamente o crescimento de alguns tipos dessas bactérias e fungos. Resultados interessantes também foram descritos por Capriotti (1961), que relatou a eficácia de vários extratos orgânicos de diferentes espécies de líquens ativos não somente contra bactérias álcool-ácido resistentes, como *Mycobacterium tuberculosis*, var. *bovis*, *avium* e *hominis*. O resultado anos mais tarde foi confirmado por Ingólfssdóttir et al. (1985; 1998) referindo que a atranorina, ácidos lobárico, d-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 as drogas padrões antibacterianas como, rifampicina, estreptomicina e isoniazida.

Durante as várias décadas que se seguiram a partir da década de 1950, os estudos da atividade bactericida foram avançando (Tabela 3) (GAYATHRI; SWAMY, 2012). A Interação *in vitro*, de droga com atividade bactericida padrão como a ampicilina foram associadas ao extrato metanólico de *Ramalina farinacea* contra o isolado clínico de *S.aureus*. Os resultados revelaram a interação sinérgica da ampicilina e os extratos do líquen. A interação sinérgica foi de 100% em todas as combinações da droga com os extratos aumentando o espectro de ação antibiótico, tornando-o assim mais potente (AGBOKE et al., 2011). Resultados promissores também foram descritos por Segatore et al. (2012), porém utilizando metilina e o ácido úsnico.

Tabela 3 - Atividade antibactericida dos líquens

Líquens	Substâncias ou extratos	Bactérias	CMI/halo mm	Referências
<i>Cladonia alpestris</i> , <i>C. rangifera</i> e <i>C. sylvatica</i>	Ácidos liquesterínico, pinástrico, pulvínico girofórico e úsnico	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Inibição do bacilo	Vartia, 1949
	Ácido úsnico combinado com estreptomicina	<i>M. tuberculosis</i>	Inibição do bacilo	Bustinza, 1950
	Ácido úsnico, usnato de sódio, usnimicina	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. mycoides</i> e <i>Streptococcus β-hemolyticus</i>	Solução aquosa de 1:1000	Bustinza, 1951
<i>Stereocaulon alpinum</i> , <i>Peltigera aphthosa</i>	Metil-β orselinato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30-80 µg mL	Ingólfssdóttir et al, 1985
<i>Cladonia arbuscula</i>	Ácido úsnico	<i>M. aurum</i>	32 µg mL	Ingólfssdóttir et al, 1998
<i>Heterodermia diademata</i> , <i>Parmelia reticulata</i> e <i>P. nepalensis</i>	Atranorina, ácidos protoliquesterínico, salazínico e úsnico	<i>Bacillus cereus</i>	11 e 12 mm	Devoka et al., 1999
<i>Ramalina farinacea</i>	Extratos etanólico, clorofórmico, <i>n</i> -hexano e aquoso	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Escherchia coli</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> e <i>P. aeruginosa</i>	9-30 mm 97-600 µg mL	Esimone e Adikwu, 1999
<i>Usnea capillacea</i> , <i>U. ciliifera</i> , <i>U. inermis</i>	Ácido úsnico	<i>B. subtilis</i>	1-10 mm	Perry et al., 1999
<i>Cladina dendroides</i> , <i>Psoroma leprolomum</i> , <i>Protousnea malacea</i> , <i>Roccelina cerebriformes</i>	Atranorina, leprolomina, ácidos divaricático e rocelínico	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>	0.1 mg mL	Ribeiro et al., 2002

Líquens	Substâncias ou extratos	Bactérias	CMI/halo mm	Referências
<i>Parmotrema tinctorum</i>	Derivados do ácido orselínico e orselinatos	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> e <i>Rastonia solanacearum</i>	7.8 – 31.25 µg mL	Gomes et al., 2003
<i>R. solediosa</i>	Ácido úsnico	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>	19.6 – 11.7 mm	Falcão et al., 2004
<i>R. farinacea</i>	Ácido nortístico	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	23.4 – 188 µg µL	Tay et al., 2004
<i>Usnea ghattensis</i>	Extratos metanólico e acetônico	<i>B. liqueniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>	5-10 µg mL	Behera et al., 2005
<i>Rocella montagnei</i>	Extrato metanólico	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. typhi</i> , <i>paratyphi</i>	10 -15 mm	Balaji et al., 2006
<i>Parmelia saxatilis</i> , <i>Plastismatia glauca</i> , <i>R. pollinaria</i> , <i>R. polymorpha</i> , <i>Umbilicaria nylanderiana</i>	Extrato metanólico	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>S. pyogenes</i>	15.62 µg mL	Gulluce et al., 2006
<i>C. convulata</i> , <i>C. firma</i> , <i>Lecanora muralis</i> , <i>R. canariensis</i> , <i>R. subfarinacea</i>	Ácido úsnico	<i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	6-17 mm	Saenz, Garcia, Howel, 2006

Líquens	Substâncias ou extratos	Bactérias	CMI/halo mm	Referências
<i>Parmotrema praesorediosum</i>	Extratos acetato de etila, diclorometano, acetônico e metanólico	<i>B. cereus</i> , <i>Corynebacterium diptheriae</i> <i>S. aureus</i> , <i>Shigella flexnerii</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	3.5 – 14.1 mm	Balaji e Hariharan, 2007
<i>U. ghattensis</i> , <i>Arthothelium awasthii</i>	Ácidos úsnico e barbático em cultura de micobionte	<i>S. aureus</i> , <i>B. liqueniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i>	1.7 – 2.7 mm	Behera et al., 2008
<i>C. furcata</i> , <i>Ochrolechia androgyna</i> , <i>P. caperata</i> , <i>P. conspresa</i>	Ácidos fumarprotocetrárico, lecanórico, protocetrárico, estistíco	<i>B. mycoides</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Enterobacter cloaceae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>	0.06 – 0.5 mg mL	Ranković et al., 2010
<i>Peltigera polydactyla</i> , <i>R. farinacea</i> , <i>Xanthoria elegans</i> , <i>ctrelia olivetorum</i> , <i>Lecanora muralis</i>	Extratos aquoso e metanólico	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	7-15 mm	Karagöz et al., 2009
<i>P. dilatatum</i> , <i>P. tinctorum</i> , <i>Pseudoparmelia sphaerospora</i> , <i>U. subclavata</i>	Ácidos difractáico, nortístico, úsnico, hipostístico, protocetrárico	<i>M. tuberculosis</i>	15-41 µg mL 62-168 µg mL 62-182 µg mL 94-251 µg mL 125-334 µg mL	Honda et al, 2010
<i>L. frustulosa</i> , <i>Parmeliopsis hyperopta</i> ,	Ácido divaricático e zeorina	<i>B. mycoides</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. cloaceae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>	0.39 – 1.56 µg mL	Kosanić, Ranković, Slobodan, 2010a
<i>Parmelia sulcata</i> , <i>L. muralis</i>	Extratos metanólico e acetônico	<i>B. mycoides</i>	0.78 mg mL 22-25 mm	Kosanić, Ranković, 2010b

Líquens	Substâncias ou extratos	Bactérias	CMI/halo mm	Referências
<i>Parmelinella simplicor</i>	Atranorina, ácido salazínico de cultura de micobionte	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. megaterium</i>	Formação de halo de inibição	Dharmadhikari , Jite, Chettiar, 2010
<i>Ramalina pacifica</i>	Extrato etéreo	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. paratyphi</i> <i>E. coli</i>	17 mm 12 mm 11 mm 13 mm 18 mm	Hoskeri, Krishna, Amruthvalli, 2010
<i>Cladia aggregata</i>	Ácido barbático	<i>S. aureus</i>	50-100 µg mL	Martins et al., 2010
<i>Parmelia centrifuga</i>	Extrato metanólico	<i>P. aeruginosa</i>	0.23 µg mL 36 mm	Ranković et al., 2010
<i>Everniastrum cirrhatum</i>	Atranorina, ácidos salazínico e protoliquesterínico	<i>S. epidermidis</i>	400 µg mL	Swathi et al., 2010
<i>R. farinacea</i>	Extrato metanólico combinado com a ampicilina	<i>S. aureus</i>	Sinergismo	Agboke et al., 2011
<i>U. cylindrica</i>	Extrato metanólico	<i>B. subtilis</i> , <i>S aureus</i>	15.62 µg mL	Manojlovic, 2012
<i>Usnea longissima</i>	Extrato etanólico	<i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i>	18 mm 21 mm 26 mm	Thippeswamy et al., 2011
<i>P. sulcata</i>	Extrato acetônico	<i>B. mycoides</i>	0.78 mg mL	Ranković e Kosanić, 2012
<i>C. lepdophora</i>	Ácido úsnico combinado com oxacilina	<i>S. aureus</i>	Sinergismo	Segatore et al., 2012

Fonte: Autor (2012)

1.3.6 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica das substâncias líquênicas está amplamente documentada em artigos publicados ao longo dos anos, tanto quanto a atividade antimicrobiana. O ácido úsnico e usnato de sódio estão entre as substâncias cujo primeiros relatos foram descritos por Bustinza (1951). Porém, os extratos de diferentes líquens mostraram serem promissores quanto a este tipo de atividade, a exemplo do extrato alcoólico de *Hypogymnia lugubris* e o acetônico de *Lasallia papulosa* inibiram o crescimento de cepas de *Tricophyta mentagrophytes* e *Marchandiomyces corallinus*, respectivamente (PERRY et al., 1999; TORZILLI et al., 1999).

O extrato etanólico de *H. physodes* e *Ramalina farinacea* quando combinados com o fungicida comercial Bentex-T inibiu o crescimento entre 60 e 70% do *Aspergillus flavus* que se desenvolvem principalmente em alimentos e produzem aflatoxinas extremamente tóxicas tanto para humanos como para animais (TAY et al., 2004). O *Fusarium oxysporum*, um fungo de importância econômica que se desenvolve no solo, foi tratado com extrato metanólico de *Parmelia saxatilis*, que inibiu seu crescimento nas concentrações entre 31.25 e 62.50 µg mL (GULLUCE et al., 2006).

A atividade antifúngica relevante foi descrita por Shahi, Shahi e Upreti (2011) para o extrato aquoso de *Peltigera paraetaxtala*, cuja atividade relevante deu-se para cepas de interesse médico, como a *Epidemophyton floccosum*, *Microsporium audouinii*, *M. canis*, *M. nanum* e *M. gypseum*, conhecidos como fungos oportunistas que se instalam em pacientes com sistema imunológico deficiente. Os pacientes infectados tratados com o extrato ficaram curados e o percentual de inibição do crescimento das cepas foi de 100%.

A atividade antifúngica das substâncias líquênicas está relatada e sumariada na Tabela 4.

Tabela 4 - Atividade antifúngica das substâncias líquênicas

Líquens	Substâncias ou extratos	Fungos	CMI/halo mm	Referências
	Ácido úsnico, usnato de sódio, usnimicina	<i>Tricophyton mentagrophytes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Turula utilis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Solução aquosa de 1:1000	Bustinza, 1951
<i>Hypogymnia lugubris</i> , <i>Parmelia homoeophyta</i> , <i>P. pickeringii</i> , <i>P. pallidum</i>	Extrato alcoólico	<i>C. albicans</i> , <i>T. mentagrophytes</i>	3-10 mm	Perry et al., 1999
<i>Lasallia papulosa</i> , <i>Flavoparmelia baltimorensis</i>	Extrato acetônico	<i>Marchandiomyces corallinus</i>	Inibição do crescimento do fungo	Torzilli et al., 1999
<i>Evernia prusnastri</i> , <i>H. physodes</i> , <i>Cladonia portentosa</i>	Ácido úsnico, evérnico	<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Ustilago maydis</i>	0.5. 10 ⁻⁵ M 0.5. 10 ⁻⁴ M 0.5.10 ⁻³ M	Hamala e Van Haluwin, 2004
<i>H. physodes</i> , <i>R. farinacea</i>	Extrato etanólico combiando com fungicida Bentex-T	<i>A. flavus</i>	60-70% 29-34%	Suberu, 2004
<i>Ramalina farinacea</i>	Ácido nortístico	<i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	2.9 µg µL	Tay et al., 2004
<i>Rubia tinctorum</i> , <i>Rhammus frangula</i> , <i>Caloplaca cerina</i>	Alizarina, emodina, parietina	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i> , <i>Aspergillus Niger</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aueobasidium pullulans</i> , <i>Mucor macedo</i>	10-50 % de inibição dos fungos	Manojlovic et al., 2005

Líquens	Substâncias ou extratos	Fungos	CMI/halo mm	Referências
<i>Roccella montagnei</i>	Extrato metanólico	<i>C. albicans</i>	9-12 mm	Balaji et al., 2006
<i>Parmelia saxatilis</i> , <i>Plastismatia glauca</i> , <i>R. pollinaria</i> , <i>R. polymorpha</i> , <i>Umbilicaria nylanderiana</i>	Extrato metanólico	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Rhizopus spp.</i> , <i>Sclerotinia minor</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>	31.25 – 62.50 µg mL	Gulluce et al., 2006
<i>Parmotrema praesorediosum</i>	Extratos acetato de etila e diclometano	<i>C. albicans</i>	3.5 – 14. 1 mm	Balaji e Hariharan, 2007
				Ranković et al., 2008
<i>Lecanora argentata</i> , <i>Cetraria japônica</i> , <i>C. braunsiana</i> , <i>R. litoralis</i> , <i>R. conduplicans</i> , <i>Parmelia simplicor</i> , <i>U. esculenta</i> , <i>Nephromopsis pallescens</i>	Cultura de micobiontes	<i>Colletotrichum acutatum</i>	19-27 mm	Wei et al., 2008
<i>Parmelinella simplicor</i>	Extrato acetônico de cultura do micobionte	<i>C. albicans</i>	Inibição do crescimento do fungo	Dharmadhikari, Jite, Chettiar, 2010
<i>P. sulcata</i>	Extrato acetônico	<i>Botrytis cinera</i> , <i>C. albicans</i>	11-24 mm	Kosanić e Ranković, 2010b
<i>Everniastrum cirrhatum</i>	Extrato metanólico	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigatus</i>	0.83-1.90 mm	Swathi et al., 2010
<i>U. cylindrica</i>	Extratos acetato de etila e metanólico	<i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i>	15.62-31.25 mm	Manojlovic et al., 2011

Líquens	Substâncias ou extratos	Fungos	CMI/halo mm	Referências
<i>Peltigera paraetaxtala</i>	Extrato aquoso	<i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporium audouinii</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. nanum</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. tonsurans</i>	Inibição do crescimento dos fungos (100%) e cura dos pacientes infectados	Shahi, Shahi, Upreti, 2011
<i>P. tinctorum</i>	Extratos metanólico e acetônico	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. alternata</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. reseau</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Ustilago sp.</i> , <i>Albugo candida</i>	8-33 mm	Tiwari et al., 2011
<i>U. longissima</i>	Extrato etanólico	<i>T. viride</i> , <i>C. albicans</i>	11-14 mm	Thippeswamy et al., 2011
<i>L. atra</i> , <i>L. muralis</i> , <i>P. saxatilis</i> , <i>P. sulcata</i> , <i>Parmeliopsis ambigua</i>	Extratos metanólico e acetônico	<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>C. albicans</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>M. Macedo</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>P. Purpureus</i> , <i>P. Verrucosum</i> , <i>T. harsianum</i>	1.56-25 mg mL 10-30 mm	Ranković e Kosanić, 2012

Fonte: Autor (2012)

1.3.7 Líquens como bioindicadores e biomonitores da qualidade do ar

As substâncias líquênicas atuam no talo como protetores, sendo considerados bons filtros solares (RANCAN et al., 2002; BJERKE; GWYNN-JONES; CALLAGHAN, 2005; BOEHM et al., 2009; SOLHAUG et al., 2009) e biomonitores (MOTA-FILHO; PEREIRA, 2007; MISUK; MOIRE; BERNHARD, 2010), pois não apresentam camadas protetoras, como a cutícula e a camada serosa; a captura dos nutrientes não se dá através do substrato que é utilizado apenas para fixação e a captação de metais, como por exemplo, o mercúrio, que se dá diretamente da atmosfera (GRANGEON et al., 2012). Outras características, também favorecem o uso dos líquens como biomonitores, tais como: tem atividade fotossintética e apresentam crescimento ao longo de todo o ano; a morfologia do talo não tem grande variabilidade e estão distribuídos por áreas muito vastas e variadas (PUCKETT, 1988; NIMIS; CASTELLO; PERROTTI, 1990).

São 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; TAKANI et al., 2002; ADAMO et al., 2003; CABRAL, 2003; HAUCK et al., 2003; UGUR et al., 2003; BACKOR; FAHSELT, 2004; LOPPI et al., 2003; CONTI et al., 2009; PAWLIK-SKOWRÓNSKA; BAĆKOR, 2010), ou ainda hidrocarbonetos provenientes do fluxo de veículos e aquecedores domésticos nas grandes cidades ou fertilizantes agrícolas (GUIDOTTI et al., 2003; McMULLIN; BELL; NEWMMASTER, 2012). Esta característica permite que se utilizem métodos de biomonitoramento com líquens, que incluem a quantificação das populações líquênicas, exame da morfologia do talo e análise dos metais pesados, como por exemplo, o mercúrio (Hg), no talo *in natura* ou transplantados, bem como, resíduos de esgotos (KRASNOGORSKAJA et al., 2005; PAOLI et al., 2012; PINHO et al., 2012).

Por esta razão poucas espécies podem sobreviver onde os níveis de poluição são relativamente altos, como em áreas urbanas, onde o dióxido de enxofre (SO₂), um poluente atmosférico, é resultante da poluição industrial (PURVIS; COPPINS; JAMES, 1993; HONDA; VILEGAS, 1998; LONGO-FAVERO et al., 2009). Algumas espécies são utilizadas como biomarcadores de nitrogênio e depósitos ácidos (GUZMÁN; XAVIER-FILHO; PEREIRA, 1984; WALKER et al., 2003), outras aceleram a degradação de minerais por métodos químicos e físicos (PRIETO et al., 1997; BANFIELD, 1999).

1.3.8 Substâncias liquênicas: potencial fonte fotoprotetora e atividade antioxidante

Na Antártica, os líquens podem sobreviver em condições extremas, em áreas onde a camada de ozônio encontra-se deficiente e as condições de alta luminosidade emitida através das radiações UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (200-280 nm) pode estimular a produção de radicais livres. No entanto, os compostos típicos dos líquens formados por grupos hidroxilas e carbonilas (depsídeos, depsídonas, dibenzofuranos, antraquinonas e xantonas) têm a propriedade de absorver todos estes tipos de radiação criando uma proteção para o talo, particularmente para camada algal contra os perigos do excesso de luminosidade (BOEHM et al., 2009). Associada a esta característica, a habilidade de sequestrar os radicais livres e as espécies reativa de oxigênio das células é outra propriedade atraente, o que tem sido bastante explorada nas últimas décadas (RANCAN et al., 2002; BJERKE; GWYNN-JONES; CALLAGHAN, 2005; ODABASOGLU et al., 2006; VRÁBLÍKOCÁ et al., 2006; ENGEL et al., 2007; BEHERA et al., 2008; RUSSO et al., 2008; LARSSON et al., 2009).

O estresse oxidativo esta envolvido em uma serie de patologias, entre elas desordens neurológicas, doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e no processo de envelhecimento. Pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radicais hidroxila e habilidade das enzimas em proteger estes organismos destas injúrias. Como consequência do estresse oxidativo pode ocorrer à oxidação das proteínas, lipídios e do DNA, o que leva a degeneração e/ou morte celular, como por exemplo, dos astrócitos tratados com o ácido úsnico nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 µg mL demonstrando a eficácia na diminuição na produção das espécies reativas de oxigênio induzida pela ação do peróxido de hidrogênio, sugerindo um efeito neuroprotetor do ácido úsnico (AMO DE PAZ et al., 2010).

Ranković et al. (2010) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes espécies de líquens. O extrato metanólico da *Anaptychia ciliaris*, *Nephroma parile*, *Ochrolechia* e *Parmelia centrifuga* inibiram a oxidação do ácido linoléico *in vitro*. O percentual de inibição da oxidação do ácido mostrou que o extrato da *P. centrifuga* foi mais eficiente que a do ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, inibindo a oxidação do lipídio em 54.19%. Esta atividade antioxidante, segundo os autores, está relacionada ao conteúdo total dos fenóis presentes no talo (0.990 mg/g do extrato seco). Resultados semelhantes foram descritos para o extrato metanólico de *Peltigera praetextata* que mostrou a inibição da peroxidação do lipídio

em 1.37%, superior ao do ácido ascórbico (HENG et al., 2010) e para o extrato clorofórmico de *Laurera banguelensis* que contém xantonas e atraquinonas (MANOJLOVIC et al., 2010a).

O ácido úsnico é uma substância química que pode ser obtida de diferentes líquens, como da *Xanthoparmelia farinosa* que foi testado quanto ao seu potencial anti-oxidante e pro-oxidante em linhagens de células de linfócitos humanos irradiados com luz UVB. Quando comparado com as células controle, os resultados mostraram que as células incubadas com o ácido úsnico nas concentrações de 1×10^8 e 1×10^6 M e irradiadas com baixas doses de luz UVB em 0.1 J/cm^2 além da sobrevivência tiveram o metabolismo normal. Por outro lado, doses altas de luz UVB acima de 14 J/cm^2 mostram efeitos opostos, no metabolismo e no crescimento normal, sugerindo o efeito bifuncional do ácido úsnico sob a luz UVB. Esta característica pode ser aproveitada nas indústrias de cosméticos e protetores solar (KOHLHARDT-FLOEHR, et al., 2010).

Os líquens produzem glutatona, ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E) e substâncias provenientes do metabolismo secundário que podem neutralizar as espécies reativas de oxigênio no talo *in natura*. Estas substâncias podem ser obtidas através de extrações com diferentes solventes (metanol, etanol, acetona e dimetilsulfóxido–DMSO), como o extrato acetônico de *Pseudophebe pubescens* que inibiu a peroxidação do ácido linoléico em 82.43% (SINGH; SINGH; RAVINDRA, 2011). Resultados importantes também foram descritos para os extratos metanólico e clorofórmico de *Umbilicaria cylindrica* comparados aos padrões de ácido ascórbico e butilato de hidróxitolueno. A peroxidação lipídica foi inibida na concentração entre 29-35 $\mu\text{g/ml}$ e a atividade antioxidante do extrato clorofórmico foi determinada na concentração de 31.34 $\mu\text{g/mL}$. Os autores co-relacionam esta atividade a alta concentração do conteúdo fenólico no talo *in natura* (79.2 e 71.2 mg de ácido gálico/g, nos extratos metanólico e clorofórmio, respectivamente) (MANOJLOVIC et al., 2012).

Em suas pesquisas, recentes, Susithra et al. (2011) associaram a atividade anti-inflamatória e anti-oxidante de substâncias obtidas do líquen *Usnea undulata*. Os radicais livres tem importante papel nos processos inflamatórios, o aumento dos radicais livres contribui para o desenvolvimento dos processos inflamatórios, particularmente no sistema respiratório, como a asma e bronquite. Neste contexto uma substância que apresente as atividades anti-inflamatórias e antioxidante pode trazer grandes benefícios para o tratamento

dessas doenças. As substâncias identificadas na *U. undulata* foram SU-I (ácido úsnico), SU-II (ácido salazínico ou atranorina) e SU-III (ácido lecanórico), mostram atividade antioxidante para o radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DDPH), radical hidroxila, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio quando comparado com o padrão do ácido ascórbico, em diferentes níveis sendo dose-dependente.

A atividade antioxidante da atranorina como sendo dose-dependente, também foi descrita por Hara et al. (2011). Além dos depsídeos, depsídonas e dibenzofuranos, a solorinina, um aminoácido extraído do extrato aquoso de *Peltigera aphthosa* mostrou atividade antioxidante similar ao Trolox, $EC_{50} = 120 \mu\text{mol/L}$ e $EC_{50} = 150 \mu\text{mol/L}$, respectivamente e mais forte que o ácido ascórbico ($888 \mu\text{mol/L}$). Em adição Melo et al. (2011) descrevem as propriedades antioxidante e citoprotetora da atranorina dependendo do radical. Em seus resultados a atranorina atua como agente citoprotetor na concentração acima de $100 \mu\text{g mL}$ sob as condições de estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio.

O ácido difractáico, obtido da *Usnea longissima*, associado com o óleo de oliva aumentou a atividade da superóxido dismutase (SOD), glutatona (GSH) e diminuiu a da mieloperoxidase (MPO) e da óxido nítrico sintase (iNOS) quando administrado por via oral (ODABASOGLU et al., 2012). Outros estudos descreveram a atividade antioxidante do extrato aquoso *Xanthoria elegans*, comparado com a mitomicina C em células de linfócitos humanos. O extrato da *X. elegans* não altera o status oxidante nas células, porém a capacidade antioxidante total diminui conforme se aplica menores concentrações de 4.5 mmol/L (TURKEZ; AYDIN; ASLAN, 2012). O ácido úsnico comercial mostrou seu potencial antioxidante, reduzindo a formação do óxido nítrico e aumentando a viabilidade das células neuronais *in vitro*, tratadas na concentração de $20 \mu\text{g mL}$ (RABELO et al., 2012).

1.3.9 Atividade antitumoral dos líquens

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 antineoplásicas

(BACKOROVÁ et al., 2011), como por exemplo, o ácido 16-O-acetil leucolitico obtido de *Myelochroa aurulenta* (TOKIWANO et al., 2009).

Existe na natureza organismos que produzem algumas substâncias capazes de regular ou controlar o crescimento de outros organismos, exemplo dos fungos liquenizados que são estimulados pelas algas a produzirem compostos que tem importante papel ecológico e biológico na natureza. Estes compostos de natureza fenólica e exclusivos dos líquens podem ser encontrados abundantemente na família das Cladoniaceae, como por exemplo, a atranorina encontrada na *C. dendroides*, o ácido fumarprotocetrárico da *C. verticillaris* e o ácido úsnico da *C. substellata*, cujos extratos foram testados em 1990 contra diferentes linhagens de células tumorais. Os extratos da *C. substellata* e *verticillaris* inibiram o crescimento do carcinoma de Ehrlich em 80%, além de inibirem em 73% e 74%, respectivamente o desenvolvimento do Sarcoma-180 (LIMA et al., 1990; NASCIMENTO et al., 1994).

Santos et al. (2001), avaliaram a citotoxicidade (células NCI-H 292) e atividade antitumoral (tumor, Sarcoma – 180) do ácido úsnico nanoencapsulado obtendo resultados promissores na faixa de concentração de 14 -20 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, respectivamente para o ácido livre e nanoencapsulado. Os dados demonstraram que o ácido úsnico encapsulado aumentou a inibição do tumor em 66% quando comparado com o livre, também não foi relatada nenhuma alteração histológica nos rins. Em 2006, estes mesmos autores confirmaram seus resultados deixando evidente a redução da hepatotoxicidade do ácido úsnico encapsulado quando comparado com o livre (SANTOS et al., 2006).

O ácido lobárico obtido da *Stereocaulon sasakii* inibiu a polimerização da tubulina, indicando uma pronunciada atividade antimitótica (MORITA et al., 2009). Em contraste, estudos realizados por O'Neill et al., (2010) demonstraram que o ácido úsnico não afeta a formação dos microtubulos em células de câncer de mama. Estes autores afirmam que a atividade antineoplásica do ácido úsnico não está relacionada à formação ou estabilização dos microtúbulos. Morita et al., (2009) sugerem que a presença dos anéis aromáticos e correta orientação óptica do carbon quiral juntamente com os grupamentos carboxílicos e hidroxílicos exercem importante papel neste tipo de atividade biológica.

O ácido úsnico (+) de *Cladonia arbuscula* e o (-) de *Alctoria ochroleuca* não diferiram entre si em suas propriedades anti-proliferativas contra o câncer de mama com IC_{50} de 4.2

$\mu\text{g/mL}$ e $4.0 \mu\text{g/mL}$ para o ácido úsnico (+) e (-) e IC_{50} $5.3 \mu\text{g/mL}$ e $5.0 \mu\text{g/mL}$ para o câncer do pâncreas, respectivamente (EINARSDÓTTIR et al., 2010). Esta mesma substância isolada de *Rhizopla melanophthalma* agiu como citoprotetores em sementes de *Zea mays* (milho) tratadas com substância cancerígena padrão (azida de sódio). Em adição, os extratos metanólico da *R. melanophthalma* e *R. chrysoleuca* mostraram efeito antimutagênico entre 70.73 e 85.71% em linhagens de *Salmonella typhimurium* (AGAR et al., 2010).

A viabilidade da linhagem de células HeLa tratadas com os extratos de acetato de etila e cloroformico do líquen *Thamnolia vermicularis* diminuiu com o aumento da concentração dos extratos. Os valores da IC_{50} depois de 24 h do extrato de acetato de etila foi de $162.5 \mu\text{g mL}$, enquanto que o extrato cloroformico foi de $159.32 \mu\text{g mL}$. Todas as concentrações testadas (50, 100, 150 e $200 \mu\text{g mL}$) após 72 h do tratamento mostraram efeitos citotóxicos. A atividade citotóxica dos extratos da *T. vermicularis* depende da sua composição química, nesta espécie foram identificados os ácidos esquamático, lecanórico, barbático e baseomicésico, todos sendo consideradas substâncias bioativas com grande potencial para serem exploradas pelas indústrias de alimento e farmacêutica (MANOJLOVIĆ et al., 2010b).

Além das substâncias citadas anteriormente, os ácidos everninico, β -resorcilíco, o etil orselinato, a vermicularina e outras três substâncias que são derivadas do ácido baseomicésico também foram isolados da *T. vermicularis* e seus efeitos antiproliferativos contra as células de câncer de próstata, leucemia, adenocarcinoma gástrico, carcinoma mamário, câncer de pâncreas e pulmão foram avaliados. Os novos compostos derivados do ácido baseomicésico, denominados 1 e 2 exibiram os maiores efeitos inibitório sobre o crescimento do câncer de próstata com IC_{50} de 70.06 e $79.37 \mu\text{M}$, respectivamente. Esta atividade superior a das outras substâncias pode estar relacionada a adição do grupamento carboxílico ($-\text{COOH}$) na posição 1' do primeiro anel fenólico da molécula. O composto 1 pode agir como estabilizante da estrutura G-quadruplex do DNA, que interagem diretamente com a telomerase, bloqueando os passos para o alongamento da cadeia, interferindo no processo de proliferação celular. No caso dos tumores pode agir deste modo como agentes antitumorais. O composto 2 não se liga a esta estrutura, porém está apto a sofrer ionização em soluções aquosa (GUO et al., 2011).

Adenocarcinoma de ovário, câncer de mama adenocarcinoma de cólon de útero, leucemia promielocítica e linfomas são alguns exemplos de tumores que foram utilizados para testar a atividade antitumoral do ácido úsnico, atranorina e a parietina. Destes compostos apenas o

ácido úsnico demonstrou atividade contra todas as linhagens de cânceres na concentração de 50 μM . Nos ensaios para verificar a habilidade clonogênica dos tumores, a atranorina também exibiu significativa inibição, embora todos os compostos testados dependessem da concentração e do tempo de contato da droga com os tumores, concluindo que tanto o ácido úsnico como atranorina induziram a apoptose e inibiram a proliferação celular (BÄCKOROVÁ et al., 2011).

A vicanicina isolada do *Psoroma dimorphum* e o ácido protoliquesterínico isolado do líquen *Protousnea magellanica* mostraram efeitos antitumorais dose-resposta nas concentrações entre 6.25-50 μM , em células de câncer de próstata, sem nenhum efeito citotóxico sobre as células de fibroblastos imortais normais usadas como modelo experimental para avaliar os efeitos citotóxicos de drogas carcinogênicas ou agentes candidatos a antineoplásicos (RUSSO et al., 2012). Outras substâncias bioativas com atividade citotóxica e antitumoral, também podem ser obtidas de *Hypogymnia physodes* (PAVLOVIC et al., 2012) e da *U. longissima* que contém o ácido difractáico, considerado um agente pro-apoptótico (ODABASOGLU et al., 2012).

1.3.10 Herbivoria e atividade inseticida dos líquens

Estudos com atividade herbicida, anti-herbívora e inseticida com líquens, tem sido investigados. O interesse por esta propriedade das substâncias liquênicas é demonstrado desde o século XVII. Trabalhos pioneiros (Lawrey, 1980) sugerem que os compostos liquênicos servem de proteção para o talo contra predadores. Segundo Solhaug et al. (2009) o papel de *deterrent* contra os herbívoros é a mais provável função ecológica das substâncias liquênicas (ASPLUND; SOLHAUG; GAUSLAA, 2009). Os mecanismos de ação podem incluir redução da palatabilidade do talo, toxicidade direta ou efeitos antibióticos indiretos na microbiota do intestino do organismo predador (LAWREY, 1980; 1993; 1987).

É certo que os líquens não produzem substâncias com a exclusiva finalidade repelente ou contra ataque de herbívoros, porém sabe-se que alguns animais, como por exemplo, a lesma *Pallifera varia* (Hubricht.) evita se alimentar de espécies liquênicas, como *Xanthoparmelia cumberlandia* (Gyelnik) Hale. que contém os ácidos úsnico, nortístico, estístico e *Huilia albocaerulescens* (Wulfen) Hertel produtora dos ácidos constístico e estístico (LAWREY, 1980). O gênero *Cetraria*, cujas espécies são ricas nos ácidos protoliquesterínico e

fumarprotocetrárico são evitados por duas espécies de ácaros – *Fuscozetes setosus* e *Carabodes intermedius* Willmann (REUTIMANN; SCHEIDEGGER, 1987).

A toxicidade dos ácidos úsnico e pulvínico contra a larva da mariposa *Spodoptera littoralis* (Boisduval) foi investigada por Emmerich et al. (1993). Esses autores verificaram que, além da mortalidade, ocorreu o aumento do período larval. Resultado semelhante com a mesma praga, também, foi verificado por Giez, Lange, Proksch (1994). Neste modelo de experimento, os ácidos pulvínico, oxifisódico, nortístico, além da atranorina e parietina causaram má-formações, além da mortalidade e menor desenvolvimento. Mariposas da espécie *Lymantria dispar* (Linnaeus) também são afetadas por substâncias liquênicas, neste caso por extratos aquosos, cujo conteúdo de glicosídeos e polipeptídeos podem ter influenciado na atividade anti-herbívora dos líquens (BLEWITT; COOPER-DRIVER, 1990). Hesbacher et al. (1995) mostraram que a parietina e a atranorina são acumuladas por algumas espécies de lepidópteros e posteriormente utilizadas como defesa.

As lagartas da espécie *Helicoverpa armigera* são conhecidas na Índia por predarem plantações de interesse econômico, e muitos inseticidas comerciais são utilizadas para supressão das pragas nas lavouras, o que leva ao desenvolvimento dos mecanismos de resistência dos insetos aos produtos. Diferentes extratos do líquen *Roccella montagnei*, ricos em compostos secundários como o ácido lecanórico, demonstraram evidente atividade inseticida contra as lagartas quando incorporado a dieta. Os extratos hexânico, metanólico e acetato de etila reduziram significativamente a pupação com indivíduos em estágios intermediários na metamorfose (BALAJI; MALARVANNAN; HARIHARAN, 2007).

Entre os compostos citados, o ácido úsnico parece ser o mais promissor no que diz respeito à atividade biológica contra insetos. Durante uma reforma no herbário, na Itália, foi verificada a presença de coleópteros, que nos caso dos líquens, só consumiram parcialmente algumas amostras dependendo das substâncias liquênicas neles contidas. Aqueles com conteúdo de ácido úsnico não foram atacados em nenhuma porção do talo (NIMIS; SKERT, 2006). Este tipo de preferência já havia sido reportado por Fröberg, Baur e Baur (1993) e Benesperi e Tretiach (2004), que descreveram a preferência dos caracóis que se alimentam de diferentes partes de líquens, e Gauslaa (2005) cujo estudo demonstrou a preferência dos moluscos sobre os talos liquênicos livres de metabólitos secundários; assim como Pöykkö,

Hyvärinen e Backor (2005) e Pöykkö et al. (2010) observaram a escolha e sobrevivência das larvas de mariposas liquenívoras.

Atualmente, a atividade biológica do ácido úsnico foi investigada contra o escaravelho, praga das plantações de chá na Índia. O ácido úsnico misturado a dieta causou pronunciada redução da F1 (75 e 100 ppm). A emergência dos adultos ficou reduzida para 16 e 7 insetos, respectivamente na concentração citada, em relação ao controle, cuja emergência foi de 107 adultos (SAHIB et al., 2008). Na Turquia, as larvas do mosquito *L.* foram tratadas nas concentrações de 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 3 e 10 ppm com o ácido úsnico e os resultados demonstraram 100% de mortalidade nas concentrações de 5– 10 ppm e nenhuma no controle. A Cl_{50} foi de 0,8 ppm para o (-) ácido úsnico e 0,9 ppm para o (+) úsnico (CETIN et al., 2008). O extrato metanólico de *Everniastrum cirrhatum* (contem atranorina, ácidos salazínico e protoliquesterínico) foi ativo contra larvas do *Aedes aegypti* no 2º instar, registrando 100% de mortalidade com 1mg mL (SWATHI et al., 2010).

No Brasil, as pesquisas apontam para os insetos de interesse em saúde pública e comercial. A atividade larvicida do ácido úsnico (acetona e água) e do extrato clorofórmico obtido da *C. substellata* contra o *Aedes aegypti* foi avaliada. Soluções entre 1-15 ppm foram aplicadas no meio aquoso por 24 h e a Cl_{50} determinada. Tanto o extrato clorofórmico como o ácido úsnico foram ativos nas larvas do mosquito no terceiro e quarto instar e Cl_{50} mais baixa foi do ácido úsnico com 6,61 ppm (BOMFIM et al., 2009). Comercialmente, os cupins trazem grandes prejuízos tanto para agriculturas como para as construções nas grandes cidades. Assim, com a finalidade de avaliar o potencial inseticida das substâncias líquênicas, a lectina obtida da *C. verticillaris* foi testada contra o *Nasutitermes corniger* e os resultados foram promissores quanto à atividade inseticida (SILVA et al., 2009).

Outras atividades biológicas das substâncias líquênicas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Outras Atividades Biológicas das Substâncias Liquénicas

Líquens	Substâncias ou extratos	Atividade Biológica	Breve descrição e Referências
1- <i>Cldonia rangifera</i> , <i>C. furcata</i> , <i>tenuis</i> , <i>sylvatica</i> , <i>alpestris</i> , <i>uncilais</i> 2- <i>Stereocaulon sasakii</i>	1- Extratos aquosos 2- Ácido lobárico	Anti-mitótica	1- O extrato da <i>C. sylvatica</i> , (0.05 g) inibiram a mitose no meristema da raiz (89%) de <i>Allium cepa</i> (Oswiecimiska et al. 1979) 2- inibidor da polimerização da tubulina (Morita et al., 2009)
1- <i>Erioderma leylandi</i> , <i>Psoroma pallidum</i> , <i>Protosnea malacea</i> 2- <i>Ramalina celastri</i> 3- <i>Cladonia substellata</i> 4- <i>R. celastri</i>	1- Cloropanarina, panarina, ácido úsnico 2- Galactomannana complexada com íon vanadyl 3- Ácido úsnico 4- α -D-glucana	Anti-parasitária	1- <i>In vitro</i> a cloropanarina e a panarina exibiram atividade em 50 μ g/ml e o ácido úsnico em 25 μ g/ml em <i>Leishmania</i> sp. <i>In vivo</i> , quando administrado via intralesional, o ácido úsnico reduziu em 43.34% o peso das lesões em 72.28 % os parasitas nas patas infectadas (Fournet et al., 1997) 2- Exibiram efeito leishmanicidal sobre as formas amastigotas da <i>L. amazonensis</i> (Noleto et al., 2002) 3- A incubação das formas epimastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i> com 5-30 μ g/ml resultou na inibição do crescimento dose-dependente (De Carvalho et al., 2005) 4- O tratamento com o polissacarídeo livre e encapsulado reduziu em 62 e 63%, respectivamente as infecções por <i>Schistosoma mansoni</i> em ratos (Araújo, 2011)
1- <i>Cetraria islandica</i> , <i>C. cucullata</i> , <i>Haematomma lapponicum</i> 2- Produto Comercial	1- Liqueanas, Isoliqueanas, β -1,6-glucanas 2- Ácido úsnico	Anti-viral	1- Atividade anti-HIV com 100% de inibição do vírus na concentração de 10 μ g/ml (Stepanenko et al., 1998) 2- A síntese viral do RNA do poliomavírus foi severamente inibida na presença de 10 μ g de ácido úsnico (Campanella et al., 2002)
1- <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	1- Glucana sulfatada (β -G-SO ₄)	Anti-trombótica e anti-coagulante	1- A inibição da formação do trombo, <i>in vitro</i> , é dose dependente. O percentual de inibição da trombose foi de 24.3, 64.5 e 83.5% e 0.05, 0.1 e 0.3 mg/kg do peso do corpo, respectivamente. <i>In vivo</i> também tem ação anticoagulante dose dependente (Martinichen-Herrero et al., 2005)

Líquens	Substâncias ou extratos	Atividade Biológica	Breve descrição e Referências
1- Síntese em laboratório 2- <i>Usnea longissima</i> 3- <i>C. islandica</i> 4- <i>Parmotrema saccatilobum</i>	1- Ácido barbático 2- Longissiminone 3- Extrato aquoso 4- Atranorina, cloroatranorina	Anti-inflamatória	1- <i>In vitro</i> inibe a síntese de leucotrienos e crescimento de queratinócitos (Kumar e Müller, 1999) 2- Quando comparado a aspirina (70.45%) exibiu alta atividade anti-inflamatória com 72.13% na concentração de 400 g/ml (Choudhary et al., 2005) 3- O extrato aquoso do líquen diminui o processo inflamatório na artrite quando administrado em doses subcutâneas na concentração de 2.5 mg/kg (Freysdottir et al., 2008) 4- Os autores sugerem que o efeito analgésico da atranorina e cloroatranorina é devido à inibição da ciclooxigenase presente nos processos inflamatórios (Bugni et al., 2009)
1- <i>Cladonia verticillaris</i> 2- <i>Alectoria sarmentosa</i> 3- <i>Parmotrema tinctorum</i>	1- Ácido fumarprotocetrárico 2- Ácido único 3- Ácidos lecanórico, orselínico e derivados	Alelopática	1- Os efeitos do ácido fumarprotocetrárico sobre os parâmetros de crescimento (germinação, comprimento da radícula e comprimento do hipocótilo) do <i>A. cepa</i> são influenciados pela concentração usada, ou seja, tanto ele inibe como estimula o crescimento da planta (Yano-Melo, Vicente, Xavier-Filho, 1999) 2- Inibe a atividade da protoporfirinogênio oxidase (I_{50} 3 μ M), última enzima da ramificação comum entre as vias HEME e da clorofila em plantas, sendo o primeiro alvo dos herbicidas do tipo difenil-éter (Romagni et al., 2000) 3- Atividade alelopática sobre <i>Lactuca sativa</i> e <i>A. cepa</i> para os parâmetros de crescimento acima citados, sugerindo serem fontes de promissores bioherbicidas (Peres et al., 2009)

Líquens	Substâncias ou extratos	Atividade Biológica	Breve descrição e Referências
1- <i>Cladina dendroides</i>	1- Atranorina	Analgésica	1- A atranorina (25 mg/kg i.p) mostrou efeito analgésico superior a aspirina (50 mg/kg i.p) (Maia et al., 2002) 2- Bugni et al., 2009
1- <i>Umbilicaria esculenta</i>	1- Glucanas	Ativadores do sistema imunológico	1- O extrato aquoso de <i>U. esculenta</i> , rico em glucanas induz a maturação de células dendríticas via kinases e ativa as vias de sinalização dos fatores de crescimento na concentração de 100, 200 e 300 µg/ml (Kim et al., 2010)
1- <i>C. islandica</i> , <i>Usnea barbata</i> , <i>Parmelia sp.</i>	1- Liquenana, β-glicosidase	Biocombustível	1- O polissacarídeo foi utilizado como biocombustível (etanol) através de hidrólise feita com a liquenase obtida do actinomiceto e uma enzima comercial. O sinergismo da liquenase com a β-glicosidase sobre a liquenana aumentou a eficiência da fermentação e consequentemente a produção do álcool (Menon, Divate, Rao, 2011)

Fonte: Autor (2012)

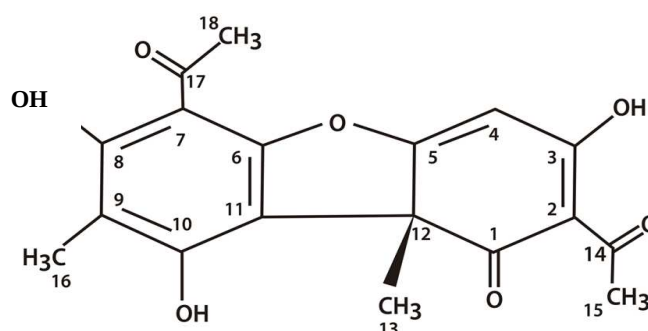
1.4 Os ácidos líquênicos, insetos e molusco utilizados nos bioensaios

1.4.1 O Ácido Úsnico e sua Importância Biológica

O ácido úsnico é o metabólito líquênico mais extensivamente estudado, desde que foi isolado pela primeira vez por Pfaff, em 1826 de *Cetraria islandica* (L.) Ach. (L.) e, em 1843, por Rohleder e Heldt de *Usnea barbata* e *Ramalina calicaris* (BUSTINZA, 1951). Está amplamente distribuído nos gêneros *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae), *Evernia* e *Parmelia* (Parmeliaceae) e *Alectoria* (Alectoriaceae), produzindo acima de 6% do peso seco do talo líquênico (PROKSA et al., 1994; INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

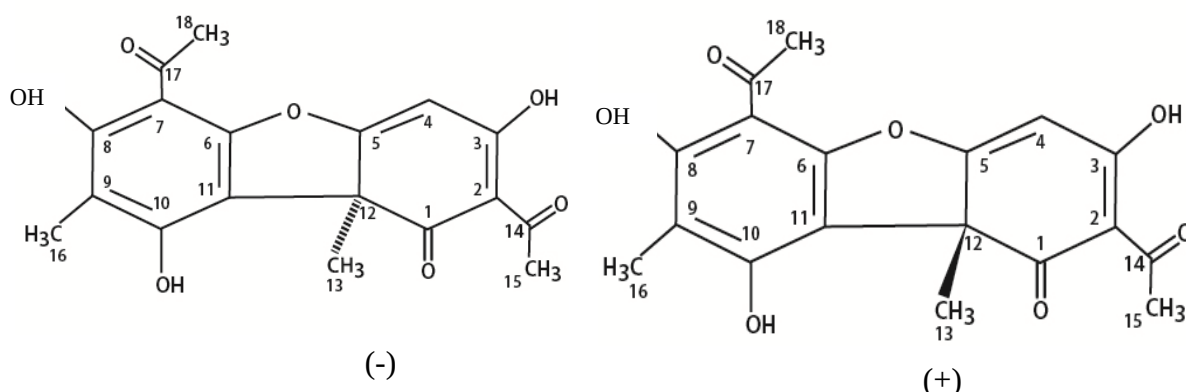
Sua estrutura consta de uma unidade aromática dihidroxilada de caráter fenólico (anel A), e a ela ligada uma função cetônica e um grupo metila. O anel B, cíclico de seis carbonos com insaturação, contém uma metila, dois grupos cetônicos e uma hidroxila. O caráter hidrofóbico da substância se dá por possuir três grupos cetônicos e um anel furano unindo os anéis A e B (Figura 28). Existem dois enantiômeros que diferem na sua orientação pelo grupo metila localizado na posição 9b sendo denominados d (+) isoúsnico, e o l (-) isoúsnico (Figura 29) (SHIBATA; TAGUCHI, 1967; KINOSHITA et al, 1997; INGÓLFSDÓTTIR, 2002). O ácido úsnico (+) de espécie *Usnea longissima* Ach., possui ponto de fusão 206°C, M⁺ 344, [-] d = + 490° (MALLAVADHANI et al, 2004). Howell, Newton, Williams-Wynn (2003), o descrevem como um esqueleto com três anéis ligados entre si.

Figura 28 - Estrutura química do ácido úsnico.



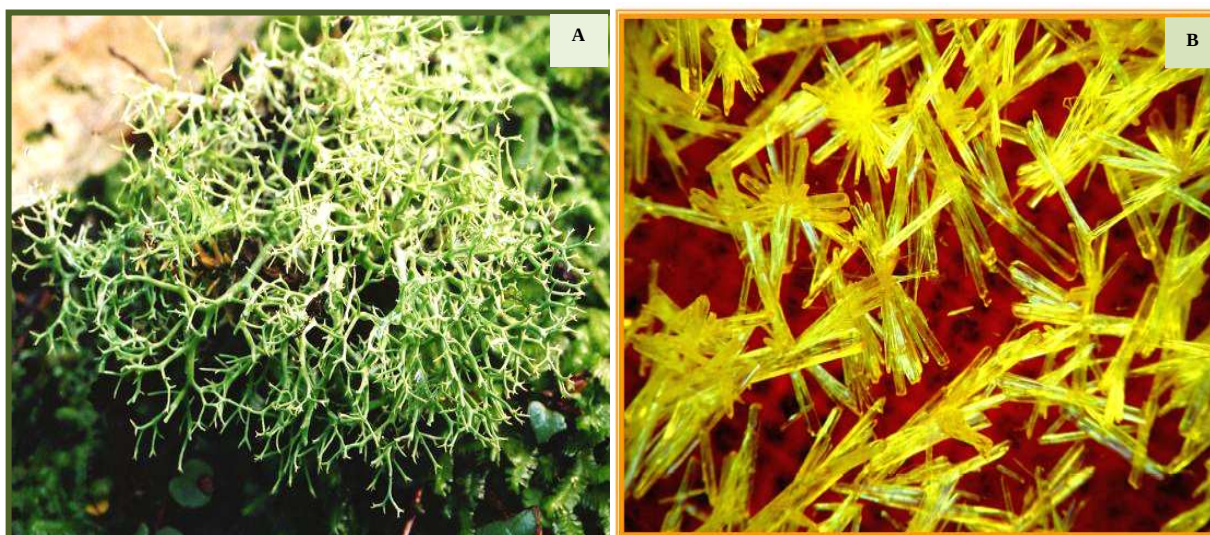
Fonte: Huneck; Yoshimura (1996)

Figura 29 - Estrutura química dos enantiômeros l (-) e d (+) do ácido úsnico.



Fonte: Cocchietto et al. (2002)

O ácido usnínico (ácido úsnico) é um pigmento cortical amarelo que pode ser obtido da *Cladonia substellata* (Figura 30A). Seus cristais (Figura 30B) variam de forma de acordo com o solvente utilizado na recristalização. São praticamente insolúveis em água, em glicerol; parcialmente solúveis em etanol e hexano e muito solúveis em acetona e éter dietílico. A solubilidade em água ou em glicerol pode aumentar quando ao invés de utilizar os cristais de ácidos livres, usar os sais de sódio ou potássio (ASAHINA; SHIBATA, 1954; RASHID; MAJID; QUADER, 1999). Embora muitos autores o classifiquem como um grupo dibenzofurano, considera-se que seja formado pela ciclização do tipo floroglucinol e não do tipo orselínica, típica dos dibenzofuranos (CULBERSON, 1969; VICENTE, 1975).

Figura 30 – A: *Cladonia substellata* e B: Cristais do ácido úsnico extraído, isolado e purificado de *C. substellata* no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

Fonte: Marcio Lima (2004)

1.4.1.1 Histórico da atividade biológica do ácido úsnico

1944 e 1945 – neste período foram publicados os primeiros estudos qualitativos a respeito das propriedades antibióticas dos líquens. Foram testadas 100 espécies diferentes, dentre elas algumas cujo ácido úsnico é o fenol principal. Os resultados observados demonstraram que os ácidos liquênicos de um modo geral exercem preferencialmente sua atividade contra bactérias Gram-positivas (BURKHOLDER et al., 1944; BURKHOLDER; EVANS, 1945).

1946, 1947 e 1948 – no decorrer destas décadas, o ácido úsnico foi continuamente extraído e isolado de *Ramalina reticulata*. Ensaios com bactérias, inclusive as patogênicas ao homem, mostraram que o ácido úsnico inibiu o crescimento de várias espécies de *Pneumococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Mycobacterium* (BARGELLINI DEL PINTO; MARINI-BETOLO, 1946; MARSHAK, 1974; SHIBATA et al., 1948).

1948 – os mecanismos de ação antibiótica do ácido úsnico foram pesquisados neste ano. Os autores verificaram que esterificando as duas hidroxilas livres do primeiro anel com 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 em $\frac{1}{4}$ sua capacidade antibiótica. Essas observações indicam que as duas hidroxilas livres (C-8 e C-10) no primeiro anel, são fundamentais como suporte da atividade antibiótica do ácido úsnico (SHIBATA et al., 1948).

1949 e 1950 – o *screening* da atividade biológica de 149 espécies de líquens foi realizado. Destas 75 foram ativas contra o crescimento de várias bactérias Gram-positivas, atribuindo a este fato a presença dos ácidos pinástrico, pulvínico, girofórico, d-protoliquesterínico, d-liquesterínico, divaricático, fisódico e úsnico. Neste período Pätialä e Vartia referem-se ao preparado hidrossolúvel, conhecido na Finlândia e Alemanha como usno e usniplant, respectivamente, indicados para casos de afecções dermatológicas e como balsâmico. Na Rússia, é conhecido como Binan indicado para uso antes das práticas cirúrgicas para evitar a formação de quelóides e contra infecção urinária. Esses autores também atribuem ao ácido úsnico grande eficácia contra enfermidades e demonstraram sua atividade contra bacilos da tuberculose humana, bovina e aviária, além de regredir por completo casos de *Lupus vulgaris*, ou tuberculose de pele (PÄTIALÄ, 1949; VARTIA, 1949; 1950).

1952 e 1956 - Vartia e Tervila (1952) e Korten kangas e Virtanen (1956) obtiveram os mesmos resultados satisfatórios usando ácido úsnico contra os microrganismos citados anteriormente.

1957 – neste ano, *in vivo* a atividade de um novo preparado solúvel em água, fabricado com o ácido úsnico, sob o nome comercial de USNO (usnato de amônia), foi testado contra o fungo *Trichophyton gallinae*. Após 9 -12 dias de tratamento, as colônias do fungo desapareceram completamente (VIRTANEN; KILPIO, 1957).

1960 e 1961 - o ácido úsnico é considerado um dos agentes liquênicos mais importante junto à estreptomicina, tendo ação eficaz contra cepas bacterianas resistentes à penicilina. Em 1960, o ácido úsnico foi testado contra leveduras presentes em secreções endobrônquicas de pacientes portadores de tuberculose pulmonar, sendo ativo contra espécies de *Candida* e *Saccaromyces* (BENZINGER; TOMÁSIC, 1960; CAPRIOTTI, 1961).

1967 – foi hipotetizado que alguns fungos presentes no solo, como por exemplo, *Cladosporium sp*, *Penicillium sp*, *Mortierella*, tem a habilidade em atacar o ácido úsnico que, em alguns casos, é a causa do desaparecimento total deste composto. A espécie de *Cladosporium* degradou 60% do ácido úsnico, obtido das espécies *Usnea* e *Alectoria* (BANDONI; TOWERS, 1967).

1969 – Mitchell e Shibata (1969) demonstraram a atividade imunológica do ácido úsnico através do uso de *patch*. Relataram que esta atividade biológica pode ser dependente da presença do grupo COCH_3 na posição 7 e do grupo CH_3 na posição 9 na molécula.

1972, 1973 e 1978 - Experimentos indicam que o ácido úsnico inibe a taxa de respiração e a atividade da amilase, protease, fosfatase e incorporação da ^{14}C - α -Leucina dentro da proteína nos vegetais. Em 1973 e 78 estudos com a germinação de sementes, demonstraram que o uso do ácido úsnico pode inativar algumas enzimas, como por exemplo, glutamato desidrogenase e a urease (CAMPOS; LOPEZ, 1972; VICENTE, GUERRA; VALLE, 1973; VICENTE al., 1978).

1990 – foi atribuído ao ácido úsnico presente em extratos orgânicos obtidos de Cladoniaceae coletadas na Chapada Diamantina (BA), tabuleiros arenosos da Paraíba e Antártica, os

resultados satisfatórios obtidos contra tumores sólidos do tipo sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich, com inibição acima de 80%, com a CI_{50} de 4 $\mu\text{g mL}$ e 7 $\mu\text{g mL}$, respectivamente (LIMA et al., 1990).

1991 – Com excessão da temperatura, fatores ambientais não afetam o teor do ácido úsnico produzido pelo micobionte cultivado de *Ramalina siliquosa*. Nos dados finais não foi observada a correlação entre a intensidade luminosa e a produção dos ácidos úsnico e 4-O-dimetilbarbático. A quantidade do composto variou apenas com a temperatura, sendo entre 5°C e 12°C a faixa ótima, onde ocorreu seu aumento (HAMADA, 1991).

1991 e 1997 - no Nordeste do Brasil a flora liquênica é rica em substâncias fenólicas. Extratos orgânicos e frações purificadas de *Cladonia substellata* e *C. crispatula*, coletadas em Santa Rita e Alhandra respectivamente, mostraram-se ativos contra diversos micro-organismos, entre fungos e bactérias, sendo atribuída a presença do ácido úsnico em ambas as espécies a atividade biológica verificada nos bioensaios (PEREIRA et al., 1991; 1997).

1995 – metabólitos liquênicos de diferentes espécies de líquens foram testados contra uma variedade de micro-organismos. As substâncias não demonstraram atividade contra os fungos. Porém *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, e espécies anaeróbicas (*Bacteroides* e *Clostridium*) demonstraram suscetibilidade às concentrações testadas tanto do ácido vulpínico quanto do ácido úsnico (LAUTERWEIN et al., 1995).

1997 – o estudo com o ácido úsnico demonstrou que ele inibe células tumorais, e que essa capacidade depende tanto da dose quanto do tempo em que os tumores ficam em contato com a substância. Após 46 h de exposição o percentual chegou a 90% de inibição do crescimento tumoral. Esta pesquisa também avaliou a atividade antimitótica do ácido contra o *Fusarium moniliforme* (CARDARELLI et al., 1997).

1998 e 1999 – a concentração inibitória mínima (CIM) de vários metabólitos liquênicos foi avaliada *in vitro*. O ácido úsnico foi testado contra o *Micobacterium aurum* que é um organismo não patogênico, mas possui sensibilidade semelhante a *M. tuberculosis*. O valor da CIM ficou em 32 $\mu\text{g mL}$ o que se considerou um bom resultado quando comparado aos outros ácidos liquênicos, como atranorina cuja CIM ficou em 250 $\mu\text{g mL}$. Em 1999 foi também verificada a ação do ácido úsnico dissolvido em etanol, clorofórmio, hexano e água contra

Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Trichophyton rubrum* com bons resultados (INGÓLFSDÓTTIR et al., 1998; ESIMONE; ADIKWU, 1999).

1999 – o ácido úsnico isolado de *Cladia retipora*, *Pseudocyphellaria glabra* e *P. homeophylla* é ativo contra micro-organismos e vírus. Quando comparado a coleções de briófitas e plantas vasculares, os líquens produziram mais compostos bioativos e a atividade antimicrobiana destes foram mais altas quando comparadas as extratos obtidos das plantas superiores (MAZID; HASAN; RASHID, 1999; PERRY et al., 1999).

