



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

JOSÉ LAURENTINO DOS SANTOS NETO

ESTUDO SOBRE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *Cladina dendroides*
LIQUEN

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ LAURENTINO DOS SANTOS NETO

ESTUDO SOBRE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *Cladina dendroides*
LIQUEN

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Graduação em licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^o.Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Co orientadora: Prof^a Dr^a. Idjane Santana de Oliveira

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2015

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB-4: 2018

S237e Santos Neto, José Laurentino dos.
Estudo sobre atividade antimicrobiana *in vitro* de *cladina dendroides*, líquen /
José Laurentino dos Santos Neto. – Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.
35 f.: il.

Orientador: Emerson Peter da Silva Falcão
Coorientadora: Idjane Santana de Oliveira
TCC (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de
Pernambuco, CAV. Licenciatura em Ciências Biológicas, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Líquens. 2. Microbiologia. 3. Metabólitos. I. Falcão, Emerson Peter da Silva
(Orientador). II. Oliveira, Idjane Santana de (Coorientadora). III. Título.

579.7 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-29/2016

JOSÉ LAURENTINO DOS SANTOS NETO

ESTUDO SOBRE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *Cladina dendroides*, LÍQUEN

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Idjane Santana de Oliveira (Co-orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Graduada Maria Aparecida da Conceição de Lira
Universidade Federal de Pernambuco

MSc. Tamiris Alves Rocha
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais José Laurentino Filho e Severina Alves (*in memoria*) pelos os incentivos, aos amigos Collette Catta e Urbano Secundes pelo apoio nas horas de dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por dar sabedoria e humildade para continuar.

Ao professor Dr^o. Emerson Peter da Silva Falcão pela orientação e paciência, por falar palavras de incentivo, por ter me ajudado nas horas que precisei e ter acreditado no meu potencial.

A professora e Dr^a. Idjane Santana de Oliveira, pela cooperação e por ter me ajudado na realização das atividades e obtenção dos resultados.

Aos meus Pais Severina Alves da Silva, José Laurentino Filho(*in memoria*) por ter me ajudado sempre que necessitei.

A Maria Aparecida da Conceição de Lira por toda ajuda, durante a elaboração deste trabalho.

A Tamiris Alves Rocha, Cristiane Maria da Conceição e todos do laboratório (SIM) pela força que me deram pra continuar.

Agradeço ao Amigo e irmão Urbano Secundes por ter dado possibilidade e condição para realização do meu sonho.

A Collette Catta por sempre dar-me conselhos e sempre acreditar em mim e no próximo caminhando na fé e que me fez entender que humildade é um alicerce para grandes conquistas.

A minha namorada Ana Verônica por estar sempre ao meu lado e incentivando.

E aos meus amigos que torcem por mim, que me ajudam a perseverar muito obrigado a todos.