2000 – a atividade anti-inflamatória do ácido úsnico foi testada em ratos de ambos os sexos de peso entre 100-120 g, por via oral. A atividade biológica foi comparada com a droga padrão, ibuprofen, e o resultado foi à redução significativa da inflamação em doses de 100 mg Kg de peso corpóreo (VIJAYAKUMAR et al., 2000).

2001 – o estresse oxidativo nos líquens pode ser causado por vários agentes incluindo os altos níveis de luminosidade, a poluição, principalmente por SO₂ e o uso de herbicidas no solo, que produzem radicais superóxido. O aumento do ácido úsnico na *Parmotrema sooredians* indicou que este metabólito tem importante papel protetor do talo, podendo ser uma promissora substância para o uso de protetor solar (CAVIGLIA et al., 2001).

A atividade antitumoral (sarcoma 180) do ácido úsnico nanoencapsulado demonstrou um aumento de 66% de inibição do tumor quando comparado ao ácido livre, também não foram observadas alterações histológicas nos rins (SANTOS et al, 2001).

2002 – os autores demonstram que o ácido úsnico é um potente inibidor da proliferação do papiloma vírus em ratos, inibindo a síntese de DNA viral e reprimindo a ação da RNA transcriptase. A droga encapsulada em vesículas de dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), cuja concentração de 10 µg mL evitou a replicação do DNA viral sem efeitos citotóxicos relevantes, pois a vitalidade celular permaneceu acima de 80% (CAMPANELLA et al., 2002).

Por ser uma molécula de grande interesse, neste mesmo ano Kristian Ingólfssdóttir, incluiu nos seus estudos uma extensa revisão do ácido úsnico e suas propriedades biológicas, desde antimicrobiana, impactos ecológicos até sua bioprodução em laboratório. A autora sugere que

a atividade anti-inflamatória e antipirética do USN pode estar ligada a inibição da síntese das prostaglandinas e seu efeito como desacoplador da cadeia fosforilativa (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

2003 – algumas moléculas orgânicas provenientes da vegetação acima do solo podem ter um efeito alelopático sobre a comunidade microbiana do solo. Neste contexto, a *Cladina stellaris* rica nos ácidos úsnico e perlatólico foi avaliada. Os resultados demonstraram que o efeito alopático é positivo, uma vez que, os micróbios presentes do solo se utilizam destes compostos, como possível fonte de carbono (STARK; HYVÄRINEN, 2003).

2004 – o extrato acetônico e o ácido úsnico de *Ramalina farinacea* mostraram atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, tais como *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*. Os valores das concentrações inibitórias mínimas variaram entre 0,05 µg/62.5 µL a 3.1 µg/62.5 µL (TURGAY et al., 2004).

2005 – as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* foram tratadas com o ácido úsnico *in vitro*. A incubação das culturas com 5-30 µg mL resultaram no aumento da inibição do crescimento destas formas dose-dependentes. As análises na ultraestrutura mostraram danos mitocondriais. A forma tripomastigota apresentou alongamento flagelar e intensa vacuolização citoplasmática. As formas amastigotas tratadas com 40 ou 80 µg mL apresentaram também intensa vacuolização no citoplasma, mas nenhum dano significativo na célula hospedeira (DE CARVALHO et al., 2005).

Vários extratos de *Usnea ghattensis* mostraram boa atividade anti-oxidante prevenindo a peroxidação dos lipídios em 87% e ainda foram ativos contra *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* com concentração inibitória mínima (CIM) de 5–10 µg/ml (BEHERA et al., 2005).

2006 – as lesões da ulcera gástrica foram significativamente reduzidas com altas doses do ácido úsnico, quando comparado a droga padrão, indometacina. A atividade da superóxido dismutase (SOD) e da glutatona são aumentadas, enquanto que a atividade da glutatona peroxidase (GPx) e da peroxidação dos lipídios (LPO) são diminuídas. O efeito gastroprotetor do ácido úsnico foi atribuído a sua capacidade de reduzir os efeitos dos danos oxidativos e o

efeito inibitório na infiltração dos neutrófilos nos tecidos do estômago dos ratos (ODABASOGLU et al., 2006).

Neste mesmo ano, Saenz, Garcia e Howel demonstraram que as espécies de líquens *Ramalina canariensis*, *Cladonia firma*, *Lecanora muralis* e *Ramalina subfarinacea* cujo teor de ácido úsnico é alto apresentam atividade antimicrobiana pronunciada, contra bactérias Gram-positivas (SAENZ, GARCIA, HOWEL, 2006).

Com o intuito de aperfeiçoar as condições para produção do ácido úsnico em cultura de células *in vitro* do líquen *Usnea ghattensis*, diferentes meios de cultura foram testados. Meios ricos em carbono e nitrogênio aumentaram o conteúdo do ácido úsnico nos reatores (BEHERA et al., 2006).

2007 – linhagens de *S. aureus* resistentes a vancomicina e meticilina foram submetidas a tratamento com o (+) ácido úsnico e o usnato de sódio, através do teste de difusão de discos e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As substâncias que foram ativas contra as cepas testadas apresentaram a CIM entre 4 e 16 µg mL, sendo superior a exibida pela ampicilina (125 µg mL) (ELO; MATIKAINEN; PELTTARI, 2007).

Diversos extratos de plantas, incluindo extrato de *Usnaea barbata* foram obtidos e testados contra micro-organismos. O ácido úsnico foi o composto mais ativo especialmente contra bactérias anaeróbicas e linhagens de *S. aureus* resistentes a meticilina (WECKESSER et al., 2007).

2008 – o ácido úsnico tem sido modificado quanto a sua estrutura química para dar origem a novos compostos, a exemplo do ácido dibenzoilúsnico que foi testado sobre diferentes isolados clínicos e cepas multiresistentes de micro-organismos. Os halos de inibição ao redor do crescimento bacteriano demonstraram atividade biológica semelhante à gentamicina contra o *Bacillus subtilis* (MELGAREJO et al., 2008).

O ácido úsnico incorporado a dieta artificial demonstrou atividade inseticida contra o *Xyleborus fornicates* (escaravelho), predador das plantações de chá no Sri Lanka. Nas concentrações de 75 e 100 ppm, somente quatro fêmeas produziram progênie, provavelmente devido a atividade antifúngica do ácido úsnico contra o *Monacrosporium ambrosium*, que

mantém reações simbióticas com coleóptero. As galerias construídas pelos besouros se mostraram com aspecto irregular (SAHIB et al., 2008).

Os extratos da *Cetraria aculeata* que contém os ácidos liquesterínico e protoliquesterínico mostraram uma significativa atividade antigenotóxica prevenindo a mutagenicidade em 57–69 % no sistema bacteriano e citotoxicidade para células de câncer de mama com concentração inibitória entre 80 e 280 µg mL (ZEYTINOGLU et al., 2008).

2009 – o ácido úsnico é uma molécula que apresenta pouca afinidade pela água, o que pode ser um fator limitante nos mecanismos de liberação controlada de drogas, por exemplo. No entanto, pesquisas para verificar a afinidade do ácido úsnico com as ciclodextrinas, a fim de aumentar a solubilidade do ácido úsnico no meio, revelaram que os complexos formados entre o ácido úsnico e o oligossacarídeo cíclico são eficientes, mas dependem do tipo de ciclodextrina e do pH do meio (SEGURA-SANCHEZ, 2009).

2010 – a tuberculose ainda é uma doença que mata cerca de 2 milhões de pessoas no mundo. Na busca de novas alternativas terapêuticas o ácido úsnico, bem como, outras substâncias liquênicas foram testadas contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados foram satisfatórios para o ácido úsnico que apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 62.5 µg mL, 182 µM mL, quando comparado com o padrão isoniazida (HONDA et al, 2010).

Os metabólitos secundários produzidos pelos líquens absorvem o excesso de radiação ultravioleta a qual estão constantemente expostos. Os líquens expostos a ambientes mais poluídos produzem mais substâncias, a exemplo das espécies *Hypocenomyce scalaris*, *Cladonia furcata* e *Lepraria spp*, cujo fotobionte produz uma substância, a fotoquelatina, capaz de se ligar a metais pesados, tais como, o zinco e chumbo e aumentar a capacidade de fotoproteção do talo (PAWLIK-SKOWRÓNSKA; BACKOR, 2010).

Os chineses são conhecidos pelo uso dos produtos naturais como fitoterápicos, daí a importância de se avaliar os efeitos de suas propriedades medicinais, por isso, um *screening* com diversas amostras de líquens coletados na China foi feito para verificar a atividade antioxidante de seus compostos. Os resultados mostram-se interessantes uma vez que os extratos metanólicos dos líquens demonstraram potente atividade anti-oxidante (HENG et al., 2010).

O ácido úsnico é conhecido pela sua capacidade de reduzir a produção de Adenosina Trifosfato (ATP) nas células mitocondriais no fígado. Este efeito pode estar relacionado com a propriedade deste composto em transferir elétrons através das membranas. Utilizando-se tumores de mama e pâncreas se pode observar que estes tumores tratados com o ácido úsnico nas concentrações de 5 µg mL e 10 µg mL por 24 h levam a redução da produção do ATP, simulam uma autofagia mas aparentemente não degradam o conteúdo autofagossomal (BESSADOTTIR et al., 2010).

Alguns dos metabólitos liquênicos presentes em *Ramalina fraxinea* e *Parmelia sulcata* impedem o crescimento nos primeiros estágios das larvas de *Cleorodes lichenaria*, inseto especializado em se alimentar de líquens, porém após 75 dias estas substâncias não têm mais nenhum efeito sobre a massa de larvas. O ácido fisódico, por sua vez, é letal para as larvas. Entretanto a maioria dos insetos metaboliza 70-95% das substâncias liquênicas ingeridas, o restante é excretado nas fezes. Esta habilidade dos insetos de metabolizar as substâncias indica uma adaptação digestiva às estruturas químicas (PÖYKKÖ et al., 2010).

2011 – biofilmes de colágeno contendo o ácido úsnico incorporado em lipossomas foram testados em ratos com queimaduras na pele. Após 7 dias de tratamento foi observada uma moderada infiltração de neutrófilos na região afetada tratada com o USN. Após 14, a reação inflamatória foi menos intensa nos animais tratados com o USN e após 21 dias observou-se que o USN favoreceu uma rápida substituição dos colágenos tipos III e I aumentando a densidade da recolonização (NUNES et al., 2011).

Pesquisas mostram que as vias chiquimato e metileritritol fosfato estão presentes e são ativas no apicoplasto (organela semelhante aos cloroplastos dos vegetais, mas que não realiza fotossíntese) do *Plasmodium falciparum*, ambas levam a formação da vitamina E em plantas e algas. O ácido úsnico é capaz de inibir esta biossíntese e induzir a peroxidação dos lipídios em eritrócitos infectados com o parasita. O crescimento do parasita foi dose-dependente com IC₅₀ de 24.6 µM após 48 h do tratamento, sendo detectada nesta mesma concentração a inibição da biossíntese da vitamina E no estágio esquizonte, com diminuição na produção do α-tocoferol em 34.9% o que aumenta a peroxidação dos lipídios de membrana (SUSSMANN et al., 2011).

2012 – o ácido úsnico e a atranorina promovem a supressão e a proliferação celular dos tumores em doses equimolares. Estas substâncias induziram a perda massiva do potencial de membrana da mitocôndria, através da ativação da caspase-3 e externalização da fosfatidilserina em ambas às linhagens testadas. Por serem provenientes de grupos químicos diferentes estes compostos podem induzir a apoptose através de múltiplas rotas, como mitocôndria, receptores, sinalização celular ou hipóxia. Por outro lado, o aumento das espécies reativas de oxigênio pode ser responsáveis pelo efeito citotóxico dos metabólitos líquênicos (BAČKOROVÁ et al., 2012).

Inúmeras perspectivas em vários campos de pesquisas continuam sendo abordados, e o ácido úsnico continua sendo, sem dúvida, a substância líquênica mais estudada, sendo considerado por alguns autores como a de maior potencial para as diversas atividades biológicas.

1.4.2 Ácidos fumarprotocetrárico e barbático

Os líquens cladoniformes são aplicados ao grupo de fungos liquenizados chamados discomicetos que apresentam talo dimórfico, ou seja, possuem estruturas verticais e horizontais diferenciadas, comumente citadas como fruticosos, por apresentarem duas formas de crescimento distintas, uma parte fruticosa e outra foliosa. Estão distribuídos em 5 famílias, 17 gêneros e aproximadamente 450 espécies, sendo os principais gêneros *Cladonia*, *Baeomyces* e *Siphula* (AHTI, 1982).

A *Cladonia verticillaris* é uma espécie extraordinariamente variada, sendo considerada de todas as *Cladonia* a mais espetacular. Vainio, em sua monografia, reorganizou e reconheceu quatro formas de *C. verticillaris* indicando, portanto, que a “*C. verticillaris* é um complexo” e não uma unidade taxonômica, embora todas as espécies compartilhem o que se chama apotécio verticilado, ou seja, o apotécio cuja cífela se divide partindo do centro até as margens. Em algumas espécies robustas, as cífelas são altamente dissecadas (AHTI, 1982).

O talo primário da *C. verticillaris* apresenta esquamulas longas, largas e umbilicadas acima de 2 cm de comprimento, a parte inferior floculosa, geralmente marrom com tufo de rizóides ao longo de suas margens. O córtex é aracnóide com verticilos ao longo do talo, de cor que vai do branco ao acinzentado quando submetida a condições de pouca umidade, ou

em tons de marrom quando exposta diretamente a intensa luminosidade; nos períodos chuvosos seu talo torna-se mesclado de verde e branco (Figura 31) (AHTI e MARCELLI, 1995).

A espécie contém o ácido fumarprotocetrárico como composto principal (Figura 32), e os ácidos protocetrárico e hipoprotocetrárico. Porém, segundo Legaz et al. (1986) as espécies *C. verticillaris* que estão expostas a alta luminosidade produzem mais ácido fumarprotocetrárico que aquelas que habitam áreas sombreadas, como também clorofilas e carotenos. Estes autores descrevem que esta substância pode ser encontrada no interior das células e na medula.

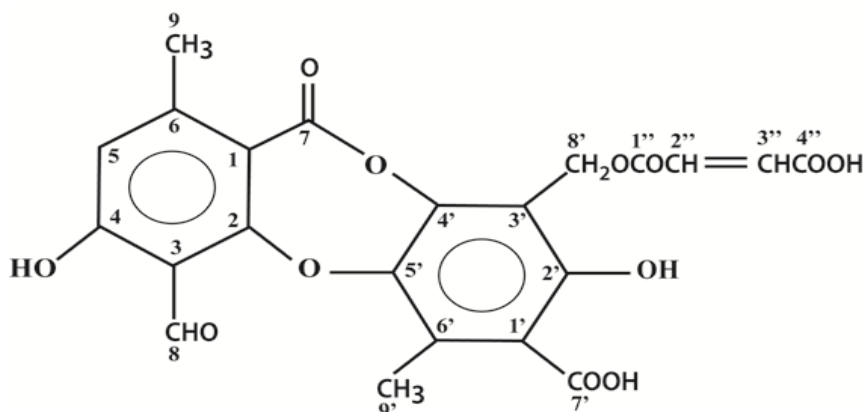
No Brasil, Vicente e Xavier-Filho (1979) foram os primeiros pesquisadores a avaliar a *C. verticillaris*. A espécie foi coletada nos tabuleiros arenosos da Paraíba, na Região de Alhandra, e também pode ser encontrada na Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (AHTI, 1993).

Figura 31 - *Cladonia verticillaris* do Vale do Catimbau/PE



Fonte: Maria de Lourdes Buril (2010)

Figura 32 - Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico



Fonte: Din et al. (2010)

Diversas atividades biológicas foram reportadas para o ácido fumarprotocetrárico (FUM). Na década de noventa o FUM foi testado a fim de se verificar a germinação das sementes de *Allium cepa*. A substância não afetou a taxa de germinação das sementes, porem estimulou significamente o crescimento radicular em relação ao controle nas concentrações de 726.7 μM e 290.6 μM . O estudo demonstrou que o tipo de extrato obtido do líquen e a concentração empregada afetam tanto os processos de germinação, quanto ao crescimento radicular e o crescimento do hipocótilo (YANO-MELO; VICENTE; XAVIER-FILHO, 1999).

O ácido FUM isolado de *Cladonia furcata* exibiu atividade antimicrobiana pronunciada contra todas as linhagens de bactérias e fungos testadas. A CIM mais relevante foi de 0,031 mg/mL relatada para *Klebsiella pneumoniae*. Contra os fungos, as menores concentrações que exibiram o crescimento foi de 0,125 mg mL e 0,25mg mL. Em adição, o ácido protocetrárico também demonstrou efeito antifúngico na concentração de 0,5 mg mL (RANKOVIĆ e MISIĆ, 2008).

Amostras de *C. verticillaris* foram coletadas no município de Saloá-PE a fim de observar as alterações fisiológicas que poderão surgir na espécie devido às atividades de extração e beneficiamento do calcário no município de Vertente do Lério. Os resultados evidenciaram as alterações no metabolismo da espécie, que modificou a produção do FUM, além do acúmulo de produtos intermediários da sua biossíntese (CUNHA, 2007).

O gênero *Cladia* foi descrito por Nylander em 1870 (PEREIRA et al., 1991, 1997). Neste gênero está incluída a espécie *C. aggregata* (Swartz) Nyl. Também conhecida como *Lichen aggregates* Swartz, *Cladonia aggregata* (Swartz) Nyl., 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 (Figura 33). Predomina em áreas abertas, geralmente sobre solos, ou córtex de árvores.

A *Cladia aggregata* apresenta uma variedade de constituintes químicos como os ácidos estítico, constístico, nortístico e o criptostítico, porém as espécies típicas do Brasil são ricas em ácidos barbático e D-barbático (STENROOS, 1988; AHTI et al., 1993). Filson (1981) cita como característica típica da *C. aggregata* sua plasticidade fenotípica que depende, prioritariamente, das condições ambientais.

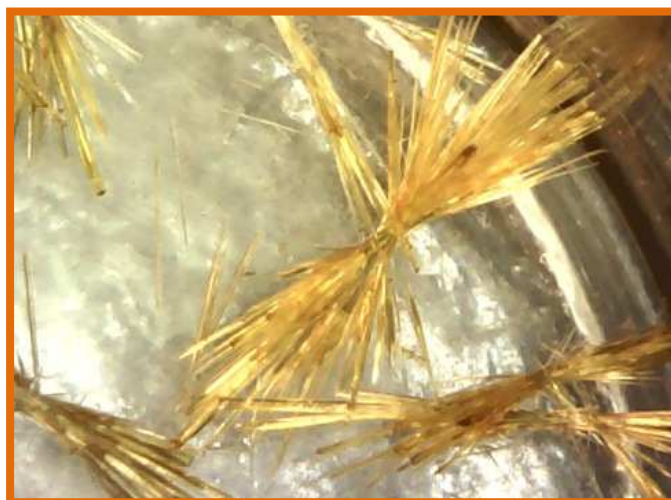
O ácido barbático ($C_{19}H_{20}O_7$ - BAR) é um composto típico de *C. aggregata* (Figura 34) e, também está presente em outras espécies de *Cladonia*, como: *C. floerkeana*, *C. coccifera*, *C. amaurocrea*, *C. cristatella*, *C. incrassata*, *C. sallzmanii* e *C. salmonea* (ASAHINA, SHIBATA, 1954; KORTEPETER, 1996; YAMAMOTO et al., 1996; PEREIRA, 1998). Ocorre também em *Rhizocarpon geographicum* (ASAHINA; SHIBATA, 1954) e *Usnea longissima* (MALLAVADHANI et al., 2004).

Figura 33 - Talo da *Cladia aggregata*, coletada no Município de Bonito - PE



Fonte: Autor (2009)

Figura 34 - Cristais do ácido barbático obtido da *Cladia aggregata*, extraído, isolado e purificado no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco.

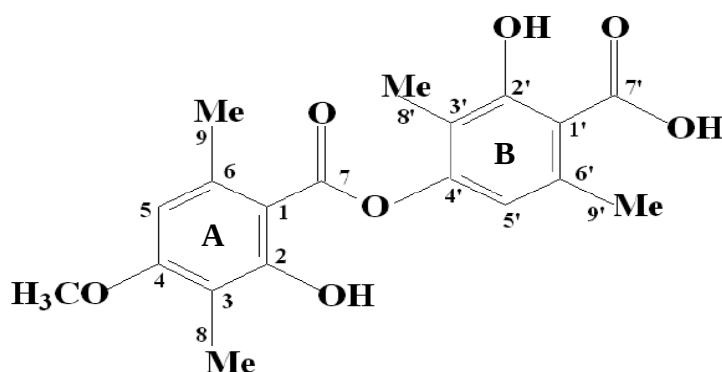


Fonte: Bruno Monteiro (2010)

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 carboxílico (PEREIRA, 1998). Possui como propriedades físico-químicas ponto de fusão 187 °C dissolve facilmente em éter dietílico, 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) (Figura: 35) reporta que o ácido barbático também pode ser chamado de ácido alectórico, rizóico, rizônico, coccelico, coenomicina e cenomicina.

Figura 35 - Estrutura química do ácido barbático



Fonte: Huneck; Yoshimura (1996)

O ácido barbático é um composto com potencial biológico ativo, ele é capaz de agir sobre a cadeia transportadora de elétrons, impedindo a transferência dos elétrons em células de tabaco (sistema PS II) (TAKAHAGI et al., 2006). Em adição, Nishitoba et al. (1987), descreveram seu efeito alelopático sobre a semente de alface, cujo crescimento foi inibido pelo ácido.

A composição química e testes antimicrobianos do ácido barbático obtido de *C. aggregata* coletada no Município de Bonito- PE foi avaliada. Os testes contra linhagens de *Staphylococcus aureus* de isolados clínicos e isolados clínicos multiresistentes demonstraram que a concentração mínima inibitória (CIM) foi de 50 µg mL para os isolados clínicos e 100 µg/mL para as linhagens multiresistentes (MARTINS et al., 2010). O potencial citotóxico do BAR obtido de *Thamnolia vermicularis*, contra linhagens de células HeLa (células imortais) mostrou que esta atividade é dose dependente, com IC₅₀ de 162.50 µg mL (MANOJLOVIĆ et al., 2010b).

A versatilidade das substâncias bioativas extraídas dos líquens parece ser inesgotável. Recentemente, foi isolado da *Usnea esculenta*, líquen usado nos países asiáticos como alimento, um composto farmacologicamente ativo, a alantoína. Quando quimicamente sintetizada, a alantoína é amplamente utilizada na indústria de cosmética e farmacêutica, uma vez que aumenta a eficácia de cosméticos e loções utilizados como protetores. Sua aplicação

sobre a pele da face e corpo promove maciez e aparência de pele saudável. Nas plantas ela exerce importante papel na assimilação, metabolismo, transporte e armazenamento de nitrogênio. Poucos estudos descrevem que a alantoína age como agente essencial nas interações químicas que ocorre entre as plantas e outras espécies de organismos. Nos líquens esta substância ainda não havia sido descrita, acredita-se que seja importante nas interações de simbiose entre o fungo e alga, incluindo o metabolismo do nitrogênio nesta associação, o que pode ser bastante atrativo para os ecologistas, que poderão investigar a importância dos líquens no ciclo de nitrogênio em diferentes ecossistemas (XU, SUNG; HAN, 2011).

Portanto, por ser bastante diversificada, a flora liquenica é rica em substancias bioativas que vem sendo descritas e testadas em diferentes setores, desde a saúde publica até a indústria de cosméticos. Estas propriedades biológicas vêm sendo descritas por diferentes autores, ao longo do tempo em publicações de artigos de revisão sobre o papel biológico das substancias liquênicas que estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6 - Trabalhos de revisão sobre o papel biológico das substâncias liquênicas

Autores	Título do Artigo	Periódico
Oksanen, 2006	Ecological and biotechnological aspects of lichens	App Microbiol Biotechnol
Podterob, 2008	Chemical composition of lichens and their medical applications	Medicinal Plants
Muggia, Schimit, Grube, 2009	Lichens as treasure chets of natural products	Sim News
Ivanova e Ivanov, 2009	Ethnobotanical use of lichens: lichens for food review	Scripta Scientifica Medica
Boustie, Tomasi, Grube, 2010	Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped	Phtytochem Rev
Molnár e Farkas, 2010	Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review	Z. Naturforsch
Shukla , Joshi, Rawat, 2010	Lichens as potential natural source of bioactive compounds: a review	Phtytochem Rev
Eisenreich, Knispel, Beck, 2011	Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens	Phtytochem Rev
Mitrović et al., 2011	Lichens as source of versatile bioactive compounds	Biologica Nyssana
Gayathri e Swamy, 2012	Lichens: a novel and potential source as antimicrobials for human use	Journal of Phytology

Fonte: Autor (2012)

1.4.3 *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae)

O gênero de percevejos *Podisus* são predadores não específicos, ou seja, generalistas, de vários lepidópteros e larvas de coleópteros, distribuídos ao longo de todo o continente americano, sendo frequentemente mencionados como importante inimigo natural com promissor potencial, para o uso de programas de controle biológico em agrossistemas. Os predadores, normalmente, se encontram em baixas populações nos campos, sua presença está associada à abundância e qualidade da presa (DE CLERCQ; DEGHEELE, 1990).

Quanto a sua morfologia e fisiologia, quando adultos, o *Podisus nigrispinus*, atinge tamanho entre 8.5 a 12 mm, com as fêmeas usualmente maiores que os machos (10-12 mm e machos 8.5-10 mm), com peso corpóreo entre 45 a 140 mg, as fêmeas e de 35 a 100 mg, os machos (Figura 36).

Figura 36 - Fêmea do *Podisus* no momento da postura.



Fonte: <http://magickcanoe.com/blog/2007/06/08/the-bug-that-laid-the-silver-eggs/>. Acessado em 18.03.2011

Dependendo da qualidade, quantidade da dieta, condições ambientais e atividade reprodutiva estes valores podem variar nos adultos. O sexo dos adultos pode ser determinado pela presença de discos genital e subgenital nas fêmeas. Machos e fêmeas também podem ser separados durante o quinto estágio ninfal; as fêmeas são geralmente maiores e o disco médio dorsal no abdome e avermelhado é maior que nos machos. Os parâmetros reprodutivos são

fortemente afetados pela temperatura, tipo de predador, intervalo de alimentação, número de gerações cultivadas no laboratório, acesso ao material botânico para alimentação e o espaço de cultivo. Em *P. nigrispinus*, por exemplo, ninfas a partir do 4º instar necessita de mais alimento, pois quando este não é suficiente para seu desenvolvimento poderá originar indivíduos menores (VIVIAN, TORRES; VEIGA, 2003).

O acasalamento pode ocorrer a qualquer hora do dia, porém é mais freqüente entre 6-9 h da manhã (48%), o que sugere atividade ferormonal aumentada neste período. A oviposição normalmente acontece 2-3 dias depois do acasalamento, dependendo das condições de alimentação, temperatura, espaço da criação e freqüência do acasalamento. Podem ainda ovipositar um grande número de ovos não fertilizados (DE CLERCQ e DEGHEELE, 1990; GRAZIA et al., 1985; TORRES, ZANUNCIO, MOURA 2006).

A incubação dos ovos, o estágio ninfal e a longevidade das fêmeas adultas de *P. nigrispinus* vão de 5 a 6, 17 a 20 e 30 para 85 dias, respectivamente, quando cultivados em temperaturas de 25-27 °C, 70-85% de umidade relativa do ar (UR) e fotoperíodo de 12 h. As fêmeas ovopositam massas contendo aproximadamente entre 25 e 40 ovos. Fêmeas mais velhas ovopositam de forma dispersa e com poucos ovos. Eles são depositados em varias partes da planta, incluindo as partes superior e inferior da folha, troncos e caules. No primeiro instar as ninfas não se alimentam permanecendo agregadas durante aproximadamente 1 dia. A dispersão da agregação é dependente da temperatura local e umidade. O segundo instar se inicia imediatamente após a exúvia. Os três primeiros instars duram aproximadamente 3 dias cada um; o quarto e o quinto são mais longos. As fêmeas requerem de 2-4 dias para maturação sexual, enquanto que os machos, somente de 1-2 dias após a emergência (ZANUNCIO et al., 2001).

O *P. nigrispinus* ocorre naturalmente e em variedade. No Brasil a subfamília mais comum é a *Asopinae*. Os percevejos pertencentes a esta família apresentam mecanismos de adaptação no aparelho bucal e no complexo enzimático digestivo, tornando-os aptos a exercerem ocasionalmente fitofagia sem causar danos às plantas hospedeiras (COHEN, 1996). Daí a necessidade de preservar as espécies nos campos, no que diz respeito ao uso indiscriminado de inseticidas, principalmente aqueles não seletivos sobre os artrópodes cujos efeitos podem ser desastrosos. A manutenção e a preservação dos inimigos naturais são

imprescindíveis para estabelecer o equilíbrio biológico e reduzir os custos com a produção (SOARES; BURSOLI, 2000).

O uso dos inseticidas sintéticos na década de 1940 e 1960 foi um sucesso, porém sua utilização indiscriminada trouxe uma série de problemas para os inimigos naturais das pragas, trazendo algumas mudanças de “status” de pragas secundárias para a condição de pragas primárias, como por exemplo, algumas espécies de insetos e ácaros. Atualmente, a quase totalidade dos sistemas de produção agrícola, em particular, as grandes culturas são dependentes do uso de inseticidas (BARROS et al., 2006).

Sendo assim, a exigência por produtos livres de agrotóxicos, obriga a busca de alternativas ao controle químico para o manejo das pragas. O extrato de plantas ou de outros micro-organismos com potencial inseticida tem se mostrado como uma alternativa de fácil aquisição e ao custo relativamente baixo (VENZON et al., 2007). Uma das alternativas para culturas do algodão é a introdução nos campos, de fêmeas com asas cortadas, cuja finalidade é aproveitar os insetos no auge da postura com ovos e ninfas, na cultura antes da manifestação das pragas (NEVES; TORRES; VIVAN, 2008). O potencial de predação do *P. nigrispinus* em diversas presas é dependente do tamanho da presa e pode variar em razão das condições do estudo (OLIVEIRA et al, 2002).

1.4.4 *Alabama argillacea* (Hubner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae)

Entre as espécies de espermatófitas cultivadas no mundo, o algodoeiro é uma das mais relevantes, quer pela importância global como planta fibrosa - oleaginosa, quer pelo elevado consumo de fertilizantes e pesticidas, devido ao seu ciclo relativamente longo e ao ataque freqüente de insetos e ácaros. Dentre as espécies com maior potencial de injúrias se destacam as do gênero *Lepidoptera*. Portanto, manter o nível de controle destas pragas abaixo dos limiares de prejuízo econômico configura-se como grande desafio ao agricultor (MIRANDA; OLIVEIRA, 2006).

Além do bicudo do algodoeiro, considerado como praga mais séria da cotonicultura, existem outras que merecem destaque principalmente no Nordeste: o pulgão (*Apis gossypii* Glover) o curuquerê (*Alabama argillacea* Hübner), a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella* Saunders), a lagarta da maçã (*Heliothis virescens* Fabricius, 1781), e a broca do

algodoeiro (*Eutinobothrus brasiliensis* Hambleton, 1937) (GRANER; GODOY JÚNIOR, 1967; COSTA, KITAJIMA; ARRUDA, 1971; BLEICHER et al., 1981, 1983; RAMALHO et al., 1989; BELTRÃO; AZEVEDO, 1993).

O *A. argillacea* Hübner (1818) (*Lepidoptera: Noctuidae*), ou curuquerê-do-algodão, como é conhecido, é uma praga capaz de desfolhar totalmente as plantações de algodão, sendo considerados insetos de grande importância Nacional e Internacional. Pode ocorrer desde a emergência das plantas até a formação dos capulhos, promovendo injúrias tanto qualitativas quanto quantitativas. O desfolhamento, por exemplo, causa perda na sua capacidade fotossintética, o que reduz a produção das fibras produzidas pela planta (Figura 37). Nas maçãs o ataque promove sua maturação precoce (RAMALHO, 1994; FONTES et al., 2006).

Figura 37 - Plantação de algodão predada por *Alabama argillacea*.



Fonte: Embrapa do algodão.

<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=46440>.

30.03.2011

Acessado em

As mariposas adultas do *A. argillacea* (Figura 38) têm entre 30 e 40 mm de envergadura, sua coloração é marrom-avermelhada, com duas manchas circulares na parte central das asas anteriores. As fêmeas adultas depositam cerca de 500 ovos dispostos individualmente, na parte abaxial das folhas. Seus ovos logo após a postura são de coloração azul esverdeada, circulares e achatados com 0,6 mm de diâmetro e quando próximo a eclosão tornam-se verde-amarelados. As lagartas eclodidas variam de coloração que vai do verde ao amarelo ou ao verde escuro, com listras longitudinais e cápsula cefálica amarela com pontuações pretas

quando atingem 40 mm de comprimento, tendo como característica se alimentar unicamente de folhas de algodão (SANTOS; BOIÇA JÚNIOR, 2001).

Figura 38 - Lagartas e mariposa adulta de *Alabama argillacea*.



Fonte: <http://statistics.arizona.edu/zeeb/butterflies/nocut.html>
http://grupos.emagister.com/imagen/larvas_de_alabama_argillacea/1823-695595. Acessado em 18.03.2011

As medidas utilizadas para a supressão de pragas no algodoeiro têm sido basicamente de ordem química, sendo, no Brasil, a cultura que mais consome inseticida (RAMALHO et al., 1986). O controle abusivo com uso de pesticidas acarreta impacto na entomofauna benéfica (por exemplo, mortalidade de inimigos naturais de outras pragas do mesmo cultivo), além de efeitos colaterais como: resistência aos inseticidas, ressurgência, poluição ambiental, resíduos nos produtos agrícolas, e também problemas de intoxicação aguda no próprio homem (FERNANDES, BACCI; FERNANDES, 2010). Culturas dependentes de pesticidas podem levar a alteração nos teores e distribuição de matéria orgânica dos solos, como o que aconteceu na faixa de bordadura noroeste do pantanal. Estas alterações levam a perda do poder de proteção ambiental, aumentando o risco de poluição química ambiental existente no local (RIEDER et al., 2000).

Estudos têm sido realizados para oferecerem alternativas e soluções para o problema por meio de programas de controle biológico (BARBOSA e CASTRO, 1983; SUJII et al., 2005) com estratégias e táticas mais adequadas, através do manejo integrado de pragas-MIP (BRAGA SOBRINHO; LUKERFARH 1983; RAMALHO; GONZAGA, 1990; BELTRÃO et al., 1992), reduzindo significativamente o emprego de pesticidas na cultura do algodão. As pesquisas se inclinam a desenvolver produtos de origem natural, alguns provenientes de vegetais superiores, ou outros organismos com o objetivo de controlar pragas (CARLINI et al., 1988; NÓBREGA, 1989; BANDYOPADHYAY; RAY; DAS, 2001; TORRES et al.,

2002; SCARPELLINI, 2001; HASHIM e DEVI, 2003; CARVALHO et al., 2008). Uma das principais vantagens do uso de inseticidas biológicos ou bioinseticidas são a sua alta especificidade em relação à praga alvo, não afetando outros insetos, plantas e animais, podendo ser degradados mais rapidamente que os sintéticos (KOUL; DHAWIWAL, 2001).

1.4.5 *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae), Cupins ou Térmites

Os cupins são insetos, também conhecidos como térmites, formigas brancas, formigas de asas, siriri, sarassará, sirilua e aleluia. Vivem em sociedades ou colônias (eussociais), em que a divisão de tarefas é bem distinta, realizada por grupos de indivíduos, denominados castas (Figura 39), representados por cupins ápteros ou alados que vivem em ninhos chamados cupinzeiros, termiteiros, aterroada ou itapecuim no Amazonas, munduru no Ceará e murundu, tacuri ou tacuru no Rio Grande do Sul (ZANETI, 2002).

Pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Hexapoda e Ordem Isoptera, com cerca de 2.800 espécies são conhecidas. Alimentam-se de celulose ou substâncias ligno-celulósicas e para facilitar a digestão de compostos estão associados a micro-organismos simbioses que habitam o intestino. Algumas espécies são consideradas pragas urbanas, outras em zonas florestais e agrícolas, tendo grande importância ecológica nos ecossistemas tropicais, onde funcionam como consumidores primários e decompositores. Como decompositores auxiliam na ciclagem dos nutrientes alocados nas plantas mortas, sendo também, responsáveis pela distribuição de vários nutrientes (HIGASHIE; ABE, 1997).

Figura 39 - Castas da colônia de cupins de acordo com a função na sociedade.

Castas					
Temporárias (alados e sexuais)		Permanentes (ápteros sexuais e não sexuais)			
		(Sexuais)	(Sexuais)	(Não sexuais)	
Fêmeas (aleluias)	Machos (aleluias)	Rainha e Rei (função de reprodução)	Ninfas de substituição (substituir a rainha e o rei caso morram)	Operárias (coletam e transportam o alimento e constroem o ninho)	Soldados (defendem a colônia e auxiliam os operários)

Fonte: Zaneti (2002)

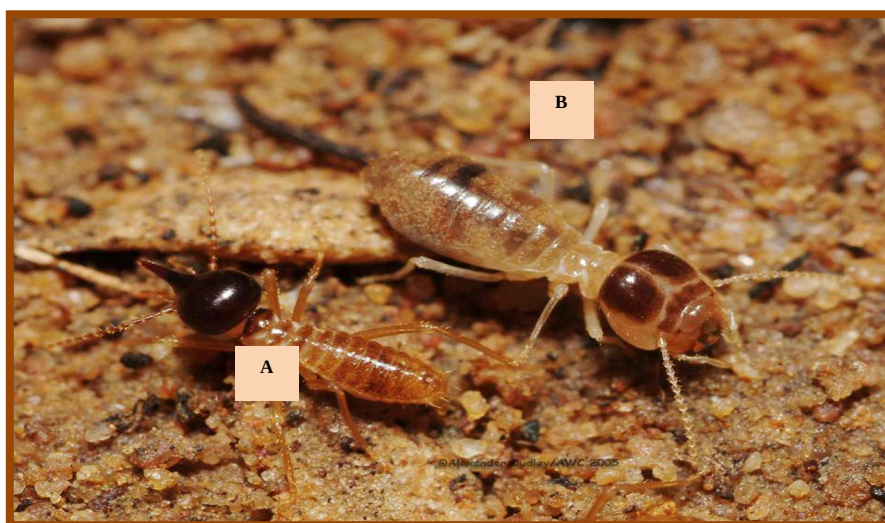
Na Ordem Isoptera são reconhecidas sete famílias entre elas a Termitidae bastante abundante em regiões Neotropicais do globo, sendo a mais rica e mais diversificada em termos ecológicos. A subfamília Nasutitermitinae está incluída entre os representantes desta família, o qual pode se distinguir dois grupos: o de soldados “mandibulados” que apresentam simultaneamente mandíbulas e tubo frontal desenvolvidos e os “verdadeiros nasutos” cujo tubo frontal é de tamanho variável e as mandíbulas são bem reduzidas (GRASSÉ, 1986).

As famílias dos cupins podem ser agrupadas em três grupos: 1- xilófagos: que vivem no interior do tronco de árvores ou madeiras tratadas (móveis e mourões de cercas), não entrando em contato com o solo; 2- arborícolas: constroem ninhos em troncos de árvores ou em madeiras em decomposição, mas se comunicam com o solo através de galerias superficiais, de onde saem em busca de alimento. Além da madeira, também se alimentam de húmus; 3- húmívoros: vivem em ninhos feitos no chão, pois se alimentam de húmus (ZANETI, 2002).

Todos os cupins, exceto os reprodutores, são tecnicamente imaturos, inclusive os soldados e as operários (Figura 40 A e B). A colônia é constituída de um par real (rei e a rainha) que são os reprodutores, e os operários e soldados (estéreis) (Figura 41). Os operários

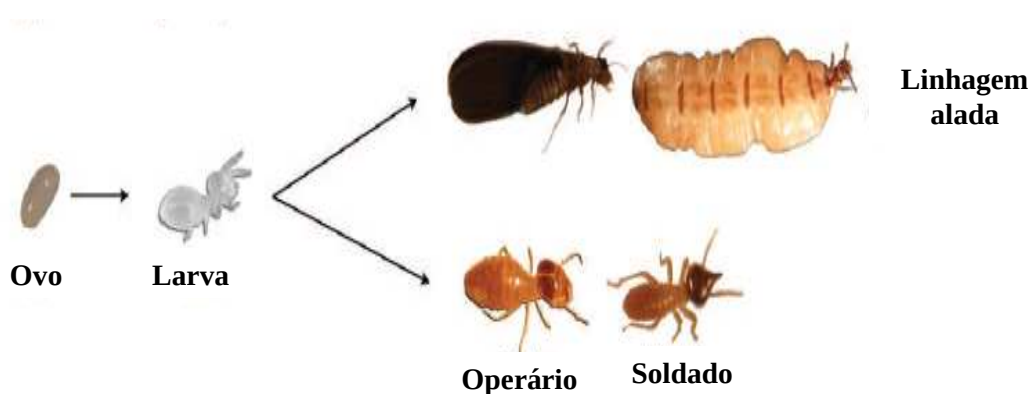
constituem a casta mais numerosa, são responsáveis por todo o trabalho da colônia, como a construção, reparo do ninho, coleta de alimento, alimentação dos indivíduos jovens de outras castas e cuidado com os jovens e com o par real. Os soldados são responsáveis pela defesa da colônia. Apresentam adaptações relacionadas à função. A defesa pode ser mecânica através de mandíbulas grandes e com diferentes formas ou química através de glândulas especiais, como a glândula frontal (THORNE, 1996).

Figura 40 - (A) soldado e (B) operário.



Fonte: <http://www.pbase.com/gehyra/image/46041049/original>. Acessado em 27.03.2011

Figura 41 - Ciclo de vida dos cupins.

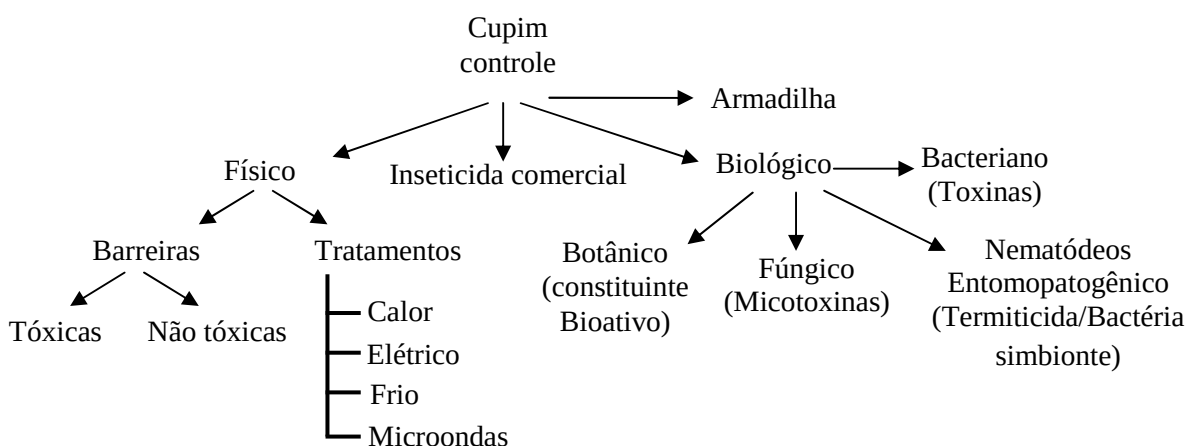


Fonte: Hartke e Baer (2011)

Os térmitas são considerados um grande problema nas plantações e nas construções. No ano de 1997, nos Estados Unidos eles causaram acima de 3 milhões de dólares em prejuízos nas madeiras de construções (LEWIS, 1997). No Brasil, os danos foram de 42.7% em 2002 (MILANO; FONTES, 2002). Portanto, diferentes métodos são empregados para o controle

e/ou o combate aos cupins, tais quais: físico, químico, biológico (nematóides, bactérias e fungos), métodos utilizando iscas, tratamento químico (inseticidas comerciais) e não químico da madeira (Figura 42).

Figura 42. Métodos de controle dos cupins



Fonte: Milano; Fontes (2002)

Os métodos físicos consistem na utilização de barreiras tóxicas que incluem o uso de termicidas como o clorofenapir que é depositado no solo ao redor da estrutura infestada; existe ainda as barreiras físicas não tóxicas que são formadas por substâncias, como areia, cascalho ou metal que evitam ou previnem a penetração dos cupins. Outros métodos físicos utilizam o calor (55.1°C e 68.1°C), frio (nitrogênio líquido -20 F), eletricidade (~ 0,5 amp, 90, 000 V e 60.000 ciclos) (MYLES, 2005; UNEP/FAO/Global IPM, 2000).

Os métodos químicos incluem o uso de inseticidas comerciais, como bifentrin, clorofenapir, permetrina, espinosade entre outros. Porém o uso destes compostos depende de fatores, tais como: a toxicidade do químico, a formulação e o método de aplicação, assim como a arquitetura do cupinzeiro. Para os cupins subterrâneos geralmente se utilizam injeções no solo. A fumigação, que inclui a incorporação de gases tóxicos (dióxido de carbono, metil bromido, fosfino, sulforil fluorído), é utilizada dentro da estrutura na madeira seca. Este método, no entanto, traz o inconveniente de produzir odores desagradáveis (VERMA; SHARMA; PRASAD, 2009).

Os métodos biológicos surgiram em 1935, como alternativa para os métodos tradicionais, através do uso do ácido citrônico em blocos de celulose. Na sequência, os óleos essenciais e os extratos vegetais como o neem e outros compostos, como antracenos, antronas, antraquinonas, xantonas, monoterpenóides, alcalóides, hidrocarbonetos e flavonóides foram e ainda são amplamente utilizados no combate aos cupins. Diferentes partes das plantas como as folhas, flores, frutos e raiz são utilizados para obtenção destes compostos. Entre os métodos biológicos são também de grande uso os nematóides, parasitas obrigatórios de insetos, alguns rizobactérias produtoras do gás cianeto e alguns espécies de fungos patogênicos (*Beauveria bassiana*) (RAINA et al., 2007).

Embora não se discuta a eficiência dos inseticidas químicos sintéticos, existe uma evidente preocupação com o uso abusivo tendo como consequência a interferência nos ecossistemas. Portanto, derivados de plantas, fungos entomopatogênicos, nematóides e algumas espécies de bactérias, surgem como fontes alternativas promissoras no combate as diferentes espécies de cupins.

1.4.6 A *Biompharia glabrata* e a esquistossomose

Os Moluscos estão envolvidos na transmissão de um conjunto de doenças parasitárias com prevalência significativa em países da América Latina e África, sendo indispensáveis para que a transmissão da doença se instale em uma localidade, razão pela qual ganham importância destacada, fundamentalmente, por se tratar de problemas de saúde pública situados na categoria das chamadas “doenças negligenciadas”, ainda diretamente relacionadas ao denominado “Saneamento Ambiental Inadequado” (RIOS, 1994). No Brasil, atualmente são contabilizadas pelo menos três formas de doenças do tipo “Verminoses ou Parasitoses” transmitidas por moluscos vetores, terrestres e límnicos/de águas doces, podendo estas ser divididas, em três grandes grupos principais, conforme o espaço e ambientes onde se desenvolvem: 1- esquistossomose, xistose ou barriga d’água; 2- fasciolose ou fasciolíase hepática; 3- angiostrongilíase abdominal (RIOS, 1994).

As esquistossomoses, esquistossomíases ou bilharzioses são doenças produzidas por trematódeos do gênero *Schistosoma* que, para o homem, tem como principais agentes etiológicos as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*, sendo a magnitude da sua prevalência e, a severidade da forma clínica complicada, que conferem a esquistossomose

grande transcendência. No Brasil, há três espécies de moluscos, por ordem de importância, envolvidos na transmissão da doença, são: *Biomphalaria glabrata* (Figura 43), *B. straminea* e *B. tenagophila*. A distribuição conhecida do *B. glabrata* abrange 16 estados (Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo e Sergipe) e o Distrito Federal (MINISTÉRIO DA SAÚDE. GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2005).

Na Região Nordeste é encontrado na faixa costeira e em áreas interiores adjacentes. São bastante exigentes quanto ao ambiente que vivem, preferencialmente em áreas bem úmidas, onde formam populações isoladas bastante suscetíveis à infestação pelo trematódeo causador da esquistossomose (PARAENSE, 1970; 1975). Porém de um modo geral, os caramujos transmissores da doença no Brasil, podem ser encontrados na água doce parada ou corrente de baixa velocidade, como lagos, lagoa, poças, cisternas, riachos, canais de irrigação ou ainda em área artificialmente alagadas. Preferem águas rasas com substrato lodoso ou rochoso com vegetação flutuante ou enraizada próximo as margens. Contudo, a espécie é capaz de sobreviver em completa dessecação por um período acima de cinco meses (PAZ, 1997).

A esquistossomose mansônica ou intestinal, também conhecida popularmente como xistossomose, xistosa, doença do caramujo ou barriga d'água, é uma doença infecciosa parasitária, cujo parasita habita os vasos sanguíneos do fígado e intestino do hospedeiro definitivo (Figura 44). A maioria das pessoas infectadas pode permanecer assintomática, dependendo da intensidade da infecção; a sintomatologia clínica corresponde ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro. O conhecimento completo da evolução da doença, somado às características epidemiológicas, serve para o estabelecimento de bases para o seu controle. A principal complicação da esquistossomose mansônica é a hipertensão portal nos casos avançados, que se caracterizam por hemorragias, ascites, edemas e insuficiência hepática severa. Há ainda, as formas particulares, como a pulmonar, cardiopulmonar e a neuroesquistossomose. Estes casos, a despeito do tratamento, quase sempre evoluem para óbito (PRATA, 1997).

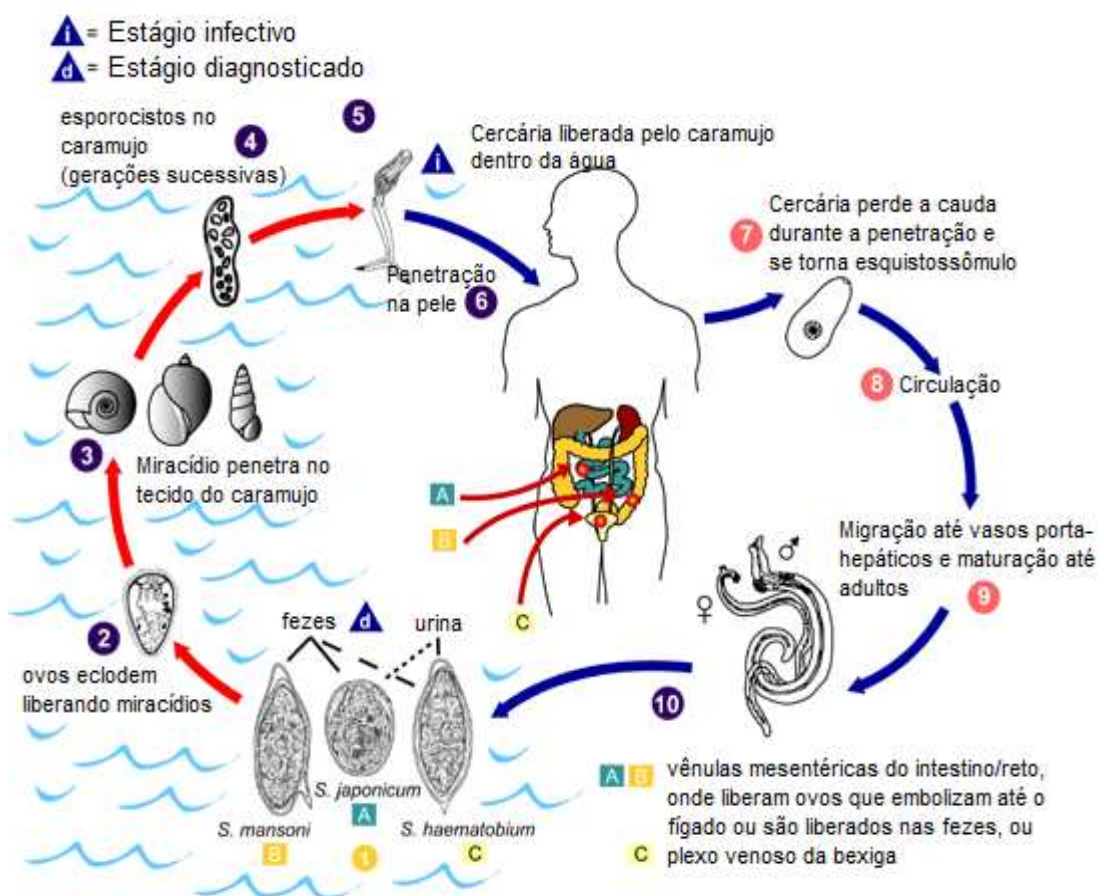
Figura 43 - *Biomplalaria glabrata*.

Fonte:

<http://herramientas.educa.madrid.org/animalandiaficha.php?id=4148>

Acesso em 31.03.2011

Figura 44 - Ciclo da esquistossomose



Fonte: Graham et al. (2010)

O contato humano com águas que contêm as cercárias, devido a atividades domésticas tais como lavagem de roupas e louças, de lazer, banhos em rios e lagoas; e de atividades profissionais, cultivo de arroz irrigado, alho, juta, etc., é a maneira pela qual o indivíduo adquire a esquistossomose. Os ovos do *S. mansoni* são eliminados pelas fezes do hospedeiro infectado (homem). Na água, estes eclodem, liberando larvas ciliadas denominadas *miracídeos*, que infectam o hospedeiro intermediário (caramujo). Após quatro a seis semanas, abandonam o caramujo, na forma de *cercárias* que ficam livres nas águas naturais retomando seu ciclo de vida (PAN, 1965).

A esquistossomose mansônica é uma endemia mundial, ocorrendo em 52 países e territórios, principalmente na América do Sul, Caribe, África e Leste do Mediterrâneo, onde atinge as regiões do Delta do Nilo, além de países como Egito e Sudão. No Brasil, a transmissão ocorre em 19 Estados, numa faixa contínua ao longo do litoral, desde o Rio Grande do Norte até a Bahia, na região Nordeste, alcançando o interior do Espírito Santo e Minas Gerais, no Sudeste. De forma localizada, está presente nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão, no Nordeste; Pará, na região Norte; Goiás e Distrito Federal, no Centro-Oeste; São Paulo e Rio de Janeiro, no Sudeste; Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, na região Sul. Atualmente, as prevalências mais elevadas são encontradas nos estados de Alagoas, Pernambuco, Sergipe, Minas Gerais, Bahia, Paraíba e Espírito Santo (VRANJAC, 2007; WHO, 2007).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2005), houve queda no período de 1977 a 2004 nas taxas de mortalidade (0,7 para 0,3/100.000 habitantes) e percentual de positividade de esquistossomose (23,3% para 6,1%). No período de 1984-2004 o percentual de internações por esquistossomose em relação ao total caiu de 1,6 para 0,7/10.000 internações. Em Pernambuco, estima-se que 15% da população está infectada pela esquistossomose (QUININO et al., 2009). Apesar de está presente em mais de 50 países e infectar mais de 83 milhões de pessoas, é uma das doenças mais negligenciadas no mundo, sendo considerada a segunda maior doença tropical responsável por morbidade, perdendo apenas para a malária (OPAS, 2006). Os Estados indenes sofrem fluxo migratório de pessoas oriundas de áreas endêmicas; em consequência, devem estruturar um sistema de vigilância epidemiológica e malacológica para evitar a introdução da doença (CHITSULO et al., 2000).

O controle da esquistossomose é uma das tarefas mais difíceis dos serviços de Saúde Pública. A importância da doença não se restringe à persistência da prevalência e larga distribuição geográfica no mundo. Ela diz respeito, também, ao mecanismo de escape do molusco frente ao moluscicida, precárias condições de moradia, saneamento básico e atividades econômicas ligadas ao uso da água. Uma das formas de erradicar a esquistossomose seria a restrição ao contato humano com água poluída e prevenção de contaminação ambiental (CHITSULO et al., 2000). Outra maneira seria romper o ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* através da utilização de agentes moluscicidas que, aliás, se apresenta como um dos principais métodos de erradicação da doença (LARDANS; DISSOUS, 1998), o que envolve a destruição do seu hospedeiro intermediário (PERRET; WHITFIELD, 1996; BEZERRA et al., 2002).

Substâncias conhecidas como moluscicida são utilizadas para combater caramujos que vivem e se alimentam de folhagens nos jardins, lavouras, estufas e campos. Acredita-se que mais de 7.000 produtos químicos já foram testados no combate dos caramujos. Porém, o sulfato de cobre, o gramaxone, o hidróxido de cálcio, o *N*-trítilmorfolina e a niclosamida se destacaram. No momento, apenas uma substância sintética, a niclosamida, é recomendada pela Organização Mundial de Saúde como moluscicida no combate à esquistossomose. Esta apresenta alta toxicidade aos moluscos na concentração de 1 mg mL, causando 100% de mortalidade na *B. glabrata*. No entanto, o uso de moluscicidas sintéticos em países do terceiro mundo tem encontrado problemas com toxicidade, contaminação do meio ambiente e resistência dos caramujos transmissores da doença, além do alto custo para aplicação do produto (D'ARCY; HARRON, 1983; NEVES 2005).

A preocupação com o desenvolvimento da resistência dos caramujos a tais substâncias e o fato de não serem seletivos, isto é, prejudicam outras espécies da fauna, levam a procura de alternativas, principalmente por substâncias seletivas e biodegradáveis; o que aumenta o interesse pelo uso moluscicida de origem vegetal. Algumas já testadas quanto aos seus princípios ativos potenciais. No Brasil, as primeiras pesquisas com moluscicidas naturais demonstraram a atividade dos extratos aquosos do caule de *Sejanis* sp (cipó-timbó) e *Sapindus saponaria* (saboneteira) (PINHEIRO; CORTEZ, 2003; LEYTON et. al., 2005; SILVA et al., 2006; BARDON et al., 2007; SANTOS et al., 2007; SILVA FILHO et al., 2009; CANTANHEDE., 2010; SANTOS et al., 2010).

No que diz respeito a outros organismos, como os líquens diferentes autores descreveram ao longo do tempo que existem preferências dos moluscos terrestres que se alimentam de determinadas partes do talo liquênico. Eles observaram que os invertebrados dão preferência as partes do talo que estão livres dos metabólitos secundários, como o ácido úsnico, atranorina e fumarprotocetrárico Benesperi e Tretiach, 2004; Gauslaa, 2005; Pöykkö, Hyvärinen e Backor, 2005; Pöykkö et al. (2010). Os mecanismos de ação dos compostos sobre os moluscos ainda não estão bem esclarecidos, porém a redução da palatabilidade e a toxicidade direta sobre a microflora intestinal dos invertebrados estão envolvidas com o consumo (Lawrey, 1980).

2 REFERÊNCIAS

- ABRAHAN, E. P.; FLOREY, H. W. **Antimicrobial substances from lichen and algae**. Antibiotic, v. 1, p. 566-575. 1949.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of Lichen Substances**. Tokio: Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. 240p.
- ACHARIUS, E. **Methodus Lichenum**. Stockholm. 1803. Hofmeisters Handbuch der Physiologisch Botanik. II. In: Engelmann, Leipzig, apud Lücking, R.; Herreira-CAMPOS, M. L. A. **Biologia de Líquens. Sistemática e Evolução dos Líquens**. Âmbito Cultural Edições Ltda. 2006. p. 455-466.
- _____. **Lichenographia Universalis**. Göttingen. 1810. In: Hofmeisters Handbuch der Physiologisch Botanik. II. In: Engelmann, Leipzig, apud Lücking, R.; Herreira-CAMPOS, M. L. A. **Biologia de Líquens. Sistemática e Evolução dos Líquens**. Âmbito Cultural Edições Ltda. 2006. p. 455-466.
- _____. **Synopsis Methodica Lichenum**. Lund. 1814. In: Hofmeisters Handbuch der Physiologisch Botanik. II. In: Engelmann, Leipzig, apud Lücking, R.; Herreira-CAMPOS, M. L. A. **Biologia de Líquens. Sistemática e Evolução dos Líquens**. Âmbito Cultural Edições Ltda. 2006. p. 455-466.
- ADAMO, P.; GIORDANO, S.; VINGIANI, S.; COBIANCHI, R. C.; 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.
- AGAR, G.; GULLUCE, M.; ASLAN, A.; BOZARI, S.; KARADAY, M.; ORTHAN, F. Mutation preventive and antigenotoxic potential of methanol extracts of two natural lichen. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 20, p. 2132-2137, 2010.
- AGBOKE, A. A.; ESIMONE, C. O. A. *In vitro* evaluation of the interaction between methanol extract of the lichen, *Ramalina farinacea* and ampicilin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. International **Journal Phytopharmacy Research**, v. 2, p. 35-39, 2011.
- AHMADJIAN, V. **The Lichen symbiosis**. New York: John Wiley and Sons, 2^a ed. 1993.
- AHMADJIAN, V; JACOBS, J. B. Relationship between fungus and algae in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck. **Nature**, v. 289, p. 169-172. 1981.
- AHTI, T; STENROOS, S; XAVIER FILHO, L. The morphological interpretation of cladoniiform thalli in lichens. **Lichenologist**, v. 14, n. 2, p. 105-113. 1982.
- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Bryologist**, [S.I.], v. 7, p. 55-70. 1993.
- AHTI, T.; MARCELLI, M. P. Taxonomy of the *Cladonia verticillaris* complex in South America. **Bibliotheca Lichenologica**, v. 58, p. 6-25. 1995.

ALMBORN, O. **The species concept in lichen taxonomy**. Säntryck ur Botaniska Notiser, v 4, p. 454-457. 1965.

ALMS, I. 1832. Über einen Stoff in der *Varidaria amara* Ach. Ann. Pharm. I: 61-68. In: Huneck, S.; Yoshimura, I. **Identification of Lichen Substances**. Springer-Verlag, Berlin. 1996. 495p.

AMO DE PAZ, G. et al. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. **J. Pharmaceut. Biomedical Analysis**, v. p. 165-171, 2010.

ARAÚJO, R. V. S. Evaluation of the antischistosomal activity of sulfated α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri* free and encapsulated into liposomes. **Journal Medical Biological Research Brazilian**, Version. 2011.

ARMSTRONG, R. A.; SMITH, S. N. Carbohydrates in the hypothallus and areolae of the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. **Symbiosis**, v 49, p. 95–100. 2009.

ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of lichen substances**, Japan Society for the Promotion of Science, Tokio, 240p. 1954.

ASPLUND, J.; SOLHAUG, K. A.; GAUSLAA, Y. Fungal depsidonas – an inducible or constitutive defence against herbivores in the lichen *Lobaria pulmonaria*? Basic and **Applied Ecology**, v 10, p. 273-278. 2009.

BAČKOR, M.; FAHSELT, D. Physiological attributes of the lichen *Cladonia pleurota* in heavy metal-rich and control sites near Sudbury. **Environmental Experimental Botany**, v. 52, p. 149-159. 2004.

BAČKOR, M.; PEKSA, O.; ŠKALOUD, P.; BAČKOROVÁ, M. Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on ITS rDNA sequences. **Ecotoxicological Environmental Safety**, v. 73, n. 4, p. 603-612. 2010.

BAČKOROVÁ, M.; BAČKOR, M.; MIKEŠ, J.; JENDŽELOVSKÝ, R.; FEDOROČKO, P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 37-44. 2011.

BAČKOROVA, M.; JENDŽELOVSKÝ, R.; KELLO, M.; BAČKOR, M.; MIKEŠ, J.; FEDOROČKO, P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n.3, p. 468. 2012.

BALAJI, P.; BHARATH, P.; SATYAN, R.S.; HARIHARAN, G. N. *In Vitro* antimicrobial activity of *Rocella montagnei* thallus extracts. **Journal Tropical Medicinal Plants**, v. 7, n. 2. p. 169-173. 2006.

BALAJI, P.; HARIHARAN, G. N. *In vitro* antimicrobial activity of *Parmotrema praesorediosum* thallus extracts. **Research Journal Botany**, v. 2 n. 1, p. 54-59. 2007.

BALAJI, P.; MALARVANNAN, S.; HARIHARAN, G. N. Efficacy of *Rocella montagnei* extracts on *Helicoverpa armigera*. **Journal of Entomology**, v. 4, n 3, p. 248-252. 2007.

BANDONI, R. J.; TOWERS, G. H. N. Degradation of usnic acid by microorganisms. **Canadian Journal Biochemistry**, v. 45, p. 1197-1201. 1967.

BANDYOPADHYAY, S.; RAY, A.; DAS, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homoptera pests in correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**, v. 161, p. 1025-1033. 2001.

BANFIELD, J. F.; BARKER, W. W.; WELCH, S. A.; TAUNTON, A. A. Biological impact on mineral dissolution: application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 30, n. 96, p. 34-3411. 1999.

BARBOSA, L. M.; CASTRO, P. R. C. Desenvolvimento e produtividade de algodoeiros sob efeito de reguladores vegetais. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, XL: 33-86, 1983.

BARDÓN A. S.; BORKOSKY, S.; YBARRA, M.S.; MONTANARO, S.; CARTAGENA, E. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. **Fitoterapia** v 78, p. 227-231. 2007.

BARGELLINI, E.; DEL PINTO, E.; MARINI-BETOLO, E. B. Sull Attività antibatterica di due acidi vulpinico. **Atti Della Accademia Nazionale dei Lincei**, v. 1, p. 1252-1255. 1946.

BARROS, R.; DEGRANDE, P.E.; RIBEIRO, J.F.; RODRIGUES, A. L. L.; NOGUEIRA, R. F.; FERNANDES, M. G. Flutuação populacional de insetos predadores associados a pragas do algodoeiro. **Arquivos Instituto Biologia**, São Paulo, v. 73, n.1, p.57-64. 2006.

BAUER, A. W; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 497-6. 1966.

BAZIN, M. A.; LAMER, A. C.; DELCROS, J.G.; ROUAUD, I.; URIAC, P.; BOUSTIR, J.; CORBEL, J. C.; TOMASI, S. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 6860–6866. 2008.

BEBERT. 1831. Sur une nouvelle substances decouvert et Blondeau. J. Pharm. Sci. Acess. 17: 696-700. Apud Huneck. S.; Yoshimura, I. **Identification of Lichen Substances**. Springer-Verlag, Berlin. 1996. 495p.

BEDNAR, T. W.; SMITH, D. C. Studies in the physiology of lichens VI. Preliminary studies of photosynthesis and carbohydrate metabolism of the lichen *xanthoria aureola*. **Department of Agriculture, University of Oxford**, p. 211-220. 1965.

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

_____. Experimental studies on the growth and usnic acid production in “lichen” *Usnea ghattensis* *in vitro*. **Microbiology Research**, v. 161, p. 232-237. 2006.

BEHERA, B. C.; VERMA, N.; SONONE, A.; MAKHIJA, U. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. **Bioresource Tecnology**, v. 99, p. 776-784. 2008.

BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P.; VIEIRA, D. J.; NÓBREGA, L. B.; QUEIROGA, V. P.; SOUZA, J. E. C. Observações morfológicas e agrônômicas em algodoeiro arbóreo precoce: I Frutograma de Plantas da Cultivar CNPA 4M do 5º ano de Ciclo. Campina Grande: **Embrapa – CNPA**, 1992. 5p.

BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. Defasagem entre a produtividade real e potencial do algodoeiro herbáceo: limitações morfológicas, fisiológicas e ambientais. Campina Grande: **Embrapa - CNPA**, 1993. 108 p.

BENATTI, M. N.; MARCELLI, M. P. Gêneros de fungos liquenizados dos manguezais do Sul-Sudeste do Brasil, com enfoque no manguezal do Rio Itanhaém, Estado de São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 4, p. 863-878. 2007.

BENESPERI, R.; TRETACH, M. Differential land snail damage to selected species of the lichen genus *Peltigera*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 127-138. 2004.

BENNETT, J. P. Discrimination of lichen genera and species using element concentrations. **The Lichenologist**, v. 40, n. 2, p. 135–151. 2008.

BENZINGER, F.; TOMÁSIC, P. Zaverserk Usninsäure aus jugoslawischen flechten und ihre antibiotische wirksmreit. **Qualeitäts Plantarum Water-Veg**, v. 7, p. 371-83. 1960.

BERLION M. **Mise au point d'un system de selection de substances antitumorales: application a l'étude d'analogues struturaux de la geopetaline** (Doctor's thesis). Grenoble: Universite Joseph Berlion; 1988.

BESSADOTTIR, M.; EGILSSON, M.; EINARSDÓTTIR, G.; BJORNSDÓTTIR, G.; MAGNUSDÓTTIR, I. H.; OMARSDÓTTIR, S.; OGMUNSDÓTTIR, H. M. The lichen compound usnic acid disturbs mitochondrial function and induces autophagy in cancer cells. **Ejc Supplements**, v. 8, n 5, p. 155–225. 2010.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P.H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, Holanda, v. 73, n 5 p. 428-430, 2002.

BJERKE, B. W.; GWYNN-JONES, D.; CALLAGHAN, T. V. Effects of enhanced UV-B radiation in the field on the concentration of phenolics and chlorophyll fluorescence in two boreal and arctic-alpine lichens. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 139-149. 2005.

BLEICHER, E.; SILVA, A. L.; SANTOS, W. J.; GRAVENA, S.; NAKANO, O.; FERREIRA, L. Conheça os insetos da sua lavoura de algodão. Campina Grande: **Embrapa – CNPA**, 1981. 21p (Documentos, 3).

_____. Conheça os insetos da sua lavoura de algodão. Campina Grande: **Embrapa – CNPA**, 1983. 21p (Documentos, 3).

BLEWITT, M, R.; COOPER – DRIVER, G, A. The effects of lichen extracts on feeding by *Gypsy moths* (*Lymantria dispar*). **The Bryologist**, v. 93. p. 220-221.1990.

BOEHM, F.; CLARKE, K.; EDGE, R.; FERNANDEZ, E.; NAVARATNAM, S.; QUILHOT, W.; RANCAN, F.; TRUSCOTT, T. G. Lichens – photophysical studies of potential a new sunscreens. **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 92, p. 40-45. 2009.

BOMFIM, R. R.; ARAÚJO, A. A. S.; CUADROS-ORELLANA, S.; MELO, M. G. D.; QUINTANS, J. L. J.; CAVALCANTI, S. C. H. Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 580-584. 2009.

BOUSTIE, J.; TOMASI, S.; GRUBE, M. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 287-307. 2010.

BRAGA-SOBRINHO, R.; LUKEFAHR, M. J. Bicudo – *Anthonomus grandis* Boheman – nova ameaça à cotonicultura brasileira: biologia e controle. Campina Grande: **Embrapa – CNPA**, 1983. 32 p (Documentos, 22).

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. 6. ed, Brasília: Ministério da Saúde, p. 297-306. 2005.

BÜDEL, B., SCHEIDEGGER, C. **Thallus morphology and anatomy**. In: Nash III, T.H. (Ed), *Lichen Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 40–68. 2008.

BUGNI, T. S.; ANDJELIC, C. D.; POLE, A. R.; RAI, P.; IRELAND, C. M.; BARROWS, L. R. Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. **Fitoterapia**, v. 80, p. 270-273. 2009.

BURKHOLDER, P. R.; EVANS, A. W.; McVEIGH, I.; THORNTON, H. K. Antibiotic activity of lichens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 30, p. 250-255. 1944.

BURKHOLDER, P. R.; EVANS, A. W. Further studies on the antibiotic of lichens. **Bull. Torrey Botanic Club**, v. 72, p. 157-164. 1945.

BUSTINZA, F. Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas de la bacitracina. **Anales Del Jardín Botánico de Madrid**, p. 583-590, 1950.

_____. Antibacterial substances from lichens. **Endeavour**, v. 10, p. 95-99. 1951.

CABRAL, J. P. Copper toxicity to five *Parmelia* lichens *in vitro*. Environ. **Environmental Experimental of Botany**, v. 49, p. 237-250. 2003.

CAMPANELLA, L.; DELFINI, M.; ERCOLE, P.; IACOANGELI, A.; RISUELO, G. Molecular characterization and action of usnic acid a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. **Biochimie**, v. 84, n. 4, p. 329-334. 2002.

CAMPOS, G.; LÓPEZ, V. Physiological and biochemical investigations on the phytotoxicity of usnic acid. **Oyton**, v. 29, p. 63-72. 1972.

CANTANHEDE, S. P. D. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 282-288. 2010.

CAPRIOTTI, A. The effect of Usno on yeast isolated from the excretion of tuberculosis patients. **Antibiotics & Chemotherapy**, v. 11, p. 409-410. 1961.

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

CARLINI, C. R.; et al. Immunoreactivity for canotoxin and concanavalin-A among proteins from leguminous seeds. **Phytochemistry**, v. 27, p. 25-30. 1988.

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: Editora eletrônica-Fenorte/ VENT. p. 47-58, 1996.

CARVALHO, G. A.; SANTOS, N. M.; PEDROSO, E. C.; TORRES, A. F. Eficiência do óleo de nim (*Azadirachta indica* a. Juss) no controle de *Brevicoryne brassicae* (linnaeus, 1758) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em couve-manteiga *Brassica oleracea* Linnaeus var. *Acephala*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p.181-186. 2008

CAVIGLIA, A. M.; NICORA, P.; GIORDANI,; BRUNIALTI, G.; MODENESI, P. Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (Lichenes). **II Farmaco**, v. 56, p. 379-382. 2001.

CETIN, H.; TUFAN, C. O.; TURK, A. O.; TAY, T.; CANDAN, M.; YANIKOGLU, A.; SUMBUL, H. Insecticidal activity of major lichen compounds (-) – and (+)- usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1277-1279. 2008.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, p. 41-51, 2000.

CHOUDHARY, M. I.; JALIL, A. S.; ATTA-UR-RAHMAN. Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen *Usnea longissima*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2346-2350. 2005.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 89:137-146. 2002.

COHEN, A. C. Plant feeding by predatory Heteroptera: evolutionary and adaptational aspects of trophic switching. In: WIEDENMANN, R.N.; ALOMAR, O. (Ed.). **Zoophytophagous Heteroptera**: implications for life history and integrated pest management. London: Entomological Society of America, 1996, p.1-17.

CONTI, M. E.; PINO, A.; BOTRÈ, F.; BOCCA, B.; ALIMONTI, A. Lichen *Usnea barbata* as biomonitor of airborne elements deposition in the province of Tierra del Fuego (southern Patagonia, Argentina). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1082-1089. 2009.

CORDOBA, C. V. **Fisiología de las substâncias liquénicas**. 1 Ed. Editorial Alhambra S.A. Madrid. 1975. 162 p.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma do milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, p. 39-41. 1971.

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 liquênicas. **Resumos de IV Congresso Nordestino de Ecologia**, Sociedade Nordestina de Ecologia, Recife. p. 36, 1991.

COURVALIN, P.; GLODSTEIN, F.; PHILIPPON, A.; SIROT, L. 1985. **L'Antibiogramme**. 1ª ed: Paris. p. 195-198.

CULBERSON, C. F. Sensitivities of some microchemical tests for usnic acid and atranorin. **Microchem. J.**, v. 7, p. 153-159. 1963.

_____. **Chemical and botanical guide to lichen products**. The University of North Carolina Press: Chapel Hill. 1969. 348p.

_____. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer chromatographic method. **Journal of Chromatography Amsterdam**, v. 72, p. 113-125. 1972.

CULBERSON, C. F.; ELIX, J. A. Lichen substances. In: **Methods in Plant Biochemistry**. V. I. Plant Phenolic Dey P. M and Harbone, J. A. Academic Press, London, p. 509-535. 1989.

CUNHA, M. H. A. *Cladonia verticillaris* (raddi) fr., para diagnostico da salubridade do ar decorrente da extração e beneficiamento de calcário em vertente do lério, Pernambuco (Brasil). **Caminhos da Geografia**, v. 8, p. 49-65. 2007.

D'ARCY, P. F.; HARRON, D. W. G. Helminth Infestation. **Pharmacy International**, v. 4, n. 7, p. 162-168. 1983.

DE BARY, A. 1866. Morphology und physiologie der Pilze Flechten und myxomyceten. Mti 101 Holzschnitten und I Kupfertafel. In: Hofmeisters Handbuch der Physiologisch Botanik. II. HERREIRA- CAMPOS, M. L. A. 2006. **Biologia de Líquens. Sistemática e Evolução dos Líquens**. Âmbito Cultural Edições Ltda. I. X, p. 455-466.

DE CARVALHO, E. A. B.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; FIGUEIREDO, R. C. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: on ultrastructural study. **Micron**, v. 36, p. 155-161. 2005.

DE CLERCQ.; DEGHEELE. Description and life history of the predatory bug *Podisus sagitta* (Fab.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Canadian Entomologist**, v. 122, p. 1149-1155. 1990.

DIN, L. B.; ZURIATI, Z.; SAMSUDIN, M. W.; ELIX, J. Chemical profile of compounds from lichens of Bukit Larut, Penninsular Malaysia. **Sains Malaysiana**, v. 39, p. 901-908. 2010.

DEVOKA, A.; GHIMIRE, G. P. S.; NANIYA, C. B. Antibiotic activities of some lichen species. **Tribhuvan University Journal**, v. 12, p. 45-51. 1999.

DHARMADHIKARI, M.; JITE, P. K.; CHATTIAR, S. Antimicrobial activity of extracts of the lichen and its isolated mycobiont. *Parmelinella simplicior*. **Asian Journal of Experimental Biological Science SPL**, p. 54-58, 2010.

DONKIN, R. A. The “manna lichen”. **Anthropos**, v. 76, p. 562-576. 1981.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**, v. 33, p. 409-421. 2000.

EINARSDÓTTIR, E.; GROENEWEG, J.; BJÖRNSDÓTTIR, G.G.; HARETHARDOTTIR, G.; OMARSDÓTTIR, S.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; OGMUNDSSÓTTIR, H. M. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. **Planta Med**, v. 76, p. 969-974. 2010.

EISENREICH, W.; KNISPEL, N.; BECK, A. Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 445–456, 2011.

ELO, K.; MATIKAINEN, J.; PELTTARI, E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resisten enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Naturwissenschaften**, v. 94, p. 465-468. 2007.

EMMERICH, R.; GIEZ, I.; LANGE, O. L.; PROKSCH, P. Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. **Phytochemistry**, v. 33, p. 1389-1394. 1993.

ENGEL, K.; SCHMIDT, U.; REUTER, J.; WECKESSER, S.; SIMON-HAARHAUS, B.; SCHEMPP, C. M. Usnea barbata extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E₂ synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 89, p. 9–14. 2007.

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

FAHSELT, D.; MAYCOCK, P.; WONG, P. Y. Reproductive modes of lichens in stressful environments in central ellesmere island, canadian high arctic. **Lichenologist**, v. 21, n 4, p. 343-353. 1989.

FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H.; GUSMÃO, N. B.; SHEYLA, M. R.; PEREIRA, E. C. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina soresiosa* (B de Lesd.) Laundron. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 911-918. 2004.

FARRAR, W. V. Synthetic dyes before 1960. **Endeavour**, v. 120, p. 149-155. 1974.

FAVERO-LONGO, S. E.; CASTELLI, D.; FUBINO, B.; PIERVITTORI, R. Lichens on asbestos-cement roofs: bioweathering and biocovering effects. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, p. 1300-1308. 2009.

FERNANDES, F. L.; BACCI, L.; FERNANDES, M. S. Impact and Selectivity of Insecticides to Predators and Parasitoids. **EntomoBrasilis**, v. 3, n 1, p. 01-10. 2010.

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

FONTES, E. M. G.; RAMALHO, F. S.; UNDERWOOD, E.; BARROSO, P. A. V.; SIMON, M. F.; SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; BELTRÃO, N. E. M.; LUCENA, W. A. S.; FREIRE, E. C The cotton agricultural context in Brazil, p. 21-66. In A. Hilbeck, D.A Andow & E.M.G. Fontes (eds.), **Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge, CABI Publishing, 373 p. 2006.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS DE ARIAS, A.; TORRES DE ORTIZ, S.; INCHAUSTI, A.; YALLUFF, G.; QUILHOT, W.; FWENANDEZ, E.; HIDALGO, M. E. Activity of compounds isolated from chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. **Comp. Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 116C, p. 51-54. 1997.

FREYSDOTTIR, J.; OMARSDÓTTIR, S.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; VIKINGSSON, A.; OLAFSDÓTTIR, E. S. *In vitro* and *in vivo* immunomodulating effects of traditionally prepared extarxt and purified compounds from *Cetraria islandica*. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 423-430. 2008.

FRIEDRICH, W. Z. 1907. Die Flechtenstoff in chemuscher, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung. In: HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. **Identification of lichen substances**. 1996. 492p.

FRÖBERG, L.; BAUR, A.; BAUR, B. Differential herbivore damage to calcicolous lichens by snails. **Lichenologist**, v. 25, p. 83-95. 1993.

GALUN, M.; SHOMER-LLAN, A. **Secondary metabolites products**. In. CRC Handbook of Lichenology, V. III, M. Galun (Ed.) CRC Press. Boca Raton, Florida, 1988. p. 3-8.

GAUSLAA, Y. Lichen palatability depends on investment in herbivore defence. **Oecology**, v. 143, p. 94-105. 2005.

_____. Trade-off between reproduction and growth in the foliose old forest lichen *Lobaria pulmonaria*. **Basic and Applied Ecology**, v. 7, p. 455-460. 2006.

GAUSLAA, Y.; HOLIEN, H.; OHLSON, M.; SOLHOY, T. Does snail grazing affect growth of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria*? **Lichenologist**, v. 38, p. 587-593. 2006.

GAYATHRI, D.; SWAMY, C. T. Lichens: a novel and potential source as antimicrobials for human use. **Journal Phytology**, v. 4, n. 1, p. 38-43. 2012.

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

GIEZ, I.; LANGE, O. L.; PROKSCH, P. Growth retarding activity of lichen substances against the hervivorous insect *Spodoptera littoralis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22. p. 113-120. 1994.

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

GMELIN, J. G. Reise durch Siberian. Göttingen. 1752. In: Hofmeisters Handbuch der Physiologisch Botanik. II. HERREIRA- CAMPOS, M. L. A. 2006. **Biologia de Líquens. Sistemática e Evolução dos Líquens**. Âmbito Cultural Edições Ltda. I. X, p. 455-466.

_____. Reise durch Siberian. Göttingen. 1858 In: Hofmeisters Handbuch der Physiologisch Botanik. II. HERREIRA- CAMPOS, M. L. A. 2006. **Biologia de Líquens. Sistemática e Evolução dos Líquens**. Âmbito Cultural Edições Ltda. I. X, p. 455-466.

GRAHAM, B. B.; BANDEIRA, A. P.; MORRELL, N. W.; BUTROUS, G.; TUDER, R. M. M. Schistosomiasis-Associated Pulmonary Hypertension Pulmonary Vascular Disease: The Global Perspective. **Chest**, v. 137, p. 20-29, 2010.

GRANER, E A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: Melhoramentos, 1967. 320 p.

GRANGEON, S.; GUÉDRON, S.; ASTA, J.; SARRET, G.; CHARLET, L. Lichen and soil indicators of an atmospheric mercury contamination in the vicinity of a chlor-alkali plant (Grenoble, France). **Ecological Indicators**, v. 12, p. 178-183. 2012.

GRASSÉ, P. P. 1986. **Termitologia. Comportement, socialite, écologie, evolution, systematique**. Paris: Masson, v. 3. 715p.

GRAZIA, J.; DEL VECCHIO. M. C.; HILDEBRAND, R. Estudo das ninfas de heterópteros predadores: I- *Podisus connexivus* Bergroth, 1891. (Pentatomidae, Asopinae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 2, p. 303-311. 1985.

GREUTER, W. **International Code of Botanical Nomenclature**. Königstein: Koeltz. 1988.

GRUBE, M.; KROKEN, S. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. **Mycological Research**, v. 11, p. 1284-1294. 2000.

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

GULLUCE, M.; ASLAN, A.; SOKMEN, M.; SAHIN, F.; ADIGUZEL, A.; AGAR, G.; SOKMEN, A Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia*

saxatilis, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 515-521. 2006.

GUO, J.; LI, Z-L.; WANG, AO-LI.; LIU, XIAO-QIU.; WANG, J.; GUO, X.; JING, YOUNG-KUI.; H, HU-MING. Three New Phenolic Compounds from the Lichen *Thamnolia vermicularis* and Their Antiproliferative Effects in Prostate Cancer Cells. **Planta Med**, v. 77, p. 2042–2046. 2011.

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

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

HAMALA, P.; VAN HALUWIN, C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. **Biocontrol**, v. 49, p. 95-107. 2004.

HAMADA, N. Environmental factors affecting the content of usnic acid in the lichen mycobiont of *Ramalina siliquosa*. **Bryologist**, v. 94, p. 57-59. 1991.

HARA, K.; ENDO, M.; KAWAKAMI, H.; KOMINE, M.; YAMAMOTO, Y. Anti-oxidation activity of ethanol extracts from natural thalli of lichens. **Mycosystema**, v. 30, n. 6, p. 950-954. 2011.

HASHIM, M. S; DEVI. K. S. Insecticidal action of the polyphenolic rich fractions from the stem bark of *Streblus asper* on *Dysdercus cingulatus*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 670-676. 2003.

HARTKE, T. R.; BAER, B. The mating biology of termites: a comparative review. **Animal Behaviour**, v. 82, p. 927- 936. 2011.

HAUCK, M.; PAUL, A.; GROSS, S.; RAUBUCH, M. Manganese toxicity in epiphytic lichens: chlorophyll degradation and interaction with iron and phosphorus. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 181-191. 2003.

HAUCK, M.; JURGENS, S. R. Usnic acid controls the acidity tolerance of lichens, **Environmental and Experimental Botany**, v. 156, p. 115-122, 2008.

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

HAUCK, M. Site factors controlling epiphytic lichen abundance in northern forests. **Flora**, v. 206, p. 81-90. 2011.

HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J. **The lichen-forming fungi**. Blackie, Glasgow and London. 1984.

HAWKSWORTH, D. L.; HONEGGER, R. **The lichen thallus: a symbiotic phenotype of nutritionally specialized fungi and its response to gal produces**. Claredon Press. pp. 77-98. 1994.

HAWKSWORTH, D. L. The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance and the nature of lichens. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 26, p. 3-0. 1998.

_____. The magnitude of fungal diversity: The 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432. 2001.

HENG, L.; YAMAMOTO, Y.; LIU, Y. P.; JUNG, J. S.; KAHNG, H. Y.; KOH, Y. J.; HUR, J. S. The *in vitro* antioxidant properties of chinese highland lichens. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 1524-1528. 2010.

HESBACHER, S.; BAUR, B.; BAUR, A.; PROKSCH, P. Sequestration of lichen compounds by three species of terrestrial snail. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 2, p. 233- 238. 1995.

HIGASHIE, M.; ABE, T. Global diversifications of termites driven by evolution of symbiosis and sociality, p. 83-112. In: ABE, T. S.A. E HIGASHIE (Eds). **Biodiversity**. Springer-Verlag. 1997.

HILL, D. J. Asymmetric Co-evolution in the Lichen Symbiosis Caused by a Limited Capacity for Adaptation in the Photobiont. **Botanical Reviewers**, v 75, p. 326–338. 2009.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin layer, chromatograms as method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329. 1970.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, v. 21, p. 110-125. 1998.

HONDA, N. K.; PAVAN, F. R.; COELHO, R. G.; ANDRADE LEITE, S. R.; MICHELETTI, A. C.; LOPES, T. I.; MISUTSU, M. Y.; BRATRIZ, A.; BRUM, R. L.; LEITE, C. Q. Antimicrobial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, v. 17, p. 328-332. 2010.

HONEGGER, R. Functional aspects of the lichen symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 553-578. 1991.

HOSKERI, H. J.; KRISHNA, V.; AMRUTHAVALLI, C. Effects of extracts from lichen *Ramalina pacifica* against clinically infectious bacteria. **Researcher**, v. 2, n. 3, p. 81-85. 2010.

HOWELL, G. M. E.; NEWTON, E. M.; WILLIAMS-WYNN, D. D. Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, acid rhizocarpic, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 651-653, p. 27-37, 2003.

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

HUNECK, S. The significance of lichens and their metabolites. Review Article. **Naturwissenschaften**, v. 86, p. 559-570. 1999.

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.; SKÚLASON, V. G.; GISSURARSON, S. R.; VIHELMSDÓTTIR, M. Antimicrobial activity of lichen metabolites *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 141-144, 1998.

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

INTERNATIONAL ASSOCIATION LIQUENOLOGY (IAL), v. 14, n. 9 p. 1981.

IVANOVA, D.; INVANOV, D. Ethnobotanical use of lichens: lichens for food review. **Scripta Scientifica Medica**, v. 41, p. 11-16. 2009.

JOULAIN, D.; TABACCHI, R. Lichen extracts as raw materials in perfumery. part 1: oakmoss. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, n. 2, p. 49-61. 2009.

KANG, H.Y.; MATSUSHIMA, N.; SAMESHIMA, S.; TAKAMURA, N. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* Léveillé). **Mokuzai Gakkaishi**, v. 36, p. 78-84. 1990.

KAPPEN, L. Some aspects of the great success of lichen in Antarctica. **Antarctic Sci.**, v. 12, p. 314-324. 2000.

KARBER G.; BEHRENS B. **Statistical methods in biological assay**. Ed. Griffin Ch. And C. London. 1964.

KARAGÖZ, A.; DOĞRUÖZ, N.; ZEYBEK, Z.; ASLAN, A. Antibacterial activity of some lichen extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 12, p. 1034-1039, 2009.

KARATYGIN, I. V; SNIGIREVSKAYA, N. S; VIKULIN, S. V. The most ancient terrestrial lichen *Winfrenatia reticulata*: a new find and new interpretation. **Paleontological Journal**, v. 43, p. 107-114. 2009.

KIM, H. S.; KIM, J. Y.; LEE, H. K.; KIM, M. S.; LEE, S. R.; KANG, J. S.; KIM, H. M.; LEE, K.; HONG, J. T.; KIM, Y.; HAN, S.B. Dendritic Cell Activation by Glucan Isolated from *Umbilicaria Esculenta*. **Imunne Network**. p. 1598-2629. DOI 10.4110/in.2010.10.6.188.

KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y.; YOSHIMURA, I. Distribution of optical isomers of usnic acids analyzed by high performance liquid chromatography. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, v. 83, p. 173:178. 1997.

KOHLHARDT-FLOEHR, C.; BOEHM, F.; TROPPE, S.; LADEMAN, J.; TRUSCOTT, T. G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 101, p. 97–102, 2010.

KNOP, W. 1944. Chemisch-physiologische Untersuchung über die Flechten. Ann. Chem. Pharm. 49: 103-124 apud Huneck, S.; Yoshimura, I. 1996. **Identification of Lichen Substances**. Springer-Verlag, Berlin. 495p.

KORTENKANGAS, A. E.; VIRTANEN, O. E. The antibiotic activity of some amino compound derivatives of usnic acid. **Soumen Kemistilehti**, v. 19, p. 1-4. 1956.

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

KOSANIĆ, M.; RANKOVIĆ, B.; SLOBODAN, S. Antimicrobial activity of the lichen *Lecanora frustulosa* and *Parmeliopsis hyperopta* and their divaricatic acid and zeorin constituents. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 885-890. 2010a.

KOSANIĆ, M.; RANKOVIĆ, B. Screening of antimicrobial activity of some lichen species *in vitro*. **Kragujevac Journal of Science**, v. 32, p. 65-72. 2010b.

KOUL, O.; DHAWIWAL, G. S. **Phytochem. Biopesticides**. Harwood Academic Publishers. 2001.

KRANNER, I.; CRAM, W. J.; ZORN, M.; WORNIK, S.; YASHIMURA, I.; STABENTHEINER, E.; PFEIFHOFER, H. W. Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared to its isolated symbiotic partners. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 102, p. 3141-3146. 2005.

KRASNOGORSKAJA, N. N.; et al. Method for evaluation of atmosphere contamination by means of lichens. **Russian Patent, RU2260934**. 2005.

KÜLZ. 1874. In: IVANOVA, D.; INVANOV, D. Ethnobotanical use of lichens: lichens for food review. **Scripta Scientifica Medica**, v. 41, p. 11-16. 2009.

KUMAR, S. K. C.; MÜLLER, K. Depsides as non-redox inhibitors of leucotriene B4 biosynthesis and HaCaT cell growth 1. Novel analogues of barbatic and diffractaic acid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 1035-1042. 1999.

LARDANS, V.; DISSOUS, C. Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. **Parasitology Today**, v. 14, p. 413-417, 1998.

LARSSON, P.; VEČEŘOVÁ, K.; CEMPÍRKOVÁ, H.; SOLHAUG, K. A.; GAUSLAA, Y. Does UV-B influence biomass growth in lichens deficient in sun-screening pigments?. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 215-221, 2009.

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

LAWREY, J. D. Correlations between lichen secondary chemistry and grazing activity by *Pallifera varia*. **Bryologist**, v. 23, p. 128-134. 1980.

_____. **Nutritional ecology of lichen/moss arthropods.** In: SLANSKY, F. JR E RODRIGUEZ, J. G. Nutritional ecology insects, mites and spiders. Chapter 6, p. 209-233. 1987.

_____. Lichen herbivore preference: a test of two hypotheses. **American Journal of Botany**, v. 70, n. 8, p. 1188-1194. 1993.

LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant physiology Lancaster**, v. 71, p. 300-301. 1983.

LEGAZ, M. E.; VICENTE, C.; ASCASO, C.; PEREIRA, E. C.; XAVIER FILHO, L. Pigment analysis of Sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 6, p. 575-582. 1986.

LEWIS, V. R. Alternative control strategies for termites. **Journal of Agricultural Entomology**, v. 14, 291-307. 1997.

LEYTON, V.; HENDERSON, T. O.; MASCARA, D.; KAWANO, T. Atividade moluscicida e princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solonaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). **Iheringia Série Zoologia**, v. 95, p. 213-216. 2005.

LIAO, C.; NORMORE-PIERCEY, M. D.; SORESSEN, J. L.; GOUGH, K. *In situ* imaging of usnic acid in selected *Cladonia* spp. by vibrational spectroscopy. **Analyst**, v. 135, p. 3242-3248. 2010.

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

LINNÉ, C. V. 1753. *Species Plantarum*. In: NASH III, T. H. **Lichen Biology**. 2 ed. Cambridge, USA, Cambridge University Press led. 2008. 486p.

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

LOPPI, S.; RICCOBONO, F.; ZHANG, Z. H.; SACIC, S.; IVANOV, D.; PIRINTSOS, S.A. Lichen as biomonitors of uranium in the Balkan area. **Environmental Pollution**, v. 125, n. 2, p. 277-280. 2003.

LUTZONI, F.; PAGEL, M.; REEB, V. Major fungal lineages derived from lichen symbiotic ancestors. **Nature**, v. 411, p. 937-940. 2001.

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

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

MANOJLOVIĆ, N. T.; SOLUJIC, S.; SUKDOLAK, S.; MILOSEV, M. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 244-246. 2005.

MANOJLOVIĆ, N. T.; VASELIJEVIĆ, P. J.; GRITSANAPAN, W.; SUPABPHOL, R.; MANOJLOVIC, I. Phytochemical and antioxidant studies of *Laurera benguelensis* growing in Thailand. **Biological Research**, v. 43, p. 169-176. 2010a

MANOJLOVIĆ, N. T.; VASELIJEVIĆ, P. J.; NIKOLIĆ, D.; DUŠANOVIĆ, G. B.; NAJMAN, S. HPLC analysis and cytotoxic potential of extracts from the lichen, *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 817-823. 2010b.

MANOJLOVIĆ, N. T.; VASELIJEVIĆ, P. J.; MASKOVIĆ.; JUSKOVIĆ.; DUŠANOVIĆ, G. B. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). **Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 2-8. 2012.

MARCELLI, M. P.; SEAWARD, M. R. D. Lichenology Latin American: history, current knowledge and applications. CETESB. São Paulo. p. 25-45. 1998.

MARSHAK, A. A. Cristaline antibacterial substance from de lichen *Ramalina reticulata*. **Public Health**, v. 62, p. 3-19. 1974.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueiriense* Hale. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 7-13. 2005.

MARTINS, M. C. B.; LIMA, M. J.G.; SILVA, F. P.; AZEVEDO-XIMENES, E.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 115-122. 2010.

MAZID, M. A.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A. Antibacterial activity of *Parmelia kamstchandalis*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 615-617. 1999.

McMULLIN, R. T.; BELL, F. W.; NEWMASER, S. G. The effects of triclopyr and glyphosate on lichens. **Forest Ecology and Management**, v. 264, p. 90-97. 2012.

MELGAREJO, M.; STERNER, O.; CASTRO, J. V.; MOLLINEDO, P. More investigations in potent activity and relationship structure of the lichen antibiotic (+)-usnic acid and its derivate dibenzoylusnic acid. **Revista Boliviana de Química**, v. 25, n. 1, p. 24-29. 2008.

MELO, M. G. D.; SANTOS, J. P.; CAREGNATO, F. F.; PASQUALI, M. A.; RABELO, T. K.; ROCHA, R. F.; QUINTANS, L.; ARAÚJO, A. A.; SILVA, F. A.; MOREIRA, J. C.;

GELAIN, D. P. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 462–468, 2011.

MENON, V.; DIVATE, R.; RAO, M. Bioethanol production from renewable polymer lichenan using lichenase from an alkalothermophilic *Thermomonospora sp.* and thermotolerant yeast. **Fuel Science and Technology International**, v. 92, p. 401–406. 2011.

MILANO, S.; FONTES, L. R. Termite pests and their control in urban Brazil. **Sociobiology**, v.40, p. 163–177. 2002.

MIRANDA, J. E.; OLIVEIRA, J. E. M. Avaliação da suscetibilidade de populações de curuquerê de áreas de Goiás a inseticidas. **Ministério da Agricultura. Comunicado Técnico 267 INSS 0102-009**. Campina Grande – PB. 2006.

MISUK, Y; MOIRE, A. W; BERNHARD. M. Variations of sulfur isotope ratios in a single lichen thallus: A potential historical archive for sulfur pollution. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 3534-3538. 2010.

MITCHELL, J. C.; SHIBATA, S. Immunologic activity of some substances derived from lichenized fungi. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 52, n. 6, p. 517- 520. 1969.

MITROVIĆ, T.; STAMENKOVIĆ, S.; CVETKOVIĆ, V.; NIKOLIĆ, M.; TOŠIĆ, S.; STOJIČIĆ, D. Lichens as source of versatile bioactive compounds. **Biologica Nyssana**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2011.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 65, p. 157 – 173, 2010.

MORITA, H.; et al. Antimitotic activity of labaric acid and a new benzofuran, sakisacaulon a from *Stereocaulon sasakii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 3679-3681. 2009.

MOTA-FILHO, F. O; PEREIRA, E. C. Influência de poluentes atmosféricos em Belo jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1072-1076. 2007.

MOXHAM, T. H. Lichens and litmus. **Bulletin Lichen Society**, v. 50, p. 1-3. 1982.

MUGGIA, L.; SCHMIT, I.; GRUBE, M. Lichens as treasure chests of natural products. **Sim News**, p. 85-97. 2009.

MYLES, T. G., 2005. Termite biology, Urban Entomology Programme, online at <http://www.utoronto.ca/forest/termite/termite.htm>. Acesso em 20.03.2011.

NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; OLIVEIRA, A. F. M.; SILVA, N. H.; BOITARD, M.; BERIEL, H. Screening de atividade citotóxica de extratos liquênicos: Cladoniaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 8, n. 1, p. 97-107. 1994.

NASH III, T. H. **Lichen Biology**. 2 ed. Cambrige, USA, Cambridge University Press led. 2008. 486p.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu. 2005. 312p.

NEVES, R. C. S.; TORRES, J. B.; VIVAN, L. M. Reproduction and dispersal of wing-clipped predatory stinkbugs, *Podisus nigrispinus* in cotton fields. **Biocontrol**. DOI 10.1007/s10526-008-9150-4. 2008.

NIMIS, P. L.; CASTELLO, M.; PERROTTI, M. Lichens as biomonitors of sulphur dioxide pollution in La Spezia (Northern Italy). **Lichenologist**, v. 22, p. 333-344. 1990.

NIMIS, P.L.; SKERT, N. Lichen and selective grazing by the coleopteran *Lasioderma serricorne*. **Environmental Experimental of Botany**, v. 55, p. 175-182. 2006.

NISHITOBA, L.; NISHIYAMA, I.; NISHIYAMA, T.; MIZUTANI, J. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 3181. 1987.

NOBREGA, A. M I. Reprodução e longevidade de *Dysdercus maurus* Distant, 1901 (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 18 (supl.). 1989.

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; SOCCOL, V.T.; OLIVEIRA, M.B.M. Effects of a lichen galactomannan and its vanady (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 233, p. 73-83. 2002.

NUNES, P. S.; ALBUQUERQUE, R. L.; CAVALCANTE, D. R.; DANTAS, M. D.; CARDOSO, J. C.; BEZERRA, M. S.; SOUZA, J. C.; SERAFINI, M. R.; QUITANS, L. J.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 761593, 9 pages Doi:10.1155/2011/761593. 2010.

NYLANDER, W. Énumération générale des lichens, avec l'indication sommaire de leur distribution géographique. **Mémoires de la Société des Sciences Naturelles et Mathématiques de Cherbourg**, v. 5, p. 85-146. 1870. In: NASH III, T. H. **Lichen Biology**. 2 ed. Cambridge, USA, Cambridge University Press led. 2008. 486p.

ODABASOGLU, F.; ÇAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 59-65. 2006.

ODABASOGLU, F.; YILDIRIM, O.S.; AYGUN, H.; HALICI, Z.; ERDOGAN, F.; CADIRCI, E.; ÇAKIR, A.; OKUMUS, Z.; AKSAKAL, B.; ASLAN, A.; UNAL, D.; BAYIR, Y. Diffractaic acid, a novel proapoptotic agent, induces with olive oil both apoptosis and antioxidative systems in Ti-implanted rabbits. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, p. 171-178. 2012.

OKSANEN, I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 723-734. 2006.

OLIVEIRA, J. E. M.; TORRES, J. B.; CARRANO-MOREIRA, A. F.; RAMALHO, S. R. Biologia de *Podisus nigrispinus* predando lagartas de *Alabama argillacea* em campo **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 7-14. 2002.

O'NEILL, M. A.; MAYER, M.; MURRAY, K. E.; ROLIM-SANTOS, H. M.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; THOMPSON, A. M.; APPLEYARD, V. C. Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells? **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 659-664. 2010.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Relatório Mundial da Saúde de 2006. www.opas.org.br (acesso em 05.07.2010).

OTÁLORA, M. A. G.; MARTINEZ, I.; O'BRIEN, H.; MOLINA, M. C.; ARAGÓN, G.; LUTZONI, F. Multiple origins of high reciprocal symbiotic specificity at an intercontinental spatial scale among gelatinous lichens (Collemataceae, Lecanoromycetes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, p. 1089–1095. 2010.

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

PAN, C. T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 14, p. 931- 976, 1965.

PAOLI, L., CORSINI, A.; BIGAGLI, V.; VANNINI, J.; BRUSCOLI, C.; LOPPI, S. Long-term biological monitoring of environmental quality around a solid waste landfill assessed with lichens. **Environmental Pollution**, v. 161, p. 70-75. 2012.

PARAENSE, W. L. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A.S. **Esquistossomose Mansonii: Por um grupo de colaboradores especializados**. São Paulo, Sarvier/Edups, p. 1-30. 1970.

PARAENSE W, L. Estado atual da sistemática dos Planorbídeos brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**, v 55, p. 105-128, 1975.

PÄTIALÄ, R. Application of usnic acid to a case of *Lupus vulgaris*. **Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae**, v. 27, p. 151-1531. 1949.

PAVLOVIC, V.; STOJANOVIĆ, I.; JADRANIN, M.; VAJS, V.; DJORDJEVIĆ, I.; SMELCEROVIĆ.; STOJANOVIĆ, G. Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. **Food and Chemical Toxicology**, Article in press, 2012.

PAWLIK-SKOWRONSKA, B.; BACKOR, M. Zn/Pb-tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelatins than specimens living in unpolluted habitats. **Environmental Experimental of Botany**, v. 72, n. 1, p. 64-70. 2010.

PAZ, R. J. **Biologia e Ecologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Pulmonata: Planorbidae), na Fazenda Árvore Alta, Alhandra (Paraíba: Brasil)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa-Paraíba. 1997. 133p.

PEREIRA, E. C., CAMPOS-TAKAKI, G. M., 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 de Portugal**, v. 64. 1991.

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

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*. **Boletim Ecotropica: Ecosistemas 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.

PERES, M. T. L. P.; MAPELI, A. M.; FACCENDA, O.; GOMES, A. T.; HONDA, N. K. Allelopathic Potential of Orsellinic Acid Derivatives. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 4, p. 1019-1026. 2009.

PERRETT, S.; WHITFIELD, P. J. Currently available molluscicides. **Parasitology Today**, v 12, n 4, p. 156-159, 1996.

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 cytotoxic activity of New Zeland lichen. **Lichenologist**, v. 31, p. 627-636. 1999.

PFAFF, 1826. In: BUSTINZA, F. Antibacterial substances from lichens. **Endeavour**, v. 10, p. 95-99. 1951.

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.

PINHEIRO, L.; CORTEZ, A. G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* Mart (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 26, p. 157-160. 2003.

PINHO, P.; BERGAMINI, P.; CARVALHO, P.; BRANQUINHO, C.; STOFER, S.; SCHEIDEGGER, C.; MÁGUAS, C. Lichen functional groups as ecological indicators of the effects of land-use in Mediterranean ecosystems. **Ecological Indicators**, v. 15, p. 36-42. 2012.

PODTEROB, A. P. Chemical composition of lichens and their medical applications. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 10, p. 32-38, 2008.

PÖYKKÖ, H.; HYVÄRINEN, M.; BAČKOR, M. Removal of lichen secondary metabolites affects food choice and survival of lichenivorous moth larvae. **Ecology**, v. 86, p. 2623-2632. 2005.

PÖYKKÖ, H.; BAČKOR, M.; BENCÚROVÁ, E.; MOLCANOVÁ, V.; BAČKOROVÁ, M.; HYVÄRINEN, M. Host use of a specialist lichen-feeder: dealing with lichen secondary metabolites. **Oecologia**, v. 164, n. 2, p. 423-430. 2010.

PRATA A. *Esquistossomose mansonii*. In: Veronesi R, Foccacia R. (ed) **Tratado de Infectologia**. Atheneu, São Paulo, p. 1354-1372. 1997.

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

PROKSA, B.; ADAMCOVÁ, J.; STURDIKOVÁ, M.; FUSKA, J. Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* and their inhibition potencial of proteolytic enzymes. **Pharmazie**, v. 49, p. 282-283. 1994.

PUCKETT, K. J. Bryophytes and lichens as biomonitors of metal deposition. **Bibl. Lichenology**, v. 30, p. 231-268. 1988.

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.

QUININO, L. R. M.; COSTA, J. M. B, S.; AGUIAR, L. R.; WANDERLEY, T. N. G.; BARBOSA, C. S. Avaliação das atividades de rotina do Programa de Controle da Esquistossomose em municípios da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, entre 2003 e 2005. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 4, p. 335-343, 2009.

RABELO, T. K.; CHULIÁ-ZEIDÁN, F.; VASQUES, L. M.; SANTOS, J. P.; ROCHA, R. F.; PASQUALI, M. A.; RYBARCZYK-FILHO, J. L.; ARAÚJO, A. A.; MOREIRA, J. C.; GALEIN, D. P. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 304–314. 2012.

RAINA, A.; BLAND, J.; DOOLITTLE, M.; LAX, A.; BOOPATHY, R.; FOLKINS, M. Effect of orange oil extract on the formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 100, p. 880–885. 2007.

RAMALHO, F. S. Cotton pest management. Part 4. A brazilian pesrspective. **Annual Review of Entomology**, v 39, p. 563-678, 1994.

RAMALHO, F. S.; JESUS, F. M. M.; MENEZES NETO, J. Avaliação de acaricidas para o controle do ácaro rajado (*Tetranychus certicae* Koch, 1836) do algodoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 15, p. 247-256. 1986.

_____. Efeitos residuais de inseticidas sobre *Trochogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogramalidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 24, p. 315-319. 1989.

RAMALHO, F. S.; GONZAGA, J. V. Parasitóide do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* (Coleóptera: Curculionidae). In: Revisão Nacional do Algodão, 6. Campina Grande, 1990. Resumos. Campina Grande: **Sociedade Brasileira de Entomologia Brasileira**, 1990, p.63.

RANCAN, F.; ROSAN, S.; BOEHM, K.; FERNÁNDEZ, E.; HIDALGO, M. E.; QUILHOT, 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.

RANKOVIC, B.; MISIC, M. The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspersa*. **Pharmaceutical Biotechnology**, v. 24 p. 1013-1016. 2008.

RANKOVIĆ, B.; MISIĆ, M.; SUKDOLAK, S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1239-1242. 2008.

RANKOVIĆ, B.; RANKOVIĆ, D.; KOSANIĆ, M.; MARIĆ, D. Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Anaptychia ciliaris*, *Nephroma parile*, *Ochrolechia tartarea* and *Parmelia centrifuga*. **Central European Journal of Biology**, v. 5, n. 5, 2010 • 649-655. 2010.

RANKOVIĆ, B.; KOSANIĆ, M. antimicrobial activities of different extracts of *Lecanora atra*, *Lecanora muralis*, *Parmelia saxatilis*, *Parmelia sulcata* and *Parmeliopsis ambigua*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, p. 429-433, 2012.

RASHID, M. A; MAJID, M. A; QUADER, M. A. Complete NMR assignments of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**, v. 70, p. 113-115. 1999.

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

REUTIMANN, P.; SCHEIDEGGER, C. Importance of lichen secondary products in food choice of two oribatid mites (acari) in an alpine meadow ecosystem. **Journal of Chemical Ecology**, v. 13. p. 363-369. 1987.

RIBEIRO, S. M., E. C. PEREIRA, N. H. SILVA, E. P. FALCÃO, N. B. GUSMÃO, N. K. HONDA, AND W. QUILHOT. 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.

RICHARDSON, D. H. S. **Medicinal and other economic aspects of lichens**. In: CRC Handbook of Lichenology, V. III, M. Galun (Ed.) CRC Press. Boca Raton, Florida, 1988, p. 93-108.

RIEDER, A.; DORES, E. F. G. C.; HIGA, N.; MIGUEL, M. P. L. Alterações no teor de matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do pantanal diante da poluição por pesticidas. **Pesticidas**, v. 10, p. 87-112. 2000.

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. 2 ed. Rio Grande, Museu Oceanográfico da Fundação Universidade de Rio Grande. 1994. 331p.

ROMAGNI, J. G.; MEAZZA G.; NANAYAKKARA, N. P.; DAYAN, F. E. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **FEBS Letters**, v. 480, p. 301-305, 2000.

ROULLIER, C.; CHOLLET-KRUGLER, M.; WEGHE, P. V.; DEVEHAT, F. L.; BOUSTIE, J. A novel aryl-hydrazide from the marine lichen *Lichina pygmaea*: Isolation, synthesis of derivatives, and cytotoxicity assays. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 4582–4586. 2010.

RUNDEL, P. W. The ecological role of secondary lichen substances. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 6, p. 157-170. 1978.

RUSSO, A.; PIOVANO, M.; LOMBARDO, L.; GARBARINO, J.; CARDILE, V. Metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. **Life Science**, v. 83, p. 468-474. 2008.

RUSSO, A.; CAGGIA, S.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.; CARDILE, V. Effect of vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: Role of Hsp70 protein. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, p. 1–10. 2012.

SACRISTÁN, M.; VIVAS, M.; MILLANES, A. M.; FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. The recognition patten of green algae by liquenized fungi can be extended to lichens containing a cyanobacterium as photobiont. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, A Méndez-vilas ed. p. 213-219. 2007.

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

SAHIB, K.; KULARATNE, N. S.; KUMAR, S.; KARUNARATNE, V. Effect od (+)- usnic acid on the shot-hole borer (*Xyleborus fornicatus* Eichh.) of tea. **Journal of the National Science Foundation. Sri Lanka**, v. 36, p. 335-336. 2008.

SANTOS, T. M.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Resistência de Genótipos de Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) a *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 297-303. 2001.

SANTOS, N. P. S.; NASCIMENTO, S. C.; BATISTA, D. C.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SILVA, J. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Usnic-acid-loaded nanocapsules: a cytotoxicity and antitumoral activity evaluation. **Proceedings of the II Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterial** p. 5-8. 2001.

SANTOS, N. P. S.; NASCIMENTO, S. C.; WANDERLEY, M. S.; PONTES-FILHO, N. T.; SILVA, J. F.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanoencapsulation of usnic acid: na attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 154-160. 2006.

SANTOS A. F.; AZEVEDO, D. P.; SANTOS, M. R. C.; MENDONÇA, D. I.; SANT'ANA, A. E. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of

Schistosoma mansoni and larvae of *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 135-139. 2007.

SANTOS, A. F.; CAVADA, B. S.; ROCHA, B. A.; NASCIMENTO, K. S.; SANT'ANA, A. E. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 794–798. 2010.

SCARPELLINI, J. R. Effect of emamectin benzoate on several larval stages of cotton leafworm *Alabama argillacea* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 57-61. 2001.

SCHEIDEGGER, C.; WERTH, S. Conservation strategies for lichens: insights from population biology. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 55 – 66. 2009.

SCHWENDENER, S. Die algentypen der Flechtengonidien. Basel. 1868. In: Richardson, D. H. S.; Hawksworth, D.L. Book Reviews. **Handbook of Lichenology**. Lichenologist v 21, p. 393-399. 1989.

_____. Die algentypen der Flechtengonidien. Basel. 1869. In: Richardson, D. H. S.; Hawksworth, D.L. Book Reviews. **Handbook of Lichenology**. Lichenologist v 21, p. 393-399. 1989.

SEGATORE, B.; BELLIO, P.; SETACCI, D.; BRISDELLI, F.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; NICOLETTI, M.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.; CELENZA, G. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and *E* model methods. **Phytomedicine**, v. 19, p. 341– 347. 2012.

SEGURA-SANCHEZ, F.; BOUCHEMAL, K.; LEBAS, G.; VAUTHIER, C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONCHEL, G. Elucidation of the complexation mechanism between (+)-usnic acid and cyclodextrins studied by isothermal titration calorimetry and phase solubility diagram experiments. **Journal of Molecular Recognition**, v. 22, p. 232-241. 2009.

SEU-SALERNO. M.; BLALEWAY, J. El perfume. **Investigación y Ciencia**, v. 132, p. 38-48. 1987.

SEYMOUR, F. A; CRITTENDEN, P. D; DYER, P. S. Sex in the extremes: lichen-forming fungi. **Mycologist**, v. 19, p. 51-58. 2005.

SHAHI, S.; SHAHI, M. P.; UPRETI, D. K. **Utilization of Lichen Metabolites as Natural Antifungal Drug against Dermatophytosis**. Journal of Pharmaceutical Research and Opinion, v. 1, n. 1, p. 34-36. 2011.

SHIBATA, S.; et al. Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and derivatives. **Japanese Medical Journal**, v 1, p. 152-155. 1948.

SHIBATA, S.; TAGUCHI, H. Occurrence of isousnic acid in lichens with reference to "isodihidrousnic acid" derived from dihidrousnic acid. **Tetrahedron Letters**, n. 40, p. 4867-4871. 1967.

SHUKLA, V.; JOSHI, G. P.; RAWAT, M. S. M. Lichens: as potential natural source of bioactive compounds: a review. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 303:314. 2010.

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

SILVA, M. L. C.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Unusual carbohydrates from the lichen, *Parmotrema cetratum*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 715-717. 1993.

SILVA, R. R. E COELHO, G. D. **Fungos. Principais grupos e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica (IBt)**. Jardim Botânico, São Paulo. 2006. 20p.

SILVA, T. M. S.; CÂMARA, C. A.; AGRA, M. F.; CARVALHO, M. G.; FRANA, M. T.; BRANDOLINE, S. V. P. B.; PASCHOAL, L. S.; BRAZ-FILHO, R. Molluscicidal activity of *Solanum* species of the Northeast of Brazil on *Biomphalaria glabrata*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 449-452. 2006.

SILVA FILHO, C. R. M.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; RIBEIRO, A. P. L. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n 4, p. 919-923. 2009.

SILVA, M. D. C.; SÁ, R.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 334–340. 2009.

SINGH, S. M.; SINGH, P.; RAVINDRA, R. Screening of antioxidant potential of Arctic lichens. **Polar Biology**, v. 34, p. 1775–1782. 2011.

SIPMAN, H. J. M.; APTROOT, A. Where are the missing lichens? **Mycological Research**, v. 105, p. 1433-1439. 2001.

SMITH, A. L. **Lichens**. Cambridge University Press. Cambridge. 1921.

SMITH, D. C.; DOUGLAS, A. E. **The Biology of symbiosis**. 1987.

SOARES, J. J.; BURSOLI, A. C. Efeito de inseticidas em insetos predadores em culturas de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasília**, v. 35, p. 1889-1894. 2000.

SOLHAUG, K. A.; LIND, M.; NYBAKKEN, L.; GAUSLAA, Y. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia phydodes*. **Flora**, v. 204, p. 40-48. 2009.

STARK, S.; HYVÄRINEN. Are phenolics leaching from the lichen *Cladonia stellaris* sources of energy rather than allelopathic agents for soil microorganisms?. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 1381–1385. 2003.

STENBERG, S. 1883. In: SMITH, A. L. **Lichens**. Cambridge University Press. Cambridge. 1921.

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

STEPANENKO, L. S.; MAKSIMOV, O. B.; FEDOREEV, S. A.; MILLER, G. G. Polysaccharides of lichens and their sulfated. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 34, n. 3, p. 337-338. 1998.

SUBERU, H. Preliminary studies of inhibitions in *Arpergillus falvus* with extracts of two lichens and entex-T fungicide. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 9, p. 468-472. 2004.

SUJII, E. R.; BESERRA, V. A.; RIBEIRO, P. H.; SILVA-SANTOS, P.V.; SILVA, K. F. A.; MACEDO, T. R.; PIRES, C. S.S.; SCHMIDT, F. G. V.; FONTES, E. M. G.; LAUMANN, R. A. Avaliação do controle biológico natural do pulgão *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) e do curuquerê, *Alabama argillacea* Hübner (Lepdoptera: Noctuidae) na cultura do algodoeiro no Distrito Federal. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 113. EMBRAPA, p. 1-20. 2005.

SUSITHRA, E.; RAO, K.; MALLIKARJUNA, K.; RAMSESH, K. V.; MEENA, S. Evaluation of *in-vitro* antioxidant activity of isolated compounds of lichen, *usnea undulata*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 2, p. 352-355. 2011.

SUSSMANN, R. A. C.; ANGELI, C. B.; KIMURA, E. A.; KATZIN, A. M. M. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize vitamin E. **FEBS Letters**, v. 585, p. 3985-3991. 2011.