RESUMO

O líquen é formado por uma associação simbiótica entre fungo e alga. Esses organismos produzem substâncias resultantes de rotas secundárias, denominadas substâncias liquênicas. Compostos obtidos de líquens são importantes em atividades farmacológicas tais como antiviral, antibiótica, antifúngica e antimicrobiana. No presente trabalho foi estudada a atividade antimicrobiana de extrato de *Cladina dendroides*. Para obtenção dos extratos orgânicos, o material liquênico de peso (10,65g) previamente limpo e seco foi macerado e acondicionado em erlenmeyer. A este, adicionou-se 100 mL de éter dietílico, seguindo-se agitação por 10 min., sendo posteriormente mantido a 6°C por 24h. Após esse tempo, a mistura foi filtrada em papel de filtro e o extrato etéreo obtido foi mantido à temperatura ambiente (28±3°C). Acrescentou-se ao resíduo liquênico 100 mL de clorofórmio sob as mesmas condições da extração anterior. Após 24h o processo foi repetido com acetona. Os extratos foram evaporados à temperatura ambiente, em seguida mantidos em dessecador até a obtenção de peso constante. A análise da composição fenólica dos extratos orgânicos foi efetuada através de Cromatografia em Camada Delgada. A atividade antimicrobiana *in vitro* foi realizada por meio do método de difusão em meio sólido utilizando-se discos de papel (Bauer et al., 1966) e o método de diluição em caldo. As bactérias utilizadas nos testes foram *Acinetobacter baumannii* (ATCC-19606), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC-14028), *Shigella flexneri* (ATCC-12022), *Enterobacter cloacae* (ATCC-13047), *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a metilicina) (cepa clínica), *Streptococcus pyogenes* (cepa clínica), *Staphylococcus aureus* (ATCC-29213) e *Kocuria rhizophila* (ATCC-93041). As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Foi utilizado como padrão o antibiótico cloranfenicol. Os resultados foram avaliados através da mensuração do halo de inibição ao redor dos discos e expressos em milímetros, comparados com do padrão, cloranfenicol. Os resultados mostraram eficientes sendo o melhor rendimento obtido com o extrato etéreo (1,023%) seguido por clorofórmico (0,084%) e acetônico (0,075%). A análise cromatográfica dos extratos apresentou um padrão de bandas distinto para os três extratos, sendo observada a presença do ácido barbático (Rf 0,57) nos extratos etéreo e clorofórmico. Foram observados ainda três bandas não identificadas, duas no extrato clorofórmico (Rfs 0,71 e 0,78) e uma banda no extrato acetônico (Rf 0,14). O extrato etéreo apresentou-se ativo frente a bactéria *A. baumannii* com um halo de 10 mm de inibição pelo método do disco e ativo contra *Salmonella* com concentração inibitória de 0,078 mg/mL, MRSA ferida com 0,009 mg/mL e *S. aureus* 0,16 mg/mL pelo método de diluição em caldo. O extrato etéreo demonstrou relevante potencial antimicrobiano. Uma vez que é constituído por ácido barbático é possível que este composto seja o responsável pela ação antimicrobiana observada.

Palavras chave: Metabólitos. Bactérias. Ácido barbático.

ABSTRACT

The Lichen is composed of a symbiotic association between a fungus and algae. These organisms produce substances resulting from secondary pathway, called lichenic substances. Compounds obtained from lichens are important in pharmacological activities such as antiviral, antibiotic, antifungal and antimicrobial. In the present work was to study the antimicrobial activity of *Cladina dendroides* extract. To obtain the organic extracts, the lichen material (10,65 g) cleansed and dry was macerated and packaged in flask. This, added 100 mL of diethyl ether, followed by stirring for 10 min, and then maintained at 6° C for 12h. After that time, the mixture was filtered in filter paper and the ether extract obtained was kept at room temperature (28 ± 3° C). Added to 100 mL of chloroform lichenic residue under the same conditions as the previous extraction. After 12h the process was repeated with acetone. The extracts were evaporated at room temperature, then kept in a desiccator until getting constant weight. The phenolic composition analysis of organic extracts was performed by thin-layer chromatography. Antimicrobial activity *in vitro* was performed via the diffusion in solid medium using paper discs (Bauer et al., 1966) and the broth dilution method. The bacteria used in the tests were *Acinetobacter baumannii* (ATCC-19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922-), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Shigella flexneri* (ATCC-12022), *Enterobacter cloacae* (ATCC-13047), *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (clinical strain), *Streptococcus pyogenes* (clinic strain), *Staphylococcus aureus* (ATCC-29213) *Kocuria rhizophila* and (ATCC-93041). The plates were incubated at 37° C for 12:00 am. Was used as the standard antibiotic chloramphenicol. The results were evaluated by measuring the halo of inhibition around discs and expressed in millimeters, compared with the standard, c. The extraction method was shown to be efficient and the best performance obtained by the ether extract (1.023) followed by chloroformic (0.084mg/ml) and acetonic (0.075mg/ml). The chromatographic analysis of the extracts showed a pattern of distinct bands for the three extracts, being observed the presence of barbatic acid (Rf 0.57) in ethereal and chloroformic extracts. Were observed three unidentified, two bands in chloroformic extract (Rfs 0.78 and 0.71) and a band in acetonic extract (Rf 0.14). The ether extract performed active front bacteria *A. baumannii* with a halo of 10 mm of inhibition by hard and active against *Salmonella* with inhibitory concentration of 0.078 mg/ml and MRSA wound with 0.009 mg/ml broth dilution method and *S.aureus* 0,16 mg/ml. The ether extract demonstrated relevant antimicrobial potential. Since it is made up of barbatic acid it is possible that this compound is responsible for the antimicrobial action observed.