SWATHI, D.; SUCHITHA, Y.; KAKUDA PRASHITH, T. R.; VENUGOPAL, T. M.; VINAYAKA, K. S.; MALLIKARAJUN, N.; RAGHAVENDRA, H. L. Antimicrobial, anthelmintic and insecticidal activity of a macrolichen *everniastrum cirrhatum* (Fr.) Hale. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 2, p. 780-789, 2010.

TAKAHAGI, T.; IKEZAWA, N.; ENDO, T.; IFUKU, K.; YAMAMOTO, T.; KINOSHITA, Y.; TAKESHITA, S.; SATO, F. Inhibition of PS II in atrazine-tolerant tobacco cells by barbatic acid, a lichen-derived depside. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, p. 266-268. 2006.

TAKANI, M.; YAJIMA, T.; MASUDA, H.; YAMAUCHI, O. Spectroscopic and structural characterization of copper (II) and palladium (II) complexes of a lichen substances usnic acid its derivatives. Possible forms of environmental metals retained in lichens. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 91, p. 139-150. 2002.

TAY, T.; TÜRK, A. O.; YILMAZ, M.; TÜRK, H.; KIVANÇ, M. Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Acetone Extract of the Lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-Usnic Acid, Norstictic Acid, and Protocetraric Acid Constituents. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 384-388. 2004.

TAYLOR, W. A.; FREE, C.; BOYCE, C.; HELGEMO, R.; OCHOADA, J. Analysis of *Spongiophyton* interpreted as a fossil lichen. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, p. 875-881. 2004.

TEMINA, M.; LEVITSKY, D.O.; DEMBITSKY, V. M. Chemical constituents of the epiphytic and lithophilic lichens of the genus *Collema*. **Records of Natural Products**, v. 4, n. 1, p. 79-86. 2010.

THIPPESWAMY, B.; NAVEENKUMAR, K. J.; BODHARTHI, J. G.; SHIVAPRASAD, S. R. Antimicrobial activity of ethanolic extract of *Usnea longissima*. **Journal of Experimental Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1-3, 2011.

THORNE, B. L. Termite terminology. **Sociobiology**, v. 28, p. 253-263. 1996.

TIWARI, P.; RAI, H.; UPRETI, D. K. U.; TRIVEDI, S.; SHUKLA, P. Antifungal activity of a common Himalayan foliose lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. Ex Nyl.) Hale. **Natural Science**, v. 9, p. 167-171. 2011.

TOKIWANO, T.; SATOH, H.; OBARA, T.; HIROTA, H.; YOSHIZAWA, Y.; YAMAMOTO, Y. A lichen substance as an antiproliferative compound against HL-60 human leukemia cells: 16-O-acetyl-leucotylic acid isolated from *Mylochroma aurulenta*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, p. 2525-2527. 2009.

TORRES, J. B.; SILVA-TORRES, C. S. A.; SILVA, M. R.; FERREIRA, J. Compatibilidade de Inseticidas e Acaricidas com o Percevejo Predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) em Algodoeiro. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 2, p. 311-317. 2002.

TORRES, J. B.; ZANUNCIO, J. C.; MOURA, M. A. The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in Eucalyptus Forest in Brazil. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 15, p. 1-18. 2006.

TORZILLI, A. P.; MIKELSON, P. A.; LAWREY, J. D. Physiological effect of lichen secondary metabolites on the lichen parasite *Marchandiomyces corallinus*. **Lichenologist**, v. 31, p. 307-314. 1999.

TURGAY, T.; TÜRK, A. O.; YILMAZ, M.; TÜRK, H.; KIVANÇ, M. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. **Zur Naturforschung**, v. 59, p. 384-388. 2004.

TURKEZ, H.; AYDIN, E.; ASLAN, A. *Xanthoria elegans* (Link) (lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes. **Cytotechnology**, v. 64, n. 6, p. 679-686. 2012.

UGUR, A.; ÖZDEN, B.; SAÇ, M. M.; YENER, G. Biomonitoring of ^{210}Po and ^{210}Pb using lichens and mosses around a uraniferous coal-fired power plant in western Turkey. **Atmospheric Environment**, v. 37, p. 2237-2245. 2003.

UNEP/FAO/Global IPM. Facility Expert Group on Termite Biology and Management, 2000. Finding alternatives to persistent organic pollutants (POPs) for termite management, online at www.chem.unep.ch/pops/termites/termite_ch4.htm. Acesso em 21.03.2011.

VARTIA, K. O. Antibiotics in lichens I. **Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae**, v. 27, p. 46-54. 1949.

_____. Antibiotics in lichens II. **Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae**, v. 28, p. 7-19, 1950.

VARTIA, K.O.; TERVILÄ, A. L. D. Effect *in vivo* on pigmented mice with inoculation tuberculosis. **Anales Medicinale Experimentals et Biologiae Feinniae**, v. 30, p. 76-78. 1952.

VERMA, M.; SHARMA, S.; PRASAD, R. Biological alternatives for termite control: A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 959-972. 2009.

VERZON, M.; ROSADO, M. C.; PALLINI, A.; FIALHO, A.; PEREIRA, C. J. Toxicidade letal e subletal do Nim sobre o pulgão-verde e seu predador *Eriopis connexa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 627-631. 2007.

VICENTE, C.; GUERRA, H.; VALLE, M. T. Formas moleculares de glutamato desidrogenasa, NADPH dependiente, producidas por acción Del L-usnato sódico. **Revista Espanhola Fiologia**, v. 29, p. 301-306. 1973.

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

VICENTE. C.; AZPIROZ, A.; ESTÉVEZ, M. P.; GONZÁLEZ, M. L. Quaternary structure changes and kinetics of uréase inactivation by L-usnic acid in relation to the nutrient transfer between lichen symbionts. **Plant, Cell & Environment**, v. 1, p. 29-33. 1978.

VICENTE, C.; XAVIER-FILHO, L. Urease regulation in *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. **φΥton**, v. 32, p. 137-143. 1979.

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

VIRTANEN, O. E.; KILPI, O. E. On the *in vivo* fungistatic activity of an usnic acid preparation with the trade name Usno. **Suomen Kemistilehti**, v. 30, p. 8-9. 1957.

VIVIAN, L. M.; TORRES, J. B.; VEIGA, F. S. L. Development and reproduction of a predatory sinkbug, *Podisus nigrispinus*, in relation to two different prey types and environmental conditions. **Biocontrol**, v. 48, p. 155-168. 2003.

VRÁBLÍKOVÁ, H.; McEVOY, M.; SOLHAUG, K. A.; BARTÁK, M.; GAUSLAA, Y. Annual variation in photoacclimation and photoprotection of the photobiont in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 83, p. 151-162. 2006.

VRANJAC, A. Vigilancia Epidemiológica e Controle da Esquistossomose. Normas e Instruções. Centro de Vigilância Epidemiológica. Manual disponível em [HTTP://www.cve.saude.sp.gov.br](http://www.cve.saude.sp.gov.br) em doenças transmitidas por água e alimento. 2007. 56p.

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, n. 3, p. 401-412, 2003.

WANG, L. S.; NARUI, T.; HARADA, H.; CULBERSON, C.; CULBERSON, W. Ethnic Uses of Lichens in Yunnan, China. **Bryologist**, v. 103, n. 3, p. 345-349. 2001.

WANG, X.; KRINGS, M.; TAYLOR, T. N. A. Thalloid organism with possible lichen affinity from the Jurassic of Northeast China. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 162, p. 591-598. 2010.

WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A.; PELZ, K.; SCHEMPP, C. M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, v. 14, p. 508-516. 2007.

WEI, X.; JEON, H. S.; HAM, K. S.; KOHN, Y. J.; HUR, J. S. Antifungal Activity of Lichen-forming Fungi against *Colletotrichum acutatum* on Hot Pepper. **Journal of Plant Pathology**, v. 24, n. 2, p. 202-206. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Molluscicide Screening and Evaluation, Bull. World Health Organization, v. 33, p. 567-581. 1965.

_____. The special programme for research and training in tropical diseases (TDR). *Schistosomiasis-Strategic direction for research*. Disease burden and epidemiological trends. 2007. <http://www.who.int/tdr/>, acesso 20. 01. 2011.

XU, B.; SUNG, C.; BYUNGHEE, H. Crystal Structure Characterization of Natural Allantoin from Edible Lichen *Umbilicaria esculenta*. **Crystals**, v. 1, p. 128-135. 2011.

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

YANO-MELO, C. C.; VICENTE, C.; XAVIER-FILHO, L. Allelopathic effects of the *Cladonia verticillaris* lichen extracts and fumarprotocetraric acid on the early growth of germinated seedlings in *Allium cepa* L. **Tropical Bryologist**, v. 17, p. 133- 139. 1999.

YUN A, M. A.; WADLEIGH, M. A.; MAYER, B. A. Variations of sulfur isotope ratios in a single lichen thallus: A potential historical archive for sulfur pollution. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 3534-3538, 2010.

ZAIN, M. E. Effect of Olive Oil on Secondary Metabolite and Fatty Acid Profiles of *Penicillium Expansum*, *Aspergillus Flavus*, *A. Parasiticus* and *A. Ochraceus*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 4274-4280, 2009

ZANETI, R. **Manejo integrado de cupins**. Lavras: UFLA, 2002. 29p.

ZANUNCIO, J. C.; RUGAMA, A. J. M.; SERRÃO, J. E.; PRATISSOLI, D. Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with combinations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, p. 331-337. 2001.

ZEYTINOGLU, H.; INCESU, Z.; TUYLU, B. A.; TÜRK, A. O.; BARUTCA, B. Determination of Genotoxic, Antigenotoxic and Cytotoxic Potential of the Extract from Lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. *in Vitro*. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 118–123, 2008.

3 OBJETIVOS

5.1 Geral:

Avaliar a atividade biológica dos extratos orgânicos e fenóis majoritários purificados obtidos das Cladoniaceae: *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., *C. substellata* (Vanio), *C. aggregata* Nyl. e do Usnato de Potássio.

3.2 Específicos:

- Coletar, identificar e herborizar os líquens
- Obter extratos orgânicos e substâncias purificadas
- Isolar, purificar e identificar os ácidos fumarprotocetrárico (FUM), úsnico (USN) e o barbático (BAR)
- Caracterizar quimicamente os ácidos através de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear de prótons (^1H RMN), ultravioleta (UV) e infravermelho (IV).
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos e o BAR purificado da *C. aggregata*.
- Avaliar topicamente e por ingestão o efeito extrato orgânico e ácido úsnico purificado sobre o *Alabama argillacea* e *Podisus nigrispinus*.
- Avaliar por ingestão o FUM, USN e BAR sobre o *Nasutitermes corniger*.
- Verificar a atividade citotóxica e antitumoral do extrato etéreo e do BAR purificado sobre as células HEp-2 (adenocarcinoma de laringe), NCI-H292 (carcinoma muco epidermóide de pulmão) e KB (carcinoma epidermóide nasofaríngeo) e o tumor Sarcoma 180.
- Investigar a atividade moluscicida e embriotóxica do usnato de potássio, do extrato etéreo e BAR da *C. aggregata* sobre a *Biomphalaria glabrata* e *Artemia salina*.

CAPÍTULO 1

Cladia aggregata (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity

Artigo Publicado no Brazilian Archives of Biology and Technology

Fator de Impacto 0.0426

Qualis CBII B5

***Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity**

Mônica Cristina Barroso Martins¹, Marcio James Gonçalves de Lima¹, Flávia Pereira Silva¹, Eulália Azevedo-Ximenes², Nicácio Henrique da Silva^{1,3}, Eugênia Cristina Pereira^{4*}

¹Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia. ²Departamento de Antibióticos. ³Departamento de Bioquímica; Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Pernambuco; Recife - PE - Brasil.

⁴Departamento de Ciências Geográficas; Centro de Filosofia e Ciências Humanas; Universidade Federal de Pernambuco; Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n; 50740-530; Recife - PE - Brasil.

ABSTRACT

The chemical composition and antimicrobial activity of the *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. were evaluated. Barbatic acid, depside obtained from *C. aggregata*, was spectroscopically analyzed and tested, as well as organic extracts. The extracts and purified substance were tested against four *Staphylococcus aureus* multi-resistant strains. The structure of barbatic acid was confirmed through NMR (¹H; ¹³C) and elemental analysis. Biochromatographic assays showed action of this compound, along with other substances contained in organic extracts, suggesting a synergic action, MIC assays placed barbatic acid in the same level of inhibition to other studied lichen substances.

Key words: *Cladia aggregata*, barbatic acid, antimicrobial activity

INTRODUCTION

In spite of being described as a symbiotic association between the photosynthetic organisms and fungi, lichens are highly complex communities that produce peculiar substances with phenolic characteristic, such as the barbatic, usnic and fumaprotocetraric acids (Honda and Vilegas, 1999). Those substances come from the secondary metabolism and are known as lichen acids. The production of these acids can vary from 0,1 to 10% of thallus dry weight, depending on the environmental conditions (Piovano et al., 2002). Lichen substances have been used for centuries (Llano, 1951). Their metabolites possess several biological properties such as antitumor (Santos et al., 2006), antiinflammatory (Vijayakumar et al.,

2000; Maia et al., 2002), antimicrobial (Piovano et al., 2002; Falcão et al., 2002; Ingólfssdóttir, 2002), antiparasitary (Carvalho et al., 2005), besides their action as UV sun blockers (Rancan et al., 2002) and efficiency as bioaccumulators and bioindicators of air quality, due to their ability of retaining contaminants, mainly heavy metals (Krishna et al., 2003; Monnet et al., 2005).

The presence of phenolic derivatives in lichen is determinant for its antimicrobial activity. These substances generally acidify the bacterial cell and consequently, cause cytoplasm membrane rupture, inactivate the enzymes, and interfere on the electrons transport process and in the oxidative phosphorylation (Mueller, 2001; Randhir et al., 2004; Vатtem et al., 2004).

*Author for correspondence: eugenia.pereira@pq.cnpq.br

Some lichen species strongly depend on climatic and/or microclimatic conditions for producing different compounds, phenolics to pigments (Legaz et al., 1986). In *C. aggregata*, the typical characteristic of adaptation is its phenotypic plasticity (Filson, 1981). This species is capable of producing morphotypes that depends on the environmental conditions. This polymorphism results in some difficulties for specimens' identification. This is the reason of the existence of several descriptions made by different specialists that consider *C. aggregata* as *C. coralloides* and *Cladonia* genus, with many synonyms (Ahti, 1980). *C. aggregata* has the barbatic acid as the main compound, besides other substances such as the stictic, norstictic and fumarprotocetraric acids, whose occurrence depends on the area where the lichen is found. On the other hand, the specimens containing barbatic acid are considered as Brazilian chemotype (Ahti et al., 1993). Barbatic acid and usnic acid are reported as efficient against microorganisms, cancer cells and tumors (Pereira et al., 1994; Pereira et al., 1997).

In preliminary studies, organic extracts and barbatic acid from *C. aggregata* collected in Minas Gerais State, showed antimicrobial property against *Bacillus cereus* (UFPEDA – 39) (unpublished data). Thus, the aim of the present study was evaluate the chemical composition of *C. aggregata* and the antimicrobial activity of its purified barbatic acid against four multi-resistant *Staphylococcus aureus* strains. This is the first report of this species from Pernambuco State.

MATERIAL AND METHODS

Lichen material

Cladia aggregata (Sw.) Nyl. was collected in Bonito, Pernambuco State, Northeastern of Brazil. The material was identified through morphological and chemical thallus characteristics. An exsiccate was kept on UFP Herbarium of Universidade Federal de Pernambuco - Brazil voucher n^o 36431.

Occurrence area description

The Brazilian northeast possesses a humid and warm climate in its coast, and semi arid in the west side. Bonito County is located in the interface between humid and semi arid landscapes (about 132 km from the coast). In its territory there are

several hills, with places at 800 m over sea level. This situation produces forest with high humidity and low temperatures, during the winter, lower than the ones registered in the coast. Due to mountains, rocks arise in areas like plateaus, where Cladoniaceae species occurs in large quantities.

Preparation of organic extracts and extraction/purification of barbatic acid (BAR)

Natural thalli of *C. aggregata* (50g) were successively extracted with diethyl ether, chloroform and acetone in Soxhlet apparatus at 40°C for 8h. The extracts were concentrated, weighed and kept in desiccator (Pereira et al., 1996). Thalli of *C. aggregata* (50g) were extracted in Soxhlet apparatus at 40°C with diethyl ether for 8h. The ether extract was washed four times in G4 funnel with chloroform until crystal formation (Asahina, 1954).

Chemical characterization of *C. aggregata* and identification of barbatic acid (BAR)

Part of the ether extract of *C. aggregata* and the purified crystals of barbatic acid were analyzed by TLC (Culberson, 1972), in "A" solvent system (toluene/dioxan/acetic acid, 180:45:5, v/v), with posterior spray of H₂SO₄ (10%) and heating at 100°C, until spots color reaction. HPLC assays carried out in a Hitachi Chromatograph, coupled to an UV detector (254nm) at room temperature (28

3°C), under the following conditions: Merck C₁₈ reverse phase column (254 x 4.6mm), isocratic solvent system, MeOH, H₂O, acetic acid (80:19.5:0.5, v/v) at 1,0 mL.min⁻¹, volume of injection 20 L, attenuation 0.04 (Legaz and Vicente 1983). The samples were diluted at 1.0 mg/mL (extracts), or 0.1 mg/mL (purified BAR and standards).

The elemental analysis of BAR was developed in a Carlo Erba analyzer model EA 1110, from 3mg of purified substance.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded in a Varian Unity Plus 300 spectrometer. The ¹³C NMR carried out at 75 MHz and ¹H at 300 MHz, using DMSO-d₆ as solvent in 5mm tubes at room temperature. UV spectrum was obtained in a Perkin Elmer apparatus, Lambda 6 model, using DMSO as solvent. IR analysis carried out in a spectrometer with a Bruker Fourier transformer model IF566 using KBr disks.

Antimicrobial activity Biochromatography

The organic extracts and purified BAR were submitted to modified method of biochromatography (Homans and Fuchs, 1970). The samples were applied to silica gel F₂₅₅₄₊₃₆₆ Merck plates (05 x 10cm), developed in one-dimensional "A" solvent system (toluene/dioxan/acetic acid, 180:45:5, v/v) (Culberson, 1972). The plates, after solvent evaporation, were placed in Petri dishes (18 cm) and over them, was placed a layer (54mL) of solid medium Mueller-Hinton, previously inoculated with a *S. aureus* suspension (500 L) at 10⁷ CFU/mL⁻¹ (strains IC 155 or IC 27), from culture collection of Antibiotic Department of Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. The results were evaluated by halo formation around the active substance of the extract, separated by TLC.

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC)

The MIC against four resistant *S. aureus* strains was estimated *in vitro* for barbatic acid. Ciprofloxacin chlorhydrate was used as standard. The following strains were used: *S. aureus* CI 155, CI 27 and 311 (from vaginal secretion,

multiresistant); *S. aureus* CI 404 (from oropharynx). It is worthy to mention that *S. aureus* CI 404, 155, 311 and CI 27, are resistant to several antibiotics, among them: amikacin, cefotaxime, chloramphenicol, erythromycin and tetracycline. *S. aureus* CI 311 was the more resistant, with additional resistance to cephalotidine, penicillin and CI 155 to sulfonamides.

The barbatic acid and ciprofloxacin were weighed and solubilized in acetone and water, respectively, to obtain stock solutions of 2000 µg/mL to barbatic acid and 1000 µg/mL to ciprofloxacin chlorhydrate (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001; Cleeland and Gunberg, 1986). The Petri dishes containing acetone were added to experiments to assure a possible intrinsic effect of this solvent.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical characterization of *C. aggregata* and identification of barbatic acid (BAR)

In the thin layer chromatogram (TLC) of ether, chloroform and acetone extracts, spots with R_f 29 were shown. They were in agreement with the purified and standard barbatic acid (Fig. 1).

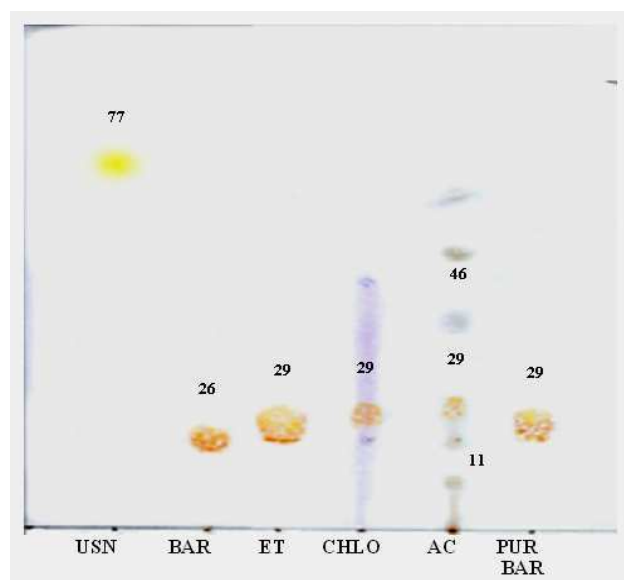


Figure 1 - Thin layer chromatogram of organic extracts of *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. Captions: UNS – standard usnic acid; BAR – standard barbatic acid; ET – ether extract; CHLO – chloroform extract; AC – acetone extract; PUR BAR - purified barbatic acid. Numbers means the spots' R_f values.

The analysis of organic extracts and purified barbatic acid through liquid chromatography (HPLC) ratified the data obtained by TLC, showing the highest content of barbatic acid in the ether extract (92.9%), and the lowest in chloroform and acetone extracts (82.4% and 66.3%), with a retention time (RT) around 19 min,

apart from other compounds also detected in lowest content by TLC (Fig. 2). The barbatic acid ($C_{19}H_{20}O_7$), through elemental analysis, showed 63.33% C and 5.55% H. For experimental calculation of purified barbatic acid, the results were C 62.48% and H 5.44%.

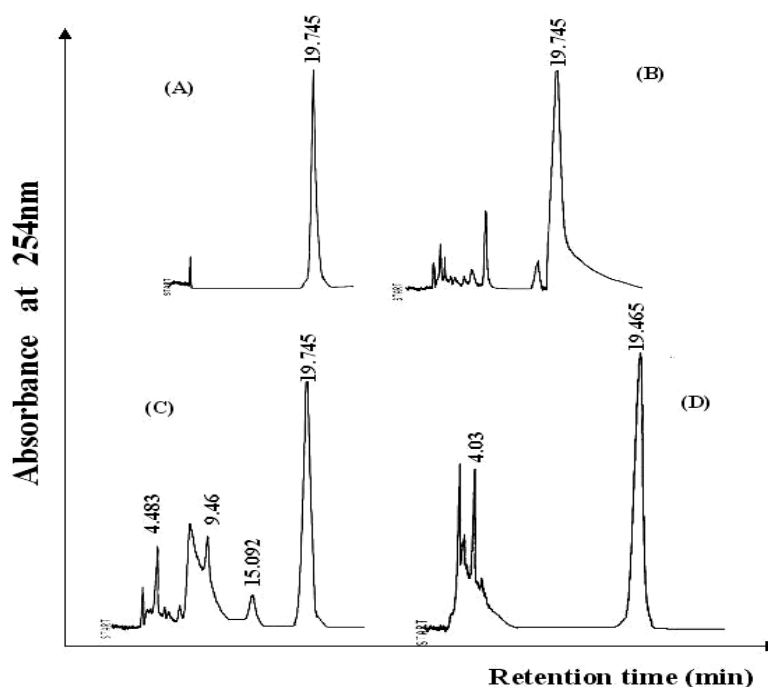


Figure 2 - Liquid chromatogram of purified barbatic acid (A) and organic extracts: ether (B), chloroform (C) and acetone (D) from *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.

Spectroscopic analysis of purified barbatic acid showed UV λ_{max}^{KBr} nm (log ϵ): 277 (4.28), 304 (3.82). IR λ_{max}^{KBr} cm^{-1} whose spectrum demonstrated an aromatic C-H (3100), CH_3 as and s (2990 and 2940), C = O ester (1720), C = O from conjugated ester (1670), aromatic C = C (1570 and 1500), as and s of CH_3 (1450 and 1380), C – O of ester (1230 and 1130). ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): 1.99 (3H, s, Me – 8'), 2.00 (3H, s, Me-8), 2.47 (3H, s, Me-9'), 2.56 (3H, s, Me-9), 3.86 (3H, s, MeO-4), 6.60 (1H, s, H-5), 6.69 (1H, s, H-5), 10.73 (1H, s, HO-2). In this protonic analysis, the peaks registered at 1.99; 2.00; 2.47 and 2.56 ppm corresponding to singlets of methyl groups, in 8', 8, 9' and 9. In 3.86 ppm, a singlet was detected due to the presence of a methoxy

group in 4. In relation to protons, the singlets were detected at 6.60 and 6.69 ppm, corresponding to 5 and 5', and hydroxyls of aromatic rings, also in a singlet form, were detected at 10.73 ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): 8.1 (Me-8), 22.8 (Me-9), 9.1 (Me-8'), 23.8 (Me-9'), 55.7 (MeO-4), 110.0 (C-1), 151.8 (C-2), 106.3 (C-4), 161.3 (C-4), 107.1 (C-5), 138.9 (C-6), 168.6 (C-7), 159.4 (C-1'), 111.4 (C-2'), 161.1 (C-3'), 116.1 (C-4'), 139.0 (C-5'), 116.1 (C-6'), 173.2 (C-7'). In this analysis, the signals 8.1; 22.8; 9.1 and 23.8 ppm corresponded to methyl of carbon atoms in 8, 9, 8' and 9'. In 55.7 ppm, the methoxy group of carbon 4 was registered. Every spectroscopic data, as well as the elemental analysis confirmed the barbatic acid chemical structure (Fig. 3).

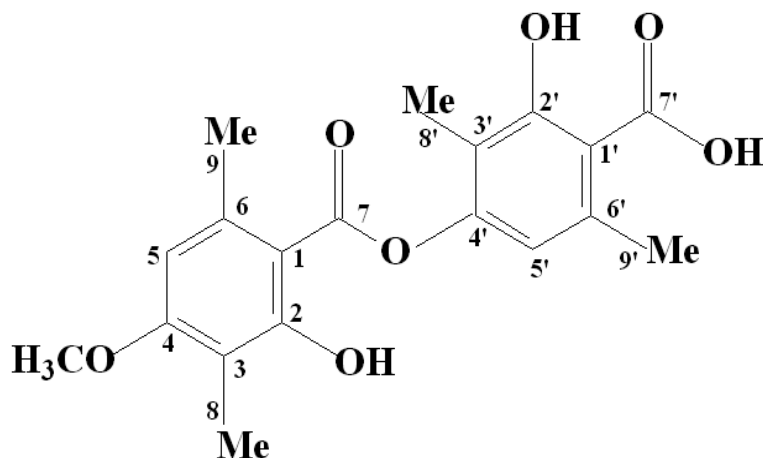


Figure 3 - Structure of barbatic acid ($C_{19}H_{20}O_7$), according to spectroscopic analysis. Molecular weight 360.36; melting point 185-186°C. Numbers 1 to 9 and 1' to 9' refer to carbon of the molecule.

C. aggregata produces stictic, constictic, norstictic and cryptostictic acids, but samples from Brazil have a barbatic acid chemotype as dominant (Ahti et al., 1993). Filson (1981) reported ursolic, barbatic, 4-O-demethyl-barbatic, fumarprotocetraric, protocetraric, homosekikaic and norstictic acids, besides some unknown substances and triterpenes. The stictic acid was reported by Galloway (1985) and diffractaic acid by Kantvillas and Elix (1987). Ahti and Kashiwadani (1984) recognized these substance complex described by Filson (1981) in nine Chilean specimens. They concluded that the chemical strain containing the fumarprotocetraric acid complex (fumarprotocetraric and protocetraric acids, besides Cph₁ and/or Cph₂ substances) were restricted to one specific area, while those that belonged to barbatic acid chemical strain were distributed in other areas. On the other hand, Ahti and Lai (1979) described *C. aggregata* from Taiwan, and found only barbatic acid in the examined samples. This species is considered highly variable in its chemistry (Stenroos, 1988). Pereira et al. (2002) detected usnic and stictic acids in samples from Minas Gerais State.

Ahti et al. (1993) found the barbatic acid as major compound of *C. aggregata* from Coastal Brazilian Northeast. Its chemical composition can vary according to the geographic area of occurrence and season (Huovinen and Ahti, 1986). The studied material from Brazilian Northeast, in Bonito County, showed a high content of barbatic acid,

whose purified form was in agreement to literature data (Huneck and Yoshimura, 1996).

Antimicrobial assays

The purified barbatic acid and organic extracts of *C. aggregata* were evaluated as microbial agents. The material, when evaluated through biochromatographic assays, showed inhibition (halo around purified barbatic acid), and this compound in the extract was one of the active principles of *C. aggregata*. The interception between the inhibition halos of extracts and purified BAR against *S. aureus*, strains 155 and IC 27, suggested an interaction of this acid and other substances in the extract.

After observation of antimicrobial activity exerted by lichen products, the minimum inhibitory concentration (MIC) of purified barbatic acid for IC 27, IC 155 and IC 311 strains, was determined. The MIC varied among the strains of *S. aureus*. It was 50 g/mL for all the strains, except for highly resistant IC 404, whose MIC was 100 g/mL.

Several studies were conducted with lichen compounds (Ingólfssdóttir et al., 1985; Perry et al., 1999; Ribeiro et al., 2002). In addition, similar results of synergism between lichen substances were observed, after submission of *B. subtilis* to ether extract of *Heterodermia leucomela* that contained high content of atranorin, and zeorin as accessory substance. Thus, the biochromatography assays showed the action of substances contained in the extracts from *C. aggregata*, besides the barbatic acid. It was also

possible due to the action of usnic acid present in the extract, and / or its interaction with BAR (Falcão et al., 2002).

When compared to other lichen acids, the MIC was around 50 g/mL. For example, usnic acid showed MIC of 32 g/mL against *Mycobacterium aurum* and between 30-40 g/mL for Methyl- - orcinolcarboxylate against *Pseudomonas aeruginosa*. This compound, when evaluated against *S. aureus* showed high MIC, between 80-160 g/mL. In contrast to these results, Piovano et al. (2002) found low MIC (15-17 g/mL) of divaricatic and difractic acids against *S. aureus*. It is known that phenolic compounds, in general, are capable of ionic dissociation (Mueller, 2001; Randhir et al., 2004), which makes possible to justify the antimicrobial activity of purified barbatic acid.

The process of H⁺ dissociation can lead to an acidification of plasmatic membrane surface of microorganism, resulting in H⁺-ATPase rupture that is required for ATP synthesis (Vattem et al., 2004; Maeda et al., 1999). Besides, it causes intracellular coagulation of cytoplasm constituents, leading the cell to death, or inhibiting its growth (Adham et al., 1998). The Gram positive bacteria are more sensible to these compounds by presenting a simple membrane (Vattem et al., 2004).

Despite the necessity for more detailed studies about the action mechanism of lichen substance against microorganisms, the *in vitro* effect of barbatic acid against *S. aureus* strains was evident. Apparently, microclimate conditions found in Bonito County induced *C. aggregata* to produce high content of barbatic acid, and usnic acid in less amount, leading to antimicrobial action.

ACKNOWLEDGEMENTS

One of the authors (E. C. Pereira) thanks the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for individual grant.

RESUMO

A composição química e a atividade antimicrobiana da *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. foram avaliadas. O ácido barbático, um depsídeo obtido da *C. aggregata*, foi espectroscopicamente

analisado e testado, bem como o extrato orgânico. O extrato e a substância purificada foram testadas contra 4 linhagens de *Staphylococcus aureus* multi-resistentes. A estrutura do ácido barbático foi confirmada através de ensaios de CCD, CLAE, IV, RMN (¹H; ¹³C), UV e análise elementar (r). C biocromatograma mostrou a ação deste composto junto com outras substâncias contidas no extrato orgânico, sugerindo a ação sinérgica, a CMI do ácido barbático mostrou o mesmo nível de inibição de outras substâncias líquênicas.

REFERENCES

- Honda, N. K. and Vilegas, W. (1999), A Química de Líquens. Química Nova. **22**, 25-55.
- Piovano, M., J. A. Garbarino, F. A. Giannini, E. R. Correche, G. Feresin, A. Tapia, S. Zacchino and R. Enriz. (2002), Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. **47**, 235-240.
- Llano, G. A. (1951), Economic uses lichens. Smithsonian Institution Publication. **4040**, 385-422.
- Santos, N. P., S. C. Nascimento, M. S. O. Wanderley, N. T. Pontes-Filho, J. F. Silva, C. M. M. B. de Castro, E. C. Pereira, N. H. Silva, N. K. Honda and N. S. Santos-Magalhães, N. S. (2006), Nanoencapsulation of usnic acid: an attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **64**, 154-160.
- Vijayakumar, C. S., S. Viswanathan, M. K. Reddy, S. Parvathavarthim and E. Sukumar. (2000), Antiinflammatory of (+) – usnic acid. *Fitoterapia*. **71**, 564-566.
- Maia, M.B.S., N. H. Silva, E. F. Silva, M. T. J. Catanho, A. R. P. Schuler and E. C. Pereira, E. C. (2002), Antinoceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from lichen *Cladonia dendroides* (dês. Abb) Ahti. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. **21**, 259-264.
- Falcão, E. P., N. H. Silva, N. B. Gusmão, S. M. Ribeiro, N. K. Honda, N. K. and E. C. Pereira. (2002), Atividade Antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. **21**, 43-49.
- Ingólfssdóttir, K. (2002), Molecules of interest usnic acid. *Phytochemistry*. **61**, 729-736.
- Carvalho, E. A. B., P. P. Andrade, N. H. Silva, E. C. Pereira and R. C. B. Q. Figueiredo. (2003), Effect of usnic acid from *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* *in vitro*: na ultrastructural study. *Micron*. **36**, 155-161.

- Rancan, F., S. Rosan, K. Boehm, E. Fernández, M. E. Hidalgo, W. Quihot, C. Rubio, F. Boehm, H. Piazena and U. Oltmanns. (2002), Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. **68**, 133-139.
- Krishna, M. V. B., D. Karunasagar and J. Arunachalam. (2002), Study of mercury pollution near a thermometer factory using lichens and mosses. *Environmental Pollution*. **124**, 357-360.
- Monnet, F., F. Bordas, V. Deluchat, P. Chatenet, M. Botineau and M. Baudu. (2005), Use of the aquatic lichens *Dermatocarpon luridum* as bioindicator of copper pollution: accumulation and cellular distribution tests. *Environmental Pollution*. **138**, 455-461.
- Mueller, K. (2001), Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **56**, 9-16.
- Randhir, R., Y-T. Lin and K. Shetty. (2004), Stimulation of phenolic, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*. **39**, 637-646.
- Vattem, D. A., Y-T. Lin, R. G. Lable and K. Shetty. (2004), Phenolic antioxidant mobilization in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food fungus *Lentinus edodes* and effect on antimicrobial activity select food borne pathogens. *Innovative Food Science Emerging Technology*. **5**, 81-91.
- Legaz, M. E., C. Vicente, C. Ascaso, E. C. Pereira and L. Xavier-Filho. (1986), Pigment analysis of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. *Biochemistry Systematic and Ecology*. **14**, 575-58.
- Filson, R. B. (1981), A revision of the lichens genus *Cladia* Nyl. *Journal Hattori Botany Laboratory*. **49**, 1-75.
- Ahti, T. Lichenologist. (1980), **12**, 25-133
- Ahti, T., S. Stenroos and L. Xavier-Filho. (1993), The lichen family Cladoniaceae in Paraiba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. *Tropical Biology*. **7**, 55-70.
- Pereira, E. C., S. C. Nascimento, R. M. C. Lima, N. H. Silva, A. F. M. Oliveira, E. Bandeira, M. Boitard, H. Beriel, C. Vicente and M. E. Legaz. (1994), Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*. **19**, 47-52.
- Pereira, E. C., N. H. Silva, G. M Campos-Takaki, L. Xavier-Filho, M. E Legaz and C. Vicente. (1997), Antimicrobial activity of biologically-active compounds from lichen *Cladonia crispataula*. *Boletim. Ecotrópica – Ecosistemas Tropicales*. **31**, 09-19.
- Pereira, E. C., N. H. Silva, E. S. Brito, J. Cruz and M. I. Silva, M. I. (1996),. Atividade antimicrobiana de liquens Amazônicos I: *Cladonia corallifera* e *Cladonia substellata*. *Revista Universidade do Amazonas. Série: Ciências Biológicas*. **1**, 65-77.
- Asahina, Y. and S. Shibata. (1954), Chemistry of lichen substances. Japan Society for the Promotion of Science. 239 p.
- Culberson, C. F. J. (1972), Improved conditions and new data the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography*. **72**, 133-25.
- Legaz, M. E. and C. Vicente. (1983), Endogenous inactivators of arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase en *Evernia prusnastri* thallus. *Journal of Plant Physiology*. **71**, 300-302.
- Homans, A. L. and A. Fuchs. (1970), Direct bioautography on thin layer, cromatograms as method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography*. **51**, 327-329.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2001).
- Cleeland, R. and E. Grunberg. (1986), Laboratory evaluation of new antibiotics *in vitro* and experimental animal. Pp. 825-876. In: Williams Watkins (Ed.), Antibiotics in Laboratory Medicine, Baltimore.
- Galloway, D. J. (1985), Flora of New Zealand lichen. Hasselberg, Wellington. 622p.
- Kantvilas, G. and J. A. Elix. (1987), New species of *Cladia* (lichenized Ascomycotina) from Tasmania. *Mycotaxon*. **29**, 99-205.
- Ahti, T. and Kashiwadani. (1984), The Lichen genera *Cladia*, *Cladina* and *Cladonia* in Southern Chile. pp. 125-151. In: Studies on Cryptogams in Southern Chile. 1ª ed. Inoue.
- Ahti, T. and M. J. Lai. (1979), The genera *Cladonia*, *Cladia* in Taiwan. *Annales Botanici Fennici*. **16**, 228-236.
- Stenroos, S. (1988), The family Cladoniaceae in Melanesia. *Annales Botanici Fennici*. **25**, 207-217.
- Pereira, E. C., L. H. C. Andrade, N. H. Silva and C. Vicente. (2002), Anticonceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from lichen *Cladina dendroides* (des. Abb). *Acta Farmaceutica Bonaerense*. **21**, 259-264
- Huovinen, K. and T. Ahti. (1986), The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia*, section Unciales. *Annales Botanici Fennici*. **23**, 173-188.
- Huneck, S. and I. Yoshimura. (1996), Identification of lichen substances. Springer, Verlag, Berlin. 492 p.

- Ingólfssdóttir, K., Bloomfield, S., Hylands, P. J. (1985), *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **28**, 289-292.
- Perry, N. B., M. H. Benn, N. J. Brennan, E. J. Burgess, G. Elliss, D. J. Galloway, S. D. Lorimer and R. S. Tangney. (1999), Antimicrobial, antiviral and citotoxic activity of New Zeland lichens. *Lichenologist*. **31**, 627-636.
- Ribeiro, S. M., E. C. Pereira, N. H. Silva, E. P. Falcão, N. B. Gusmão, N. K. Honda, and W. Quilhot. (2002), Detection of antibacterial activity of lichen substances through microdilution tests. *In*: S. Calvelo, T. Feuerer (Eds.) *Lichenology in Latin America*. 187-194.
- Maeda, T., Y. Manabe, M. Yamamoto, M. Yoshida, K. Ojasaki, H. Nagamune and H. Kourai. (1999), Synthesis and antimicrobial characteristics of novel biocides, 4,4- (1,6- hexamethylene dioxydicarbonyl) bis (1- alkylpyridinium iodines). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **47**, 1020.
- Adham, I., A. J. Dinning, I. Eastwood, P. Austin, and P. J. Collie. (1998), Cell membrane effects of some common biocides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **21**, 6.

Received: April 30, 2007;
Revised: September 04, 2007;
Accepted: April 27, 2009.

CAPÍTULO 2

IN VITRO AND IN VIVO ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF BARBATIC ACID

Submetido para o Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Fator de Impacto 1.150

Qualis CBII A2

De: **bjmbr@msubmit.net**

Enviada: quarta-feira, 8 de agosto de 2012 15:40:39

Para: emerson_falco@yahoo.com.br

Cc: monicabarmartins@hotmail.com; mjgl3@hotmail.com; m_netto_10@hotmail.com; verticillaris@gmail.com; nps_santos@hotmail.com; terezinha100@gmail.com; famanajas@yahoo.com.br; nhsilva@uol.com.br

Dear Dr. Emerson Falco,

On August 8, 2012, your manuscript entitled "IN VITRO AND IN VIVO ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF BARBATIC ACID" by Monica Cristina Martins, Marcio James de Lima, Marinaldo Pacifico Neto, Eugenia Pereira, Noemia Pereira Santos, Terezinha da Silva, Francisco Carlos de Aguiar Junior, Emerson Falco, and Niccio da Silva was received.

Your manuscript has been assigned the number: 2418.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<http://bjmbr.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A3Fw5Ne6A3DI5F2A9E9aZoGZ41dvYXf2NchS5zwZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your paper to the Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

Sincerely yours,

Journal Office Brazilian Journal of Medical and Biological Research

IN VITRO AND IN VIVO ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF BARBATIC ACID

M.C.B. Martins^{#1}, M.J.G. Lima¹, Neto, M.P.C.², E.C. Pereira³; Santos, N.P.S.²; Silva, T. G. ⁴,
F.C.A Aguiar Junior², E.P.S. Falcão^{2*}; N.H. Silva¹

¹Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

²Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

³Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

⁴Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

Part of the author's doctoral thesis

Abstract

The increase in the incidence of cancer worldwide has stimulated the search for new antineoplastic compounds. Isolated lichen compounds are widely described due to their biological and pharmacological antitumor properties. The aim of the present study was to perform *in vitro* and *in vivo* assessments of the antineoplastic activity of barbatic acid isolated from *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. Cytotoxic tests with the isolated compound revealed inhibitory concentration (IC₅₀) values of 19.06 µg mL for NCI-H292 and 12.0 µg mL KB cells and 6.25 µg mL for HEP-2. The antineoplastic experiments were preceded by an evaluation of drug toxicity and the determination of the lethal dose (LD₅₀: 75.69 mg kg). After the cytotoxic experiments, *in vivo* tests were performed on albino Swiss mice using the Sarcoma-180 experimental tumor. The results demonstrated 46.3% inhibitory activity against the tumor. Despite its efficacy in reducing tumor mass, the barbatic acid showed no significant effect on the expression of argyrophilic nucleolar organizer regions proteins (AgNORs), a useful histopathological indicator of ribosome biosynthesis and proliferation rate in neoplastic cells. The present study indicates that barbatic acid exhibits significant antineoplastic activity and a low degree of toxicity.

Keywords: Antineoplastic activity; Barbatic acid; Lichen

Introduction

The increase in the incidence of malignant tumors worldwide has stimulated the search for new drugs and therapies that may control the spread of cancer. The available pharmaceutical arsenal is composed of substances of natural or synthetic origin. However, the particularities of each tumor type and possible resistance to chemotherapeutic drugs constitute obstacles that underscore the need for new drugs with antineoplastic activity (1).

Lichens are biological structures formed by a combination of a mycobiont (fungus) and one or more photobionts (algae). Specialists agree that the combination ranges from

parasitism to strict mutualism (2). However, this combination is delicately balanced and any alteration in the growth rate and/or death rate of the components involved may lead to the death of the lichen. Lichen symbiosis is a successful evolutionary strategy that can result in a rich diversity of fungal species that produce substances of great biological potential from the depside, depsidone and dibenzofuran class (usnic acids), among others (3).

Lichen compounds commonly have two aromatic rings, the ideal orientation of which is approximately 125°. Carboxyl and hydroxyl are fundamental to biological activity in these substances (4) Pharmacological use of lichen extracts includes antifungal, antibacterial and antitumor activity as well as the prevention of cancer cells (5-8).

With regard to antineoplastic activity, there are promising reports associating compounds that are metabolically related to barbatic acid with the *in vitro* inhibition of cancer development. Lima et al. (9) describe the inhibitory action of usnic acid (80% against sarcoma-180) extracted from *Cladonia substellata*. Santos et al. (10) describe similar results with the acid encapsulated. Methanol extracts of *Umbilicaria esculenta* and *Usnea longissima* significantly reduce melanin formation in human melanomas (7). Sphaerophorin (depside) and pannarin (depsidone) have the same effect, inducing cell death by apoptosis (11). The inhibition of tubulin polymerization has been described for substances from the lichen *Stereocaulon sasakii*, particularly lobaric acid (4). Nevertheless, recent studies indicate that not all compounds have the same active site. For example, usnic acid inhibits the proliferation of breast tumors at a concentration of 29 μ M, but does not alter the formation and/or stability of microtubules, which suggests that there is no association between microtubules and the action mechanism of this compound (12).

The aim of the present study was to perform *in vitro* and *in vivo* assessments of the antineoplastic activity of barbatic acid isolated from the lichen *Cladia aggregata* in order to contribute to the search for new drugs with antitumor activity.

Materials and Methods

Collection and storage of lichen

A 200 g sample of *C. aggregata* (Sw.) Nyl. previously identified by Dr. Eugênia Cristina Pereira using the morphological and chemical characteristics of the thallus, was collected in the city of Bonito, Brasil. The lichen was stored in paper bags and kept at room temperature ($28 \pm 3^\circ$ C) until the tests were performed. A voucher specimen was deposited in

the Herbarium UFP – Geraldo Mariz, of the Universidade Federal de Pernambuco (Brasil) voucher n° 36431.

Isolation and purification of barbatic acid

Organic lichen extracts were obtained using Soxhlet extraction (30° C), followed by ether diethyl solvent. The phenolic pattern of the lichen was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) based on the data described by Martins et al. (13). The ether extract was chosen for the purification procedure, as it exhibited the highest concentrations of the target compound. Barbatic acid was crystallized through the concentration of the ether extract and repeated washing of the crystals with chloroform. The purity of the crystals was determined using thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC).

Chemical characterization of *C. aggregata* and identification of barbatic acid

The ether extract of *C. aggregata* and the purified barbatic acid crystals were analyzed by TLC, using Merck® F₂₅₄ nm silica gel plates. The elution system was toluene/dioxane/acetic acid at 180:45:5 (v/v/v). The bands were examined under UV light (254 and 366 nm), revealed with H₂SO₄ (10%) and then heated to 50° C until the occurrence of the staining reaction (14). HPLC was conducted using an Hitachi chromatograph, coupled to a UV detector (254 nm) at room temperature (28 ± 3° C) under the following conditions: C18 reverse-phase Merck column (254 x 4.6 mm); solvent system of methanol/water/acetic acid (80:19.5:0.5, v/v/v); 1.0 mL min⁻¹; 20-μL injection volume; 0.04 attenuation. The samples were dissolved in diethyl ether at 1.0 mg mL (extracts) and 0.1 mg mL (purified barbatic acid and standard) (15). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded with a Varian Unity Plus 300 spectrophotometer at 300 MHz and 75 MHz, respectively, using DMSO-D₆ as the solvent. The ultraviolet spectrum (UV) was attained by a Perkin Elmer apparatus (Lambda 6 model), using dimethylsulfoxide (DMSO) as the solvent. Infrared (IR) analysis was carried out using a spectrophotometer with a Bruker Fourier IF566 transformer on potassium bromide discs.

Cytotoxic activity and cell viability

Cytotoxicity tests were performed with the HEP-2 (adenocarcinoma of the larynx), NCI-H292 (squamous cell lung carcinoma) and KB (nasopharyngeal squamous cell carcinoma) cell lines provided by the Cell Culture Laboratory, Department of Antibiotics,

Universidade Federal de Pernambuco (Brasil). Cells were kept in Minimum Essential Medium, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (SIGMA), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (GIBCO), 1% antibiotic solution (1000 U/ml of penicillin + 250 mg mL of streptomycin) and 200 Mm of 1% L-glutamine (16). The cell suspensions (10^5 cells mL) were distributed in 96 culture plates (220 μ L/plate). The plates were incubated at 37° C (Sedas, Milan-Italy) with a humid atmosphere enriched with 5% CO₂. After 24 h of incubation, 22 μ L/plate of purified barbatic acid was added, diluted in DMSO at final concentrations of 20, 10, 5 and 2.5 μ g mL. DMSO was used as the control. After 72 h of treatment, the cytotoxic effects of the samples were assessed using the MTT colorimetric method 3-[4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium (MTT). Cell viability was determined using 0.4% Trypan Blue vital dye (Merck). The results were assessed in terms of cell inhibition in comparison to the control group, with the determination of the percentage of living and dead cells (1).

Lethal dose (LD₅₀) determination

The antitumor activity assays were preceded by tests for the determination of the toxicity of the pyrimidine derivatives, following the methodology proposed by Karber and Berhrens (17) and modified by Berlion (18). Male albino Swiss mice were used in the experiments, divided into groups of ten animals. The administration technique was intraperitoneal injection.

The assay consisted of a preliminary phase and definitive phase. In the preliminary phase, the animals were divided into groups and received the test drug in a single dose at increasing concentrations, following a geometric progression with a common ratio of 2.0. The aim was to determine the highest non-lethal dose (D1) and the lowest 100% lethal dose (D2). Once these data were obtained, the definitive phase began. The animals received doses of the drug ranging between D1 and D2, following a geometric progression with a common ratio of 1.5. The animals were then observed for four hours (with notes recorded every 10 minutes) and monitored for periods of 24, 48 and 72 hours. The final results were determined using the following formula: $LD\ 50\% = Df - \sum (a.b)/n$. **Df** = lowest 100% lethal dose; **a** = difference between two consecutive doses; **b** = mean number of dead animals between two consecutive doses; **n** = number of mice per batch; **LD** = lethal dose.

Antitumor activity

Female albino Swiss mice (*Mus musculus*) with a mean weight of 48.25 g provided with chow (Labina®, Purina Brazil Ltd.) and water *ad libitum*. The mice were divided into two groups of five and subsequently inoculated in the right axillary region with a tumor cell suspension (0.2 mL at a concentration of 5×10^6 cells/mL) of sarcoma-180 provided by the Department of Antibiotics, Universidade Federal de Pernambuco (Brasil). The control group received doses of saline solution (3.5 mL/kg of body weight) through intraperitoneal injection. The experimental group was treated with doses of 10% LD₅₀ (75.69 mg/kg), corresponding to 7.60 mg/kg of purified barbatic acid, every 24 h for seven days. At the end of the experiment, the mice were sacrificed through cervical dislocation and the tumors were surgically removed and weighed. The tissues and organs were analyzed to determine microscopic changes induced by the treatment. The entire experimental protocol received prior approval from the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Pernambuco (Brasil).

Histopathological analysis and argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR) proteins staining procedure.

Fragments of the tumor, kidneys, liver and spleen were washed with physiological serum and subsequently maintained in a fixative solution of 10% buffered formaldehyde for 24 h. The resulting biological material was dehydrated, clarified and embedded in paraffin. Semi-serial cuts with a thickness of 5 µm were performed. The cuts were stained using the hematoxylin and eosin technique for subsequent histopathological analysis under an optical microscope (Nikon E-200).

The technique recommended by Ploton et al. (19) was used to quantify the AgNORs, whereby histological cuts were incubated in a darkroom for 30 minutes at 37° C in a colloidal silver solution containing one part 2% gelatin in 1% formic acid and two parts 50% silver nitrate aqueous solution. The slides were then dehydrated, clarified and mounted with DPX. Histological images were captured with a digital camera (Moticam 2300) coupled to an optical microscope (Nikon E-200) at a final magnification of 400X. The quantification was performed using the ImageJ 1.44 program (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). AgNORs were seen as black dots within the nuclei of the cells. The mean number of AgNOR per nucleus was calculated, and for each animal, a total of 1200 cells were randomly assessed in the control and experimental groups. For the statistical analysis, the data were analyzed

using the SPSS 15.0 program and the Students t-test, with the significance level set at 5% ($p < 0.05$).

Results

The TLC analysis revealed the presence of barbatic acid in ether extract (Rf-0,43). The chemical pattern of the species was confirmed by the chromatographic data described by Martins et al. (13), along with its accessory substance D-barbatic acid and purified barbatic acid (Rf-0,43) in the ether extract (Figure 1). These results were confirmed by HPLC, which led to the choice of the ether extract for the isolation process due to its high barbatic acid content. The purity of the purified barbatic acid crystals was analyzed using the same chromatographic procedure (Figure 2).

Spectroscopic analysis of purified barbatic acid confirmed the chemical structure of the compound. Ultraviolet (UV), nuclear magnetic resonance of (^1H and ^{13}C) and infrared (IR) data are described in the following lines. UV (DMSO, log e) nm: 277 (4.28), 304 (3.82) spectrum displayed aromatic hydrogens; IR (KBr) cm^{-1} : C-H (3100), CH_3 (2990 and 2940), C = O ester (1720), C = O of conjugated ester (1670), aromatic C = C (1570 and 1500), of CH_3 (1450 and 1380), C – O of ester (1230 and 1130); ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): d 1.99 (3H, s, Me – 8'), 2.00 (3H, s, Me-8), 2.47 (3H, s, Me-9'), 2.56 (3H, s, Me-9), 3.86 (3H, s, MeO-4), 6.60 (1H, s, H-5), 6.69 (1H, s, H-5'), 10.73 (1H, s, HO-2). Nuclear magnetic resonance analysis of hydrogens recorded peaks of 1.99, 2.00, 2.47 and 2.56 ppm, corresponding to singlets of the methyl hydrogens at 8', 8, 9' and 9. At 3.86 ppm, a singlet was found due to the presence of a methoxy group at 4. With regard to hydrogens, singlets were detected at 6.60 and 6.69 ppm, corresponding to 5' and 5, and the hydroxyls of the aromatic rings were also identified as singlets at 10.73 ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): d 8.1 (Me-8), 22.8 (Me-9), 9.1 (Me-8'), 23.8 (Me-9'), 55.7 (MeO-4), 110.0 (C-1), 151.8 (C-2), 106.3 (C-4), 161.3 (C-4), 107.1 (C-5), 138.9 (C-6), 168.6 (C-7), 159.4 (C- 1'), 111.4 (C-2'), 161.1 (C-3'), 116.1 (C-4'), 139.0(C-5'), 116.1 (C-6') 173.2 (C-7'). The ^{13}C NMR analysis revealed signals of d 8.1, 22.8, 9.1 and 23.8 ppm, corresponding to carbons 8, 9, 8' and 9'. The methoxy group of carbon 4 was recorded at 55.7 ppm. All spectroscopic data confirmed the chemical structure of barbatic acid (Figure 3).

Cytotoxicity tests on the carcinogenic cell lines submitted to the organic ether extract at concentrations of 6.5, 12, 25 and 50 $\mu\text{g mL}$ achieved the following respective inhibition percentages: 60, 70, 72 and 78% for HEP-2; 36, 42, 61 and 63% for NCI-H292; and 47, 52,

80 and 80% for KB (Figure 4). The purified barbatic acid achieved lower inhibition percentages, suggesting synergism between the substances in the organic extract: 49, 54, 61 and 66% for HEP-2; 36,7, 42, 61.1 and 63.4% for NCI-H292; and 43, 53, 71 and 77% for KB at concentrations of 2.5, 5.0, 10 and 20 $\mu\text{g mL}$, respectively (Figure 5).

The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of the purified barbatic acid and the ether extract is shown on table 1. The purified barbatic acid was active against all the tested neoplastic cells. The most sensitive was the HEP-2 cells. Solid tumors reached 1.42 cm in the experimental group and 2.65 cm in the control group. A reduction in weight was found in the kidneys (0.39 g) and liver (2.11 g), whereas a slight increase was found in the spleen (0.21 g) (Table 2). Despite of this, no histopathological changes were observed in these organs.

The histopathological tumor analysis revealed groups of large, pleomorphic, anaplastic cells with an increased nucleus-cytoplasm ratio. The nuclei of these cells were notably hyperchromatic, with loose chromatin and evident nucleoli. A high mitotic index with atypical mitoses was also recorded (Figure 6B). Neoplastic invasion of muscle and adipose tissue, hemorrhagic foci and coagulation necrosis were easily identifiable.

AgNORs were easily distinguished as black spots on the nucleus of tumor cells and were visible either as large round argyrophilic structures or as small scattered units (Figure 6A). The mean number of AgNORs per tumor cell was slightly higher in the control group (1.55 ± 0.35) than in the group treated with purified barbatic acid (1.52 ± 0.24), although the difference between the groups was not statistically significant ($p = 0.612$).

Purified barbatic acid displayed an inhibitory effect on tumor growth against sarcoma-180, with a statistically significant ($p < 0.05$) reduction in tumor mass (61%). This final inhibition percentage was calculated using the mean of the tumors measured seven days after the administration of the drug.

Discussion

Other species of Cladoniaceae (*Cladonia substellata*, *C. crispatula* and *Cladina dendroides*), which are common in sandy soils of the savanna region in the state of Paraíba (Brazil), have also been tested against adenocarcinomas. The most efficient were organic extracts from *C. substellata* due to the presence of usnic and stictic acids. The organic extracts of *C. substellata* at a concentration of 50 $\mu\text{g mL}$ achieved over 80% inhibition of prostatic (PC3) and mammary adenocarcinomas (MDA – MB 231) as well as over 90% inhibition of leukemia (P388 and L1210) (9). The authors cited also analyzed the activity of lichens

collected in Alhandra and Santa Rita (Paraíba, Brasil) and reported that *C. substellata* and *C. verticillaris* achieved 80% inhibition of sarcoma-180 as well as 73% and 64% inhibition for Ehrlich carcinomas, respectively. This activity has been attributed to the usnic, fumarprotocetraric and atranorin acids found in these species (9). Santos et al. (20) also studied sarcoma-180 and found that nanoencapsulated usnic acid reduced the tumor and considerably reduced toxic action at the level of hepatocytes in comparison to the free form of usnic acid.

Umbilicaria esculenta and *U. longissima* organic extracts, which contain usnic acid, have also been found to inhibit the growth of human melanoma by 31.2% and 34.9%, respectively, whereas the control group with ascorbic acid grew by 54.0% (7). Other metabolites, such as pherophorin and panarin, are reported to be active against tumors (melanomas) by inducing apoptosis (11).

Recently, the screening of lichen substances against malignant mesothelioma MM98, vulvar carcinoma A431 and HaCat keratinocytes revealed sensitivity to usnic, salazinic, vulpinic and gyrophoric acids. The most pronounced cytotoxic activity was attributed to usnic acid. A combination of gyrophoric and usnic acids is reported to promote an increase in tissue regeneration (21). Usnic acid is considered a potent inhibitor of DNA synthesis in breast cancer cells, with an IC_{50} of 4.2 and 5.0 $\mu\text{g mL}$ when extracted from *Cladonia arbuscula* and *Alectoria ochroleuca*, respectively (22).

Nucleolar organizer regions (NORs) are chromosome regions containing rRNA (ribosomal RNA) genes. NORs also contain a set of acidic, non-histone proteins that bind silver ions and are selectively visualized by silver methods in histopathological samples. These proteins stained by silver are called AgNORs, whose quantity increases in parallel with ribosome biogenesis (N1 e N2). The AgNORs proteins quantity represents a valuable parameter of cell proliferation, ploidy or protein synthesis (N3). Besides, these proteins play a fundamental role in the control of ribosomal RNA transcription and are defined as markers of “active” ribosomal genes. The close relationship between the rate of cell proliferation and ribosomal biogenesis is well established (N4).

In our study, the administration of purified barbatic acid did not influence significantly the expression *in vivo* of AgNOR proteins in sarcoma-180 cells. However, the treatment occasioned a significant reduction in tumor mass. This fact suggests that other effects than reducing cellular proliferation or ribosomal synthesis appear to be of overriding importance in this tumor type control.

Bačkorová et al. (23) observed that atranorin induced a massive loss in the mitochondrial membrane potential along with caspase-3 activation and phosphatidylserine externalization. In base of the obtained data the authors proposed that the mechanism of action of that secondary metabolite was the activation of the programmed cell death through the mitochondrial pathway. Since the barbatic acid is a depside like the atranorin is quite possible having the same mechanism of action. Therefore, a possible explanation for the significant *in vitro* and *in vivo* antineoplastic effect provided by barbatic acid may be related to apoptosis triggering.

Acknowledgments

The authors are very grateful to CAPES, CNPq and UFPE for sponsoring their research.

References

1. Geran RH, Greenberg GNH. Protocol for screening of agent and natural products against animal tumors and other biological system. *Cancer Chemoth Rep* 1990; 3: 1-103.
2. Ahmadjian V, Jacobs JB. Relationship between fungus and algae in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck. *Nature* 1981; 289: 169-172.
3. Grube M, Kroken S. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. *Mycol Res* 2000; 11: 1284-1294.
4. Morita H, Tsuchiya T, Kishibe K, Noya S, Shiro M, Hirasawa Y. Antimitotic activity of lobaric acid and a new benzofuran, sakisacaulon a from *Stereocaulon sasakii*. *Bioorganic & Medicinal Chem Lett* 2009; v 19, p. 3679-3681.
5. Pereira EC, Nascimento SC, Lima RMC, Silva NH, Oliveira AFM, Boitard M, *et al.* Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. *Tokai J Exp Clin Med* 1994; 19: 47-52.
6. Ingólfssdóttir K. Molecules of interest usnic acid. *Phytochemistry* 2002; 61: 729-736.
7. Moo- Sung K, Hong-Bum C. Melanogenesis inhibitory effects of methanolic extracts of *Umbilicaria esculenta* and *Usnea longissima*. *J Microbiol* 2007; 45: 578-582.
8. Tokiwano T, Satoh H, Obara T, Hirota H, Yoshizawa Y, Yamamoto Y. A lichen substance as an antiproliferative compound against HL-60 human leukemia cells: 16-O-acetyl-leucotylic acid isolated from *Myelochroa aurulenta*. *Biosc Biotechnol Biochem* 2009; 73: 2525-2527.
9. Lima RMC, Nascimento SC, Pereira EC, Campos-Takaki GM. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos líquênicos. *Bol da Soc Brot* 1990; 63: 339-348.
10. Santos NPS, Nascimento SC, Silva JF, Pereira EC, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS. Usnic acid nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *J Sci Tech* 2006; 15: 355-361.
11. Russo A, Piovano M, Lombardo L, Garbarino J, Cardile V. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sci* 2008; 83: 468-474.
12. O'Neill MA, Mayer M, Murray KE, Rolim-Santos HML, Santos-Magalhães NS, Thompson AM, Appleyard VCL. Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells? *Brazilian Journal Biology* 2010; 70: 659-664.
13. Martins MCB, Lima MJG, Silva FP, Azevedo-Ximenes E, Silva NH, Pereira EC. *Cladia aggregate* (lichen) from Brazilian Northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. *Braz Arch Biol Techn* 2010; 53: 115-122.

14. Culberson CF. *Chemical and botanical guide to lichen products*. 1 ed, Carolina do North, The University of North Carolina Press: Chapel Hill. 1969.
15. Legaz ME, Vicente C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiol* 1983; 71: 300-302.
16. Carvalho TUM, Attias M, Cunha E, Silva NL, Carvalho TU. Métodos de estudo da célula. Cultura de células animais. In: *Benchimol*, Rio de Janeiro: Editoração eletrônica-Fenorte/VENT; 1996. p 47-58.
17. Karber G, Behrens B. *Statistical methods in biological assay*. Ed. Griffin Ch. And C. London. 1964.
18. Berlion M. Mise au point d'un system de selection de substances antitumorales: application a l'étude d'analogues structuraux de la geopetaline (Doctor's thesis). Grenoble: Universite Joseph Berlion; 1988.
19. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnett JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986; 18: 5-14.
20. Santos NPS, Nascimento SC, Wanderley, MSO, Pontes-Filho NT, Castro CMMB, Pereira EC, Silva NH, Honda NK, Magalhães NSS. Nanoencapsulation of Usnic Acid : An Attempt to Improve Antitumour Activity and Reduce Hepatotoxicity. *European EUR J Pharm Biopharm* 2006; 64: 154-160.
21. Burlando B, Ranzato E, Volente A, Appendino G, Pollastro F, Verotta L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Med* 2009; 75: 607-613.
22. Einarsdóttir E, Groeneweg J, Björnsdóttir GG, Harðardóttir G, Omarsdóttir S, Ingólfssdóttir K, *et al.* Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med* 2010; 76: 969-974.
23. Bačkorová M, R. Jendželovský R, Kello M, Bačkor M, Mikeš J, Fedoročko Bačkorová M, R. Jendželovský R, Kello M, Bačkor M, Mikeš J, Fedoročko P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol In Vitro* 2012; 26: 462-468.

Figure Captions

Figure 1. Chromatogram (TLC): BAR standard – standard barbatic acid; BAR purified – purified barbatic acid extracted from *Cladia aggregata*; Et – ether extract

Figure 2. Chromatogram (HPLC): (A) – standard barbatic acid; (B) – purified barbatic acid; (C) – ether extract

Figure 3. Chemical structure of barbatic acid isolated from *Cladia aggregata*

Figure 4. *In vitro* % inhibition; 6.5, 12.5, 25 and 50 µg mL; of adenocarcinoma of larynx (HEp -2), squamous cell lung carcinoma (NCI-H292) and nasopharyngeal squamous cell carcinoma (KB) by ether extract from *Cladia aggregata*

Figure 5. *In vitro* % inhibition; 2.5, 5.0, 10 and 20 µg mL; of adenocarcinoma of larynx (HEp -2), squamous cell lung carcinoma (NCI-H292) and nasopharyngeal squamous cell carcinoma (KB) by barbatic acid from *Cladia aggregata*

Figure 6 – Photomicrographs showing sarcoma-180 tumor cells: (A) AgNOR proteins expression. Silver staining, magnification, 400 x; (B) Sheets of cells with marked nuclear atypia and irregular nuclear contours, arrows: mitotic figures. HE., magnification 400 x.

Table Captions

Table 1 – IC₅₀ of ether extract and purified barbatic acid from *Cladia aggregata*, expressed as µg mL

Table 2 – Mean weight (g) of tumors and organs; control group and group treated with purified barbatic acid from *C. aggregata*

IC₅₀ (µg mL)		
	Ether extract	Purified barbatic acid
HEp-2	ud.	6.25
KB	8.9	12.0
NCI-H292	19.5	19.06

ud. - undetermined

Mean weight of tumors and organs (g)		
	Control	Purified barbatic acid
Tumors	2.6508	1.422
Spleen	0.2129	0.2433
Kidneys	0.4320	0.3906
Liver	2.1354	2.1117

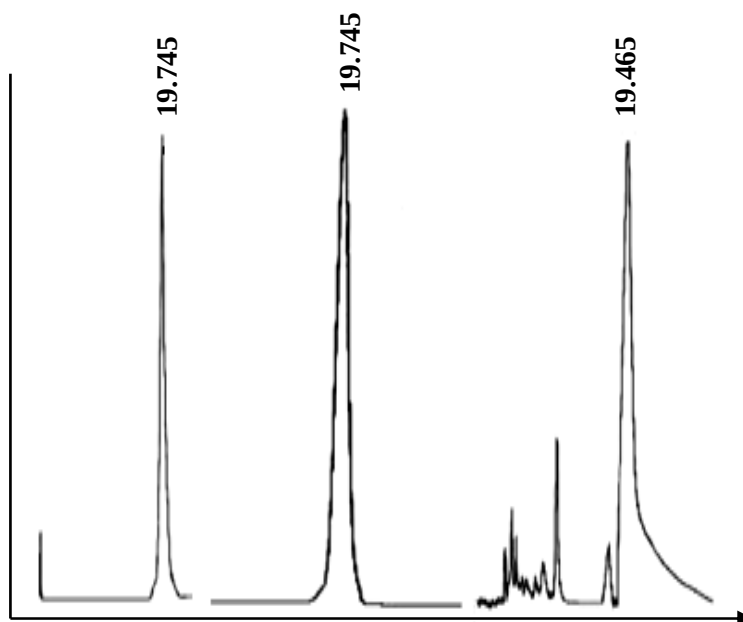
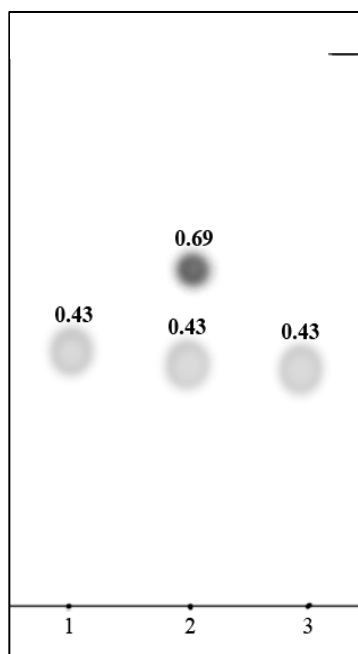


Fig. 1

Fig. 2

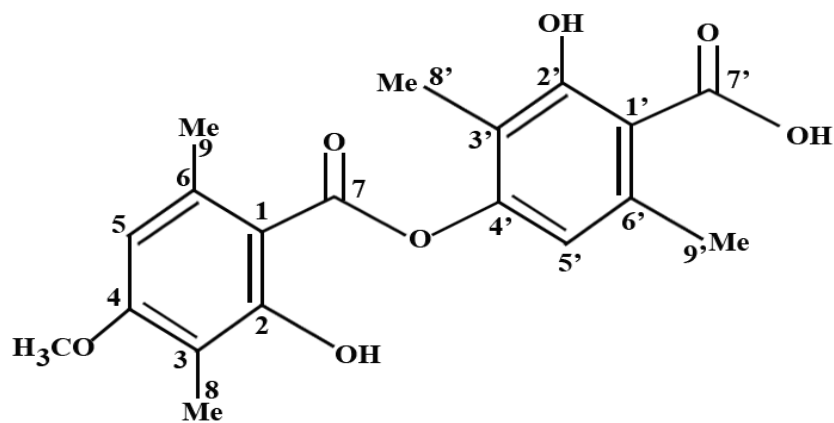


Fig. 3

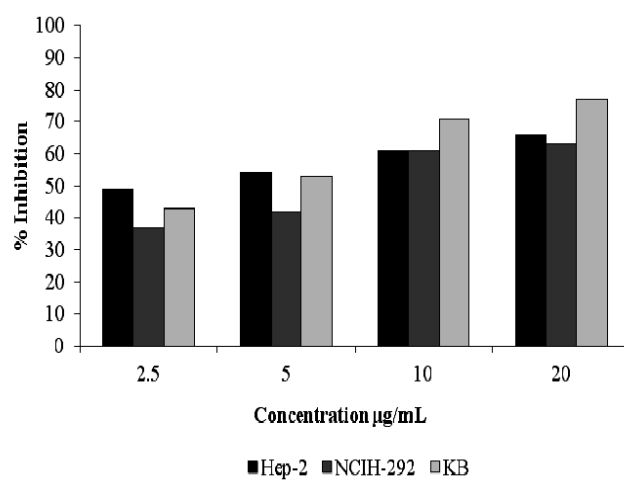


Fig. 4

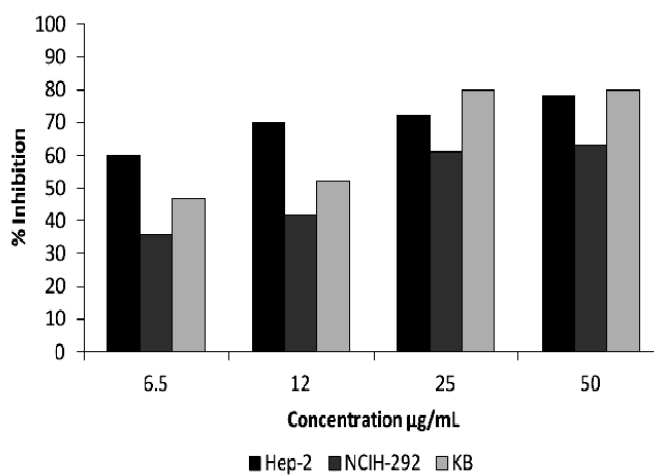


Fig. 5

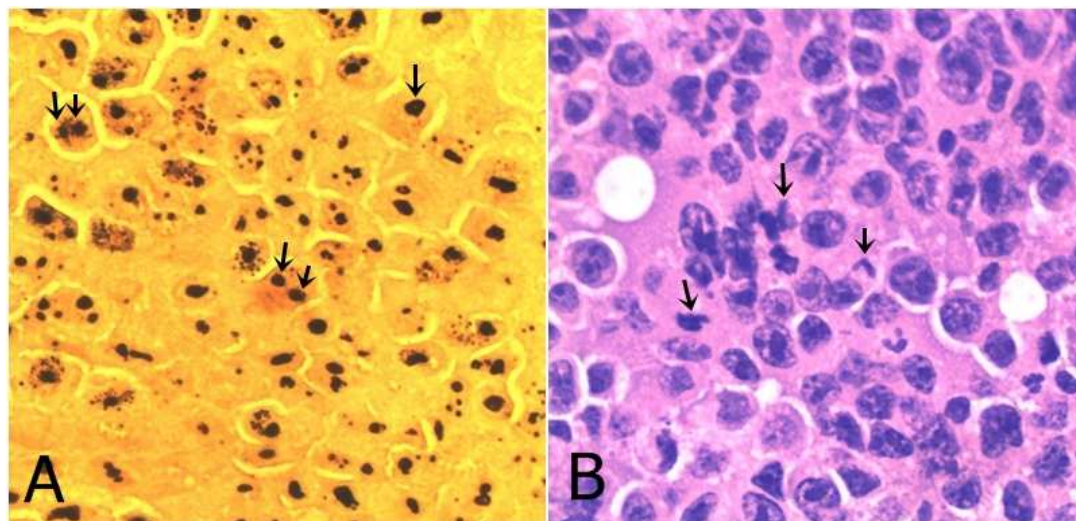


Fig. 6

CAPÍTULO 3

Embryotoxic and molluscicidal activity of potassium usnate

Submetido para Acta Tropica

Fator de Impacto 2.262

Qualis CBII B1

Mensagem encaminhada -----

De: Acta Tropica <actrop@elsevier.com>

Para: emerson_falco@yahoo.com.br

Enviadas: Terça-feira, 10 de Julho de 2012 12:25

Assunto: Submission Confirmation

Dear Emerson Peter,

Your submission entitled "Embryotoxic and molluscicidal activity of potassium usnate." has been received by Acta Tropica

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/actrop/>.

Your username is: Emerson Peter

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Acta Tropica

Embryotoxic and molluscicidal activity of potassium usnate

M.C.B. Martins^a, M.C. Silva^a, L.R.S. Silva^b, V.L.M. Lima^a, E.C. Pereira^c, E.P.S. Falcão^d,
A.M.M.A. Melo^b, N.H. Silva^a

^aDepartamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 50670-420 Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^cDepartamento de Ciências Geográficas, Universidade de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^dCentro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Brazil

M.C.B. Martins^a monicabarmartins@hotmail.com

M.C. Silva^a foknick@hotmail.com

L.R.S. Silva^b luannaribeiro_lua@hotmail.com

V.L.M. Lima^a vlml@ufpe.br

E.P.S. Falcão^c emerson_falco@yahoo.com.br

A.M.M.A.^b Melo amdemelo@hotmail.com

N.H. Silva^a nhsilva@uol.com.br

Abstract: Schistosomiasis is a disease transmitted by certain aquatic snail such as the *Biomphalaria glabrata*. Eradication of the host snail by natural compounds is important widespread control of the disease. In the present study it was evaluated for the first time the toxicity of water soluble potassium usnate synthesized from the usnic acid purified from lichen *Cladonia substellata* to adult *B. glabrata* and its embryos, and also to ambient bioindicator *Artemia salina* Leach. The results indicate that the sample is not toxic to *A. salina* Leach, since the lethal concentration that kills 10% was 1 ppm. Nevertheless, potassium usnate was effective against snails embryos, killing 100% of them at a concentration of 10 ppm, whilst with 5 ppm only 51% were alive. Furthermore, the sample was very active also against the adult *B. glabrata*, killing 100% of adult mollusks at a concentration of 1 ppm.

Keywords: Molluscicidal activity, *Biomphalaria glabrata*, Lichen, Potassium usnate

Corresponding author: Tel: 55-081-3523-3351

E-mail address: emerson_falco@yahoo.com.br

1. Introduction

Molluscicides are substances used to kill mollusks, especially those that live and feed on foliage in greenhouses, gardens, farms and fields. They are also used to control snail vectors of parasites important in public health. Control Programs that include the use of molluscicides are aimed to combat snails transmitting diseases such as schistosomiasis mansoni that is a parasitic disease caused by the helminth *Schistosoma*, which is endemic in 74 tropical countries, include Latin American, Africa and Asia. There are approximately 2.5 to six million people infected with *Schistosoma mansoni* in Brazil alone, with cases distributed among the states of Maranhão, Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe, Minas Gerais and Espírito Santo and isolated cases in the states of Pará, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Tocantins, Rio Grande do Sul and Goiás (Chitsulo et al., 2000; Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose, 2011). Due to its epidemiological importance, the search for new forms of vector control is extremely important to reducing the prevalence and number of cases in affected states.

Data from 2009 seem to indicate a reduction in the transmission of this disease in Brazil. Nonetheless, there were 820 cases of the most severe forms, with hospitalizations between 2000 and 2010 and approximately 505 deaths in the same period (Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose, 2011). It is therefore clear that access of infected individuals to diagnosis and treatment remains limited (Reis et al., 2010). According to the World Health Organization, control methods for this parasitic disease should involve chemotherapy, the interruption of the lifecycle of the parasite and the elimination or reduction in the mollusk host population in endemic areas using molluscicidal agents (WHO, 1993, Santos et al., 2010).

Three Brazilian species of intermediate hosts (*B. glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea*) of *S. mansoni* are known, *B. glabrata* is the most important due to their geographical distribution, high rates of infection and efficiency in the transmission of schistosomiasis. These mollusks are found in still water, such as ponds, wells, cisterns, marshes or any naturally or artificially flooded area. They are able to reproduce by both cross-fertilization and self-fertilization. Oviposition is usually nocturnal and eggs are deposited on the underside of floating leaves or other solid supports submerged in the water. Spawning occurs throughout the year, but is more intense in warmer seasons. The embryo hatching occurs between seven and 10 days after oviposition, when the snails are most susceptible to the adverse effects of chemicals (Paraense, 1972).

It is estimated that more than 7000 chemicals have been tested for mollusk control, among which copper sulfate, gramoxone, calcium hydroxide, N-tritylmorpholin (Frescon) and niclosamide (Cantanhede et al., 2010). Niclosamide is the agent recommended by the World Health Organization (Oliveira-Filho et al., 2010) and is highly efficient in all stages of the mollusk lifecycle, killing 100% of adults and embryos at a concentration of less than 1.5 ppm after 2 h of exposure (Ribeiro et al., 2009). However, its high cost, sensitivity to sunlight and high degree of toxicity to fish, amphibians and aquatic plants (Lima et al., 2002) has limited its use, especially in developing countries, which often have serious basic sanitation problems (Giovanelli et al., 2002).

The use of niclosamide in *B. glabrata* eradication programs is common in Brazil. However, re-colonization of mollusks is observed after months of application, possibly due to resistance mechanisms developed by these organisms. This makes Biological Control Programs expensive and operationally difficult, especially in the poorest municipalities (Schall et al., 2001). Thus, there is a need for studies aimed at developing specific, low-cost alternatives to combating snails. Accordingly, the search for molluscicides derived from plants or natural extracts has gained prominence worldwide, the aim of which is to obtain cheaper, biodegradable, safe, efficient products for controlling snail populations (Luna et al., 2005).

Searches in the country to verify the molluscicidal activity of plants were made with aqueous extracts of the stem of *Sejana* sp. (known locally as *cipó-timbó*) and *Sapindus saponaria* L. (saboneteira), which have been tested on *B. glabrata*. Toxic action in plants is due to the presence of secondary metabolites, such as tannins, saponins, steroids, terpenoids and flavonoids. For example, saponins obtained from *Phytolacca icosandra* and *Catunaregam mitotica* have been found to be active at concentrations of 25 to 200 ppm and 3 to 26 ppm, respectively (Cantanhede et al., 2010). The lectins (*Cratylia floribunda* and *Dioclea guianensis*) were toxic at concentrations of 50 and 41 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (Santos et al., 2010) as well as the latex of *Euphorbia milii* whose LC_{50} was 0.12 mg mL^{-1} at 48 h exposure (Oliveira Filho et al., 2010).

In addition to compounds obtained from higher plants, symbiotic biological structures formed by the association of a heterotrophic organism (mycobiont) and an autotrophic organism (photobiont), known as lichen, produce a variety of substances with phenolic traits, known as lichen substances, which are considered natural protectors of the thallus. The biological properties antibacterial (Martins et al., 2010), antifungal (Wei et al., 2008), antiviral (Campanella et al., 2002), antitumor (Einarsdóttir et al., 2010), insecticidal (Nimis

and Skert, 2006) and sunscreen (Solhaug et al., 2009) of these substances have been known and tested since the 1950s (Nash III, 2008).

Phenols derived from lichen substances (some unique to the class) comprise four distinct, well-characterized, core chemical structures: depsides, depsidones, depsones and dibenzofurans (usnic acid) (Howell et al., 2003). Usnic acid (Fig. 1) is widely distributed among the genera *Cladonia*, *Usnea*, *Ramalina*, *Lecanora*, *Evernia*, *Parmelia* and *Alectoria*, with its content reaching 6% of the dry weight of the lichen thallus. However, it is not completely soluble in water being necessary the use of organic solvents like acetone, which makes it unfit for use in snails (Ingólfssdóttir, 2002). Potassium or sodium, in turn, are salts derivatives from usnic acid completely solubles in water that can be obtained from the purified molecule extracted from different lichens or chemically synthesized in the laboratory (Stanković et al., 1989), which has antibacterial and fungal properties described in the literature (Savić et al., 2010).

A large number of perspectives in various research fields with the usnic acid show great potential for many biological activities, including the insecticide and antiherbivory action, which demonstrate the *deterrent* action against herbivores as the most likely ecological role of lichen substances (Asplund et al., 2009; Solhaug et al., 2009). While lichens do not produce these substances with the exclusive *deterrent* activity or against herbivores attack, but, some animals, such as the slug *Pallifera varia* (Hubricht.), avoid feeding on lichen species, such as *Xanthoparmelia cumberlandia* (Gyelnik) Hale., which contains usnic, norstictic and stictic acids, and *Huilia albocaerulescens* (Wulfen) Hertel, which produces constictic and stictic acids (Lawrey, 1980).

Different authors have described the preferences of terrestrial snails that feed on certain thallus parts of lichen and report that invertebrates prefer parts that are free of secondary metabolites (Benesperi and Tretiach, 2004; Gauslaa, 2005; Pöykkö et al. 2005; Pöykkö et al., 2010). The action mechanisms of lichen substances on snails are not well understood, but the reduction in palatability and direct toxicity to the intestinal microbiota of invertebrates are involved (Lawrey, 1980; 1989).

However, to be considered a good molluscicide, a pure substance must kill 90% of the snails at a concentration of 20 ppm and have little or no toxicity to aquatic organisms. Thus, tests with biological bioindicators, such as *Artemia salina*, have been carried out at research centers to determine possible toxicity of molluscicides to non-target organisms, such as fish and small crustaceans, which may occur in the same areas as snails. *A. salina* has been largely used as a test organism for bioassays due to its high sensitivity to a broad range of

compounds, allied to the easy storage for years at room temperature, and their larvae can be obtained in 24-48 h (Oliveira-Filho et al., 2000; Cantanhede et al., 2010).

Therefore, the present work aims to study the effect of potassium usnate chemically derived of usnic acid purified from *Cladonia substellata* (Vanio) in adults and embryos (blastocyst stage) of *B. glabrata* and on *A. salina* Leach. The last simple bench-top bioassay involving the brine shrimp lethality test was used as an environmental bioindicator to probe the pharmacological activity of potassium usnate.

2. Material and Methods

2.1 Lichen collection and storage: Samples of *Cladonia substellata* (Vanio) (300 g) were collected from Mamanguape in the state of Paraíba (Northeastern Brazil). The lichen was previously identified through chemical and morphological characteristics of the thallus. The material was placed in paper bags at room temperature (28 ± 3 °C) until testing. Identification was performed at the Laboratory of the Chemistry of Natural Products, Universidade Federal de Pernambuco (Brazil) and the voucher specimen was deposited in the Geraldo Mariz Herbarium of Universidade Federal de Pernambuco (voucher n° 34402).

2.2 Isolation, purification, identification of usnic acid and acquisition of potassium usnate: The natural thallus of *Cladonia substellata* (200 g) submitted to four successive extractions with diethyl ether in a Soxhlet apparatus at 40 °C for 16 h. The extract was then filtered and concentrated until dryness in a rotary evaporator coupled to a water bath at 40 °C (Asahina and Shibata, 1954). For the separation, isolation and purification of usnic acid, the ether extract was fractionated on a column of silica gel (70-230 mesh) eluted in the chloroform:hexane (80:20 v/v) solvent system (Odabasoglu et al., 2006). To obtain potassium usnate, usnic acid was partially dissolved in distilled water at 40 °C, and then a potassium hydroxide solution (10%)previously prepared was added slowly by stirring until pH 11, when the precipitation of usnic salt occurred. The obtained solution was lyophilized. The molecular structure confirmation of the usnic acid was performed by analyzing the spectra of proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) obtained at 300 MHz in a Varian UNITY spectrometer. The potassium usnate was analyzed by infrared (IR) spectrum in a spectrophotometer coupled to Bruker Fourier transformer (model IF566), using KBr pellets. Purity (> 95%) was assessed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC).

2.3 Bioassay with *B. glabrata* embryos and adults: A pigmented wild type strain of *B. glabrata* obtained from São Lourenço da Mata (State of Pernambuco, Brazil) and reared to the Radiobiology Laboratory of the Biophysics and Radiobiology Department of the Universidade Federal de Pernambuco (Brazil) was used. Adult snails (*S. mansoni* negative) were maintained in plastic aquaria with filtered and dechlorinated water, changed once a week, pH around 7.0, at room temperature (25 °C) and fed fresh lettuce (*Lactuca sativa*).

Bioassays were performed according to the WHO Expert Committee on the Bilharzia (1965) method. A population of 110 snails was pre-selected and kept in reproductive isolation for five days to confirm sexual maturity. For the experiments, 105 sexually mature adult individuals with shell diameter between 10 and 16 mm were distributed in 7 groups of 5 individuals, as follows: one group was the as positive control (cupric carbonate at 50 ppm), another was the negative control (filtered water) and the other groups were treated with potassium usnate at concentrations of 0.25, 0.5, 0.9, 1, 2.5, 5, 10, 50 and 100 ppm (to a final volume of 500 ml of solution). Embryotoxicity tests were conducted with 100 embryos (0 to 15 h after spawning) in the blastocyst phase exposed to usnate for 24 h at concentrations of 1, 2.5, 5, 10 ppm (to a final volume of 10 ml of solution). Filtered water was used in the control group. Embryo development was monitored until hatching. The experiments were performed in triplicate.

2.4 Environmental toxicity – *Artemia salina* test: Encysted eggs of *A. salina* (brine shrimp) (25 mg) were hatched in a beaker filled with seawater under artificial light at 30 °C, pH 8 to 9, under constant aeration. After 48 h, the nauplii were collected with a Pasteur pipette and macroscopically counted in the stem of the pipette against a lit background. The nauplii were transferred to test tubes containing the samples. The concentration of potassium usnate ranged from to 1, 5 and 10 ppm in vials containing 5 ml of seawater. Ten nauplii were added to each vial. The plates were maintained under illumination. Survivors were counted after 24 h of incubation and the percentage of survival was determined in each treatment and the control. The bioassay was performed as described by Santos et al. (2010). The experiments were performed in quadruplicate.

2.5 Statistical analysis: The percentage (%) of survival was obtained for each treatment and expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The statistical analysis was performed using the SAS Proc Lifetest (SAS Institute, 2001), with probit analysis and 95% confidence intervals. Significant differences were established using the Student's t-test ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

In the thin layer chromatography (TLC) of ether extract and usnic acid purified from *C. substellata*, spots with R_f 0.64 were shown. They were in agreement with the purified and standard usnic acid, and others spots of ether extract (R_f 0.52 and 0.34), corresponding to another phenolic substances which can be found in *C. substellata* as stictic and cryptostictic acids described by Ahti et al. (1993) (Fig. 2). The analysis of purified usnic acid through liquid chromatography (HPLC) confirms the TLC data, showing highest content of usnic acid in the purified sample (99%). The retention time (RT) of the purified compound (Fig. 3 A) agreed with the usnic standard (Fig. 3 B).

^1H NMR and IR analysis of purified usnic acid and IR of potassium usnate showed: usnic acid is a yellow crystalline solid, MP, 201-203°C, $[\alpha]_D^{25}$ + 493° (CHCl_3 c, 1,00), ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δH (H; *mult.*; int.): 1,73 (3H; s, CH_3 -13), 2,08 (3H; s, CH_3 -16), 2,64 (3H; s, CH_3 -15), 2,65 (3H; s, CH_3 -18), 5,92 (1H; s, C-4-H), 11,04 (1H; s, C-10-OH), 13,29 (1H; s, C-8-OH), 18,89 (1H; s, C-3-OH). IR (KBr): 3090, 3007, 2930, 1692, 1632, 1560, 1454, 1370, 1357, 1340, 1330, 1289, 1230, 1190, 1143, 1118, 1070, 1039, 959, 940, 840, 818, 700 cm^{-1} . The IR of potassium usnate showed: IR. (KBr): 3454, 2982, 2929, 1687, 1631, 1540, 1480, 1460, 1382, 1330, 1291, 1240, 1140, 1188, 1136, 1073, 1038, 980, 940, 880, 840, 820, 770, 730, 700 cm^{-1} .

The results of the embryotoxicity test revealed no survival after 24 h of exposure to potassium usnate at concentration 10 ppm (Fig. 4 A), but 42% and 35% survived at 2.5 and 5 ppm, respectively (Fig.5). However, after 72 h, the survival media of treated embryos (1 ppm) was 26.8, but this data does not differ significantly from the cupric carbonate group, whose mortality rate was 100%. In the negative control group there was no mortality (Fig. 4 B). None of the adult snails treated with potassium usnate survived to exposures long as for 24 h at concentrations of 1, 2.5, 5, 10, 50 or 100 ppm. However, 73% survived at concentrations of 0.5, and 100% survived at concentration of 0.25 ppm (Fig. 6). The calculated LD_{50} for adults was 0.92 ppm and for embryos was 5.77 ppm. No survival occurred on the cupric carbonate group. No mortality was observed to both in the filtered water group. This demonstrates the effectiveness of potassium usnate for both embryos and adult of *B. glabrata*.

The mortality rate of *B. glabrata* embryos and adults treated with potassium usnate was higher than that reported for plant extracts. Saponins derived from *Phytolacca icosandra* and *Cartunaregam milotica* are reported to be active at concentrations of 200 to 25 ppm and 26 to 3 ppm, respectively (Treyvaud et al., 2000). The ethanol extract of the latex from *Euphorbia conspicua* (Euphorbiaceae) at a concentration of 4.87 ppm is reported to kill 90% of adults

within 96 h, and the ethanol extract from the leaves of *Solanum jabrense* (Solonaceae) at concentration of 39.8 ppm is reported to kill 90% at 24 h (Santos et al., 2007), as well as lectins obtained from *Dioclea guianensis* with 100% of mortality at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Santos et al., 2010). However, the whole plant extract of *Agave filifera*, rich in flavonoids and steroids (Rawi et al., 2011) are inactive for embryos, probably due to the high molecular weight of their components, which prevents penetration into the gelatinous membrane of the embryos (Lemma and Yau, 1974).

The embryotoxic and molluscicidal activity of potassium usnate was more effective than the activity of the commercial product niclosamide, which is toxic to embryos at a concentration of 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ between 24 and 96 h of exposure (Oliveira-Filho et al., 2010). The high cost and toxic effects on the environment, as well as the possible buildup of resistance among snails to this compound, has become constant concern to public health authorities (Ribeiro et al., 2009). This underscores the importance of the present findings with regard to combating schistosomiasis.

The *A. salina* test was performed to determine the environmental toxicity of potassium usnate. This microcrustacean is highly sensitive to a number of substances, which favors its use as an experimental model for the evaluation of the toxicity of organic residues that might pose risks to the environment and mammals in general (Cantanhede et al., 2010). The assays with *A. salina* revealed that potassium usnate was not toxic at 1 ppm, as 90% of the specimens survived to treatment at this concentration (Fig. 7), demonstrating that usnate represents an extremely low risk to aquatic organisms. In addition, the LD_{50} calculated to *A. salina* is 2.6 ppm. These results are equivalent to those reported by Lima et al. (2002) with potassium salt (lapachol), which was not toxic to brine shrimp.

According to the WHO (1993), in an extract or active component of a plant, molluscicide activity is only considered effective when achieving 90% mortality at 20 ppm for the active ingredient and 100 ppm for the extract. The results presented with potassium usnate showed to be this compound a potential molluscicidal and embryotoxic agent with low toxicity to *A. salina*. This could be an alternative to chemical for control of snails.

Acknowledgments

The authors wish to thanks to the Brazilian fostering agencies Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE) for their financial support and grants for research productivity (EC Pereira).

4. References

- Ahti, T., Stenroos, S., Xavier Filho, L., 1993. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. *Tropical Bryol.* 7, 55-70.
- Asahina, Y., Shibata, S., 1954. Chemistry of lichen substances, first ed. Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo.
- Asplund, J., Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2009. Fungal depsidones – an inducible or constitutive defense against herbivores in the lichen *Lobaria pulmonaria*? *Basic. Appl. Ecol.* 10, 273–278.
- Benesperi, R., Tretiach, M., 2004. Differential land snail damage to selected species of the lichen genus *Peltigera*. *Biochem. Sys. Ecol.* 32, 127–138.
- Campanella, L., Delfini, M., Ercole, A., Iacoangeli, E., Risuleo, G., 2002. Molecular characterization and action of usnic acid a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. *Biochim.* 84, 329-334. 2002.
- Cantanhede, S.P.D., Marques, A.M., Silva-Souza, N., Valverde, A.L., 2010. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. *Braz. J. Pharmacogn.* 20, 282-288.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta. Trop.* 77, 41.
- Einarsdóttir, E., Groeneweg, J., Björnsdóttir, G., Hardardóttir, G., Omarsdóttir, S., Ingólfssdóttir, K., Ögmundsdóttir, H.M., 2010. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med.* 76, 969-974.
- Gauslaa, Y., 2005. Lichen palatability depends on investments in herbivore defense. *Oecologia.* 143, 94-105.
- Giovanelli, A., Vieira, M.V., Coelho da Silva, C.L.P.A., 2002. Interaction between the intermediate host of schistosomiasis in Brazil *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) and a possible competitor *Melanoides tuberculata* (Thiaridae): I. Laboratory experiments. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 90, 261-269.
- Howell, G.M.E., Newton, E.M., Williams-Wynn, D.D., 2003. Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, acid rhizocarpic, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. *J. Mol. Struct.* 651, 27-57.
- Huneck, S., Yoshimura, I., 1996. Identification of lichen substances, first ed. Springer, Verlag, Berlin.
- Ingólfssdóttir, K., 2002. Molecules of interest usnic acid. *Phytochemistry* 61 729-736.
- Lawrey, J.D., 1980. Correlations between lichen secondary chemistry and grazing activity by *Pallifera varia*. *Bryologist.* 23, 128-134.
- Lawrey, J.D., 1989. Lichen secondary compounds: evidence for a correspondence between antiherbivore and antimicrobial function. *Bryologist.* 92, 326-328.

- Lawrey, J.D., 1980. Correlations between lichen secondary chemistry and grazing activity by *Pallifera varia*. Bryologist. 23, 128-134.
- Lemma, A., Yau, P., 1974. Studies on the molluscicidal properties of endod (*Phylolacca dodecandra*), III. Ethiopian. Med. J. 12, 109-114.
- Lima, N.M.F., Santos, A.F., Porfírio, Z., Goulart, M.O.F., Sant'Ana, A.E.G., 2002. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* carcarie, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. Acta Trop. 83, 43-47.
- Luna, J.S., Santos, A.F., Lima, M.R.F., Omena, M.C., Mendonça, F.A.C., Bieber, L.W., Sant'Ana, A.E.G., 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. J. Ethnopharmacol. 97, 199-206.
- Martins, M.C.B., Lima, M.J.G., Silva, F.P., Azevedo-Ximenes, E., Silva, N.H., Pereira, E.C., 2010. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: chemical characterization and antimicrobial Activity. Braz. Arch. Biol. Technol. 53, 115-122.
- Nash III, T.H., 2008. Lichen Biology, second ed. Cambridge University Press Led. Cambrige, USA.
- Nimis, P.L., Skert, N., 2006. Lichen chemistry and selective grazing by the coleopteran *Lasioderma serricorne*. Environ. Exp. Bot. 55, 175-182.
- Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M., Kazaz, C., 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. J. Ethnopharmacol. 103, 59-65.
- Oliveira-Filho, E.C., Geraldino, B.R., Coelho, D.R., De-Carvalho, R.R., Paumgertten, F.J.R., 2010. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. Chemosphere. 81, 218-227.
- Oliveira-Filho, E.C., De-Carvalho, R.R., Paumgertten, F.J.R., 2000. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. Ecotoxicol. Environ. Saf. 46, 342-350.
- Paraense, W.L., 1972. Fauna planorbídica do Brasil, in: Lacaz, C. S., Baruzzi, R. G., Siqueira Júnior, W. (Eds.), Introdução à Geografia Médica do Brasil. São Paulo, Edgard Blücher/EDUSP, pp. 212-219.
- Pöykkö, H., Backor, M., Bencúrová, E., Molcanová, V., Backorová, M., Hyvärinen, M., 2010. Host use of a specialist lichen-feeder: dealing with lichen secondary metabolites. Oecologia. 164, 423-430.
- Pöykkö, H., Hyvärinen, M., Backor, M., 2005. Removal of lichen secondary metabolites affects food choice and survival of lichenivorous moth larvae. Ecology. 86, 2623-2632.
- Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose. 2011 Coordenação Geral de Doenças Negligenciadas. Situação Epidemiológica de *Esquistossomose mansoni* no Brasil. SUS. Governo Federal.

- Rawi, S.M., Al-Hazmi, M., Seif Al Nassr, F., 2011. Comparative study of the molluscicidal activity of some plants extracts on the snail vector *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria alexandrina*. Int. J. Zool. Res. 7, 169-189.
- Reis, D.C., Kloos, H., King, C., Quites, H.F.O., Matoso, L.F., Coelho, K.R., Gazzinelli, A., 2010. Accessibility to and utilization of schistosomiasis related health services in a rural area of state of Minas Gerais Brazil. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 105, 587-597.
- Ribeiro, K.A.L., Carvalho, C.M., Molina, M.T., Lima, E.P., Lópes-Monteiro, E., Reys, J.R.M.,
- Santos, A.F., Cavada, B.S., Rocha, B.A.M., Nascimento, K.S., Sant'Ana, A.E.G., 2010. Toxicity of some glucose/manose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. Bioresour. Technol. 101, 794-798.
- Santos, M.S., Azevedo, D.P.L., Mata, R.C.S., Mendonça, D.I.M.D., Sant'Ana, A.E.G., 2007. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. Bioresour. Technol. 98, 135-139.
- Savić, I., Nikolić, G., Savić, I., Zlatković, S., Djokić, D., 2010. New, simple and validated UV-spectrophotometric methods for the estimation of sodium usnate in preparations. Maced. J. Chem. Chem. En. 29, 157-164.
- Schall, V.T., Vasconcellos, M.C, Rocha, S.R., Souza, C.P., Mendes, N.M., 2001. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* (syn *milli* Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. Acta. Trop. 79, 165-170.
- Solhaug, K.A., Lind, M., Nybakken, L., Gauslaa, Y., 2009. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. Flora. 204, 40-48.
- Stanković, M., Stanković, S., Dorđević, Z., Đorđević, S., 1989. Process for obtaining natrium salt of (+) -usnic acid. Pat. Yu. 43978.
- Treyvaud, V., Marston, A., Dyatmiko, W., Hostettmann, K., 2000. Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. Phytochemistry. 55, 603-609.
- Wei, X., Jeon, H.S., Han, K.S., Koh, Y.J., H, J.S., 2008. Antifungal Activity of Lichen-forming Fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. Plant. Pathol. J. 24, 202-206.
- WHO, 1965. Molluscicide Screening and Evaluation, Bull. World Health Organization, vol. 33, pp. 567-581.
- WHO, 1993. The Control of Schistosomiasis. WHO Tech. Rept. Ser. 830, Geneva. 86.

Figure Captions

Fig. 1. Chemical structure of usnic acid (Huneck and Yoshimura, 1996) obtained from *Cladonia substellata*. R = OH usnic acid, R = OK potassium usnate

Fig. 2. Thin layer chromatogram showing: 1- Merck usnic acid standard (R_f 0.64); 2- usnic acid purified from *Cladonia substellata* (R_f 0.64); 3- ether extract from *C. substellata* (R_f 0.64, 0.52, 0.34)

Fig. 3. High performance liquid chromatograms showing: A- usnic acid purified from *Cladonia substellata* (RT-14.59); B- Merck usnic acid standard (RT-14.93)

Fig. 4. A- Embryos of *Biomphalaria glabrata* treated with potassium usnate at concentrations of 10 ppm for 24 h; B- Living embryos of *Biomphalaria glabrata* . Control group (-) treated with filtered water

Fig. 5. *Biomphalaria glabrata* embryo survival (%) following treatment with potassium usnate at concentrations of 1, 5, 2.5 and 10 ppm. Ctrl+ (positive control); Ctrl- (negative control)

Fig. 6. Survival (%) of adult specimens of *Biomphalaria glabrata* treated with potassium usnate at concentrations of 0.25, 0.5, 0.9 and 1ppm. Ctrl+ (positive control); Ctrl- (negative control)

Fig. 7. Survival (%) of *Artemia salina* treated with potassium usnate at concentrations of 1.5 and 10 ppm. Ctrl- (negative control)

Fig. 1

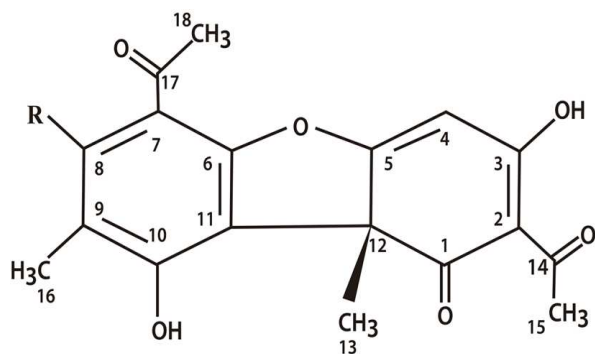


Fig. 2

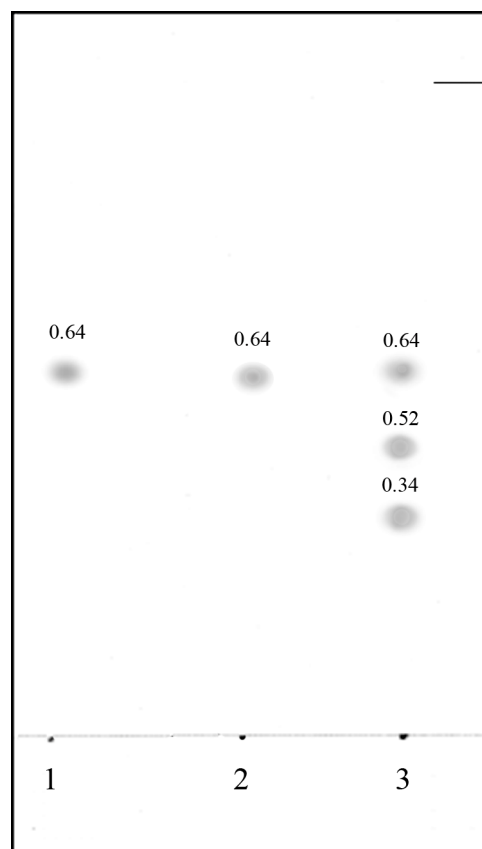


Fig. 3

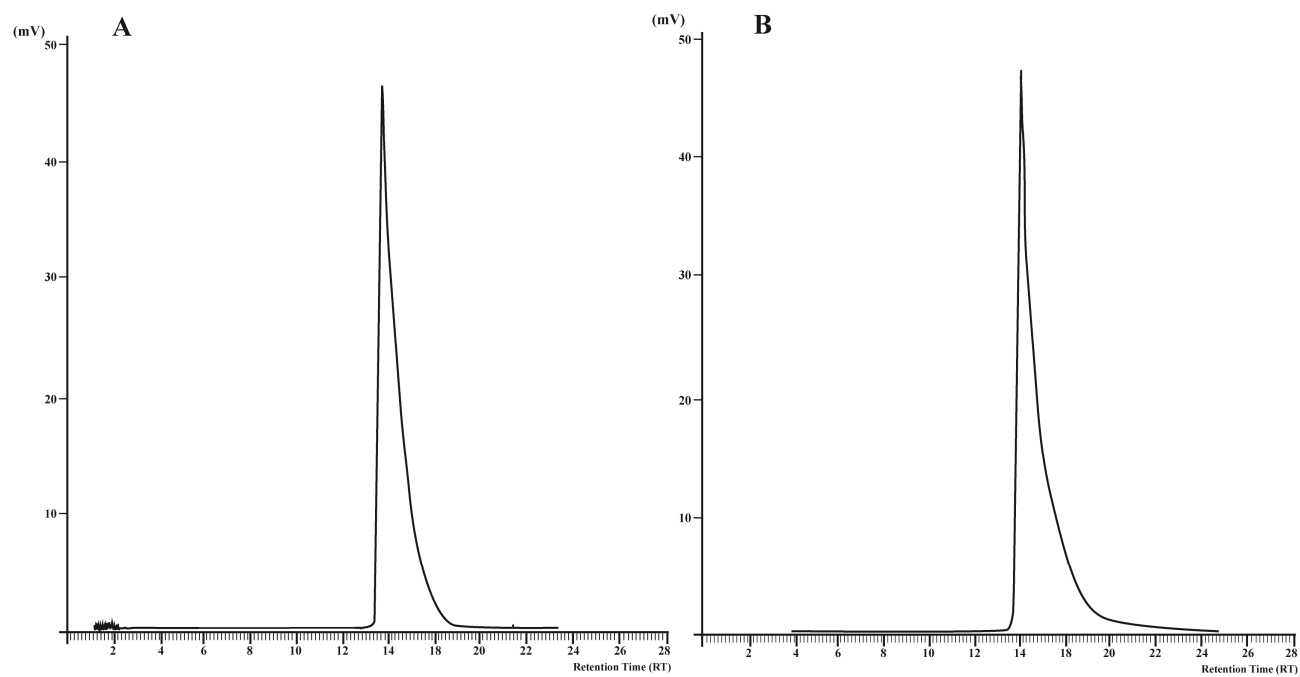




Fig. 4

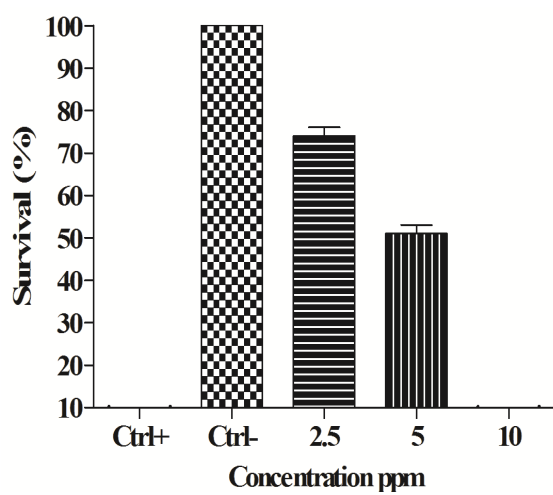


Fig. 5

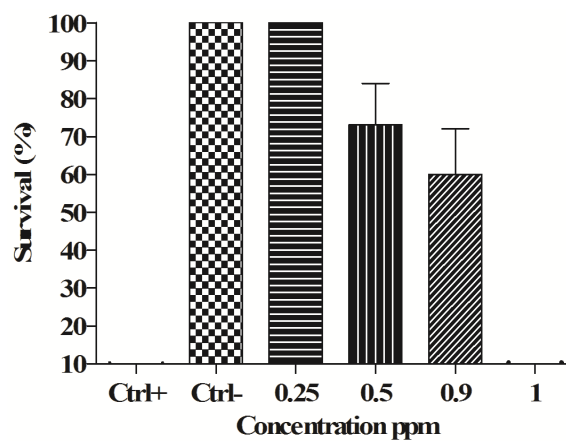


Fig. 6

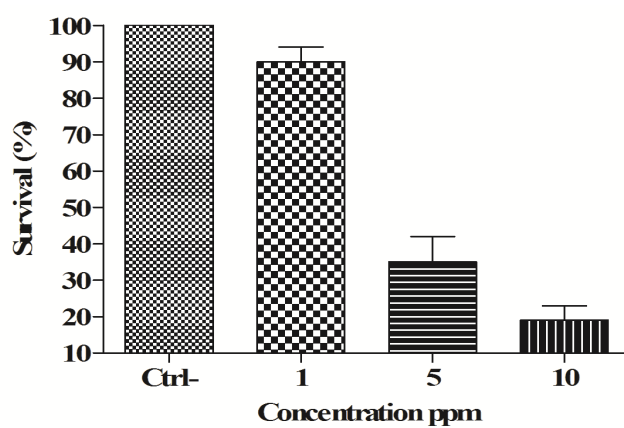


Fig. 7

CAPÍTULO 4

EFFECTS OF LICHEN SUBSTANCES ON SURVIVAL OF *Nasutitermes corniger*
(Motschulsky)

A ser Submetido para International Biodegradation and Biodeterioration

Fator de Impacto 2.252

Qualis CBII

EFFECTS OF LICHEN SUBSTANCES ON SURVIVAL OF *Nasutitermes corniger*
(Motschulsky)

Mônica C.B. Martins¹, Rosineide S. Lopes¹, Patricia S. Barbosa¹, Bruno R. M. Rodrigues¹, Auristela C. Albuquerque², Eugênia C. Pereira³, Emerson P.S. Falcão⁴, Vera L.M. Lima¹ and Nicácio H. Silva^{1*}

¹Departamento de Bioquímica/CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil, ²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-030 Recife, Pernambuco, Brazil, ³Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

⁴Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Brazil

*Author for correspondence (nicacio_hsilva@hotmail.com)

SUMMARY

The lichen-forming process involves the symbiotic relationship between fungi and algae for the production of substances. This paper describes the termiticidal activity of lichen compounds against *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (workers and soldiers). Usnic, fumarprotocetraric and barbatic acids were isolated from *Cladonia substellata*, *C. verticillaris* and *Cladia aggregata*, respectively, and their purity and chemical characterization were determined through thin layer and high performance liquid chromatographies, IR and ¹H NMR spectroscopy. Termiticidal activity against workers of *N. corniger* was achieved up the 8th day of treatment at all concentrations of tested substances. However, no significant effect on the soldiers was found. These findings indicate that usnic, fumarprotocetraric and barbatic acids are potential compounds for use in the control of this urban pest.

Keywords: Barbatic acid, *Cladoniaceae*, fumarprotocetraric acid, insecticidal activity, termiticidal activity, usnic acid

INTRODUCTION

Lichens are ancient organisms, with scientific evidence suggesting their existence since the Devonian age and possibly earlier with records of their presence in the Cenozoic age (Karatygin et al., 2009). They are the result of a symbiotic relationship between fungi and algae and/or cyanobacteria (about 20% of species) (Nash III, 2008) in a process denominated lichenization. The characteristics that make lichens different from other fungi are the formation of an air-exposed thallus, slow growth and the longevity of the fruiting bodies (Sipman and Aptroot, 2001). As with parasitism and saprophytism, lichenization can be

considered a nutritional strategy successfully adopted by many fungi that are completely adapted to cohabitation with algae (Hawksworth and Hill, 1984).

Lichens are complex biological structures with unique characteristics, such as the production of distinctive phenolic substances, which are divided into four chemically distinct classes: depsides, depsidones, dibenzofurans and usnic acids (Howell et al., 2003). These cyclic compounds with free hydroxyl groups are toxic to most other living beings and their formation on the thallus is likely due to a metabolic control mechanism in response to external aggression (Cordoba, 1975). A number of studies have related herbicidal, anti-herbivory and insecticidal activity to lichens and their secondary metabolites (Lawrey, 1987; Giez et al., 1994; Rundel, 1978; Nimis and Skert, 2006; Asplund et al., 2009; Silva et al., 2009; Pöykkö et al., 2010; Tigre et al., 2012). Studies by Lawrey (1980) suggest that the major function of lichen compounds is the protection of the thallus against predators. According to Solhaug et al. (2009), the deterrent action against herbivores is the most likely ecological function of such substances.

Termites are social insects that live in large colonies, in which the work is well divided and all tasks are performed by distinct groups of individuals organized in castes of wingless or winged termites. Seven families are recognized in the isopteran order in which these extraordinary insects are included, including Termitidae and the subfamily Nasutitermitinae, which are very common in Neotropical regions. These organisms are the most diversified in ecological terms (Grassé, 1986). In Brazil, this species (*N. corniger* (Motschulsky)) is found in the semi-arid region, where it is dominant in a few places. Termites are well adapted to urban areas, field regions and many other different environments (Lelis, 1994) and make their nests in trees, soil, roofs and even furniture, feeding on cellulose or lignocellulose digested by symbiotic protozoa that live in their intestines (Higashie and Abe, 1997).

Termites have considerable ecological importance as primary consumers, helping in the decomposition process and recycling of nutrients from plants. These arthropods are also responsible for the distribution of important nutrients, such as organic particles and minerals. Termites fix nitrogen and can be used as a bioindicator of soil quality and fertility. In urban areas, some species are considered pests due to the destruction they cause to building materials and the deterioration of paintings, books, old documents and monuments of historical importance (Verma et al., 2009). In 1997, termites caused over three million dollars in damage to wood constructions in the United States (Lewis, 1997). In 2001, economic losses were estimated to be between 200 and 800 million dollars in China and Japan (Zhong and Liug, 2002). In Brazil, termite damage affected 42.7% of constructions in 2002, with

losses of about 3.5 billion in the past 20 years in the state of São Paulo (Milano and Fontes, 2002). Korb (2007) reports construction losses of approximately 50 million dollars due to termite damage.

The usual method for controlling termites involves the use of synthetic compounds. However, insecticides such as organophosphates and pyrethroids are extremely toxic to mammals as well as aquatic and terrestrial ecosystems. Thus, research has been carried out on natural products from plants, such as flavonoids, alkaloids, terpenoids and tannins (Santana et al., 2010), and lichens, such as lectins, depsides and depsidones (Cetin et al., 2008), due to their biological activities, including anti-herbivory and insecticidal properties. For example, Silva et al. (2009) describe the insecticidal activity against the termite *N. corniger* (Motschulsky) of a lectin extracted and purified from *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.

The aim this study was to evaluate the insecticidal potential of phenolic compounds (usnic, barbatic and fumarprotocetraric acid) extracted and purified from the lichens *Cladonia substellata* Vainio, *C. verticillaris* (Raddi) Fr and *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. collected from northeastern Brazil against *N. corniger*, a termite of ecological importance that is well adapted to urban areas.

MATERIALS AND METHODS

Harvesting and storage of lichens

Cladonia substellata Vainio, *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. were collected, respectively, in the municipalities of Mamanguape and Alhandra, state of Paraíba; *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. in Bonito, state of Pernambuco. About 150 g of each species was harvested in the selected areas. The samples were stored in paper bags at ambient temperature ($28 \pm 3^{\circ}\text{C}$). Preliminary assays with 100 mg of each species were performed for the micro chemical identification of all samples. For such, standard secondary metabolites described in the scientific literature (Ahti et al., 1993) as present in high levels in the lichens studied were used: usnic (USN), fumarprotocetraric (FUM) and barbatic (BAR) acids, respectively. A 10 g sample of each species was deposited at the Geraldo Mariz Herbarium of the Federal University of Pernambuco, Brazil under the accession numbers 34402 (*C. substellata*), 36431 (*C. aggregata*) and 361638 (*C. verticillaris*).

Obtaining organic extracts and purified substances

Samples (100 g) of *C. substellata* Vainio and *C. aggregata* (Sw.) Nyl. each were submitted to diethyl ether extraction in Soxhlet apparatus at 40°C for 16 h. The extract were filtered (Whatman No. 1), evaporated until dryness (40 °C) in rotaevaporator (Buchler Instruments, Fort Lee, NJ, USA). *C. verticillaris* (Raddi) Fr. (100 g) was extracted with acetone by same procedure (Martins et al., 2010). The USN was obtained from *C. substellata* Vainio ether extract. Isolation and purification were performed using a classic chromatographic procedure in a silica gel column (porosity 70 to 230 mesh). The mobile phase was chloroform: n-hexane (80:20 v/v) (Odabasoglu et al., 2006). The ether extract of *C. aggregata* (Sw.) Nyl. was washed five times with chloroform in a G₄ funnel to obtain pure BAR (Martins et al., 2010). The acetone extract of *C. verticillaris* (Raddi) Fr. was treated with cold methanol to obtain FUM (Asahina and Shibata, 1954).

Compounds: detection and characterization

The identification, degree of purity (>95%) was evaluated using thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) and confirmation of molecule structure was made with proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) and infrared (IR) spectroscopy. The USN standard was obtained from Merk® Darmstadt, Germany; the BAR and FUM were obtained in Products Natural Laboratory of Federal University of Pernambuco, Brazil.

Thin layer chromatography (TLC)

Samples of 0.1 mg of the purified compounds, organic extracts and phenolic standards were dissolved in acetone (0.5 ml). Next, 1 µl of the solution was applied to a silica gel plate (Gel 60 F₂₅₄₊₃₆₆ Merk® Darmstadt, Germany) measuring 20 x 20 cm. TLC assays were performed under ascending conditions using the solvent A system (toluene/dioxane/acetic acid, 36:9:1, v/v/v) for USN and BAR and using the solvent B system (n-hexane/diethyl ether/formic acid, 6.5:4:1 v/v/v) for FUM. Spots were observed under short (256 nm) and long (366 nm) ultraviolet (UV) light and visualized using a sulfuric acid solution (10%) and heating to 50°C for 20 minutes to promote the color reaction. The phenolic composition was evaluated by determining retention factors (R_f) values and comparisons with those obtained for standard USN, BAR and FUM (Culberson, 1972).

High performance liquid chromatography (HPLC)

This method involved the use of a Hitachi chromatograph (655 A-11, Tokyo, Japan) coupled to an UV (655 A-11, Tokyo, Japan) detector at 254 nm and a reverse phase column (RP 18 MicroPack MCH-18, 300-4 mm, Berlin, Germany). The purified substances (USN, BAR and FUM) were dissolved in methanol 0.1 g dm^{-3} and injected onto a column at 0.1 mg ml^{-1} . The mobile phase was methanol/deionized water/acetic acid (80:19.5:0.5 v/v/v). The flow rate was 1.0 ml min^{-1} , 0.04 attenuation at room temperature ($28 \pm 3^\circ\text{C}$). The substances were identified based on their retention times (R_T) and peak area in comparisons with standard USN, BAR and FUM acids (Legaz and Vicente, 1983).

Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and infrared (IR) spectroscopy

The chemical structures of the isolated compounds (USN, BAR and FUM) were confirming using ^1H NMR and IR spectroscopy. The ^1H NMR data were obtained from a Varian Unity Plus 300 MHz spectrometer using DMSO- d_6 . IR analyses were performed in a Bruker Fourier spectrometer (model IFS 66) with KBr pellets.

Termiticidal activity of lichen substances against *Nasutitermes corniger* (Motschulsky)

A colony of *N. corniger* termites was collected from the campus of the Federal University of Pernambuco, Brazil near at Antibiotic, Department (and the termites were identified by one of authors (Dr^a. A. C. Albuquerque). The colony was kept in a greenhouse of the Botany Department. Termiticidal tests were performed using a method based on Kang et al. (1990). Paper filter (Whatman No. 1, 9 cm diameter) was cut in disks (4 cm in diameter) and impregnated with solutions (200 μl) of the USN, BAR or FUM at 5, 7 and 10 mg ml^{-1} in acetone. The disks were dried at 28°C and placed in Petri dishes (90 x 15 mm). Twenty termites (16 workers and 4 soldiers) were carefully transferred to the plates and kept in the dark at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ with 80% relative humidity. Experiments were performed with five replicates for each concentration. The percentage of survival was determined for each treatment over an 11 day period. The control groups were established by using acetone or distilled water.

Statistical analysis

The percentage of survival (%) for each treatment was expressed as mean $\pm$ standard error (SE). The statistical analyses were performed with the Proc Lifetest of the SAS program (SAS Institute, 2001). Significant differences were determined using the Student's t-test ($p < 0.05$).

RESULTS

The TLC data demonstrates the presence of FUM (R_f 0.18) as the major phenolic compound in the acetonic extract of *C. verticillaris* (Raddi) Fr. Two other substances were also found, R_f s of 0.08 and 0.19. The same result was also observed to two other studied Cladoniaceae *C. substellata* Vanio (R_f s 0.22; 0.30) and *C. aggregata* (Sw.) Nyl. (R_f 0.43), been identified the USN (R_f 0.50) for the first one and the BAR (R_f 0.31) for the second (Figure 1). The TLC data were confirmed by HPLC. The purity degree of the isolated compounds determined as 100% to FUM (Rt 5 min), 95% to USN (Rt 15 min), and 98% to BAR (Rt 23 min) (Fig. 2A, B, C).

The chemical structures of the isolated compounds from *C. verticillaris* (Raddi) Fr., *C. substellata* Vanio and *C. aggregata* (Sw.) Nyl. were confirmed by the determination of the fusion point, ^1H NMR and IR spectroscopy. The data are described below: **FUM** (Fig. 3A): white solid, MP. 252-260°C (decomposition), ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ_H (H; *mult.*; *int.*): 2.38 (3H; s; CH₃-9), 2.41 (3H; s; CH₃-9'), 5.26 (2H; s; CH₂-8'), 6.60 (2H; s; CH-2'; CH-3'), 6.80 (1H; s; CH-5), 10.53 (1H; s; CH-8), 11.93 (1H; s; C-4-OH or C-2'-OH). IR. (KBr): 3490, 3095, 2950, 2851, 1745, 1701, 1654, 1329, 1259, 1229, 1209, 1156, 1105 cm^{-1} ; **USN** (Fig. 3B): Yellow cristal solid, MP, 201-203°C, $[\alpha]_D^{25} + 493^\circ$ (CHCl₃ c, 1.00 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ_H (H; *mult.*; *int.*): 1.73 (3H; s, CH₃-13), 2.08 (3H; s, CH₃-16), 2.64 (3H; s, CH₃-15), 2.65 (3H; s, CH₃-18), 5.92 (1H; s, C-4-H), 11.04 (1H; s, C-10-OH), 13.29 (1H; s, C-8-OH), 18.89 (1H; s, C-3-OH). IR. (KBr): 3090, 3007, 2930, 1692, 1632, 1560, 1454, 1370, 1357, 1340, 1330, 1289, 1230, 1190, 1143, 1118, 1070, 1039, 959, 940, 840, 818, 700 cm^{-1} e **BAR** (Fig. 3C): Gray solid cristal, MP, 188-189°C, ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): 1.99 (3H; s; CH-8'), 2.00 (3H; s; CH₃-8), 2.47 (3H; s; CH-9'), 2.56 (3H; s; CH₃-9), 3.86 (3H; s; CH₃-O-4), 6.60 (1H; s; CH-5), 6.69 (1H; s; CH-5'), 10.73 (1H; s; C-2-OH). IR. (KBr): 3092, 2992, 2984, 2858, 1659, 1631, 1399, 1290, 1272, 1233, 1154, 1080 cm^{-1} .

The insecticide activity of purified USN, FUM and BAR was evaluated at 5, 7 and 10 mg ml⁻¹, whose survival percentual was observed during 11 days. It was achieved a high activity of these compounds, in all tested concentrations, after 8th of experiments, but only on workers. No significant effect was detected on soldiers, when compared to control groups. At the end of experiment (11th) a reduction of workers survival was observed with significant difference of control groups.

At the concentration of 5 mg ml⁻¹, after the 5th day treatment the survival of the worker termites treated with the FUM decreases to 43%; to those treated with BAR the survival reduces to 51 %, and to 64 % to the group treated with the USN. After the 7th day treatment the percentual of survival to the workers group treated with FUM and BAR was lower than 1% and there were no statistical difference between them (Table 1). At the concentration of 7 mg ml⁻¹, in the 5th day treatment the survival was reduced to values lower than 50% to all the tested compounds: USN (38%), BAR (32%) and FUM (42%). After the 7th day of treatment the survival was lower than 1% for workers groups. No statistical difference was achieved (Table 1). At 8th day treatment the group submitted to USN had also its survival reduced to less than 1%, while the ones treated with the FUM and BAR did not survive (Table 2). The workers treated at the concentration of 10 mg ml⁻¹, had their survival significantly reduced when compared to the control groups at the 5th day treatment with USN (38%), BAR (37%) and FUM (37%) (Table 3).

In analyzing the data obtained for all purified compounds and tested concentrations, it was possible to observe a survival reduction of 50% for all treatments at 5th day of experiment; at 7th day days, FUM and BAR reduced the survival to less than 1% and USN showed this result in 8th day.

DISCUSSION

Ahti (1993) when describe the phenolic composition of *C. verticillaris* (Raddi) Fr., occurring in northeastern Brazil, identified the presence of FUM, protocetraric acid, orcinol, methyl β -orcinol carboxylate and atranorin. To *C. substellata* Vainio and *C. agregatta* (Sw.) Nyl. the same author also describes the presence of compounds that have been identified in this work, as USN for *C. substellata* Vainio and BAR for *C. agregatta* (Sw.) Nyl.. The author also the referer stictic, constictic, criptotistic, nortistic connortistic acids to the first species and

stictic, constictic, nortistic and cryptostictic acids for the second one, confirming the pattern observed in both assays.

Studies on the termiticidal activity of lichen substances are scarce. However, prior investigations have demonstrated that arthropods such as moths, mites and beetles avoid feeding on particular species of lichens that produce stictic, pulvinic and fumarprotocetraric acids. These substances are described as toxic compounds with a bitter taste (Lawrey, 1987; Reutimann and Scheidegger, 1987). According to Nimis and Skert (2006), there is a close relationship between the presence of lichen metabolites and grazing phenomena. The observations of these authors indicate species that contain atranorin, calcium oxalate, as well, gyrophoric, lecanoric and usnic acids and zeorin have an important ecologic function. In other words, either repel or attract the insects, depending on their chemical composition.

The insecticidal activity of natural products is of considerable interest to researchers, as these compounds may be the basis for strong new insecticides, offering an alternative to extremely toxic synthetic insecticides. In this study, survival of termite workers treated with lichen substances was significantly reduced in relation with the control group, within a short period of treatment. However, the efficiency of these substances as insecticide may be extended to other types of insects. Giez et al. (1994) studied the survival of *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) larvae submitted to a diet with oxyphysodic ($11.2 \mu\text{mol g}^{-1}\text{wt}$) and fumarprotocetraric ($30.5 \mu\text{mol g}^{-1}\text{wt}$) acids or calicyn ($37.6 \mu\text{mol g}^{-1}\text{wt}$) obtained from lichens demonstrating a strong increase in the larval period and a high incidence of malformations, indicating a prolonged effect of the lichen substances tested.

Depsides as the barbatic, lecanoric and rosolic acids as well as orceine including the depsidones as fumarprotocetraric, protocetraric and stictic acids, derivatives of the orcinol, are found in lichens particularly those from the genus *Cladonia* and *Cladia* (Ahti, 1993). These substances are also described by their insecticide activity. Depside as lecanoric acid and depsidone as fisodic acid, caused mortality of the *Helicoverpa armigera* (Hubner) larvae at the pupal stage and the *Cleorodes lichenaria* (Hufnagel, 1767) larvae, respectively (Balaji et al., 2007; Pöykkö et al. 2010). In our research BAR and FUM leads workers of *N. corniger* (Motschulsky) to mortality. By other hand, USN major compound of the *C. substellata* Vainio, causes 100% of mortality in termite workers at the concentration of 10 mg ml^{-1} (Table 3). The efficiency of this substance is also demonstrated by Cetin et al. (2008), which describe

the action of usnic acid against *Culex pipiens* Linnaeus, 1758, insect of public health interest, under laboratory conditions, demonstrating 100% lethality in 3rd and 4th instar larvae at concentrations of 5 and 10 ppm, with LC₅₀ at 0.8 ppm. These data indicate that usnic acid may be used as a new bioinsecticide and its chemical structure can be used as a prototype for stronger insecticidal compounds.

Besides the phenolic derivatives (depsides and depsidones) from the secondary metabolism, the lichen thallus is rich in many substances from its primary metabolism, such as complex carbohydrates and lectins. Lectins have an important function in the symbiotic association with fungi and algae and have proven to be effective against *N. corniger* (Motschulsky). Lectin (ClaveLL) extracted and purified from *C. verticillaris* (Raddi) Fr. exhibits termiticidal activity, inducing the death of both workers (LC₅₀: 0.196 mg ml⁻¹) and soldiers (LC₅₀: 0.5 mg ml⁻¹) termites after 10 days of treatment (Silva et al., 2009). These results associated with those shown in this work with the major phenol, of *C. verticillaris* (Raddi) Fr, the FUM, which has reduced survival of termite workers at all tested concentrations, demonstrates that the compounds from this species have high potential as bioinsecticide.

According to Yamaoka (1996), cellulose digestion in the intestine of termites occurs with the assistance of symbiont protozoa or more types of bacteria present there in. The lichen substance possesses a large number of biological activities described by many different authors. As examples, the BAR showed bactericidal effect on *Staphylococcus aureus*, FUM over *Klebsiella pneumoniae* and USN over the *Mycobacterium tuberculosis* (Martins et al., 2010, Neeraj and Behera ., 2011; Lucarini et al., 2012). It is quite possible that the effect of such chemical substances are associated to their antibacterial activity, or even can be associated with their acidic nature and bitter taste, which reduces the palatability of the thallus (Ivanova and Invanov, 2009). Moreover, lichens produce complex carbohydrates, such as evernin, inulin, lichenin and isolichenin, which cause irritation of the intestinal tract and hinder the digestion of many substances (Lawrey, 1987).

Termites are responsible for the destruction of cellulose based materials, such as wood used in civil construction, trees and agricultural crops, leading to considerable economic losses. The control of these insects is currently based on the use of chemical insecticides, which can contaminate the environment, are toxic to humans and animals and can lead to the

emergence of resistant insects. The substances isolated from lichens in the present study demonstrated good results against *N. corniger* (Motschulsky), indicating their potential as bioinsecticides. Further studies are needed for the discovery of new potential termiticidal compounds produced by lichens and their secondary metabolism and the characterization of their action mechanisms against pests.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to the Brazilian fostering agencies CAPES and CNPq and the Federal University of Pernambuco for sponsoring this study.

References

- Asahina, Y. and Shibata, S.** (1954). Aromatic Lichen Substances. In *Chemistry of lichen substances*. (ed. Japan Society for the Promotion of Science), pp. 130-150. Tokyo.
- Asplund, J., Solhaug, K.A. and Gauslaa, Y.** (2009). Fungal depsidones – an inducible or constitutive defense against herbivores in the lichen *Lobaria pulmonaria*? *Basic Appl. Ecol.* **10**, 273–278.
- Ahti, T.** (1993). The lichen family Cladoniaceae in Paraiba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. *Trop Bryol.* **7**: 55-70.
- Balaji, P; Malarvannan, S. E. and Hariharan, G. N.** (2007). Efficacy of *Rocella montagnei* extracts on *Helicoverpa armigera*. *J. Entomol.* **4**, 248-252
- Cetin, H., Tufan-Cetin, O., Turk, A.O., Tay, T., Candan, M., Yanikoglu, A. and Sumbul, H.** (2008). Insecticidal activity of major lichen compounds (-) – and (+) -usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. *Parasitol Res.* **102**, 1277-1279.
- Cordoba, C. V. (1975). Fisiología de las sustancias líquénicas. Editorial Alhambra S.A. Madrid.
- Culberson, C. F. J.** (1972). Improved conditions and new data the identification of lichen products by a standardized thin layer chromatographic method. *J. Chromatogr.* **72**, 133-25.
- Giez, I., Lange. O. L.; Proksch, P.** (1994). Growth Retarding Activity of Lichen substances Against the Polyphagous Herbivorous Insect *Spodoptera littoralis*. *Biochem. Syst. Ecol.* **22**, 113-120.
- Grassé, P. P.,** (1986). Termitologia. Comportement, socialite, écologie, evolution, systematique. Paris. Masson.
- Hawksworth, D. L. and Hill, D. J.** (1984). The lichen-forming fungi. Blackie, Glasgow and London.
- Higashie, M. and Abe, T.** (1997). Global diversifications of térmites driven by evolution of symbiosis and sociality. (ed. Higashie), pp. 83-112. Biodiversity – an Ecological Perspective. Springer-Verlag.
- Howell, G. M. E., Newton, E. M. and Williams-Wynn, D. D.** (2003). Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, acid rhizocarpic, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. *J. Mol Struct.* **651**, 27-37.
- Ivanova, D. and Ivanov, D.** (2009). Ethnobotanical use of lichens: lichens for food review. *Script Scientifica Medica.* **41**, 11-16.
- Kang, H. Y., Matsushima, N., Sameshima, K. and Takamura, N.** (1990). Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* Léveillé). *Mokuzai Gakkaishi.* **36**, 78-84.

- Karatygin, I. V., Snigirevskaya, N. S., Vikulin, S.V.** (2009). The most ancient terrestrial lichen *Winfrenatia reticulata*: a new find and new interpretation. *Paleontol J.* **43**, 107-114.
- Korb, J.** (2007). Termites. *Current Biology.* **17**, 995–999.
- Lawrey, J. D.** (1980). Correlations between lichen secondary chemistry and grazing activity by *Pallifera varia*. *Bryologist.* **23**, 128-134.
- Lawrey, J. D.** (1987). Nutritional ecology of lichen/moss arthropods. In: *Nutritional ecology insects, mites, spiders and related invertebrates*. John Wiley and Sons (ed. Slansky, F. J. R and Rodriguez, J. G). pp, New York.
- Legaz, M. E and Vicente C.** (1983). Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prusnastri* thallus. *Plant Physiol.* **71**, 300-302.
- Lelis, A. T.** (1994). Termite problem in São Paulo City-Brazil. In: *Proceedings of the 12th Congress of the International Union for the Study of Social Insects-IUSSI* (ed. Lenoir, A., Arnold, G., Lepage), pp. 42-46. Paris.
- Lewis, V. R.** (1997). Alternative control strategies for termites. *J. Agric Entomol.* **14**, 291–307.
- Lucarini, R., Tozatti, M. G, Salloum, A. O, Crotti, A. E. M, Silva, M. L. A, Gimenez, V. M. M, Groppo, M, Januário, A. H, Martins, C. H. G, Cunha, W. R.** (2012). Antimycobacterial activity of *Usnea steineri* and its major constituent (+)-usnic acid. *Afr. J. Biotechnol* **11**, 4636-4639.
- Lutzoni, F., Pagel, M. and Reeb, V.** (2001). Major fungal lineages derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature.* **411**, 937-940.
- Martins, M. C. B., Lima, M. J. G., Silva, F. P., Azevedo-Ximenes, E., Silva, N. H. and Pereira, E. C.** (2010). *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity. *Braz Arch Biol Techn.* **53**, 115-122.
- Milano, S. E. and Fontes, L. R.** (2002). Termite pests and their control in urban Brazil. *Sociobiology.* **40**, 163–177.
- Nash III, T. H.** (2008). *Lichen Biology*. 2 ed. Cambridge, USA, Cambridge University Press led. 486p.
- Nimis, P. L. and Skert, N.** (2006). Lichen and selective grazing by the coleopteran *Lasioderma serricorne*. *Environ. Exp. Bot.* **55**, 175-182.
- Neeraj, V. and Behera, B. C.** (2011). Bactericidal activity of some lichen secondary compounds of *Cladonia ochrochlora*, *Parmotrema nilghrrensis*, *Parmotrema sanctiangalii*. *Int. J. Drug Develop Res.* **3**, 222-232.
- Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M. and Kazaz, C.** (2006). Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J. Ethnopharmacol.* **103**, 59-65.

- Pöykkö, H., Bačkor, M., Bencúrová, E., Molcanová, V. and Hyvärinen, M.** (2010). Host use of a specialist lichen-feeder: dealing with lichen secondary metabolites. *Oecologia*. **164**, 423-430.
- Rundel, P. W.** (1978). The ecological role of secondary lichen substances. *Biochem Sys Ecol*. **6**, 157-170.
- Santana, A. L. B. D., Maranhão, C. A., Santos, J. C., Cunha, F. M., Conceição, G. M., Bieber, L. W., and Nascimento, M. S.** (2010). Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. *Int. Biodeter. Biodegr.* **64**, 7-12.
- Silva, M. D. C., Sá, R. A., Napoleão, T. H., Gomes, F. S., Santos, N. D. L., Albuquerque, A. C., Xavier, H. S., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B.** (2009). Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *Int. Biodeter. Biodegr.* **63**, 334-340.
- Sipman, H. J. M. and Aptroot, A.** (2001). Where are the missing lichens? *Mycol. Res.* **105**, 1433-1439.
- Solhaug, K. A., Lind, M., Nybakken, L. and Gauslaa, Y.** (2009). Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora*. **204**, 40-48.
- Tigre, R. C., Silva, N. H., Santos, M. G., Honda, N. K., Falcão, E. P. S. and Pereira, E. C.** (2012). Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. *Ecotox. Environ. Safe.* **84**, 125-132.
- Verma, M., Sharma, S. and Prasad.** (2009). Biological Alternatives for termite control: a review. *Int. Biodeter. Biodegr.* **63**, 959-972.
- Yamaoka, I.** (1996). Symbiosis in termites. Diversity in time and space. Plenum Press, New York.
- Zhong, J. H. and Liug, L. L.** (2002). Termite fauna in China and their economic importance. *Sociobiology*. **40**, 25-32.

Figure Captions

Fig. 1 - Thin Layer Chromatogram (TLC) of 1- fumarprotocetraric acid standard (R_f 0.18); 2- purified fumarprotocetraric acid (R_f 0.18); 3- acetonic extract of *Cladonia verticillaris* (R_f 0.12); 4- usnic acid standard (R_f 0.50); 5- purified usnic acid (R_f 0.50); 6- Ether extract of *Cladonia substellata* (R_f 0.50); 7- barbatic acid standard (R_f 0.31); 8- barbatic acid purified (R_f 0.31); 9- Ether extract of *Cladia aggregata* (R_f 0.31)

Fig. 2 - High Performance Liquid Chromatogram of A- purified fumarprotocetraric acid (R_T 5.14 min); B- purified usnic acid (R_T 14.93 min); C- purified barbatic acid (R_T 22.99 min)

Fig. 3 - Chemical structures of purified lichen substances. A- Fumarprotocetraric acid; B- Usnic acid; C- Barbatic acid

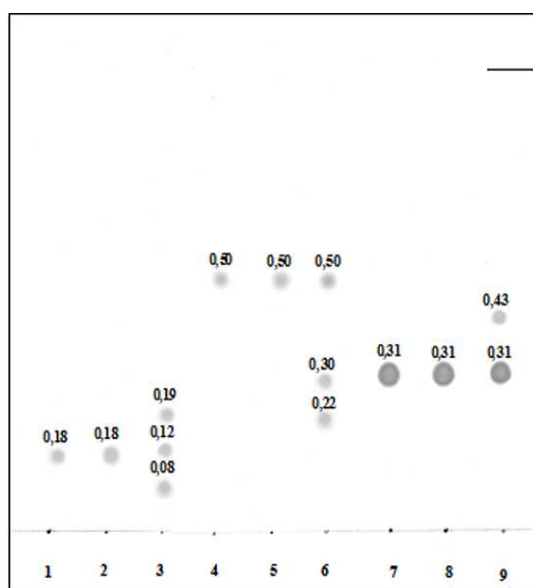


Fig. 1

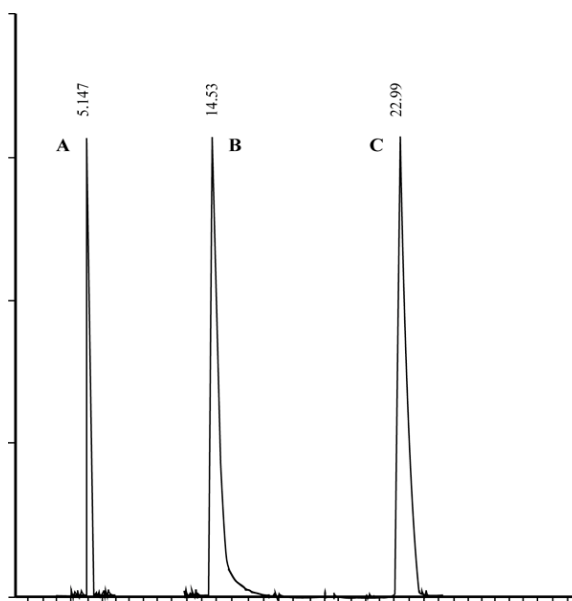


Fig. 2

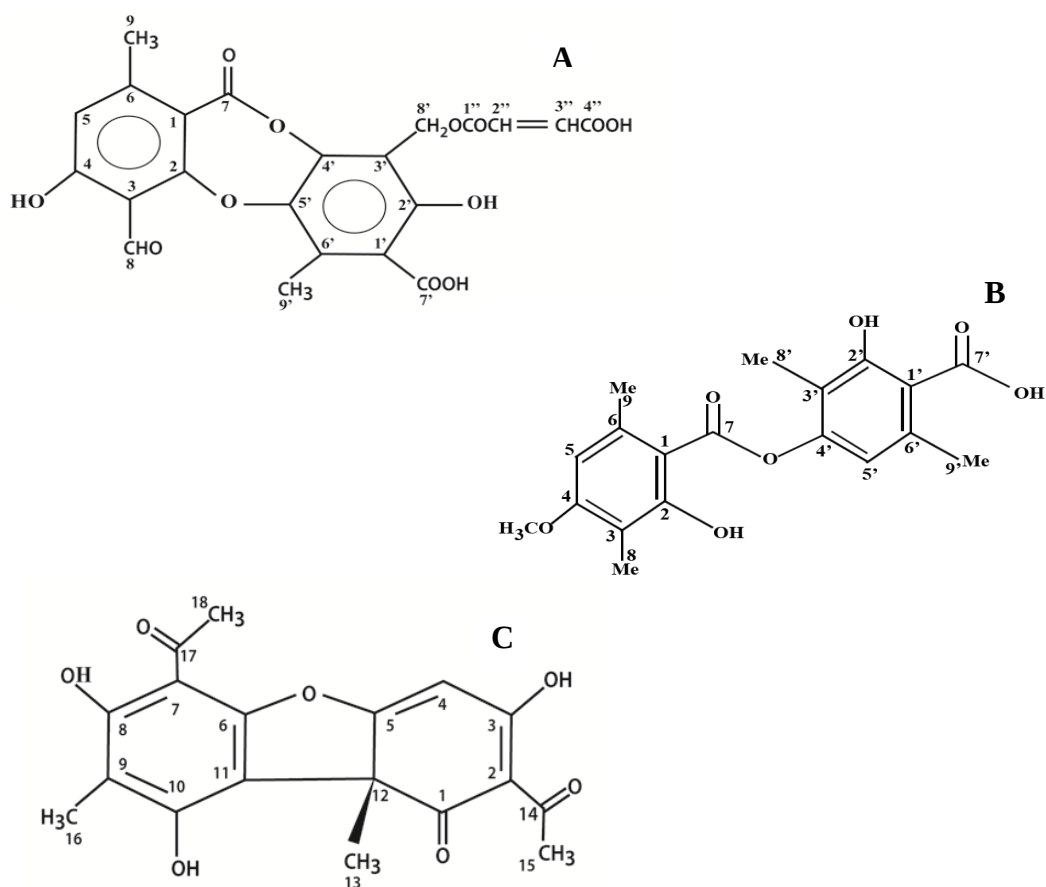


Fig. 3 (A, B, C)

Table Captions

Table 1 - Percentage survival of termite workers treated with usnic acid (USN), fumarprotocetraric (FUM) and barbatic (BAR) acids at a concentration of 5 mg ml⁻¹

Table 2 - Percentage survival of termite workers treated with usnic acid (USN), fumaprotocetraric (FUM) and barbatic (BAR) acids at a concentration of 7 mg ml⁻¹

Table 3 - Percentage survival of termite workers treated with usnic acid (USN), fumarprotocetraric (FUM) and barbatic (BAR) acids at a concentration of 10 mg ml⁻¹

Time parameters	Survival (%)											
Days	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Control	100±0	90±0	89±0.1	82±0.1	75±0.2	60±0.4	43±0.5	35±0.7	33±0.6	33±0.6	33±0.6	33±0.6
USN	100±0	93±0.7	89±0.1	86±0.1	79±0.2	64±0.3	33±0.6	15±0.8	0.2±0.9	0.1±0.9	-	-
FUM	100±0	95±0	93±0	90±0.1	68±0.3	43±0.5	17±0.8	0.2±0.9	-	-	-	-
BAR	100±0	96±0	88 ±0.1	84±0.1	79±0.2	51±0.4	20±0.8	0.1±0.9	-	-	-	-

Time parameters	Survival (%)											
Days	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Control	100±0	90±0	89±0.1	82±0.1	75±0.2	60±0.4	43±0.5	35±0.7	33±0.6	33±0.6	33±0.6	33±0.6
USN	100±0	88±0.1	84±0.1	80±0.2	63±0.3	38±0.6	25±0.7	15±0.8	0.3±0.9	-	-	-
FUM	100±0	97±0	96±0	93±0	75±0.2	42±0.5	20±0.8	0.5±0.9	-	-	-	-
BAR	100±0	96±0	93 ±0	86±0.1	62±0.3	32±0.6	15±0.8	0.2±0.9	-	-	-	-

Time parameters	Survival (%)											
Days	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Control	100±0	90±0	89±0.1	82±0.1	75±0.2	60±0.4	43±0.5	35±0.7	33±0.6	33±0.6	33±0.6	33±0.6
USN	100±0	90±0	77±0.1	64±0.3	59±0.4	38±0.6	16±0.8	0.7±0.9	-	-	-	-
FUM	100±0	98±0	95±0	91±0	63±0.3	37±0.6	16±0.8	0.2±0.9	-	-	-	-
BAR	100±0	95±0	88±0.1	83±0.1	60±0.4	37±0.6	20±0.8	0.8±0.9	0.1±0.9	-	-	-

CAPÍTULO 5

Substâncias líquênicas e seu potencial moluscicida e embriotóxico sobre a *Biomphalaria glabrata*

A ser publicado no International Journal for Parasitology

Fator de Impacto 3.393

Qualis CBII A2

Substâncias liquênicas e seu potencial moluscicida e embriotóxico sobre a *Biomphalaria glabrata*

M.C.B. Martins^a, M.C. Silva^a, L.R.S. Silva^b, E.C. Pereira^c, E.P.S. Falcão^d, A.M.M.A. Melo^b, N.H. Silva^a

^aDepartamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 50670-420 Recife, PE, Brasil

^bDepartamento de Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil

^cDepartamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

^dCentro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Brasil

M.C.B. Martins^a monicabarmartins@hotmail.com

M.C. Silva^a foknick@hotmail.com

L.R.S. Silva^b luannaribeiro_lua@hotmail.com

E.C.Pereira^c eugenia.pereira@pq.cnpq.br

E.P.S. Falcão^d emerson_falco@yahoo.com.br

A.M.M.A.^b Melo amdemelo@hotmail.com

N.H. Silva^a nhsilva@uol.com.br

Resumo: As substâncias liquênicas exibem uma variedade de propriedades biológicas. O ácido barbático (BAR), por exemplo, apresenta atividade antiproliferativa sobre queratonócitos, porém testes moluscicidas e embriotóxicos ainda não foram descritos. Portanto, esta pesquisa objetiva avaliar a atividade do extrato etéreo e do BAR isolado e purificado da *Cladia aggregata* sobre embriões e caramujos adultos da *Biomphalaria glabrata*, bem como sua toxicidade sobre o indicador ambiental *Artemia salina*. O extrato etéreo e BAR purificado foram obtidos através de sucessivas extrações com éter dietílico, sendo os extratos obtidos analisados através de cromatografias em CCD, CLAE, espectrômetro de RMN ¹H e espectrofotômetro de IV. Os resultados demonstram que o extrato etéreo e o BAR purificado foram moluscicidas nas concentrações de 20 e 25 ppm e, o extrato orgânico etéreo mostrou ser embriotóxico nas concentrações de 50 e 100 ppm. Nenhuma das substâncias demonstrou toxicidade sobre a *A. salina*. Este resultado indica o potencial moluscicida do extrato etéreo e do BAR purificado sobre a *B. glabrata*.

Palavras-chave: Ácido Barbático, *Artemia salina*, Atividade Moluscicida, *Biomphalaria glabrata*, Embriotoxicidade, Moluscos

1. Introdução

Na natureza, os organismos desenvolvem varias estratégias nutricionais, entre elas a liquenização, que é a associação simbiótica entre um fungo, geralmente um Ascomiceto e uma alga, frequentemente clorofícea ou cianobactéria usualmente do gênero *Nostoc*, que garante ao fungo liquenizado ou líquen a produção de metabólitos, provenientes do seu metabolismo secundário com vasta aplicações biológicas (Hawkswork and Hill, 1984), entre elas, a atividade antimicrobiana (Martins et al, 2010; Segatore et al., 2012), antitumoral (Russo et al, 2012; Pavlovic et al., 2013), fotoprotetora (Kohlhardt-Floehr et al., 2010; Rabelo et al., 2012) , antiherbívora (Solhaug et al., 2009), inseticida (Silva et al., 2009) entre outras.

Os fenóis característicos do metabolismo secundário dos fungos liquenizados, compreendem os depsídeos, depsídonas e ácidos úsnicos que segundo Asplund et al. (2009) tem uma função ecológica importante para os líquens, especialmente sobre lesmas e caramujos que se alimentam de parte do talo. Estes pequenos invertebrados evitam se alimentar de certas espécies, como *Xanthoriaparmelia cumberlandia*, que contem os ácidos úsnico, nostístico e estítico (Lawrey, 1980). O ácido barbático é um importante depsídeo, que apresenta atividade bactericida sobre o *Staphylococcus aureus* descrita na literatura (Martins et al., 2010), antitumoral (Manojlović et al., 2010a), porém, não há relatos na literatura científica sobre atividade moluscicida.

Entre as espécies de moluscos hospedeiros intermediários transmissores da esquistossomose, a *B. glabrata* é um dos mais importantes devido a sua distribuição geográfica, a alta taxa de infecção e a eficiência na transmissão da doença (Paraense, 1972), podendo ser controlado através de substâncias químicas, como o sulfato de cobre ou a niclosamida (Who, 1993). No entanto, mesmo mostrando grande eficiência sobre todos os estágios do ciclo de vida dos caramujos, estas substâncias são sensíveis a luz, tóxicas para peixes, anfíbios e para plantas aquáticas (Chen et al., 2012). Adicionalmente, os custos para aplicação destes produtos são altos e os caramujos podem desenvolver mecanismos de resistência a estes moluscicidas (Lima et al., 2002).

Portanto, substâncias ainda não pesquisadas quanto ao seu potencial moluscicida têm sido investigadas, com o intuito de se obter um produto que seja não só eficiente, mas, que tenha pouco ou nenhum impacto, seja para o ambiente, seja para os animais aquáticos. Neste

contexto, as substâncias liquênicas são fontes promissoras, uma vez que este tipo atividade biológica ainda não foi descrita particularmente para os extratos orgânicos ou para o ácido barbático purificado da *C. aggregata*. Por isso, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade do extrato etéreo e do ácido barbático purificado obtido da *C. aggregata* (líquen) sobre os embriões e adultos da *B. glabrata* e sua toxicidade sobre o bioindicador ambiental *A. salina*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Coleta e armazenamento do material liquênico

A *C. aggregata* Nyl (SW.) 100 g foi coletada no município de Bonito, Pernambuco, Nordeste do Brasil. O material foi identificado através de caracteres morfológicos e químicos do talo, através de reações de coloração utilizando hidróxido de potássio e hipoclorito de cálcio, segundo Hale-Jr (1983). Uma exsicata foi depositada no herbário UFP da Universidade Federal de Pernambuco, sob registro nº 36431.

2.2 Obtenção do extrato orgânico etéreo do talo *in natura* da *C. aggregata* através de extração por esgotamento, isolamento e purificação do ácido barbático (BAR)

Amostras de 50g da *C. aggregata* foram maceradas, e submetidas a extrações sucessivas por esgotamento à temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$), com 150 mL de éter dietílico, sob agitação mecânica por 1 h, deixada em repouso a 4°C por 24h e posteriormente filtradas em papel de filtro Whatman (No. 1). Este procedimento foi repetido 5 vezes. O extrato etéreo obtido foi evaporado até *secura* em rotaevaporador (Buchler Instruments, Fort Lee, NJ, USA) acoplado em banho-maria (40°C) (Pereira et al., 1996). O BAR purificado foi obtido através da extração do talo *in natura* (40 g) com éter dietílico conforme descrito anteriormente. O extrato etéreo foi evaporado até *secura* e o pó obtido foi lavado com clorofórmio em funil de fundo poroso G4 até a obtenção do ácido barbático purificado, conforme Asahina e Shibata (1954).

2.3 Análise química do BAR purificado e do extrato etéreo

2.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD), Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN^1H) e Infravermelho (IV)

Amostra do BAR purificado da *C. aggregata*, do ácido barbático padrão e do extrato etéreo (0.1 mg), foram dissolvidas em éter dietílico (0.5 mL) e aplicadas (0.5 μ L) em cromatoplaça 20x20 cm de sílica Gel F₂₅₄₊₃₆₆ de espessura 0.20 mm (Merck Darmstadt, Germany), desenvolvida no sistema de solventes tolueno/dioxano/ácido acético (180: 45: 5, v/v/v, respectivamente). Após evaporação do solvente as bandas foram visualizadas sob luz UV curta e longa (254 e 366 nm, respectivamente). Posteriormente o cromatograma foi borrifado com ácido sulfúrico a 10% e aquecido a 50 °C por 20 minutos para que fossem evidenciadas as bandas por reação de coloração. Os resultados foram avaliados mediante cálculos dos valores de R_f do extrato etéreo comparado com o BAR purificado e o padrão (Culberson, 1972). Para a análise em CLAE, amostras 0,1 mg do extrato etéreo, BAR purificado e do padrão foram dissolvido em metanol 0,01 g dm⁻³ e injetada (0.1 mg mL⁻¹) em cromatógrafo líquido Hitachi (655 A-11, Tokyo, Japan), acoplado em detector UV (655 A-11, Tokyo, Japan) a 254 nm, em coluna de fase reversa (RP 18 MicroPack MCH-18, 300-4 mm, Berlin, Alemanha), tendo como fase móvel metanol/ água/ ácido acético (80: 19,5: 0,5 v/v/v) com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, atenuação 0.04 e temperatura ambiente (28 $\pm$ 3°C). Os resultados foram analisados através da comparação entre os tempos de retenção (T_R) do extrato etéreo, BAR purificado e do padrão do BAR (Legaz e Vicente, 1983). A confirmação estrutural da molécula do BAR purificado através de RMN ¹H foi obtida em espectrometro a 300 MHz Varian UNITY e infravermelho (IV) em espectrofotômetro acoplado a transformador Bruker Fourier (modelo IF 566), utilizando pastilhas de KBr.

2.4 Obtenção, manutenção dos caramujos, atividade embriotóxica e moluscicida do extrato etéreo e do BAR purificado

Adultos da linhagem pigmentada de *B. glabrata* foram obtidos do moluscários em São Lourenço da Mata (Pernambuco) e mantido no Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/Brasil. Os caramujos não infectados foram mantidos em aquários de plásticos com água filtrada e/ou declorinada, pH em torno de 7.0, a temperatura de (25°C) e alimentados com alface fresca (*Lactuca sativa*).

Para os testes da atividade moluscicida, uma população de 400 caramujos foi pré-selecionada e mantida em isolamento durante 5 dias para confirmar a maturidade sexual. Grupos de cinco caramujos em triplicatas foram transferidos para miniaquários de 500 mL, onde foram expostos às concentrações de 1; 10; 10.5; 11; 11.5; 12; 12.5; 20; 25; 50 e 100 ppm

do extrato etéreo e do BAR purificado durante 24h, ambos dissolvidos em etanol à 0,5%. Para o controle negativo foram utilizados dois grupos: um exposto em água filtrada e outro com etanol 0,5%. No controle positivo foi utilizado carbonato cúprico na concentração de 50 ppm. Após um período de 24 h de exposição, os animais foram lavados e mantidos em água filtrada sem tratamento, sendo alimentados com alface fresca e observados durante 96 h quando se coletou as posturas e se avaliou os embriões. Como critério de morte, foi adotado a retração dos caramujos para dentro de suas conchas ou a liberação de hemolinfa (Silva, 2008).

Os testes de embriotoxicidade foram conduzidos com 100 embriões (0 a 15 h após a postura), na fase de blastocisto expostos ao extrato etéreo e ao BAR purificado nas mesmas concentrações e controles utilizadas para os adultos (volume final de 10 mL de solução). Os embriões foram monitorados até a eclosão dos caramujos jovens. Como critério de avaliação dos embriões foi adotado malformação ou mortalidade. O experimento foi feito em triplicata (Oliveira-Filho et al., 2010).

2.5 Ensaio de toxicidade ambiental com *A. salina*

Os ovos encistados da *A. salina* (25 mg) foram incubados em água do mar sob luz artificial a temperatura de 30°C, com pH entre 8 e 9 sob aeração. Após 24 h os microcrustáceos foram coletados com Pipeta de Pauteur e contados microscopicamente em aparelho estereoscópico (Tecnival-SQZ), sendo depositados em tubos de ensaio calibrados com 5 mL de soluções de extrato etéreo/ou BAR purificado solubilizados em água do mar e etanol a 0,5%. Os tubos foram incubados por 24 h e o percentual de sobrevivência para cada tratamento foi determinado. Nos grupos controle negativo foram utilizados água do mar e água do mar e etanol a 0.5%. O experimento foi feito em quadruplicata (Santos et al., 2010).

2.6 Análise estatística

As análises foram feitas através do programa SAS Institute 2001. SAS/STAT User's guide, version 8.2, TS level 2MO. SAS Institute. Inc., Cary, N.C, sendo estabelecidas diferenças significativas utilizando o teste de Student's t- ($p < 0.05$).

3. Resultados

3.1 Análises químicas

O extrato etéreo obtido da *C. aggregata* coletada em Bonito/PE apresentou como quimiotipo principal o ácido barbático. O cromatograma em camada delgada (CCD)

demonstrou a presença de uma banda no extrato etéreo obtido do talo *in natura* da *C. aggregata* (Rf 0,43), compatível com a banda do BAR padrão (Rf 0,43), além de outra banda correspondente a um composto não identificado (Rf 0,69), bem como o BAR purificado (Rf 0,43) (Figura 1). Estes resultados foram confirmados através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cujo tempo de retenção (T_R), do BAR contido no extrato etéreo foi de 19.465 min (Figura 2 A), enquanto o BAR purificado foi de 19.745 min (Figura 2 B), e para o padrão do BAR (T_R 19.745 min) (Figura 2 C). O percentual de pureza do BAR purificado de acordo com a CLAE foi > 98%. As análises de RMN ^1H e infravermelho confirmaram a estrutura química do BAR purificado, resultando nos seguintes dados: cristal sólido cinza, PF 188-189°C, RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1.99 (3H; s; CH-8'), 2.00 (3H; s; CH₃-8), 2.47 (3H; s; CH-9'), 2.56 (3H; s; CH₃-9), 3.86 (3H; s; CH₃-O-4), 6,60 (1H; s; CH-5), 6.69 (1H; s; CH-5'), 10.73 (1H; s; C-2-OH). IR. (KBr): 3092, 2992, 2984, 2858, 1659, 1631, 1399, 1290, 1272, 1233, 1154, 1080 cm^{-1} (Figura 3).

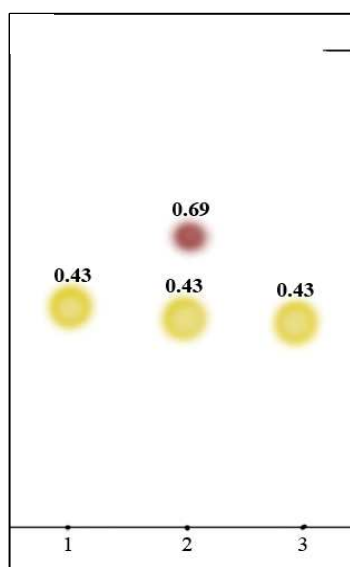


Figura 1: Cromatograma em camada delgada (CCD): 1- Ácido barbático padrão Rf 0.43; 2- Extrato etéreo Rfs 0.43 e 0.69; 3- Ácido barbático purificado Rf 0.43

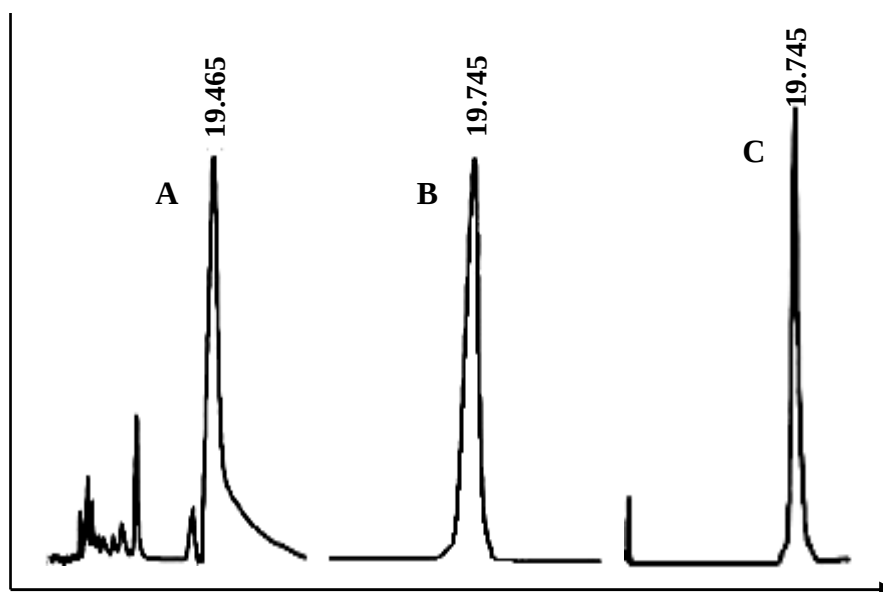


Figura 2: Cromatograma líquido de alta eficiência (CLAE): A- extrato etéreo T_R 19.465 min; B- ácido barbático purificado T_R 19.745 min; C- ácido barbático padrão T_R 19.745 min.

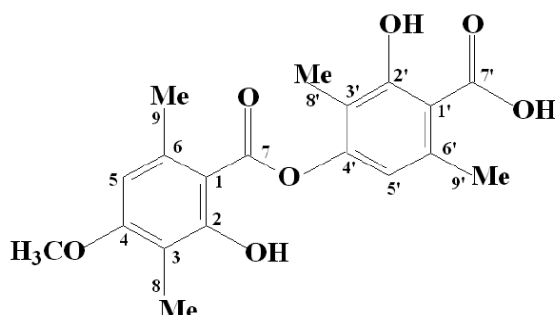


Figura 3: Estrutura química do ácido barbático isolado e purificado da *Cladia aggregata*

3.2 Atividade moluscicida do extrato etéreo e BAR purificado sobre a *B. glabrata*

O extrato etéreo e o BAR purificado obtido da *C. aggregata* apresentaram atividade moluscicida semelhante em todas as concentrações testadas, com média de sobrevivência dos adultos inferiores a 70% após o quinto dia de exposição, com valores significativamente diferentes dos controles com etanol 0.5% e água filtrada (CTRL-) (Figura 4). Na concentração de 20 ppm com 24 h após a exposição a média de sobrevivência foi de 10%, no entanto, após 48 h com este tratamento nenhum caramujo sobreviveu. Tanto para o BAR purificado quanto para o extrato etéreo a CL_{50} foi de 11.9 ppm.

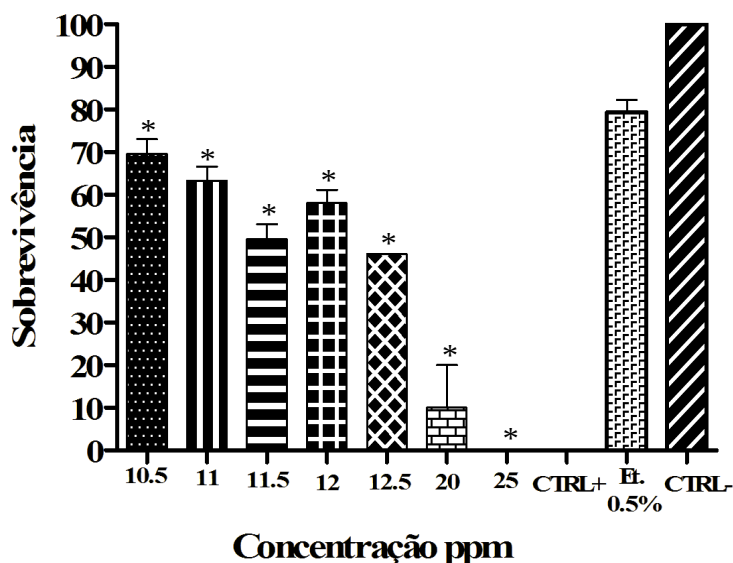


Figura 4: Percentual de sobrevivência da *Biomphalaria glabrata* submetidas ao tratamento com o extrato etéreo e o ácido barbático purificado da *Cladia aggregata*. * $P < 0.0001$ para todas as análises quando comparado com o grupo controle tratado com água filtrada e etanol a 0,5%.

Legenda: CTRL+: carbonato cúprico 50 ppm; Et.: etanol; CTRL-: água filtrada.

Os caramujos adultos foram observados durante oito dias após a exposição e as posturas foram analisadas quanto sua morfologia, número e viabilidade dos embriões. Os resultados demonstraram que não houve qualquer alteração nos parâmetros anteriores das desovas resultantes do tratamento com BAR purificado nas concentrações de 1 e 10 ppm, com 95.5% e 100%, respectivamente de sobrevivência ou com o extrato etéreo para as concentrações de 1 e 12 ppm com 94.3% e 100% respectivamente de sobrevivência. Porém, os caramujos tratados com o BAR purificado na concentração de 11.5 e 12.5 ppm e aqueles tratados com 10 ppm do extrato etéreo que não fizeram posturas como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Percentual de viabilidade e inviabilidade dos embriões após as posturas obtidas dos caramujos que sobreviveram ao tratamento com o BAR purificado e o extrato etéreo

Substância	Concentração (ppm)	Nº de embriões	Inviáveis (%)	Viáveis (%)
Água filtrada	-	379	0.5	99.5
Et. 0.5 %	0.5	195	1.5	98.5
	1	242	4.1	95.9
	10	38	0	100
BAR purificado	11.5	-	-	-
	12	25	4	96
	12.5	-	-	-
Extrato etéreo	1	207	5.7	94.3
	10	-	-	-
	11	44	6.8	93.2
	12.5	26	0	100

3.3 Embriotoxicidade do extrato etéreo e BAR purificado sobre os embriões na fase de blástula

O extrato etéreo da *C. aggregata* foi ativo sobre os embriões em todas as concentrações testadas, exceto para a concentração de 1 ppm, cujo percentual de sobrevivência não foi significativamente diferente do controle com água filtrada (100%). As concentrações de 10, 11, 11.5, 12 e 12.5 ppm tiveram sobrevivência de 70% e para tratamentos de 50 e 100 ppm a sobrevivência ficou reduzida a menos que 10% após 24 h de exposição (Figura 5). A CL₅₀ do extrato etéreo sobre os embriões foi de 19.9 ppm. Por outro lado, o BAR purificado não apresentou atividade sobre os embriões.

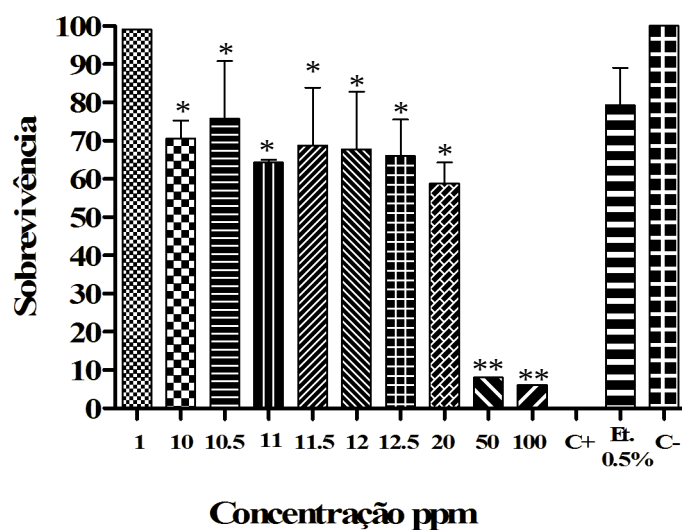


Figura 5: Percentual de sobrevivência dos embriões da *Biomphalaria glabrata* tratados com o extrato etéreo da *Cladia aggregata*. * $P < 0.0001$ para concentrações acima de 1 ppm quando comparado com o grupo controle tratado com água filtrada e ** $P < 0.0001$ para os grupos tratados com 50 e 100 ppm quando comparado com o controle etanol 0.5%.

Legenda: C+: controle positivo com carbonato cúprico a 50 ppm; Et.: etanol; C-: controle negativo com água filtrada.

3.4 Toxicidade do extrato etéreo e o BAR purificado sobre *A. salina*

A *Artemia salina* foi submetida ao tratamento com o extrato etéreo da *C. aggregata* e o BAR purificado. Os resultados mostraram que as concentrações de 20 e 25 ppm que foram moluscicidas, e o extrato etéreo e o BAR purificado não foram tóxicas para o indicador ambiental. O extrato etéreo, por exemplo, foi ativo na concentração mais alta (1000 ppm) (Figura 6 A). O BAR purificado mostrou resultados sobre a *A. salina* significativamente diferente do controle negativo nas concentrações de 100, 250, 500 e 750 ppm (Figura 6 B). A DL_{50} para o extrato etéreo foi de 512 ppm, enquanto que para o BAR purificado foi de 1999 ppm.

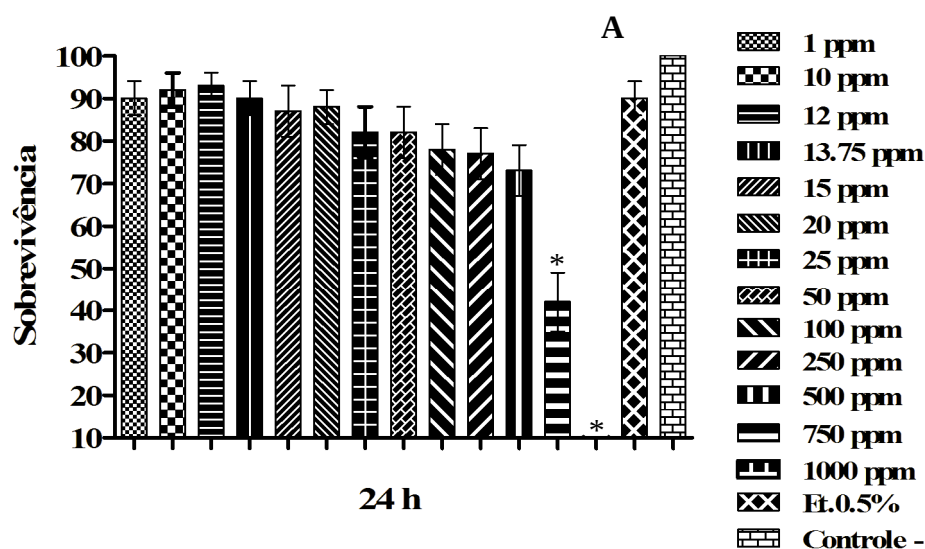


Figura 6 (A): Percentual de sobrevivência da *Artemia salina* tratada com o extrato etéreo da *Cladia aggregata*. * $P < 0.0001$ para concentrações de 750 e 1000 ppm quando comparado com o grupo controle tratado com água do mar.

Legenda: Et.: etanol; C-: controle negativo com água do mar.

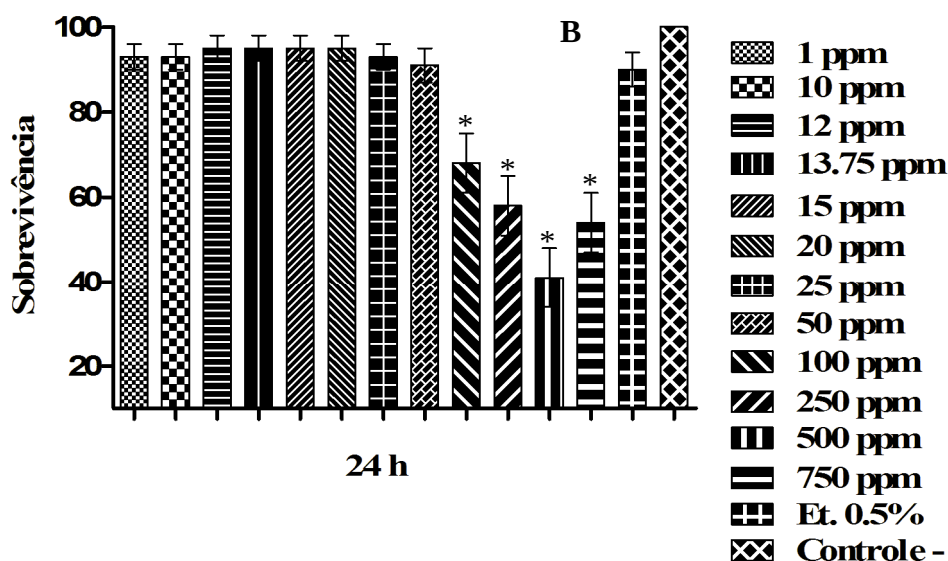


Figura 6 (B): Percentual de sobrevivência da *Artemia salina* tratada com o ácido barbático purificado da *Cladia aggregata*. * $P < 0.0001$ para concentrações de 100, 250, 500 e 750 ppm quando comparado com o grupo controle tratado com água do mar.

Legenda: Et.: etanol; C-: controle negativo com água do mar.

4. Discussão

Os líquens apresentam diversos quimiotipos de caráter fenólico que podem variar de acordo com as estações do ano e local da coleta. Filson (1981) cita como característica típica da *C. aggregata* sua plasticidade fenotípica que depende, prioritariamente, das condições ambientais, por esta razão, diferentes quimiotipos podem ser encontrados, como os ácidos estítico, constitico, nortístico e criptotístico, porém, Ahti (1993), descreve que no Brasil o BAR é a substância dominante, estando nossos achados de acordo com esta descrição. Entretanto, o BAR purificado da *C. aggregata* quando analisado por CCD, apresentou Rf 0.43 e T_R 19.745 min na CLAE. Este último dado foi diferente daquele encontrado na *Thamnolia vermicularis*, cujo valor da CLAE foi de 17.20 min, descrito para os extratos metanólico, clorofórmio e acetato de etila (Manojlović et al., 2010 b). Contudo, existe diferença na metodologia para a CLAE, pois enquanto nós utilizamos como fase móvel metanol/ água/ ácido acético (80: 19,5: 0,5 v/v/v, Manojlović et al. utilizaram metanol/água/ácido fosfórico (80:20: 0,9 v/v/v).

Atualmente as substâncias liquênicas têm chamado atenção e vem sendo investigadas mais intensivamente quanto as suas propriedades biológicas. Elas apresentam diversas funções, sendo utilizadas na medicina popular desde a antiguidade (Boustie et al., 2010). O ácido úsnico e a atranorina promovem a supressão e a proliferação celular de tumores em doses equimolares, induzem a perda do potencial de membrana da mitocôndria, através da ativação da caspase-3 e externalização da fosfatidilserina. Por serem provenientes de grupos químicos diferentes (dibenzofurano e depsideo, respectivamente) podem induzir a apoptose através de múltiplas rotas, como mitocôndria, receptores, sinalização celular ou hipóxia (Bačkorová et al., 2012). O BAR (depsideo), por exemplo, é um inibidor da fotossíntese do fotossistema II (Endo et al., 1998), age como inibidor não redox na síntese de leucotrienos (LTB₄), demonstrou atividade antiproliferativa sobre os queratinócitos (Kumar e Müller, 1999) e antibacteriana sobre o *S. aureus* (Martins et al., 2010). Entretanto, a atividade moluscicida do ácido barbático ainda não esta descrita na literatura.

A Organização Mundial de Saúde (1993) considera que uma substância é um bom moluscicida quando mata 90% dos caramujos a uma concentração de 20 ppm e 100 ppm quando não estiver purificada e apresentar pouca ou nenhuma toxicidade para organismos aquáticos. Esta indicação mostra que o BAR purificado da *C. aggregata* esta dentro das

especificações recomendadas pela WHO, uma vez que nesta concentração o BAR reduziu mais de 90% da população dos caramujos tratados não sendo toxico para o indicador ambiental, o que mostra que o composto pode ser mais eficiente que algumas substâncias obtidas de plantas superiores, consideradas grande fonte para obtenção de material com atividade biológica, como, por exemplo, a atividade descrita para o *Solanum jabrense* na matou 90% dos caramujos na concentração de 39,8 ppm (Santos et al., 2007).

As substâncias líquênicas têm um papel fundamental na manutenção do talo servindo, por exemplo, de protetores contra pequenos predadores, particularmente invertebrados, como insetos, lesmas e caramujos que praticam a herbivoria, demonstrando a provável função ecológica dessas substâncias (Asplund et al., 2009). Lawrey (1980) descreve que a lesma *Pallifera varia* (Hubricht.) evita se alimentar de espécies líquênicas, como *Xanthoparmelia cumberlandia* (Gyelnik) Hale. que contém os ácidos úsnico, nortístico, estístico e *Huilia albocaerulescens* (Wulfen) Hertel produtora dos ácidos constístico e estístico. Possivelmente uma destas quatro últimas substâncias supracitadas pode ser encontrada na *C. aggregata*, provavelmente no extrato etéreo, porem foram sido testadas quanto seu potencial moluscicida como aqui apresentado, uma vez que a atividade do extrato etéreo foi eficiente tanto para adultos como para os embriões da *B. glabrata* e o referido extrato pode conter uma destas substâncias, além do BAR, o que poderia potencializar seu efeito. A proposta de Lawrey (1980) para os mecanismos de ação das substâncias líquênicas sobre os herbívoros inclui redução da palatabilidade do talo, toxicidade direta ou efeitos antibióticos indiretos na microbiota do intestino do organismo predador.

A preferência alimentar dos invertebrados foi reportada por Fröberg et al. (1993) e Benesperi e Tretiach (2004), que descreveram a preferência dos caracóis que se alimentam de diferentes partes de líquens, e Gauslaa (2005) cujo estudo demonstrou a preferência dos moluscos sobre os talos líquênicos livres de metabólitos secundários, o que indica que estas substâncias causam algum tipo de toxicidade para estes animais. Este dado foi confirmado através dos resultados aqui demonstrados para o extrato etéreo e para o BAR purificado da *C. aggregata*, possibilitando a abertura de novas fontes de pesquisas em áreas de interesse para saúde pública e ambiental, uma vez que estas substâncias demonstraram baixas ou mesmo nenhuma toxicidade ambiental sobre a *A. salina*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

5. Referências

- Asahina, Y., Shibata, S., 1954. In: Chemistry of Lichen Substances. Japanese Society for the Promotion of Science, Tokio, pp. 240.
- Asplund, J., Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2009. Fungal depsidonas – an inducible or constitutive defence against herbivores in the lichen *Lobaria pulmonaria*?. Basic and Appl. Ecol. 10, 273-278.
- Ahti, T., 1993. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. Trop. Bryol. 7, 55-70.
- Bačkorova, M., Jendželovskt, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J., Fedoročko, P., 2012. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. Toxicol. in Vitro. 26, 462-468.
- Benesperi, R., Tretiach, M., 2004. Differential land snail damage to selected species of the lichen genus *Peltigera*. Biochem. System. Ecol. 32, 127-138.
- Boustie, J., Tomasi, S., Grube, M., 2010. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. Phytochem. Rev. 10, 287-307.
- Chen, Y.Q.X., Qiong, M., Liu, Y.L., Li, X.R., Yang, S.L., Zhuge, H.X., 2012. Laboratory evaluation of the molluscicidal Activity of *Pulsatilla Chinensis* (Bunge) Regel Saponins against the Snail *Oncomelania Hupensis*. Biomed. Environ. Sci. 25, 224-229.
- Culberson, C.F., 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer chromatographic method. J. Chromatogr. Amsterdam. 72, 113-125.
- Endo, T., Takahagi, T., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y., Sato, F., 1998. Inhibition of photosystem II of spinach by lichen-derived depsides. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 2023-2027.
- Filson, R.B. A revision of the lichen genus *Cladia* Nyl. J. Hattori. Bot. Lab. 49, 1-75.
- Fröberg, L., Baur, A., Baur, B., 1993. Differential herbivore damage to calcicolous lichens by snails. Lichenologist. 25, 83-95.
- Gauslaa, Y., 2005. Lichen palatability depends on investment in herbivore defense. Oecology. 143, 94-105.
- Hale-Jr., M.E., 1983. In: The biology of lichens. (3ed.), Edward Arnold Pub, London, pp. 90.
- Hawksworth, D.L.; Hill, D.J., 1984. In: The lichen-forming fungi. Blackie, Glasgow and London. 1984.

Kohlhardt-Floehr, C., Boehm, F., Troppens, S., Lademann, T., Truscott, G., 2010. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 101, 97–102.

Kumar, S.K.C.; Müller, K., 1999. Depsides as non-redox inhibitors of leucotriene B₄ biosynthesis and HaCaT cell growth 1. Novel analogues of barbatic and diffractaic acid. *Eur. J. Med. Chem.* 34, 1035-1042.

Lawrey, J.D., 1980. Correlations between lichen secondary chemistry and grazing activity by *Pallifera varia*. **Bryologist.** 23, 128-134.

Lima, N.M.F., Santos, A.F., Porfírio, Z., Goulart, M.O.F., Sant’Ana, A.E.G., 2002. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* carcarie, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop.* 83, 43-47.

Legaz, M.E.; Vicente, C., 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine descarboxilase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiol., Lancaster.* 71, 300-301.

Martins, M.C.B., Lima, M.J.G., Silva, F.P., Azevedo-Ximenes, E., Silva, N.H., Pereira, E.C., 2010. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. *Braz. Arch. Biol. Tecnol.* 53, 115-122.

Manojlović, N.T., Vasiljević, P.J., Gritsanapan, W., Supabphol, R., Manojlovic, I., 2010 a. Phytochemical and antioxidant studies of *Laurera benguelensis* growing in Thailand. *Biol. Res.* 43, 169-176.

Manojlović, N.T., Vasiljević, P.J., Jusković, M., Najman, S., Janković, S., Milenković-Andjelković, A., 2010 b. HPLC analysis and cytotoxic potential of extracts from the lichen, *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *J. Med. Plants Res.* 4, 817-823.

Paraense, W.L., 1972. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In: Cunha, A.S. Esquistossomose Mansoní: Por um grupo de colaboradores especializados. São Paulo, Sarvier/Edups, pp. 1-30.

Pavlović, V., Stojanović, I., Jadranin, M., Vajs, V., Djordjević, I., Smelcerović, A., Stojanović, G., 2013. Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. *Food Chem. Toxicol.* 51, 160-164.

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.

Oliveira-Filho EC., Geraldino BR., Coelho DR., De-Carvalho RR., Paumgarten FJ., 2010. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. *Chemosphere.* 2, 218-227.

Rabelo, T.K., Chuliá-Zeidán, F., Vasques, L.M., Santos, J.P.A., Rocha, R.F., Pasquali, M.A.B., Rybarczk-Filho, J.L., Araújo, A.A.S.; Moreira, J.C.F., Galain, D. P., 2012. Redox

characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicol. in Vitro.* 26, 304–314.

Russo, A., Caggia, S., Piovano, M., Garbarino, J., Cardile, V., 2012. Effect of vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: Role of Hsp70 protein. *Chemico Biol. Interact.* 195, 1–10.

Santos A. F., Azevedo, D.P.L., Mata, R.C.S., Mendonça, D.I.M.D., Sant’Ana, A.E.G., 2007. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. *Bioresour. Technol.* 98, 135-139.

Santos, A. F., Cavada, B.S., Rocha, B.A.M., Nascimento, K.S., Sant’Ana, A.E.G., 2010. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. *Bioresour. Technol.* 101, 794–798.

Segatore, B., Bellio, P., Setacci, D., Brisdelli, F., Piovano, M., Garbarino, J.A., Nicoletti, M., Amicosante, G., Perilli, M., Celenza, 2012. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and *E* model methods. *Phytomedicine.* 19, 341– 347.

Silva, N.F.S., Cogo, J., Wiepieski, C.C.P., Laverde JR. Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar.* 11, 179-181.

Silva, M.D.C., Sá, R.A., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Santos, N.D.L., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 2009. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *Inter. Biodeterior. Biodegr.* 63, 334–340.

Solhaug, K.A., Lind, M., Nybakken, L., Gauslaa, I., 2009. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidonas in the foliose lichen *Hypogymnia phydodes*. *Flora.* 204, 40-48.

WHO, 1993. The Control of Schistosomiasis. WHO Tech. Rept. Ser. 830, Geneva. 86.

CAPÍTULO 6

Efeito do ácido úsnico obtido da *Cladonia substellata* Vainio sobre a sobrevivência do *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae)

A ser submetido para Entomologia Experimentalis et Applicata

Fator de Impacto 1.535

Qualis CBII B2

Efeito do extrato orgânico e do ácido úsnico obtido da *Cladonia substellata* sobre o *Alabama argillacea* e *Podisus nigrispinus*

Mônica, C.B Martins¹, Rayane, C.S Silva¹, Emerson, P.S Falcão², Eugênia, C Pereira³, Jorge, T Braz⁴, Nicácio, H Silva¹

¹Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 50670-420 Recife, PE, Brasil

²Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Brasil

³Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

⁴Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

Mônica C.B. Martins¹ monicabarmartins@hotmail.com

Rayane, C.S Silva¹ cssrayane@gmail.com

Emerson P.S. Falcão² emerson_falco@yahoo.com.br

Eugênia C.Pereira³ eugenia.pereira@pq.cnpq.br

Jorge, T Braz⁴ jtorres@depa.ufrpe.br

Nicácio H. Silva¹ nhsilva@uol.com.br

*Author for correspondence (nicacio_hsilva@hotmail.com)

Resumo: A atividade biológica do ácido úsnico sobre o *Alabama argillacea* e seu predador *Podisus nigrispinus* ainda não foi descrita na literatura embora já se conheça sua atividade sobre as larvas do *Aedes aegypti*. O extrato orgânico reunido foi obtido através de extrações sucessivas com éter dietílico, clorofórmio e acetona e, o ácido úsnico foi isolado a partir do extrato etéreo e purificado em coluna de sílica gel (porosidade 70-230 mesh). As substâncias obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada e líquida de alta eficiência e o ácido úsnico purificado teve a sua estrutura química confirmada através de ressonância magnética nuclear de prótons e infravermelho. Os testes com os insetos foram realizados com 10 lagartas no 3º instar e 10 ninfas de percevejos no 5º instar nas concentrações de 0.25, 1, 1.5 e 2 mg mL⁻¹. Os resultados mostraram que tanto o extrato orgânico como ácido úsnico purificado reduziu a sobrevivência do *A. argillacea* a valores inferiores a 50% em todas as concentrações, porém após 2 dias do tratamento aquelas submetidas ao extrato orgânico reunido, tiveram sua sobrevivência reduzida para 10%. As substâncias não mostraram nenhum efeito tóxico sobre o predador natural da lagarta, *P. nigrispinus*. Estes dados indicam o potencial bioinseticida das substâncias obtidas da *Cladonia substellata*.

Palavras-chave: Algodão, Atividade inseticida, Insetos, Líquen, *Cladonia substellata*

1 Introdução

O algodão é uma das principais matérias primas comercializadas mundialmente, sendo o Brasil o quinto maior produtor deste recurso. Porém, o ecossistema algodoeiro apresenta uma entomofauna bastante variada, incluindo diversas espécies de pragas e de artrópodes benéficos que atuam no controle biológico (Luttrell et al., 1994). Devido à depreciação nos níveis de produção do algodão por ataques de pragas, o Brasil é responsável pelo uso de cerca de 10 toneladas de inseticidas anualmente (Martinelli e Omoto, 2006).

Dentre os grandes responsáveis pelos danos dessa cultura, podemos destacar o pulgão *Aphis gossypii* (Glover, 1877), e o curuquerê do algodoeiro *Alabama argillacea* (Hübner, 1818), como pragas que atuam na fase inicial ou vegetativa do algodão (Sujii et al., 2007). A lagarta desfolhadora, *A. argillacea*, alimenta-se exclusivamente do algodão, sendo uma espécie monófaga. A desfolha causada nas plantas do algodão, por ataques desta lagarta, reduz a taxa fotossintética e a capacidade de produzir fibras, podendo por vezes, resultar na perda completa das folhas e ataque de estruturas reprodutivas como capulhos e maçãs (Martinelli e Omoto, 2006).

Numerosos inseticidas químicos são utilizados para o combate desta praga, porém, eventualmente, estes não apresentam seletividade, afetando não só a população de insetos alvo, como também predadores naturais de insetos praga, responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre as populações. O percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851), possui habito generalista e frequentemente está associado à predação de larvas de lepidópteros. Cada fêmea deste predador, na fase adulta, são capazes de se alimentar de cerca de 54 lagartas por dia de *A. argillacea*, sendo uma importante alternativa ao controle natural desta praga (Oliveira et al., 2002).

Os inseticidas químicos sintéticos durante muito tempo foram utilizados como única alternativa para o combate de pragas, porém devido aos efeitos negativos gerados à saúde humana e ao meio ambiente, os produtos oriundos do metabolismo secundário vegetal alcançaram um papel de importante destaque neste cenário (Saito e Lucchini, 1998), estando incluídos neste contexto os líquens que, são resultados da associação simbiótica entre um fungo e uma ou mais algas, capazes de produzir substâncias fenólicas, como por exemplo, o ácido úsnico com diferentes atividades biológicas, inclusive inseticida (Cetin et al., 2008).

Este fenol está amplamente distribuído, nos gênero *Cladonia*, *Usnea*, *Evernia*, *Parmelia* (Ingólfssdóttir, 2002).

A atividade biológica do ácido úsnico sobre lepidópteros (Emmerich et al., 1993) já havia sido reportada, porem não há nenhuma descrição para o *A. argillacea* ou para os Hemipteros, semelhante ao *P. nigrispinus*. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inseticida do extrato orgânico e do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* Vainio (líquen) sobre *A. argillacea* e seu predador natural, o *P. nigrispinus* como uma forma alternativa para controle da praga do algodão.

2 Materiais e Métodos

2.1 Coleta e herborização do material líquênico

A *Cladonia substellata* (Vainio) (100 g) foi coletada no Município de Mamanguape/PB, Brasil. Métodos químicos através de reação de coloração com hidróxido de potássio e hipoclorito de cálcio, bem como análises morfológicas realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais na Universidade Federal de Pernambuco/Brasil foram utilizados para identificação da espécie (Hale, 1983). Uma amostra da espécie foi depositada no herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco sob o registro n° 34402

2.2 Obtenção do extrato orgânico a partir do talo *in natura* da *C. substellata*. Isolamento, purificação e identificação do ácido úsnico

Para obtenção do extrato orgânico, 40 g de *C. substellata* foi limpa e seca em estufa, maceradas até a formação de um pó fino, e submetida a extrações sucessivas por esgotamento à temperatura ambiente (28 ± 3 °C) com éter dietílico, clorofórmio e acetona. Os extratos permaneceram em repouso a 4 °C por 24h e posteriormente foram filtrados em papel de filtro Whatman (No. 1). Este procedimento foi repetido 5 vezes. Os extratos orgânicos obtidos foram reunidos e evaporados até a secura em rotaevaporador (Buchler Instruments, Fort Lee, NJ, USA) acoplado a banho-maria (40 °C) (Martins et al., 2010). O ácido úsnico purificado foi obtido a partir do talo *in natura* (50 g), extraído com éter dietílico, sendo isolado e purificado em coluna de sílica gel (porosidade 70-230 mesh) eluída com clorofórmio: n-hexano (80:20 v/v) (Odabasoglu et al., 2006).

2.3 Análise química do ácido úsnico purificado

2.3.1 Cromatografias em camada delgada (CCD), líquida de alta eficiência (CLAE), Ressonância magnética nuclear de prótons (RMN¹H) e Infravermelho (IV)

A CCD do extrato orgânico e do ácido úsnico purificado da *C. substellata* e do ácido úsnico padrão (Merck Darmstadt, Alemanha), foi realizada em cromatoplasas de sílica Gel F₂₅₄₊₃₆₆, 20x20 cm, com 0.20 mm de espessura (Merck Darmstadt, Alemanha) e desenvolvidas no sistema de solventes tolueno/dioxano/ácido acético (180:45:5 v/v/v, respectivamente). Após evaporação do solvente as bandas foram visualizadas sob luz UV curta e longa (254 e 366 nm, respectivamente). Posteriormente o cromatograma foi borrifado com ácido sulfúrico a 10% e aquecidas a 50 °C por 20 minutos para que fossem evidenciadas as bandas por reação de coloração. Os resultados foram avaliados mediante cálculos dos valores de R_f do extrato orgânico comparado com os ácidos úsnico purificado e o padrão (Merck Darmstadt, Alemanha) (Culberson, 1972).

Para a análise em CLAE, as amostras 0,1 mg dos ácidos úsnicos purificado e padrão foram injetadas em cromatógrafo líquido Hitachi (655 A-11, Tokyo, Japan), acoplado em detector UV a 254 nm (655 A-11, Tokyo, Japan), em coluna (RP 18 MicroPack MCH-18, 300-4 mm, Berlin, Alemanha) de fase reversa, tendo como fase móvel metanol/ água/ ácido acético (80: 19,5: 0,5 v/v/v, respectivamente) com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ 0.04 de atenuação a temperatura ambiente (28 ± 3 °C). Os resultados foram analisados através da comparação entre os tempos de retenção (TR) do ácido úsnico purificado e do padrão de ácido úsnico (USN) Merck[®] (Legaz e Vicente, 1983).

A confirmação da estrutura molecular do ácido úsnico purificado foi obtida através de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN¹H) realizada em espectrofotometro a 300 MHz Varian UNITY e infravermelho (IV) em espectrômetro acoplado a transformador Bruker Fourier (modelo IF 566), utilizando pastilhas de KBr.

2.4 Armazenamento e criação dos insetos

O *P. nigrispinus* e o *A. argillacea* foram mantidos no Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Agronomia/Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE. O *P. nigrispinus* foi armazenado em cúpula de vidro (21,5 cm de altura e 14,4 cm de diâmetro), forradas com papel toalha, como substrato para oviposição, mantidos a 28±1 °C, 53±5% de umidade relativa, fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro) e alimentadas

com pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). O *A. argillacea* foi mantido em gaiolas de PVC (21,5 cm de altura e 14,4 cm de diâmetro), sendo as mariposas alimentadas com solução de mel e as pupas com folhas de algodão acala (Oliveira et al., 2002).

2.5 Ensaios biológicos com o *A. argillacea* e *P. nigrispinus*

Ninfas do 5º instar do *P. nigrispinus* e lagartas do 1º instar do *A. argillacea* foram tratados topicamente (0,5 µL) com ácido úsnico purificado e com o extrato orgânico reunido solubilizados em acetona pura, nas concentrações de 0.25, 0.50, 1, 1.5 e 2 mg mL⁻¹ e o grupo controle tratado apenas com acetona pura. O desenho experimental constou de 10 insetos para cada grupo testemunha e 10 insetos para cada concentração testada com 10 repetições. Foram observadas mortalidade, alterações morfológicas nas lagartas, assim como a fase de pupas e eclosão dos adultos e, ainda o tempo de sobrevivência dos *P. nigrispinus*, emergências dos adultos, bem como as posturas (Torres et al., 2002).

2.6 Análise estatística

O percentual de sobrevivência (%) para cada tratamento foi expresso através da média do erro padrão e as diferenças significativas foram determinadas utilizando o Student's t-test ($p < 0.05$), no programa Proc Lifetest of the SAS Institute 2001 (SAS/STAT User's guide, version 8.2, TS level 2MO. SAS Institute. Inc., Cary, N.C).

3. Resultados e Discussão

A cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a presença do ácido úsnico no extrato orgânico reunido (R_f 0.89), além de bandas correspondentes a substâncias acessórias (R_f s, 0.42, 0.55, 0.62 e 0.89) que podem ser encontradas no talo *in natura* da *C. substellata* (Figura 1). De acordo com Ahti et al. (1993), os ácidos estístico, criptostítico, constístico e connortístico podem ser encontrados em espécies coletadas na Região Nordeste do Brasil. Os resultados encontrados na CCD para os ácidos úsnico purificado e padrão (R_f 0.89) foram confirmados através das análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (TR 14.59 e 14.93 min) (Figura 2A, 2B, respectivamente), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN H^1) e infravermelho (IV). O grau de pureza do ácido úsnico purificado foi > 98%.

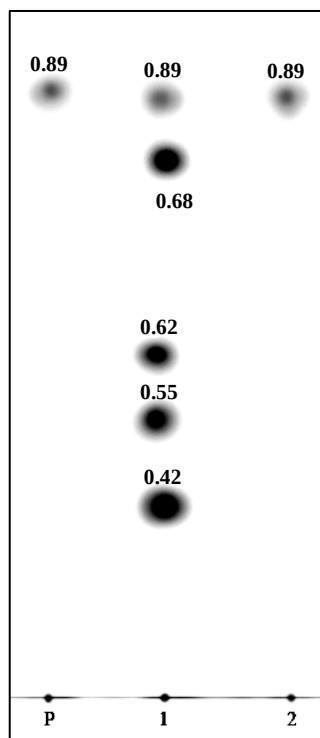


Figura 1: Cromatograma em camada delgada (CCD). P- Ácido úsnico padrão Merck (R_f 0,89); 1- Extrato orgânico reunido (R_f 0.42; 0.55; 0.62; 0.88; 0.89); 2- Ácido úsnico purificado (R_f 0,89)

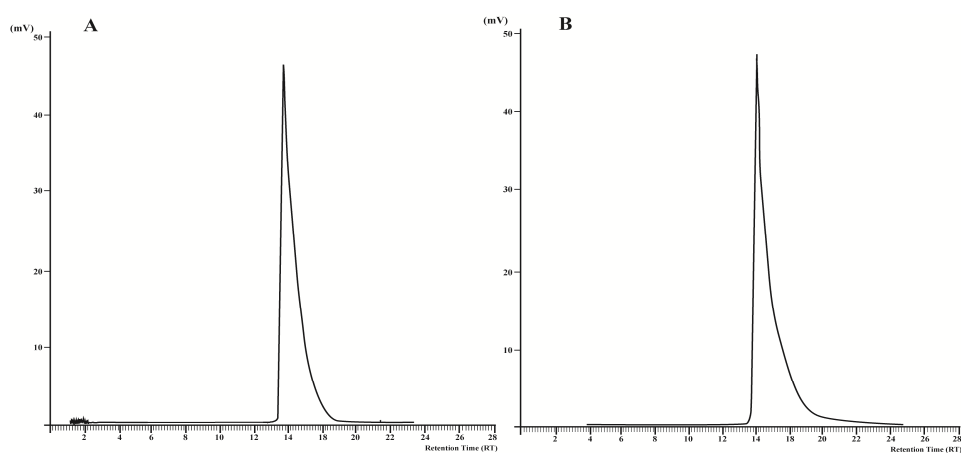


Figura 2: Cromatograma líquido de alta eficiência (CLAE). A- Ácido úsnico purificado (TR 14.59); B- Ácido úsnico padrão Merk (TR 14.93)

As análises de RMN ^1H e o infravermelho mostraram os seguintes resultados: o ácido úsnico sólido amarelo cristalino, PF, 201-203°C, $[\alpha]_D$ a 25 °C + 493° (CHCl_3 c, 1,00), RMNH^1 (300 MHz, DMSO-d_6) δH (H; *mult.*; int.): 1,73 (3H; s, CH_3 -13), 2,08 (3H; s, CH_3 -16), 2,64 (3H; s, CH_3 -15), 2,65 (3H; s, CH_3 -18), 5,92 (1H; s, C-4-H), 11,04 (1H; s, C-10-OH), 13,29 (1H; s, C-8-OH), 18,89 (1H; s, C-3-OH). IV (KBr): 3090, 3007, 2930, 1692, 1632, 1560, 1454, 1370, 1357, 1340, 1330, 1289, 1230, 1190, 1143, 1118, 1070, 1039, 959, 940, 840, 818, 700 cm^{-1} .

A avaliação da sobrevivência do *A. argillacea* revelou a suscetibilidade das lagartas tratadas com o ácido úsnico purificado cujo percentual de sobrevivência foi a abaixo de 50% tanto para o extrato orgânico como para o ácido úsnico purificado em todas as concentrações testadas com dois dias de tratamento, porém as concentrações de 1.0; 1.5 e 2.0 mg mL^{-1} causaram maior mortalidade, não havendo diferença estatística entre elas ($P < .0001$). O extrato orgânico da *C. substellata* se mostrou mais eficiente que o ácido úsnico purificado. Após 2 dias do tratamento a sobrevivência foi menor que 10% para todas as concentrações testadas, chegando a 1% após cinco dias para concentração de 2 mg mL^{-1} . Todas as concentrações testadas, tanto para o ácido úsnico purificado como para o extrato orgânico foram significativamente diferentes do grupo testemunha (Figura 3 A e B).

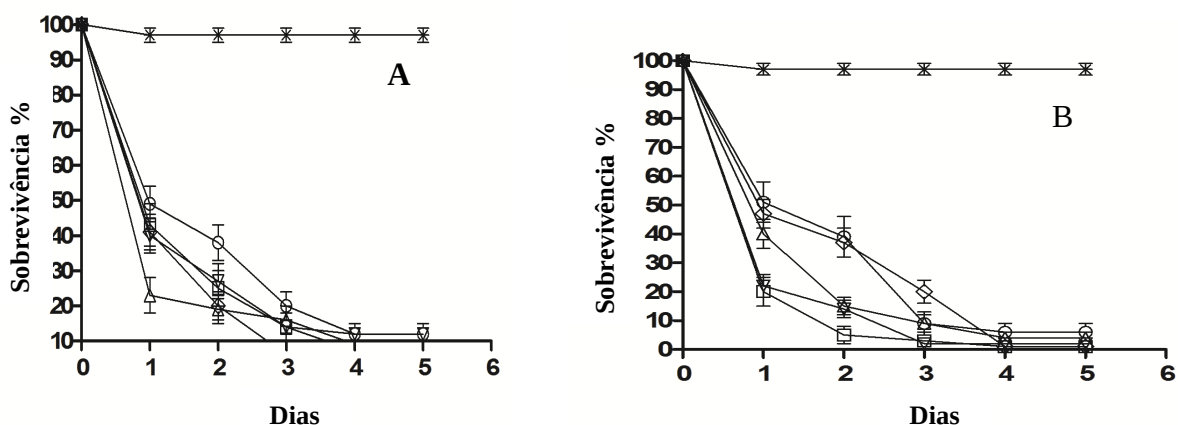


Figura 3: Percentual de sobrevivência do *Alaboma argillacea* tratado com o ácido úsnico nas purificado concentrações de 0.25(⊕), 0.50 (⊞), 1(Δ), 1.5(▽) e 2(◇) mg mL^{-1} e (*) controle. A- tratamento com ácido úsnico purificado e B- tratamento com o extrato orgânico reunido da *Cladonia substellata*

As lagartas que sobreviveram aos tratamentos foram mantidas e observadas até a fase adulta, bem como sua progênie. As substâncias não afetaram o desenvolvimento em nenhuma fase do ciclo de vida, consequentemente as mariposas adultas fêmeas fizeram oviposição

normal, com lagartas eclodidas sem nenhuma mortalidade ou malformação. Estes resultados são diferentes daqueles apresentados por Giez et al. (1994), que mostraram que o ácido pulvínico e seus derivados quando incorporados a dieta artificial da *Spodoptera littoralis* causam perda de peso nas lagartas, levando atraso ao seu crescimento. O ácido úsnico purificado não pode ser incorporado à dieta das lagartas, por ter baixa solubilidade em água, sendo somente solúvel em solventes orgânicos, como a acetona, o que o torna inadequado para impregnação nas folhas do algodão que é o alimento exclusivo das lagartas.

Percevejos predadores são normalmente muito ativos na procura de suas presas e podem se contaminar pelo resíduo seco do produto sobre a planta pelos tarsos, na higiene corporal através do uso dos tarsos sobre as demais partes do corpo, e pela alimentação de presas contaminadas. Devido às múltiplas chances de contaminação insetos predadores apresentam maior suscetibilidade a baixas concentrações dos inseticidas que as suas presas. Porém, a sobrevivência dos percevejos tratados com o ácido úsnico purificado não diferiu do grupo testemunha (95%), em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, aqueles tratados com o extrato orgânico tiveram sua sobrevivência reduzida para 29 e 31% nas concentrações de 1.0, 1.50 e 2.0 mg mL⁻¹ (Figura 4), respectivamente. Os percevejos sobreviventes não foram afetados quanto a sua fertilidade. As posturas se mantiveram normais, com eclosão dos ovos aproximadamente entre o 6º e 7º dias após a oviposição, o número de ovos variou entre 18 e 24, com ninfas vivas e desenvolvimento normal.

Os inseticidas químicos sintéticos muitas vezes não apresentam estes efeitos, ao contrário, ao mesmo tempo, que beneficiam as lavouras erradicando as pragas, atuam sobre os predadores naturais, como por exemplo, o inseticida Endosulfan que foi nocivo a duas fases do ciclo de vida do inseto; 50% das fêmeas morreram antes da realização da postura dos ovos, bem como alta mortalidade no estágio larval (Dantas et al., 2009). Em trabalho de Torres et al. (2002), foram testadas a seletividade de inseticidas e acaricidas à *P. nigrispinus*, recomendados para o controle de lagartas, o lambadacialotrina e o mocrtofós proporcionaram o controle de *A. argillacea* em mais de 90%, porém foram significativamente tóxicos à *P. nigrispinus*. Produtos de origem natural também já foram testados para o controle de *A. argillacea* visando os benefícios ecológicos que estes trazem ao meio ambiente. Segundo Miranda et al. (2002) o extrato diclorometano-etanol de *Piper tuberculatum* apresentou DL₅₀ após 72 horas de aplicação de 219 mg de extrato.inseto⁻¹, sendo uma alternativa na busca de novas substâncias ao controle de *A. argillacea*.

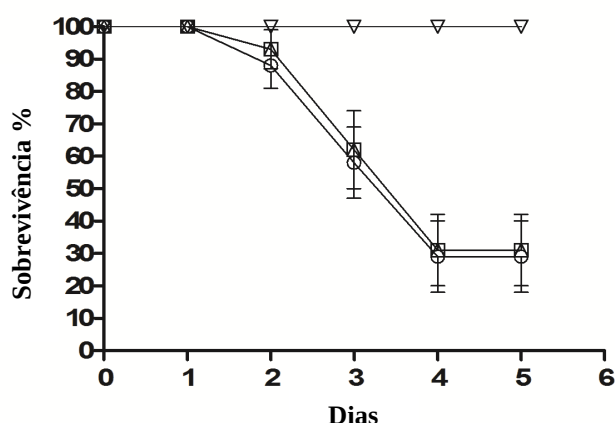


Figura 4: Percentual de sobrevivência do *Podisus nigrispinus* tratado como extrato reunido da *Cladonia substellata* nas concentrações de 1(○), 1.5(◻) e 2(△) mg mL⁻¹ e (▽) controle

No que diz respeito às substâncias líquênicas, ao longo do tempo, diferentes autores descreveram a preferência alimentar de insetos, caracóis e lesmas para determinadas espécies. Durante uma reforma no herbário, na Itália, foi verificada a presença de coleópteros, que no caso dos líquens, só consumiram parcialmente algumas amostras dependendo das substâncias líquênicas neles contidas. Aqueles talos que continham ácido úsnico não foram atacados em nenhuma porção do talo (Nimis e Skert, 2006). Segundo Pöykkö et al. (2010), as substâncias líquênicas tem um papel fundamental na defesa química contra insetos liquenívoros, no entanto, a ação sobre eles depende do estágio do ciclo de vida de cada um e da espécie líquênica que está sendo consumida. A *Cleorodes lichenaria*, evita se alimentar de *Hypogymnia physodes*, pois o ácido fisódico presente nesta espécie é letal para suas larvas.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com trabalhos que reportam sobre a atividade inseticida do ácido úsnico. Emmerich et al. (1993) analisaram as atividades inseticida e anti-alimentar após injetar o ácido úsnico na hemolinfa da praga do algodoeiro *Spodoptera littoralis*, observando alta mortalidade, significativo retardo no crescimento, bem como um aumento no período larval, com CL₅₀ de 8.6 µmol g⁻¹. No presente estudo utilizamos o teste tópico, entretanto, não foi observado nenhum efeito sobre o crescimento ou aumento do período larval, porém também observamos alta mortalidade do *A. argillacea*. Resultados semelhantes aos nossos, também utilizando o ácido (+) úsnico, demonstrou a alta atividade larvicida sobre o *Culex pipiens* e *Culiseta longiareolata* (Diptera), com CL₅₀ 0.8

ppm e CL₅₀ 0.48 ppm, respectivamente para os enantiômeros ácidos (+) e (-) úsnico foram registrados por Cetin et al. (2008; 2012).

Embora não determinando os mecanismos de ação das substâncias liquênicas sobre este tipo de inseto, há relatos na literatura destas substâncias apresentarem efeitos tóxicos sobre a microbiota intestinal dos insetos (Lawrey, 1980), uma vez que as substâncias liquênicas são bactericidas (Honda et al., 2010), além de reduzirem a palatabilidade do talo para evitar o ataque de predadores. Entretanto, podemos inferir que o ácido úsnico e o extrato orgânico reunido da *C. substellata* foram eficientes quando aplicados topicamente sobre as larvas no 3º instar do *A. argillacea* em baixas concentrações. Por outro lado, as substâncias não apresentaram nenhum efeito tóxico sobre seu predador natural o *P. nigrispinus*, indicando seu potencial bioinseticida.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

4. Referências

- Ahti T, Stenroos S, Xavier-Filho L (1993) The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. *Tropical Bryology* 7: 55-70.
- Cetin H, Tufan-Cetin O, Turk AO, Tay T, Canadian M et al. (2008) Insecticidal activity of major lichen compounds (-) and (+) usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. *Parasitology Research* 102: 1277-1279.
- Cetin H, Tufan-Cetin O, Turk AO, Tay T, Canadian M et al. (2012) Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae). *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 26: 350-355.
- Culberson CF (1972) Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer chromatographic method. *Journal Chromatography Amsterdam* 2: 113-125.
- Dantas PC, Poderoso JCM, França-Santos A, Correia-Oliveira G et al (2009). Efeito de inseticidas organossintéticos na atividade alimentar de *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (Heteroptera: Pentatomidae). *Scientia Plena* 5: 111-117.
- Emmerich R, Giez I, Lange OL, Proksch P (1993) Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry* 33: 1389-1394.
- Giez I, Lange OL, Proksch P (1994) Growth Retarding Activity of Lichen Substances Against the Polyphagous Herbivorous Insect *Spodoptera littoralis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 22: 113-120.
- Hale-Jr ME (1983) The biology of lichens. 3rd edn. Edward Arnold Pub. London.
- Honda NK, Pavan FR, Coelho RG, Andrade Leite SR, Micheletti AC et al (2010). Antimicrobial activity of lichen substances. *Phytomedicine* 17, p: 328-332.
- Ingólfssdóttir K (2002) Usnic acid. *Phytochemistry* 61: 729-36.
- Lawrey JD (1980). Correlations between lichen secondary chemistry and grazing activity by *Pallifera varia*. *Bryologist* 23: 128-134.
- Legaz ME, Vicente C (1983) Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiology Lancaster* 71: 300-301.
- Luttrell RG, Fitt GP, Ramalho FS, Sugonyaev ES (1994) Cotton pest management: Part 1. A worldwide perspective. *Annual Review Entomology* 39: 517-26.
- Martinelli S, Omoto C (2006) Resistência de lepidópteros-praga a inseticidas na cultura do algodão no Brasil. *Revista Brasileira Oleífera Fibrosa* 10: 1167-82.

Martins MCB, Lima MJG, Silva FP, Azevedo-Ximenes, E et al (2010) *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. Brazilian Archives Biology Technology 53: 115-122.

Miranda JE, Oliveira J, Rocha KCG, Bortoli AS, Navickiene HMD et al (2002) Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuide). Revista Brasileira Oleífera Fibrosa 6: 557-563.

Nimis PL, Skert N (2006). Lichen and selective grazing by the coleopteran *Lasioderma serricorne*. Environmental Experimental of Botany 55: 175-182.

Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A et al (2006) Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. Journal Ethnopharmacology 103: 59-65.

Oliveira JEM, Torres JB, Carrano-Moreira AF, Ramalho FS (2002) Biologia de *Podisus nigrispinus* predando lagartas de *Alabama argillacea* em campo. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37: 7-14.

Pöykkö H, Bačkor M, Bencúrová E, Molcanová V, Bačkorová M et al (2010) Host use of a specialist lichen-feeder: dealing with lichen secondary metabolites. Oecologia 164: 423-430.

Saito ML, Lucchini F (1998) Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. CNPMA. Jaguariúna, SP.

Sujii ER, Bezerra VA, Ribeiro P H, Silva-santos PV, et al (2007) Comunidade de inimigos naturais e controle biológico natural do pulgão, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) e do curuquerê, *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodoeiro. Arquivos Instituto Biologia 7: 329-36.

Torres JB, Silva-Torres, Christian AS, Silva MR et al (2002) Compatibilidade de inseticidas e acaricidas com o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) em algodoeiro. Neotropical entomology 31: 311-317.

4 CONCLUSÕES

- ❖ Os extratos etéreos, clorofórmico, acetônico e o ácido barbático purificado da *Cladia aggregata* demonstram atividade antimicrobiana contra linhagens de bactérias Gram-positivas. As linhagens multiresistentes e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* foram as mais sensíveis quando tratadas com ácido barbático purificado.
- ❖ O extrato reunido bem como o ácido úsnico purificado da *Cladonia substellata* mostraram significativa ação inseticida contra o a lagarta do *Alabama argillacea*. O ácido úsnico purificado não apresentou efeito sobre o seu predador natural, o percevejo, *Podisus nigrispinus* e o extrato orgânico não apresentou mortalidade significativa mesmo nas concentrações acima de 1 mg mL⁻¹, quando tratados topicamente. O usnato de potássio utilizados no teste por ingestão não teve efeito sobre a lagarta e/ou sobre o percevejo.
- ❖ Os ácidos purificados fumarprocetrário da *Cladonia verticillaris*, úsnico da *C. substellata* e barbático da *C. aggregata* afetaram significativamente a sobrevivência dos cupins operários, *Nasutitermes corniger*, sem nenhum efeito sobre a sobrevivência dos soldados.
- ❖ O extrato etéreo e ácido barbático purificado da *Cladia aggregata* demonstraram citotoxicidade para as linhagens de células tumorais HEP-2 (adenocarcinoma de laringe), NCI-H292 (carcinoma muco epidermóide de pulmão) e KB (carcinoma epidermóide nasofaríngeo) e o ácido barbático purificado reduziu o peso do tumor sólido Sarcoma-180.
- ❖ O usnato de potássio obtido a partir do ácido úsnico, o extrato etéreo e o ácido barbático purificado da *Cladia aggregata* apresentaram potente atividade moluscicida sobre a *Biomphalaria glabrata*. Exceto o ácido barbático, tanto o usnato quanto o extrato etéreo foram embriotóxicos, nos embriões na fase de blástula. Nenhuma das substâncias mostrou toxicidade ao bioindicador ambiental *Artemia salina*.

ANEXOS

ANEXO A - MATERIAIS E MÉTODOS

A 1. Coleta e armazenamento do material liquênico em herbário: o material liquênico foi coletado nos meses de dezembro (2008) e janeiro (2009), período quente e seco. A *C. verticillaris* foi coletada no Município de Alhandra – PB, a *C. substellata* em Mamanguape – PB e a *C. aggregata* em Bonito – PE. Cerca de 200 g do material de cada espécie, foram coletados e acondicionados em sacos de papel e conservado à temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ$ C). Uma amostra de cada espécie (10 g) foi depositada no herbário UFP da Universidade Federal de Pernambuco, sob os registros n° 361638 (*C. verticillaris*), 34402 (*C. substellata*), 36431 (*C. aggregata*).

A 2. Reação de coloração e análise química do talo *in natura* para identificação dos fenóis presentes nas amostras coletadas: para realização dos testes químicos, as amostras do talo foram adicionadas soluções de hidróxido de potássio e/ou hipoclorito de sódio no córtex e na medula a fim de obter uma reação de coloração, observadas com o auxílio de microscópio estereoscópico, indicando a presença de determinados fenóis nas diferentes espécies coletadas. Para confirmação da presença dos fenóis, 10 mg de cada espécie foram limpas com o auxílio microscópio estereoscópico, para garantir a homogeneidade das espécies e a remoção de fragmentos e/ou resíduos sólidos ou substratos incrustados na superfície dos líquens. Em seguida cada amostra liquênica foi submetida a extração com éter, clorofórmio e acetona para obtenção de extratos orgânicos e posterior avaliação do conteúdo fenólico, através de cromatografia em camada delgada (CCD), de cada uma das espécies (HUNECK; YOSHIMURA, 1996).

A 3. Obtenção dos extratos orgânicos do talo *in natura* através de extração por esgotamento: A *C. substellata* triturada (75 g) foi submetida a extrações sucessivas com éter dietílico permanecendo sob agitação mecânica durante 1 h a temperatura ambiente. O extrato etéreo obtido foi filtrado e mantido a temperatura de $\pm 4^\circ$ C. Ao resíduo foi adicionado novamente éter dietílico e repetido o mesmo processo de extração por mais 4 vezes. Este procedimento também foi feito para o clorofórmio e em seguida para acetona. Os extratos

etéreo, clorofórmico e acetônico foram evaporados separadamente até a secura em banho-maria 40 °C, acoplado em rotaevaporador e em seguida foram reunidos. O mesmo método de extração foi utilizado para *C. aggregata* (75 g) utilizando somente éter dietílico para obtenção do extrato etéreo e para *C. verticillaris* (75 g) foi utilizada somente acetona para obtenção do extrato acetônico. Todas as amostras foram avaliadas através das cromatografias em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE) e comparadas com padrão do ácido úsnico comercial Merck® (PEREIRA et al., 1996).

A 4. Isolamento e purificação dos ácidos liquênicos: o ácido úsnico foi isolado a partir de 75 g do talo da *C. substellata* que foi triturado e submetido à extração somente com éter dietílico em aparelho de Soxhlet a 40 °C por 72 h; em seguida concentrado até a secura em rotaevaporador acoplado a banho-maria a 40 °C. Para purificação da substância, o extrato etéreo da *C. substellata* foi fracionado em coluna de sílica gel (porosidade 70-230) e eluída com o sistema de solvente clorofórmio: n-hexano (80:20 v/v) conforme a metodologia de Odabasoglu et al. (2006).

A modificação da molécula do ácido úsnico purificado em usnato de potássio foi obtida com o ácido úsnico parcialmente dissolvido em água destilada a 40 °C e em seguida adicionado hidróxido de potássio a 10%, pH 11. A amostra foi congelada em freezer -80 °C e posteriormente liofilizada (ASAHINA e SHIBATA, 1954). O grau de pureza (> 95%) do ácido úsnico purificado foi avaliado através de CCD, CLAE e a confirmação da estrutura da molécula foram realizadas através da análise do espectro de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ¹H) e infravermelho (IV). O usnato de potássio foi analisado por IV.

O ácido barbático foi isolado a partir do extrato etéreo da *C. aggregata* obtido conforme o item 5.2, e purificado através de sucessivas lavagens com clorofórmio em funil G4 de fundo poroso até a obtenção da molécula pura (> 95%) que foi analisada através de CCD e CLAE e confirmada pelos espectros de ressonância magnética nuclear de prótons e carbono 13 (RMN ¹H e ¹³C), IV, ultravioleta e infravermelho (UV) (ASAHINA e SHIBATA, 1954).

O ácido fumarprotocetrárico foi isolado a partir do extrato acetônico da *C. verticillaris* obtido conforme o item 5.2. O extrato acetônico foi dissolvido em acetona e precipitado em metanol gelado, sendo mantida a temperatura de ± 4 °C até a formação de um pó branco que foi separado do líquido por filtração em funil G4 de fundo poroso. O grau de pureza (> 95%) foi avaliado por CCD e CLAE. A confirmação da molécula do ácido fumarprotocetrárico foi realizada por RMN ^1H e infravermelho (ASAHINA e SHIBATA, 1954).

A 5. Análises químicas

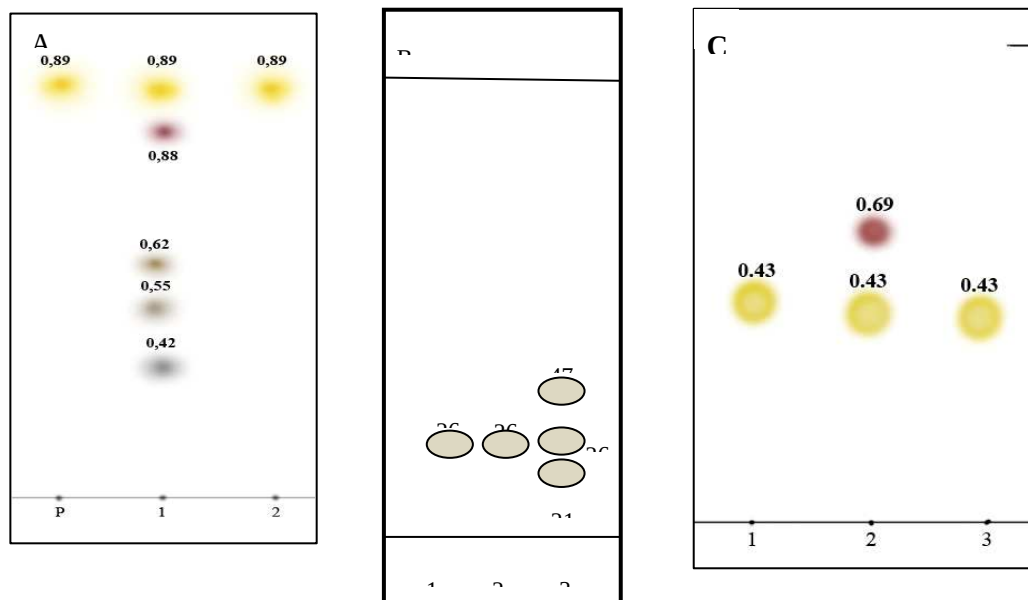
A 5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD): Os extratos orgânicos assim como as substâncias purificadas foram avaliados qualitativamente através da cromatografia em camada delgada (Figura 1 A, B e C). Amostras de 0,1 mg dos extratos orgânicos foram dissolvidas em acetona, aplicadas em placas de sílica Gel 60 F₂₅₄+ 366 Merk de 20 x 20 cm, e desenvolvidas, de forma ascendente, nos sistemas de solventes A (tolueno/ dioxano/ ácido acético, 36:9:1, v/v) para os extratos reunidos da *C. substellata*, para o extrato etéreo da *C. aggregata* e para os ácido úsnico e barbático e o sistema B (hexano/éter/acido fórmico, 6,5:4:1 v/v), para o extrato acetônico da *C. verticillaris* e o ácido fumarprotocetrárico. As bandas foram visualizadas sob luz UV curta (254 nm) e longa (366 nm), posteriormente borrifadas com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 60 °C por 20 minutos, para que fossem evidenciadas as bandas por reação de coloração. Os resultados foram avaliados mediante cálculo dos valores de R_fs, que foram comparados aos padrões dos ácidos úsnico, barbático e fumarprotocetrárico (CULBERSON, 1972).

Figura 1 - Cromatogramas em camada delgada - CCD

A- *Cladonia substellata*. P- padrão USN Merck; 1- extrato reunido; 2- ácido úsnico purificado.

B- *Cladonia verticillaris*. 1- padrão do FUM; 2- FUM purificado; e 3- extrato acetônico

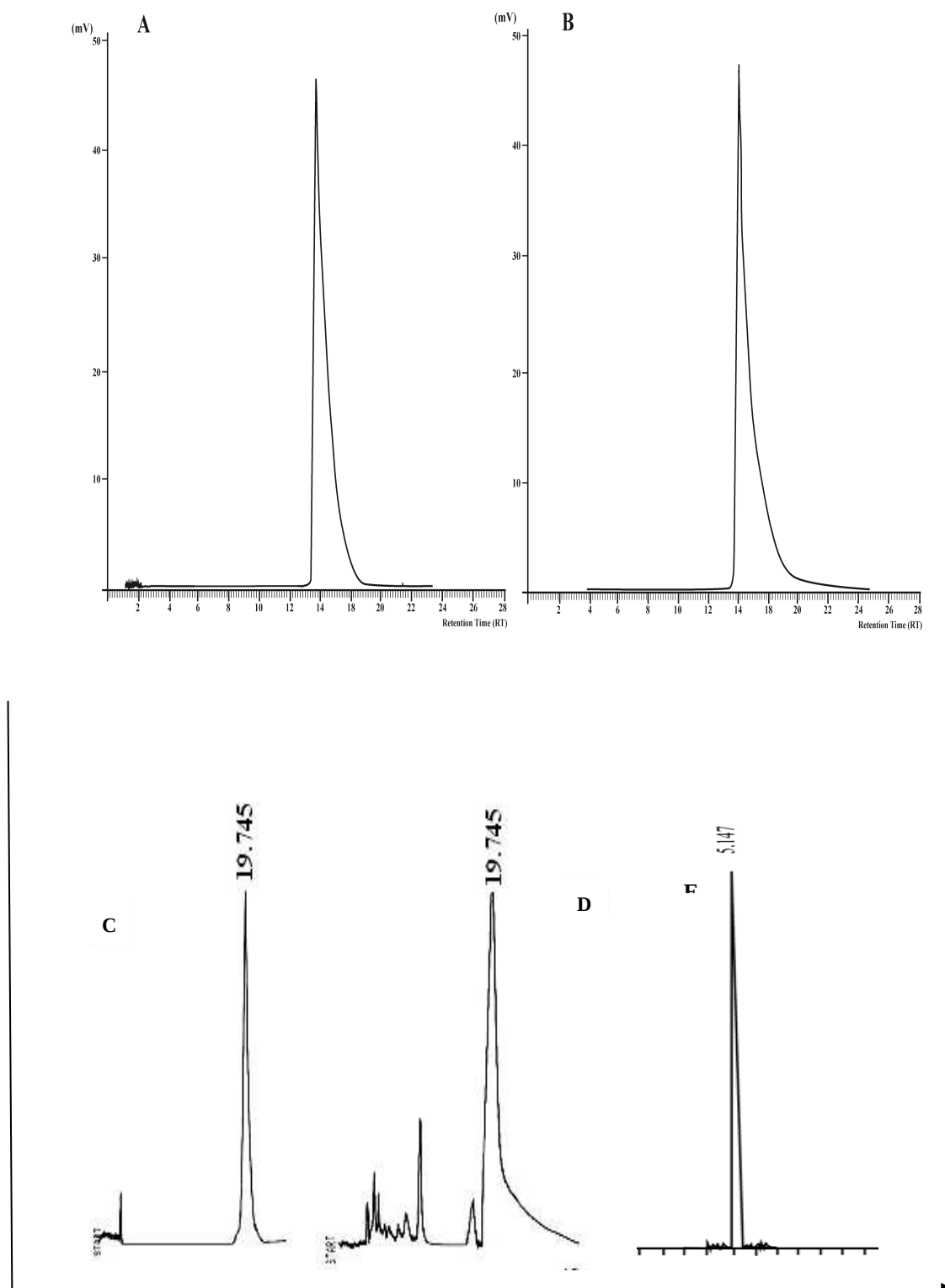
C- *Cladia aagreaata*. 1- padrão do BAR; 2- extrato etéreo; 3- ácido barbático purificado



Fonte: Autor (2010)

A 5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): Os extratos orgânicos (1mg) e as substâncias purificadas (0,1mg) foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado em detector UV a 254nm (figura 2). As amostras foram injetadas em coluna C18 de fase reversa, tendo como fase móvel metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v), em fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Os resultados foram analisados pelo tempo de retenção (RT) da substância na coluna e comparados com os padrões, dos ácidos fumarprotocetrárico, úsnico e barbático (LEGAZ e VICENTE, 1983).

Figura 2 - Cromatogramas líquido de alta eficiência. *Cladonia substellata*. A- Ácido úsnico padrão Merck® TR 14.93 min e B- Ácido úsnico purificado TR 14.59 min; *Cladia aggregata*. C- Ácido barbático purificado TR 19.745 min e D- extrato etéreo TR 19.745 min; *Cladonia verticillaris*. E- ácido fumarprotocetrárico



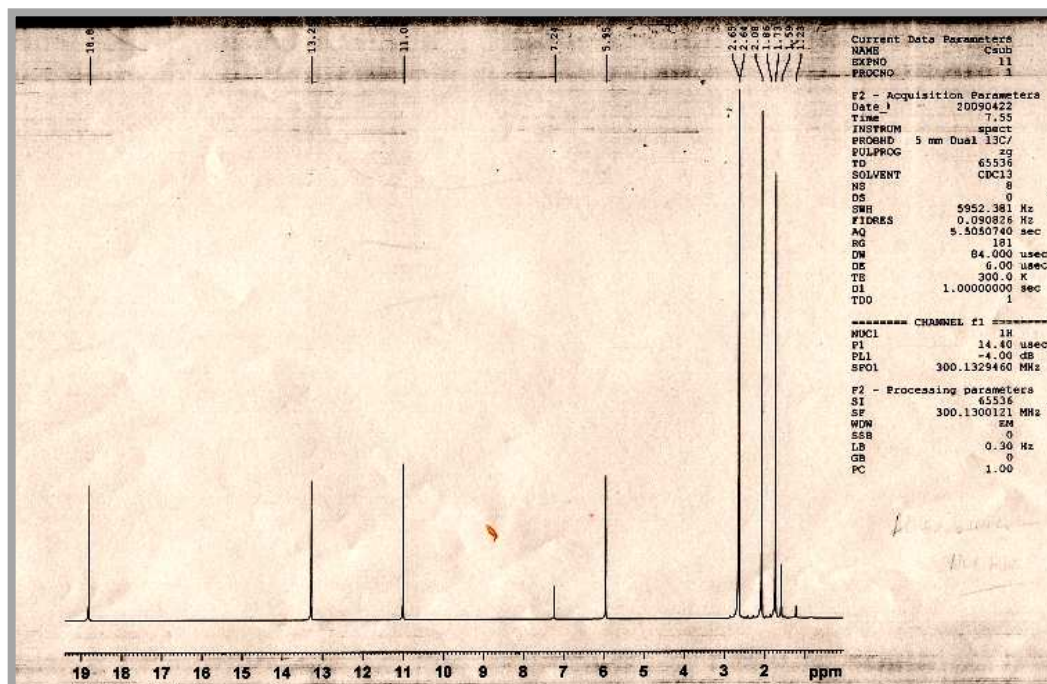
A 5.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^1H), ^{13}C e infravermelho (IV) das substâncias purificadas: o espectro de ^1H e ^{13}C foi registrado em espectrofotômetro Varian Unity Plus 300 MHz. O RMN ^{13}C foi realizado a 75 MHz e o ^1H a 300 MHz usando DMSO- d_6 como solvente em tubos de 5 mm a temperatura ambiente. A análise por infravermelho foi realizada com espectrofotômetro com transformador Bruker Fourier, modelo IF 566 usando pastilhas de KBr.

A 5.3.1 Ressonâncias magnéticas nucleares de prótons (RMN ^1H) dos ácidos úsnico (USN), fumarprotocetrárico (FUM) e do ácido barbático (BAR)

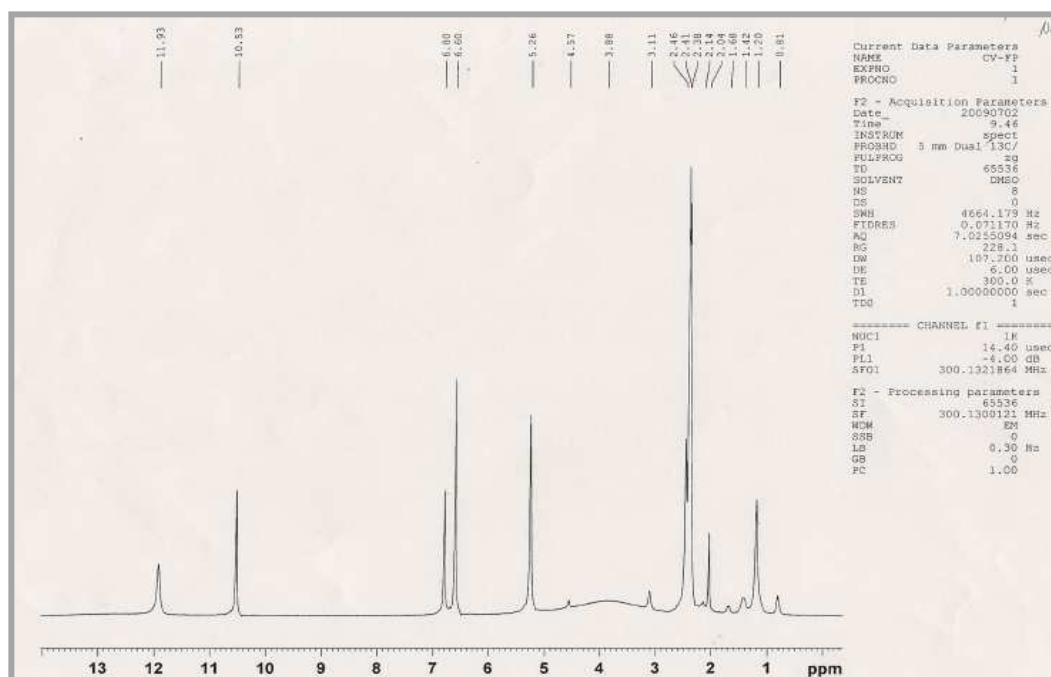
A 5.3.1.1 USN: Cristal sólido amarelo, PF, 201-203°C, $[\alpha]_D$ a 25 °C + 493° (CHCl_3 c, 1.00 ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δH (H; *mult.*; int.): 1.73 (3H; s, CH_3 -13), 2.08 (3H; s, CH_3 -16), 2,64 (3H; s, CH_3 -15), 2.65 (3H; s, CH_3 -18), 5.92 (1H; s, C-4-H), 11.04 (1H; s, C-10-OH), 13.29 (1H; s, C-8-OH), 18.89 (1H; s, C-3-OH) (Figura 3).

A 5.3.1.2 FUM: Branco sólido, PF. 252-260 °C (decomposição), ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δH (H; *mult.*; int.): 2.38 (3H; s; CH_3 -9), 2.41 (3H; s; CH_3 -9'), 5.26 (2H; s; CH_2 -8'), 6.60 (2H; s; CH -2'; CH -3'), 6.80 (1H; s; CH -5), 10.53 (1H; s; CH -8), 11.93 (1H; s; C-4-OH ou C-2'-OH) (Figura 4).

A 5.3.1.3 BAR: Sólido cinza, PF, 188-189 °C, ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): 1.99 (3H; s; CH -8'), 2.00 (3H; s; CH_3 -8), 2.47 (3H; s; CH -9'), 2.56 (3H; s; CH_3 -9), 3.86 (3H; s; CH_3 -O-4), 6,60 (1H; s; CH -5), 6.69 (1H; s; CH -5'), 10.73 (1H; s; C-2-OH).

Figura 3 - RMN ^1H do ácido úsnico isolado da *Cladonia substellata*

Fonte: Honda (2010)

Figura 4 - RMN ^1H do ácido fumarprotocetrárico isolado da *Cladonia verticillaris*

Fonte: Honda (2010)

A 5.3.2 Ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN¹³C) do ácido barbático

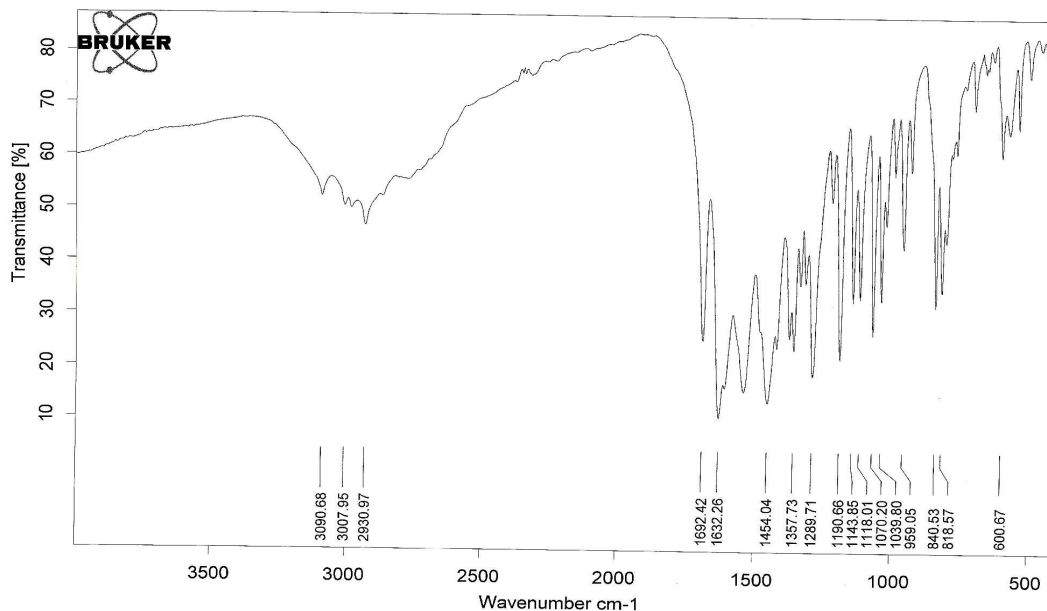
¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ 8.1 (Me-8), 22.8 (Me-9), 9.1 (Me-8'), 23.8 (Me-9'), 55.7 (MeO-4), 110.0 (C-1), 151.8 (C-2), 106.3 (C-4), 161.3 (C-4), 107.1 (C-5), 138.9 (C-6), 168.6 (C-7), 159.4 (C-1'), 111.4 (C-2'), 161.1 (C-3'), 116.1 (C-4'), 139.0 (C-5'), 116.1 (C-6'), 173.2 (C-7').

A 5.3.3 Infravermelho das substâncias utilizadas nos bioensaios

A 5.3.3.1 Espectroscopia de infravermelho do ácido úsnico (USN)

IV. (KBr): 3090, 3007, 2930, 1692, 1632, 1560, 1454, 1370, 1357, 1340, 1330, 1289, 1230, 1190, 1143, 1118, 1070, 1039, 959, 940, 840, 818, 700 cm⁻¹ (Figura 5).

Figura 5 – Espectroscopia de infravermelho do ácido úsnico isolado da *Cladonia substellata*

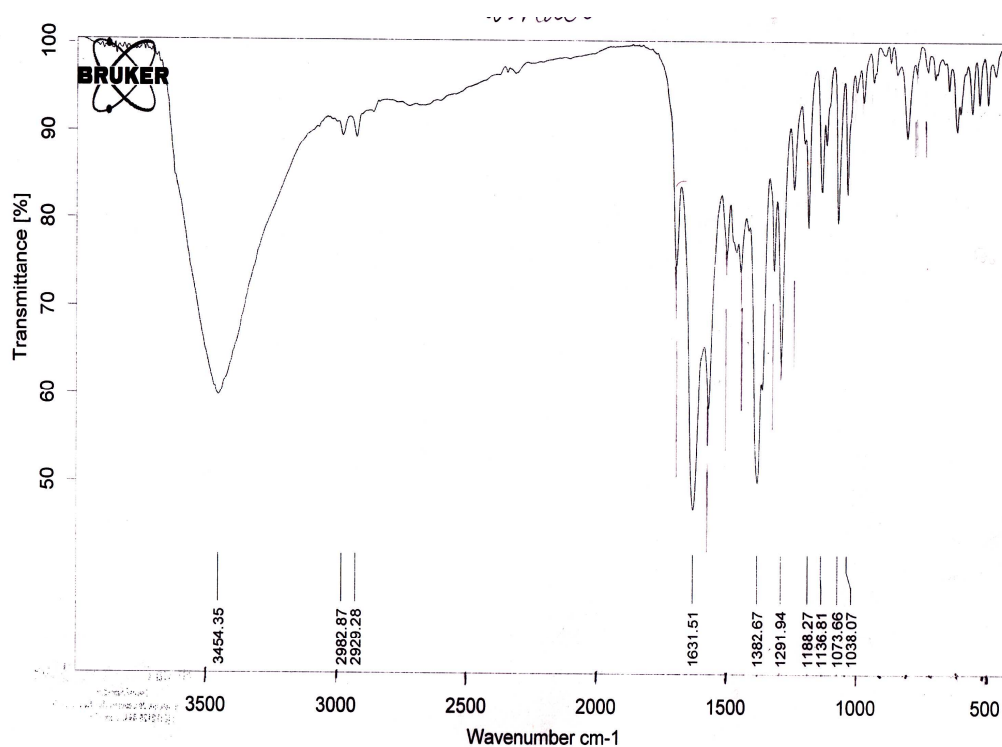


Fonte: Central de Química Analítica da UFPE (2010)

A 5.3.3.2 Espectroscopia de infravermelho do usnato de potássio

IV. (KBr): 3454, 2982, 2929, 1687, 1631, 1540, 1480, 1460, 1382, 1330, 1291, 1240, 1140, 1188, 1136, 1073, 1038, 980, 940, 880, 840, 820, 770, 730, 700 cm^{-1} (Figura 6).

Figura 6 - Espectroscopia de infravermelho do usnato de potássio

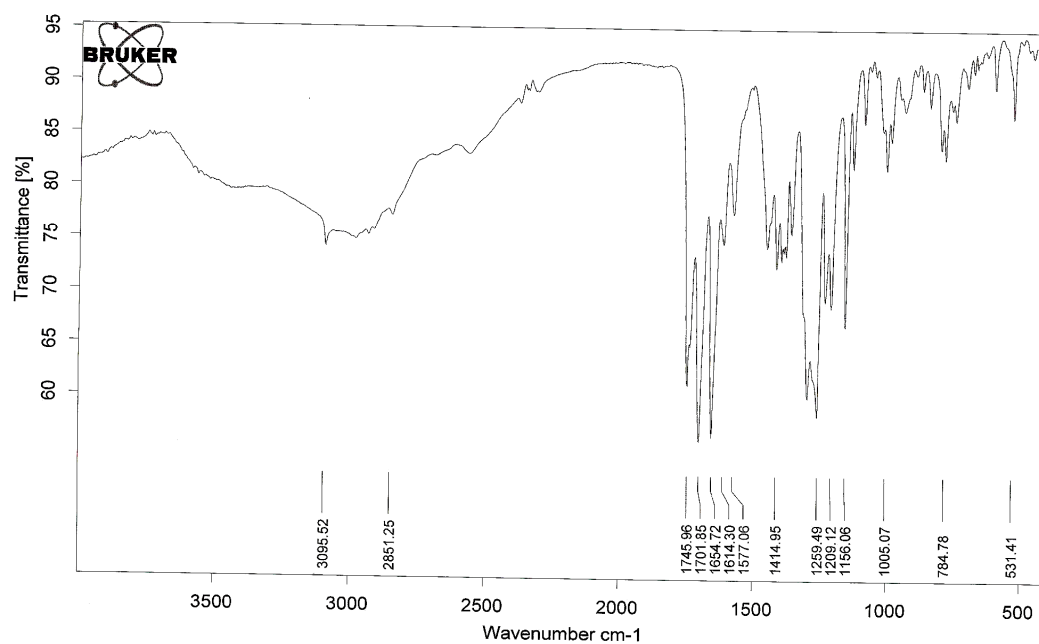


Fonte: Central de Química Analítica da UFPE (2010)

A 5.3.3.3 Espectroscopia de infravermelho do ácido fumarprotocetrárico (FUM)

IV. (KBr): 3490, 3095, 2950, 2851, 1745, 1701, 1654, 1329, 1259, 1229, 1209, 1156, 1105 cm^{-1} (Figura 7).

Figura 7 – Espectroscopia de infravermelho do ácido fumarprotocetrárico isolado da *Cladonia verticillaris*

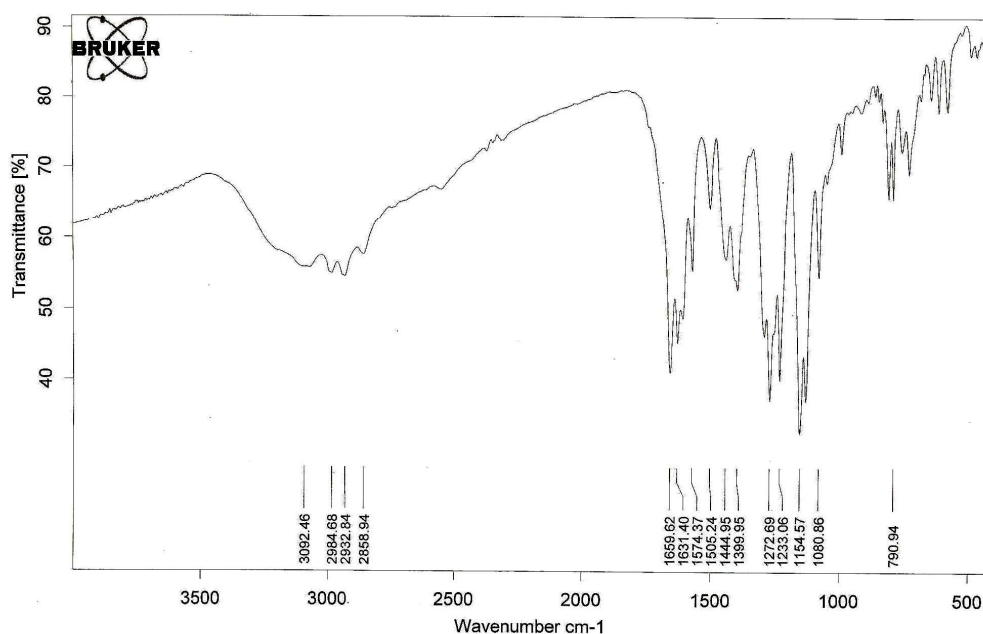


Fonte: Central de Química Analítica da UPFE (2010)

A 5.3.3.4 Espectroscopia de infravermelho do ácido barbático (BAR)

IR. (KBr): 3092, 2992, 2984, 2858, 1659, 1631, 1399, 1290, 1272, 1233, 1154, 1080 cm^{-1} (Figura 8).

Figura 8 – Espectroscopia de infravermelho do ácido barbático isolado da *Cladia aggregata*



Fonte: Central de Química Analítica da UFPE (2010)

A 5.4 Ultravioleta (UV) do ácido barbático purificado (BAR)

UV λ nm ($\log \epsilon$): 277 (4.28), 304 (3.82)

A 5.5 Análise elementar do usnato de potássio

Resultado de Análise Elementar

Data: 17/2/2011

Operador: Eliete/Severino

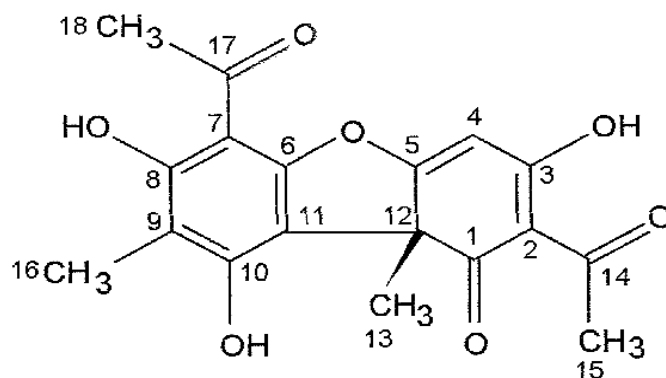
Usuário: Prof. Nicacio

Amostra	Arquivo	% de Nitrogênio	% de Carbono	% de Hidrogênio	% de Enxofre
USNATO	J0216_1	0	47.68991089	4.612298012	0

A 5.6 Estruturas químicas das substâncias purificadas dos líquens utilizadas nos bioensaios

A 5.6.1 Estrutura química do ácido úsnico purificado (Figura 9)

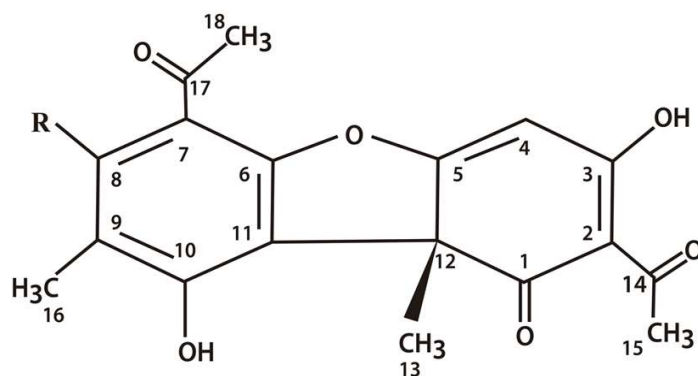
Figura 9 - Estrutura química do ácido úsnico purificado obtida a partir dos dados de RMN ^1H



Fonte: Autor (2010)

A 5.6.2 Estrutura química do usnato de potássio (Figura 10)

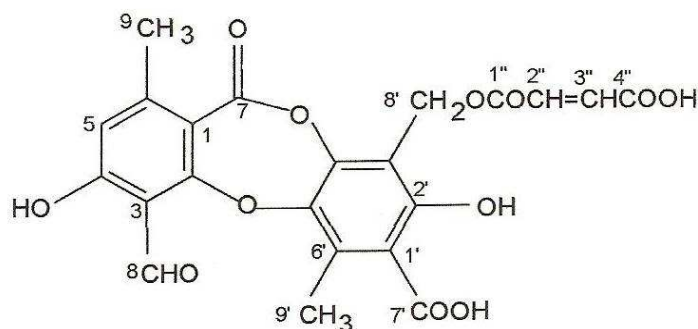
Figura 10- Estrutura química do usnato de potássio modificado a partir do ácido úsnico isolado e purificado da *C. substellata*.



R= KOH

A 5.6.3 Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico purificado (Figura 11)

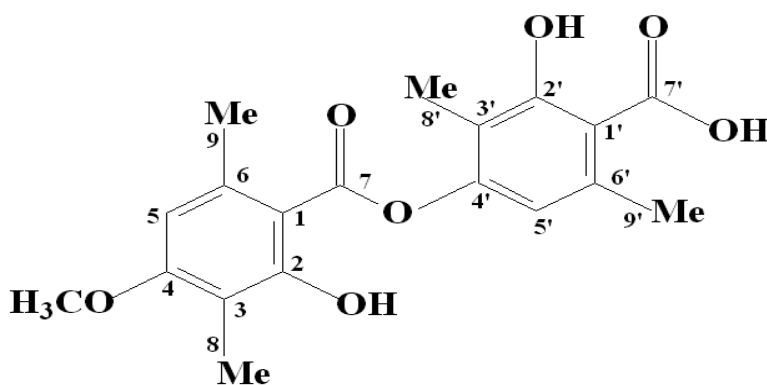
Figura 11 - Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico purificado obtida a partir dos dados de RMN ^1H



Fonte: Autor (2010)

A 5.6.4 Estrutura química do ácido barbático purificado (Figura 12)

Figura 12 – Estrutura química do ácido barbático obtida a partir dos dados de RMN ^1H



Fonte: Autor (2010)

A 6 Atividade antimicrobiana

A 6.1 Preparação dos meios de cultura e dos inóculos dos micro-organismos: 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 capacidade ajustada segundo o tubo 0,5 da escala de MacFarland, o que equivale a 10^7 UFC/mL.

A 6.2 Preparação das placas e semeio dos micro-organismos: 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.

A 6.3 Teste de difusão com disco: os testes qualitativos foram realizados através do teste de difusão com disco em meio sólido. Placas de Petri (90 mm) contendo 5 mL 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⁻¹, 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).

A 6.4 Biocromatograma: os microrganismos mais sensíveis no teste de disco foram selecionados, sendo inoculados em meio Mueller-Hinton, 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/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.

A 6.5 Concentração Mimima Inibitória (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 5 mL 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 18 mL de Mueller-Hinton sólido e com diluições do ácido barbático purificado, em 9 partes, a uma concentração inicial de 2mg/mL. Os micro-organismos selecionados foram semeados com *swabs* e, 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.

A 7 Atividade antitumoral

A 7.1 Atividade citotóxica e viabilidade celular: 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. As células foram mantidas em DMEM – Minimum Essencial Medium, Ealgle modificado Dulbeccco's (SIGMA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de solução antibiótico (penicilina 1000 U/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 Mm (CARVALHO et al., 1996). As suspensões celulares (10^5 células/mL) foram distribuídas em placas de cultura com 96 poços (220 μ L/poço). As placas

foram incubadas a 37 °C em estufa (Sedas, Milão-Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂. Após 24 h de incubação foram adicionados 22 µL/poço do ácido BAR purificado, diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido), nas concentrações finais de 20; 10; 5 e 2,5 µg/mL para o ácido barbático purificado. Foi realizado controle com DMSO. Após 72 h 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 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., 1990).

A 7.2 Determinação da dose letal a 50% (DL₅₀): os ensaios de atividade antitumoral foram precedidos de testes para a determinação da toxicidez dos derivados pirimidínicos, segundo a metodologia de Karber e Berhrens (1964), modificada por Berlion (1988). Nos experimentos foram utilizados camundongos machos albinos suíços, divididos em lotes de dez animais. A via de administração utilizada foi à intraperitoneal.

O ensaio consiste de duas fases, uma preliminar e outra definitiva. Na primeira fase, os animais são divididos em lotes e recebem em única dose a droga teste, em concentrações crescentes, seguindo uma progressão geométrica de razão 2,0. A finalidade é se determinar qual a maior dose que não apresenta letalidade (D1) e a menor que apresenta 100% de letalidade (D2). A partir dos dados da fase preliminar inicia-se a fase definitiva. Os animais recebem doses da droga compreendidas entre D1 e D2, seguindo uma progressão geométrica de razão 1,5. Em seguida, os animais foram observados durante quatro horas (com anotações a cada 10min.) e acompanhados por período de 24, 48 e 72h. Os resultados finais são avaliados segundo a fórmula: $DL_{50\%} = Df - \Sigma(a.b)/n$

Df = dose mínima capaz de matar todos os animais

a = diferença entre duas doses consecutivas administradas

b = média de animais mortos entre duas doses consecutivas

n = número de camundongos por lote

A 7.3 Teste com o sarcoma-180: foram utilizados camundongos albinos suíços, *Mus musculus*, do sexo feminino, pesando em média 48,25 g, alimentados com dieta artificial labina® e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram divididos em dois lotes de cinco indivíduos e, posteriormente inoculados com suspensão de células neoplásicas de Sarcoma-180, gentilmente fornecidas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) na região axilar direita. O grupo controle recebeu por via intraperitoneal doses de solução salina. O grupo experimental foi tratado, com a dose de 10% da DL₅₀ que corresponde a 76,0 mg/kg do ácido barbático (BAR) purificado, a cada 24h, durante sete dias. Ao final do experimento os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical e os tumores foram removidos cirurgicamente e pesados. Tecidos e órgãos foram analisados com o intuito de se avaliar alterações microscópicas induzidas pelo tratamento. Todo o protocolo experimental foi aprovado previamente pelo Comitê de ética em pesquisa da UFPE.

A 8 Atividade moluscicida e embriotoxicidade com o usnato de potássio e ácido barbático purificado

A 8.1 Obtenção e bioensaio com os adultos da *Biomphalaria glabrata*: a linhagem pigmentada de *B. glabrata* foi obtida em São Lourenço da Mata –PE e conservada no Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. Os caramujos adultos, não infectados com o parasita *Schistosoma mansoni* foram mantidos em aquários plásticos com água filtrada e/ou decolorada, pH 7.0, a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) e alimentados com alface fresca. A manutenção dos aquários foi feita semanalmente com a lavagem e substituição da água.

Os bioensaios foram desenvolvidos de acordo com os métodos do Comitê especializado em esquistossomose da WHO (1965). Uma população de 110 caramujos foram pré-selecionados e mantidos em recipientes plásticos isolados para confirmação da maturidade sexual. Os indivíduos com maturidade sexual adequada (105) com diâmetro entre 10 e 16 mm foram distribuídos em 7 grupos de 5 moluscos, como se segue: um grupo para o controle positivo tratado com carbonato cúprico (50 ppm – dose padrão, considerada moluscicida para esta

droga), um grupo para o controle negativo, tratado com água filtrada e/ou decolorinada e outros 5 grupos tratados com o usnato de potássio, solubilizado em água filtrada nas concentrações de 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 50 e 100 ppm e o ácido barbático e o extrato etéreo da *C. aggregata* solubilizados em etanol a 0,5% nas concentrações de 1, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 20, 25, 50 e 100 ppm. Cada recipiente recebeu 500 mL de solução. Os adultos foram expostos por um período de 24 h, em seguida foram lavados com água filtrada e alimentados com alface. Como critério de avaliação foi à utilizada a mortalidade, retração da região cefalopodial e liberação da hemolinfa. Os caramujos sobreviventes foram mantidos para verificação das posturas e eclosão dos embriões. Os experimentos foram feitos em triplicata.

A 8.2 Embriotoxicidade: os embriões da *B. glabrata* (0-15 h após a postura) em fase de blástula foram expostos durante 24 h a soluções de usnato de potássio, solubilizado em água filtrada, nas concentrações de 1, 2.5, 5 e 10 ppm e o ácido barbático e o extrato etéreo da *C. aggregata* solubilizados em etanol a 0,5% nas concentrações de 1, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 20, 25, 50 e 100 ppm em placas Petri (6 mm) com volume final de 10 mL para cada solução. Água filtrada foi utilizada como controle. Após o período de 24 h, os embriões foram lavados e transferidos para placas somente com água filtrada, sendo monitorados durante oito dias ou até a eclosão de todos os ovos. Foi observada a mortalidade e malformação. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

A 8.3 Teste com a *Artemia salina* ou teste de toxicidade ambiental: os ovos encistados da *A. salina* (25 mg) foram colocados para eclodir em água do mar sob luz artificial a temperatura de 30 °C, pH 8 a 9 sob constante aeração. Após 48 h, os microcrustáceos foram coletados com o auxílio de pipeta de Pasteur e contados com o auxílio de microscópio estereoscópico, sendo transferidos para os tubos de ensaios calibrados (30 mL) contendo as amostras de usnato de potássio (5 mL) solubilizado em água do mar, nas concentrações entre 1, 5 e 10 ppm e do ácido barbático e extrato etéreo nas concentrações de 1, 10, 12, 13, 75, 15, 20, 25, 50 e 100 ppm. Os experimentos foram feitos em quadruplicata. O percentual de sobrevivência foi registrado para o tratamento e controle após 24 h da exposição (SANTOS et al., 2010).

A 9 Atividade termiticida com *Nasutitermes corniger*

A 9.1 Coleta e ensaios de toxicidade com os cupins: a colônia dos cupins foi coletada no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os térmites foram identificados pela Dra. Auristela C. Albuquerque da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), como sendo da espécie *N. corniger*. A colônia foi mantida e conservada em casa de vegetação no Departamento de Biologia Vegetal, Centro de Ciencias Biologicas da UFPE. A atividade termiticida foi desenvolvida baseada no método de Kang et al. (1990). Discos de papel de filtro (4 cm de diâmetro) foram impregnados com soluções (200 µL) dos ácidos úsnico, barbático e fumarprotocetrárico purificados nas concentrações de 5, 7 e 10 mg mL⁻¹, solubilizados em acetona. Os discos foram secos a temperatura de 28 °C e em seguida depositados em Placas de Petri (90 x 15 mm). No total 20 insetos (16 operários e 4 soldados) foram cuidadosamente transferidos para placas com auxilio de pincéis, sendo mantidos sob temperatura de 27±1 °C, umidade relativa ± 80% e no escuro. Para o controle os discos foram impregandos com acetona e depois de secos foram depositados nas placas. Os experimentos foram efetuados em quintuplicata para cada concentração e o percentual de sobrevivência foi obtido para cada tratamento durante 11 dias.

A 10 Atividade inseticida sobre o *Alabama argillacea* e o *Podisus nigrispinus*

A 10.1 Armazenamento e criação do *A. argillacea* e *P. nigrispinus*: os insetos foram armazenados e criados no Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Agronomia/Fitossanidade da UFRPE. Cúpulas de PVC medindo 21,5 cm de altura e 14,4 cm de diâmetro, forradas com papel sulfite, como substrato para oviposição foram utilizadas para o armazenamento dos insetos. As ninfas do *P. nigrispinus* e o *A. argillacea* foram mantidas a 25±1 °C, 53±5% de umidade relativa (U.R), fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro). Os percevejos foram alimentados com larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) e os adultos de *A. argillacea* com uma solução de mel (30%), embebida em esponjas de 0,5 cm de espessuras mantidas no interior do recipiente em que se encontravam. A água foi fornecida através de um tubo de vidro de 10 mL, vedado com chumaço de algodão. As larvas de *A.*

argillacea foram criadas com folhas de algodão, oferecidas com o pecíolo imerso em recipientes com água no laboratório em gaiolas de quando criadas no campo (OLIVEIRA et al., 2002).

A 10.2 Ensaios de toxicidade em laboratório do *A. argillacea* e *P. nigrispinus*: ninfas do 5º instar do *P. nigrispinus* e lagartas do 1º instar do *A. argillacae* foram tratados com ácido úsnico purificado e o extrato orgânico reunido obtido da *Cladonia substellata* solubilizado em acetona e o usnato de potássio solubilizado em água modificado a partir do ácido úsnico purificado, nas concentrações entre 0.25, 0.50, 1, 1.5 e 2 mg mL⁻¹, uso tópico (0,5 µL) no dorso dos insetos. O *P. nigrispinus* e o *A. argillacea* foram tratados com o usnato de potássio através dos métodos tópico e ingestão. Para os grupos tratados com o ácido úsnico purificado e o extrato orgânico, os grupos controles foram tratados com acetona e para os grupos tratados com o usnato de potássio, somente água destilada foi usada como controle. O desenho experimental constou de 10 insetos para o grupo testemunha e 10 insetos para os grupos tratados com 10 repetições. Foram observadas mortalidade, alterações morfológicas nas lagartas, assim como a fase de pupas e eclosão dos adultos e, ainda o tempo de sobrevivência dos *P. nigrispinus*, emergências dos adultos, bem como as posturas (TORRES et al., 2002).

Para o teste por ingestão foi utilizadas lagartas no 1º instar. Folhas de algodão impregnadas com soluções de usnato de potássio na concentração de 2 mg mL⁻¹ foram oferecidas as lagartas por cinco dias. Da mesma forma, soluções de usnato de potássio solubilizado em água foram oferecidas aos percevejos abstenidos de alimentação e água por 24 h, sendo observados durante trinta dias (mortalidade, emergência dos adultos e posturas).

A 11 Análise estatística: os artigos com as atividades moluscicida, cupinicida e inseticida receberam tratamento estatístico através da análise de percentual de sobrevivência obtidos em cada tratamento e expressados com erro padrão ($\pm$) usando o programa de análise SAS Proc Lifetest (SAS Institute, 2001), com análise de probit e 95% de intervalo de confiança. As diferenças foram estabelecidas usando Student's t-test ($p < 0.05$).

ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Referente ao Artigo: *IN VITRO AND IN VIVO ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF BARBATIC ACID*

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 204/09

Recife, 19 de novembro de 2009

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: Prof.: **Emerson Peter da Silva Falcão**
Departamento: Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória
Processo nº 23076.013992/2009-01

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: **“Avaliação da atividade Antineoplásica *in vivo* de extratos orgânicos e compostos isolados de *Cladonia salzmanii*.”**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Observação: Origem dos animais: Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keiso-Asami-LIKA; Animais: Camundongos, linhagem: Albinos Suíços; Sexo: Machos; Idade: 45 dias ; Nº de Animais previsto no projeto: 88 animais .


Prof. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA

ANEXO C – NORMAS DAS REVISTAS

C 1 Brazilian Journal of Medical and Biological Research

About the Brazilian Journal of Medical and Biological Research

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research is an open-access journal published by the Associação Brasileira de Divulgação Científica and can be found at www.scielo.br/bjmbr. The journal features articles of exceptional significance, originality, and relevance in all areas of biological science. Our audience is the Brazilian and international scientific community.

Criteria for Publication

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research is highly selective in the manuscripts that it publishes; rejection rates are high. To be considered for publication in the Brazilian Journal of Medical and Biological Research, any given manuscript must be outstanding in the following ways: Originality, Importance to researchers in its field, Interest to scientists outside the field, Rigorous methodology and substantial evidence for its conclusions.

Submission of a manuscript to the Brazilian Journal implies that the data have not been published previously and will not be submitted for publication elsewhere while the manuscript is under review.

The following represent "prior publication": any printed material in excess of 500 words describing results or methods of a submitted/in press manuscript; published tables or illustrations that duplicate the content of a manuscript; electronic manuscripts or posters available via the Internet. When part of the material in a manuscript has been presented as a preliminary communication or in an unrefereed symposium, this should be cited as a footnote on the title page and a copy should accompany the submitted manuscript.

Publication Charges

The authors are responsible for "publication charges" of all accepted papers. Publication charges will be billed to the Corresponding Author when the paper is accepted.

The charge is R\$1.450,00/paper for Brazilian authors and US\$800.00/paper for authors outside Brazil and is independent of the length of the paper.

The Journal does not provide reprints to corresponding authors. They will receive a CD containing the issue in which the paper is published. There is no charge for figures in color.

Please contact Reinaldo de Souza (bjournal@fmrp.usp.br) if you have any questions.

Overview of the Editorial Process

Our aim is to provide all authors with an efficient, courteous, constructive and just editorial process. To ensure the fairest and most objective decision-making, the editorial process is run as a partnership between the Brazilian Journal of Medical and Biological Research editors and the editorial board, which is comprised of leaders in all fields of medicine and biology.

In situations in which authors are unsure whether their paper is within the scope of the journal and satisfies the basic requirements for publication in the Brazilian Journal of Medical and Biological Research, we are happy to consider presubmission enquiries. Responses to these enquiries will normally be provided within a few days. The papers of authors who receive an invitation to submit their manuscripts will then enter the regular editorial process.

Submitted manuscripts will be assigned to one of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research Section Editors, who will promptly evaluate the paper and decide if it is likely to meet the requirement of providing a major advance in its relevant field and describing a sufficient body of work to support the main claims, and, if so, it will be sent out for peer review. A Section Editor works with the Editor throughout the review process.

Expert reviewers will be asked to assess the technical and scientific merits of the work. Once all reviews have been received and considered by the Editor and Section Editor, a decision letter to the author will be drafted.

There are several types of decisions possible:

- accept the paper as submitted;
- accept it with revision;
- invite the authors to revise the manuscript prior to the final decision;
- reject the paper, but with encouragement to resubmit it after extensive revision. If the authors submit another revised version, it must be done as a new submission (<http://submission.scielo.br/index.php/bjmbr/login>);
- or reject the manuscript outright, typically because it does not meet the criteria outlined above of originality, importance to the field, cross-discipline interest, or sound methodology.

Upon acceptance, the manuscript enters our production system. Articles are typically published online within 9 weeks of formal acceptance, and usually before they are assembled into a complete issue. Publication may be further expedited when justified. For complete explanation see [Editorial Review Policies](#).

Preparation of Research Manuscripts

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research publishes original research articles of outstanding scientific significance. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work

and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a limited number of experiments. The key criteria are that the research demonstrates clearly its novelty, its importance to a particular field as well as its interest to those outside that discipline, and conclusions that are justified by the data.

General Information

Cover Letter

It is important that you include a cover letter with your manuscript. Take the time to consider why this manuscript is suitable for publication in the Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Why will your paper inspire the other members of your field, and how will it drive research forward? Please explain this in your cover letter.

The cover letter should also contain the following information:

- Title of article.
- Name(s) of all author(s).
- Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, fax number and e-mail of author to whom correspondence should be sent.
- Running title. This short title, to be used as a page heading, should not exceed 60 letters and spaces.
- **Suggested Reviewers.** You must provide the names of up to 5 SPECIALISTS that could be considered as reviewers of the paper. Please inform the full names, e-mail and full postal address in the presentation letter
- If a version of the manuscript has been previously submitted for publication to another journal, include comments from the peer reviewers and indicate how the authors have responded to these comments.
- Papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee (Hospital with which at least one of the authors is associated) and that written informed consent was obtained from all participants.

Text format

The text of a manuscript can only be accepted as a Microsoft Word file created with MS Word 6.5 or a later version as a "doc" or "rtf" document.

- Submit the manuscript by e-mail, in letter size format (8.5 x 11"), with wide margins of at least 1 inch (2.54 cm), 23 lines per page, which contains approximately 2,156 characters, including spaces.
- Use a serif font, preferably Times New Roman, 12 point type, including title page, abstract, text, acknowledgments, references, figure legends, and tables. Each page should contain the page number in the upper right-hand corner starting with the title page as page 1.

- Report all measurements in Système International, SI (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) and standard units where applicable (see below).
- Do not use abbreviations in the title or abstract and limit their use in the text.
- The length of the manuscript and the number of tables and figures must be kept to a minimum.
- Ensure that all references are cited in the text.
- Generic names must be used for all drugs. Instruments may be referred to by proprietary name; the name and country or electronic address of the manufacturer should be given in parentheses in the text.

Guidance on grammar, punctuation, and scientific writing can be found in the following sources: Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers. 7th edn. Rockefeller University Press, Reston, 2006; Medical Style and Format. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD. The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (<http://www.icmje.org/>).

The writing style should be concise and accessible. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

Although we encourage submissions from around the globe, we require that manuscripts be submitted in American English. As a step towards overcoming language barriers, we encourage authors to seek the assistance of [professional services available on the site](#).

Footnotes

Text footnotes, if unavoidable, should be numbered consecutively in superscript in the manuscript and written on a separate page following the abstract.

Headings in text

- Position all headings flush with the left margin.
- Keep headings short (three or four words).
- Use only three types of headings in the text. Clearly indicate the type of level of headings by using the following typographic conventions.
 - First-level: Only the 1st letter of the 1st word is capitalized, font size 11, **bold type**.

- o Second-level: Only the 1st letter of the 1st word is capitalized, font size 9, **bold type**.
- o Third-level: Only the 1st letter of the 1st word is capitalized, *italic type*

Subject sections (and subsections)

Eight to nine issues per year of the Brazilian Journal are organized into sections of **Biosciences** and authors should specify in the cover letter the specific section in which they prefer to publish their paper.

- Biochemistry and Molecular Biology
- Cell Biology
- Experimental Biology
- Immunology
- Neurosciences and Behavior
- Pharmacology
- Physiology and Biophysics

Three to four issues per year are dedicated to **Clinical Investigation** and authors should specify in the cover letter the specific section in which they prefer to publish their paper.

- Analytical, diagnostic and therapeutic techniques and instruments
- Blood, immunology and organ transplantation
- Cardiovascular, respiratory and sport medicine
- Digestive system
- Endocrine diseases, nutrition and metabolism
- Environmental factors of diseases
- Health care and community medicine
- Infectious agents and diseases
- Kidney and extracellular environment
- Neonatal medicine, growth and development
- Oncology
- Psychological processes, behavior and mental diseases
- Reproductive medicine
- Skeletal, muscle and nervous systems
- Skin and connective tissue diseases
- Surgical procedures, anesthesia and analgesia

Authorship requirements

Only those persons who contributed directly to the intellectual content of the paper should be listed as authors. Authors should meet all of the following criteria, thereby allowing persons named as authors to take public responsibility for the content of the paper.

- Conceived, planned and carried out the experiments that led to the paper or interpreted the data it presents, or both.
- Wrote the paper, or reviewed successive versions.
- Approved the final version.
- Holding positions of administrative leadership, contributing patients, and collecting and assembling data, however important to the research, are not by themselves criteria for authorship. Other persons who have made substantial, direct contributions to the work but cannot be considered authors should be cited in the acknowledgment section, with their permission, and a description of their specific contributions to the research should be given.

Manuscript categories

Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a Full-length Paper, Short Communication, Review Article, Concepts and Comments, Case Report, Overview.

All formats should contain: abstract of no more than 250 words, no more than 6 key words, a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces.

For Short Communication and Full-length Paper the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), without a separate section for conclusions. For Review Article the text may be divided into sections with appropriate titles and subtitles.

References, no exceptions will be made: Review: 90 references, Full-length Paper and Concepts and Comments: 40 references, Case Report and Short Communication: no more than 20 references and up to three illustrations (figures and/or tables).

Full-length paper

Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis; the experimental design and methods used (including the study setting and time period, patients or participants with inclusion and exclusion criteria, or data sources and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study, and a section placing the results in the context of published literature.

Short communication

A short communication is **a report on a single subject**, which should be concise but definitive. The scope of this section is intended to be wide and to encompass methodology and experimental data on subjects of interest to the readers of the Journal.

Review article

A review article should provide a synthetic and critical analysis of a relevant area and should not be merely a chronological description of the literature. A review article by investigators who have made substantial contributions to a specific area in medical and biological sciences will be published by invitation of the Editors. However, an outline of a review article may be submitted to the Editors without prior consultation. If it is judged appropriate for the Journal, the author(s) will be invited to prepare the article for peer review. A minireview is focused on a restricted part of a subject normally covered in a review article.

Concepts and Comments

The Concepts and Comments section provides a platform for readers to present ideas, theories and views.

Case report

A case report should have at least one of the following characteristics to be published in the Journal:

- special interest to the clinical research community
- a rare case that is particularly useful to demonstrate a mechanism or a difficulty in diagnosis
- new diagnostic method
- new or modified treatment
- a text that demonstrates relevant findings and is well documented and without ambiguity.

Overview

An overview does not contain unpublished data. It presents the point of view of the author(s) in a less rigorous form than in a regular review or minireview and is of interest to the general reader.

Other Papers

Papers that will not be accepted for publication

- Studies on people not approved by an accredited Ethics Committee or without written informed consent from the subject or legal guardian.
- Studies on animals not approved by an accredited Ethics and Animal Care Committee.
- Manuscripts that report preliminary results or only confirm previously reported results.

- Manuscripts that describe the pharmacokinetics, bioavailability and toxicity of drugs in people or animals.
- Manuscripts that deal with transcultural adaptation and validation of instruments of measurements.
- Manuscripts that translate a text published in another language and validate it on local patients.
- Manuscripts that use questionnaires translated from the language of another country and their validation in local patients.

Specific areas of the Journal

Cell biology

The main characteristic of research papers in the area of Cell Biology is the emphasis on the integration at the cellular level of biochemical, molecular, genetic, physiological, and pathological information. This section considers manuscripts dealing with either prokaryotic or eukaryotic biological systems at any developmental stage. Papers on all aspects of cellular structure and function are considered to be within the scope of Cell Biology by the BJMBR. The Editors encourage submission of manuscripts defining cell biology as an area of convergence of several other research fields, especially manuscripts providing insights into the cellular basis of immunology, neurobiology, microbial pathology, developmental biology, and disease. Manuscripts containing purely descriptive observations will not be published. Manuscripts reporting new techniques will be published only when adequately validated and judged by the Editors to represent a significant advance.

Biological activity of natural products

The Journal will consider papers for publication which describe the activity of substances of biological origin only if they satisfy all of the following criteria:

- Papers should describe the separation of the crude material into fractions (not necessarily into homogeneous materials) with the fractions containing biological activity identified clearly in the separation scheme. Phytochemical studies should be accompanied by biological tests. A survey of pharmacological activity of plant extracts or teas will not be considered for publication.
- In addition to the demonstration of activity in one or more biological system, experiments must be performed attempting to provide information concerning the mechanism(s) of action of the substance(s) being tested.
- Sufficient experimental information must be provided to permit repetition of the preparation of fractions and the bioassay used.
- Sources should be identified completely, and, if plant material, a specimen should be classified by an expert and deposited in a local botanical garden, university or research institute. The name and institution of the person who

classified the plant and the number of the voucher under which it was deposited should be provided in the Material and Methods section.

- **The Journal does not publish toxicological studies.**

Organization of the Manuscript

Most articles published in the Brazilian Journal of Medical and Biological Research will be organized into the following sections: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Key words, Introduction, Results, Material and Methods, Discussion, References, Acknowledgments, Tables with legends and footnotes, Figure legends and Figures. Uniformity in format will facilitate the experience of readers and users of the journal. Continuous page numbers are required for all pages including figures. There are no specific length restrictions for the overall manuscript or individual sections. However, we urge authors to present and discuss their findings concisely. We recognize that some articles will not be best presented in our research article format. If you have a manuscript that would benefit from a different format, please contact the editors to discuss this further.

Our online submission system can support a large range of formats for text and graphics, but if you experience difficulties with the site or are concerned about the suitability of your files, please see the [manual](#) for submission or contact the Production Department of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research (bjournal@fmrp.usp.br).

Title Page

Title

The title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines.

Example:

Single-step purification of crotopotin and crotoactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing

Please also provide a brief "running title" of approximately 60 characters.

Example:

Purification of crotopotin and crotoactine

Authors and Affiliations

Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions). Institution(s) (Department, Faculty, University, city, state, country) of each author (in Portuguese if authors are from Brazil).

Example:

A.S. Aguiar¹, A.R. Melgarejo¹, C.R. Alves² and S. Giovanni-De-Simone^{2,3}

¹**Divisão de Animais Peçonhentos, Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ, Brasil**

²**Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil**

³**Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil**

One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list, and the summary of the author contributions to the study are accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed after the Acknowledgments.

Corresponding author: Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of author to whom correspondence should be sent.

Acknowledgment of research grants and fellowships (agency and grant number).

Key Words

A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. A capital letter should be used for the first letter of each key word, separated by a semicolon. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the Scielo Database (see http://www.scielo.br/bjmbr/articles_search/subject) to index the article.

Running title

This short title, to be used as a page heading, should not exceed 60 letters and spaces.

Abstract

Since abstracts are published separately by Information Services, they should contain sufficient hard data, to be appreciated by the reader. The Brazilian Journal publishes unstructured abstracts.

The abstract should briefly and clearly present the problem, experimental approach, new results as quantitative data if possible, and conclusions. It should mention the techniques used without going into methodological detail and mention the most important results.

Abbreviations should be kept to a minimum and should be defined in both the Abstract and text.

Please do not include any reference citations in the abstract. If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be given within the abstract.

The abstract should not exceed 250 words and should be written as a single paragraph double-spaced on a separate page following the title page.

Please see <http://www.bjournal.com.br/writing_a_good_abstract.html> for suggestions on writing a good abstract

Introduction

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. This should state the purpose of the investigation and justification for undertaking the research and relationship to other work in the field. An extensive listing or review of the literature should not be used. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about what was achieved.

Material and Methods

Sufficient information should be provided in the text or by referring to papers in generally available journals to permit the work to be repeated.

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. We encourage authors to submit, as separate files, detailed protocols for newer or less well-established methods. These will be linked to the article and will be fully accessible.

Results

The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. In some situations, it may be desirable to combine Results and Discussion into a single section. The Results section should provide results of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but a description of experiments that are peripheral to the main message of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supplemental files; these are

published online alongside the accepted article. The Results section should be written in past tense.

Discussion

The purpose of the Discussion is to interpret the results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text, especially in Results, may be cited but all results not repeated in detail in the Discussion. The Discussion should spell out the major conclusions and interpretations of the work including some explanation of the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done? The Discussion should be concise and tightly argued. If warranted, the Results and Discussion may be combined into one section.

Acknowledgments

When appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and contributions from colleagues. People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments, along with their contributions. Donations of animals, cells, or reagents should also be acknowledged. You must also ensure that anyone named in the Acknowledgments agrees to being so named. Financial support for the research and fellowships should be acknowledged on the title page.

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Meeting abstracts, conference talks, or papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only. All personal communications should be supported by a letter from the relevant authors. Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. When possible, references which are easily available in English should be cited.

The BJMBR uses the numbered citation (citation-sequence) method. References are listed and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in parentheses. Multiple citations within a single set of parentheses should be separated by commas without a space (1,5,7) . Where there are more than three sequential citations, they should be given as a range. Example: "...has been shown previously (4–9)." Make sure the parts of the manuscript are in the correct order before numbering the citations.

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For all references, list the first

6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages,

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Use the Medline journal abbreviations and follow the reference style shown on the Website noted above, with several exceptions. See below for details. If the author uses the program "Reference Manager", copy the file containing the [style of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research](#) and place it in the folder of "Styles". When submitting the manuscript, send the file produced in Reference Manager (".rmd" and ".rmx") as an attachment.

Please use the following style for the reference list:

Published Papers. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation in italics), Year, Volume, Complete Pages.

Lammers AE, Hislop AA, Flynn Y, Haworth SG. The 6-minute walk test: normal values for children of 4-11 years of age. *Arch Dis Child* 2008; 93: 464-468.

Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Belin de CE, et al. Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1627-1633.

National Heart Lung and Blood Institute. Global Initiative for Asthma (GINA). *Global strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO Workshop Report*. Bethesda: National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute publication No. 02-3659; 2006.

Article accepted for publication but not yet published. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year of expected publication, (in press) at the end of the citation.

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 (in press).

Electronic Journal Articles (Online Journals). Ensure that URLs are active and available.

American Academy of Ophthalmology. Diabetic retinopathy disease severity scale. *Am Acad Ophthalmol*
http://www.aao.org/education/library/recommendations/international_dr.cfm; 2005. Accessed 11 August 2006.

Simon JA, Hudes ES. Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/281/24/2289>; 1999. Accessed 11 August 2006.

Internet Communication. Ensure that URLs are active and available.

Brasil. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade: pesquisa da população brasileira. <http://www.abeso.org.br>. Accessed February 22, 2008.

Information behaviour of the researcher of the future, CIBER Report. <http://www.bl.uk/news/2008/pressrelease20080116.html>.

CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>. Accessed March 16, 2006.

CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I". <http://fomentonacional.cnpq.br/dmfomento/home/index.jsp>. Accessed March 16, 2006.

Audiovisual Material

Physician's Desk Reference (PDR). Release 2003.1AX. [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

Computer Program

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. *Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers*. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Version 12.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

Patent

Larsen CE, Trip R, Johnson CR. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. Patent No. 5.529.067. Novoste Corporation; 1995.

Book, Whole. Authors, Book title, Edition, City, Publisher, Year.

American College of Sports Medicine. *Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição*. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan; 2007.

Book, Chapter. Authors, Chapter Title, Editors, Book title, Edition, City, Publisher, Year, Pages of citation.

Kronfol A. Behavioral effects of cytokines: a psychiatrist's perspective. In: Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA (Editors), *Cytokines stress and immunity*. London: CRC Press; 2007. p 1-16.

Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy? In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), *Plants that fight cancer*. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.

Report

WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). *Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.

National Commission on Sleep Disorders Research. *Wake up America: a national sleep alert*. Washington: Government Printing Office; 1993.

Thesis

Joselevitch C. Visão no ultravioleta em *Carassius auratus* (Ostariophysi, Cypriformes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células horizontais. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

Conference, Symposium Proceedings. Cite papers only from published proceedings.

Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. *Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology*. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

"Unpublished results", "Personal communication" and "Submitted papers". Reference should appear in the text with the individual name(s) and initials and not in the reference list.

(Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results).

It is assumed that the author has obtained permission from the source when "personal communication" is cited.

Abstract. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages (Abstract).

Lima SM, Bonci DM, Grotzner SR, Ribeiro CA, Ventura DF. Loss of amacrine cells in MeHg-treated retinæ in a tropical fish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: E-5172 (Abstract).

Competing Interest

Authors are asked at submission to state whether they have any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced their paper. Reviewers are also asked to declare any interests that might interfere with their objective assessment of a manuscript. Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.

Abbreviations

Abbreviations should be kept to a minimum. Define all abbreviations upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

- Explain all abbreviations in the text, figure and table legends when they first appear. Keep the number of abbreviations to a minimum.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 mL, not 3 milliliters (mL)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].
- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).
- Use abbreviations in figures and tables to save space, but they must be defined in the legend.

Nomenclature

The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step toward the integration and linking of scientific information reported in published literature. We will enforce the use of correct and established nomenclature wherever possible:

We strongly encourage the use of [SI units](#). If you do not use these exclusively, please provide the SI value in parentheses after each value. Examples:

- s for second
- min for minute
- h for hour
- L for liter
- m for meter
- kDa for mass in kilodaltons
- 5 mM rather than 5×10^{-3} M or 0.005 M

Species names should be italicized (e.g., *Homo sapiens*).

Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database, e.g., HUGO for human genes. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text.

The [Recommended International Non-Proprietary Name \(rINN\)](#) of drugs should be provided.

Figures

Figures must be submitted in high-resolution version (600 dpi). Please ensure that the files conform to our [Guidelines for Figure Preparation](#) when preparing your figures for production.

Preparing figure files for submission

Brazilian Journal of Medical and Biological Research encourages authors to use figures where this will increase the clarity of an article. The use of colour figures in articles is free of charge. The following guidelines must be observed when preparing figures. Failure to do so is likely to delay acceptance and publication of the article.

- Illustrations for publication should be provided as separate files.
- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file.
- Tables should NOT be submitted as figures but should be included in the main manuscript file.
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figure titles and legends should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- The aim of the figure legend should be to describe the key messages of the figure, but the figure should also be discussed in the text. An enlarged version of the figure and its full legend will often be viewed in a separate window online, and it should be possible for a reader to understand the figure without moving back and forth between this window and the relevant parts of the text. Each legend should have a concise title of no more than 15 words. The legend itself should be succinct, while still explaining all symbols and abbreviations. Avoid lengthy descriptions of methods.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements, when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats.
- Individual figure files should not exceed 5 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously

been published elsewhere. In order for all figures to be open-access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non-open-access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Supported file types

The following file formats can be accepted. Detailed information for each file type can be found by clicking on individual links.

- EPS (suitable for diagrams and/or images)
- PDF (suitable for diagrams and/or images)
- Microsoft Word (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- PowerPoint (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- TIFF (suitable for images)
- JPEG (suitable for photographic images, less suitable for graphical images)
- BMP (suitable for images)

Micrographs should be treated like photographs with the following additional guidelines

- Details of the magnification should be given.
- Details of any stains used and the method of preparation the sample should be given in the figure legend or in the Methods section.
- Detailed information about the microscope used should be included in the figure legend or in the Methods section.
- The type of camera, photographic software and details of any subsequent image manipulation should be given in the article text.

Tables

- Tables must be submitted in word (.doc) or Excel (.xls).
- Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text.
- Tables must have a concise and descriptive title.
- All explanatory information should be given in a footnote below the table. Footnotes should be used to explain abbreviations and provide statistical information.
- All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text.
- Tables must be understandable without referring to the text.

- Each table should be on a separate page after the Reference section in the submitted manuscript. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible.
- Vertical and diagonal lines should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.
- Adapting/Reproducing Tables and Relevant Permissions. Acknowledgments of original sources of copied material should be given as a reference in the table footnote.
- Tables must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables.

Submission of Research Manuscripts

You are Ready to Submit Your Manuscript. Text files can be submitted for review in the following formats: DOC or RTF.

Files with figures can be submitted in the following formats: EPS, Excel, JPEG, PhotoShop, PowerPoint, or TIFF.

Electronic Submission

Detailed [instructions for submission](#) can be found on the Brazilian Journal of Medical and Biological Research Manuscript Submission and Peer Review Web site. Files are uploaded individually and are combined into a single PDF file.

Outline of the Production Process

Once an article has been accepted for publication, the manuscript files are transferred into our production system. Manuscripts are then copyedited by professional copyeditors who correspond directly with the authors concerning queries and corrections. Any corrections should be made before the article is formatted. Once the article has been formatted, PDF proofs are generated so that authors can approve the final article. The prompt return of proofs by authors will expedite the production process.

C 2 Acta Tropica

<http://www.elsevier.com/journals/acta-tropica/0001-706X/guide-for-authors>

- *Acta Tropica* publishes original research papers, short communications and review articles. Original papers **should normally not exceed 10 printed pages** including tables and figures. Short communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures. Manuscripts must be accompanied by a letter signed by all the authors. Submission of a paper to *Acta Tropica* is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to *Acta Tropica* carries with it the right to publish the paper. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://elsevier6.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923/.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1)

Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult

<http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$1,800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:

<http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors and affiliations, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum image size: 400 × 600 pixels (h × w, recommended size 200 × 500 pixels). Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the

printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

- **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

C 3 International Biodegradation and Biodeterioration

<http://www.elsevier.com/journals/international-biodeterioration-and-biodegradation/0964-8305/guide-for-authors>

C 4 International Journal of Parasitology

<http://www.elsevier.com/journals/international-journal-for-parasitology/0020-7519/guide-for-authors>

C 5 Entomologia Experimentalis et Applicata

Entomologia Experimentalis et Applicata

Submission of manuscripts

Manuscripts submitted to *Entomologia Experimentalis et Applicata*, or any part of the work described therein, must be original and must not be simultaneously under consideration for publication elsewhere. Work previously published in abstract form should be referred to in the introduction. The Editors cannot accept responsibility for damage to or loss of papers submitted to them.

Online

Manuscripts for *Entomologia Experimentalis et Applicata* should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/eea>. Submission online enables the quickest possible review and allows online manuscript tracking. Manuscript submission online should be in Word document (.doc or .docx) which will be automatically converted to PDF for reviewing. Figures can be embedded in the native word processor file or may be uploaded separately in one of the following formats: GIF (.gif), JPEG (.jpg), TIFF (.tif), EPS (.eps). Figures uploaded separately in these file formats will be automatically converted to small jpegs/PDFs for reviewing.

Full upload instructions and support are available from the [ScholarOne Manuscript Submission Site](#) via the Get Help Now button (now button at top right corner of each page). When prompted online, please submit your covering letter or comments to the Editor-in-Chief including one or two sentences describing the contents of the paper and its relevance to the focus of the journal.

Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, **Wiley-Blackwell will dispose of all electronic material submitted two months after publication**. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Presentation of manuscripts

Authors using our EndNote Word formatting template to help them to present their article correctly can use the 'Submit an EndNote manuscript' option to speed submission when in our Manuscript Central submission site. [Click here](#) to download and unzip the template. Manuscripts, including the references, should be double-spaced, line & page numbered, and written in grammatically correct English. The title page should state the title of the paper, the names and addresses of the authors, a short title for running headlines, the full address of the

corresponding author and up to 12 key words, which should not duplicate words in the title. An Abstract of not more than 300 words should include the reason why the work was carried out, the key techniques, the results and the major conclusions. The abstract should contain the full scientific name, followed by that of the family and tribe of the subject insect(s), along with the full name(s) of food plants, chemicals, etc. The Latin names of insects as well as plants should be followed by the name of the describer. Original articles should include, in the following order, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figure legends (starting on a separate sheet), Tables. The text should preferably be in MS Word (PC or Mac format) and the illustrations must be submitted according to the Wiley-Blackwell digital illustration standards (see below). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

The SI system of units should be used for all scientific and laboratory data; temperature should be expressed in degrees Centigrade. A table of commonly used SI units and their symbols is available to view by clicking the following link: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/eea_ifa.doc

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

Entomologia Experimentalis et Applicata requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the manuscript (under the Acknowledgment section) and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Corresponding authors will be asked to confirm whether or not a conflict of interest exists as part of the submission process.

Entomologia Experimentalis et Applicata is a member of and subscribes to the principles of the Committee on Publication Ethics.

Technical Notes

A short manuscript (up to four pages in print) that describes a new technique or rearing method, or substantial improvements of existing methods, or that presents data on the bio-activity of a novel substance may be submitted as a Technical Note. These short manuscripts should not have an abstract, and can be organized either along the lines of a regular manuscript or without subdivisions. Authors may also consider combining the results and discussion sections. Technical Notes should not present incomplete or preliminary data sets.

References

References in the text. References should be in the Harvard style, i.e. citations appear in the form (Smith, 1990; Smith & Jones, 1991, Smith et al., 1992), (Smith et al., 1990) or if only the year is given in brackets, there should be no comma after the author name, e.g., The results of recent work by Smith et al. (1992).... References to papers having three or more authors should give the name of the first author only, followed by et al.

Reference list. References should be listed alphabetically at the end of the article and should conform to the formats of the following examples. Journal titles should be given in full.

Journal

article:

Dicke M & van Loon JJA (2000) Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97: 237-249.

Book:

Gullan PJ & Cranston PS (1999) *The Insects. An outline of entomology*. 2nd edn. Blackwell Science, Oxford, UK.

Book

chapter:

Shapiro M (1986) In vivo production of baculoviruses. *The Biology of Baculoviruses*, Vol. 2: Practical Application for Insect Control (ed. by RR Grandos & BA Federici) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 31-62.

Where a DOI is included in a reference, it should be cited as follows:

Mazmanian SK, Ton-That H & Schneewind O (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 40: 1049-1057. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02411.x

or alternatively if it has not yet been allocated to an issue:

Mazmanian SK, Ton-That H & Schneewind O (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02411.x

References should be checked carefully to make sure that all references given in the text (and no others) appear in the list of references and that the spelling of authors names and the dates are correct.

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

End Note reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Illustrations

Illustrations must be in a finished form ready for reproduction. All lettering in the figures, where possible, should be in 'Arial' font. Subdivided figures should be lettered A, B, etc. in the top left hand corner. The maximum figure size is 175 x 224 mm. Magnifications should be indicated by scale bars. Labelling should be clear and sized appropriately for the intended final size that the figure is intended to appear in the journal. Figures should be referred to in the text as (Figure 10). Authors may be asked to reduce the number of figures if some are considered to be inessential.

Electronic artwork. We would like to receive your artwork in electronic form. Save line art (vector graphics), uncompressed if possible, in Encapsulated PostScript (.eps) format and bitmap files (halftones or photographic images) in Tagged Image Format Files (.tif). The Editor will ask for these final versions of figures after the manuscript has been accepted for publication.

Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/journal.asp>

Copyright Transfer Agreement Form

Authors will be required to sign a Copyright Transfer Agreement Form (CTA) for all papers accepted for publication. Signature of the Copyright Transfer Agreement Form is a condition of publication and papers will not be put into production until a signed form has been received. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various media/circumstances (please see the form for further details). A copy of the form may be downloaded [here](#).

Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley **Online Library**, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Colour Illustrations

It is the policy of *Entomologia Experimentalis et Applicata* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork, with the exception of colour figures in Mini Review articles. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Entomologia Experimentalis et Applicata* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher.

Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a [colour work agreement form](#) before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF* from the internet. If you are unable to download the form, please contact the Production Editor at the address below and they will be able to email a form to you.

Once completed, please return the form to the Production Editor at the address below:

Production Editor

Entomologia Experimentalis et Applicata

Wiley-Blackwell 101 George Street Edinburgh Scotland EH2 3E Email: eea@wiley.com

Any article received by Wiley-Blackwell with colour work will not be published until the form has been returned.

* To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Early View

Entomologia Experimentalis et Applicata is covered by the Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. *Early View* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way.

They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found on the Web: <http://www.doi.org/faq.html> Note to NIH Grantees Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Offprints

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal. For order enquiries please email: offprint@cosprinters.com

Online production tracking is now available for your article through Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

List of abbreviations

ANCOVA analysis of covariance (not small caps)

ANOVA analysis of variance (not small caps)

°Celsius/centigrade

ca.(roman) circa/approx.

c.p.m. counts per minute

centrifugal force: use **g** rather than r.p.m. (except for blenders and stirrers)

cv cultivar

day not abbreviated

d.f. degrees of freedom

Department (not Dept)

Dr doctor (not dr)

e.g., always followed by a comma

et al. (roman)

Experiment(not Expt)

F-value notitalic

g centrifugal force; Use instead of r.p.m.
g gram
h hour
i.e., always followed by a comma
in vitro (roman)
in vivo (roman)
l litre
L16:D8 photoperiod indication
(not 16L:8D)
Mu symbol roman
min minute
n number, not *n* italics
The Netherlands
ns non-significant
P-value Always roman (not italic)
r.h. relative humidity
r.p.m. revolutions per minute - do not use! Supply value in **g** force
room temperature (do not abbreviate to RT)
s second
SD standard error
SEM standard error of the mean
U-test *U* not italic
UK (not Scotland, England, Wales, Northern Ireland, nor GB)
USA
vs. versus
vic versa (roman, no hyphen)
vol/vol volume by volume
week not abbreviated
year not abbreviated