Keywords: Metabolites. Bacterium. Barbático acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Líquens crustoso, folioso e fruticoso	14
Figura 2 - Líquen fruticoso do gênero <i>Cladina dendroides</i>	15
Figura 3 - Modelo esquemático da anatomia de um talo liquênico	16
Figura 4 - Estrutura química do ácido úsnico	17
Figura 5 - Estrutura química do ácido barbático.....	17
Figura 6- Cromatografia em camada delgada dos extatos.....	24
Figura 7 - Halos de inibição do extrato do líquen <i>Cladina dendroides</i> frente à <i>Acinetobacter baumani</i> no teste de difusão em meio sólido.....	26
Figura 8 - Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (CBM).	28

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação do halo de inibição dos extratos orgânicos frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas no teste difusão em meio sólido com disco de papel, em relação, ao fármaco cloranfenicol..... 26

Tabela 2 -Determinação da concentração mínima inibitória dos extratos orgânicos frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas no teste de microtitulação, em relação ao fármaco padrão cloranfenicol e tetraciclina..... 28

LISTA DE ABREVIATURAS

AB – Ácido Barbártico
OMS – Organização Mundial Da Saúde
AU – Ácido Úsnico
E.E - Extrato Etérico
E.C- Extrato Clorofórmico
E.A- Extrato Acetônico
uL- Microlitro
Rf - Fator de Retenção
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
mL – mililitro
mg – Miligrama
DMSO - Dimetilsulfóxido
CCD- Cromatografia de Camada Delgada
MIC- Menor Concentração Inibitória
UV- Ultravioleta
HC- Muller-Hinton
MBC- Menor concentração bactericida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Características morfológicas dos líquens	13
2.2 Metabólitos secundários líquênicos	15
2.3 Atividades antimicrobianas.....	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Obtenções do material líquênicos	21
4.2 Preparações dos extratos orgânicos	21
4.3 Análises dos fenóis líquênicos de <i>Cladina dendroides</i>	21
4.4 Ensaio antimicrobianos <i>in vitro</i>	22
4.4.1 Micro-organismo teste	22
4.4.2 Teste de difusão em meio sólido com disco de papel.....	22
4.4.3 Teste de microtitulação.....	23
5 RESULTADOS E DISCURSSÃO	24
5.1 Análises dos fenóis líquênicos de <i>Cladina dendroides</i>	24
5.2 Atividade antimicrobiana pelo Teste de difusão em meio sólido com disco de papel..	25
5.3 Teste de microtitulação.....	27
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2002), 80% da população dos países em desenvolvimento usam quase que exclusivamente a medicina tradicional, tendo os vegetais como maior fonte de medicamentos. São cerca de 3,3 milhões de pessoas utilizando mais de 9.000 espécies de vegetais, entre monocotiledôneas, dicotiledôneas, briófitas, pteridófitas e líquens.

O líquen é um organismo de difícil classificação taxonômica oriundo de uma associação simbiótica entre fungo e alga (CULBERSON, 1972). Produzem substâncias resultantes de rotas secundárias, denominadas substâncias liquênicas. Sabe-se que se trata de derivados fenólicos e carboidratos, sendo que estes metabólitos são os principais responsáveis por grande parte de sua atividade biológica (HALE-JR, 1983).

Compostos derivados de líquens são descritos em numerosos trabalhos de diversos pesquisadores por sua ampla gama de atividades farmacológicas tais como antioceptiva (MAIA et al., 2002), antitumoral (FALCÃO et al. 2002) antiviral (ESIMONE et al. 2007), antibiótica(PIOVANO et al., 2002), antifúngica (SHRESTHA, 2014), mutagênica (GULLUCE, 2011) e citotóxica (ARAÚJO, 2014).Além destas é citado a atividade antimicrobiana (MARTINS, 2010), objetivo desta pesquisa.

Os metabólitos secundários liquênicos são classificados em grupos químicos bioenergeticamente relacionados, tais como: depsídeos, depsídonas, dibenzofuranos e ácidos úsnicos (NASH III, 2008). Esta ampla diversidade de compostos é oriundo das vias do ácido xiquímico mevalônicoe.

A presença dos derivados fenólicos do líquen é determinante para a sua atividade antimicrobiana. Existem diversos mecanismos propostos para a ação destes compostos, no entanto poucas vias foram confirmadas. Entretanto, menciona-se sua possível ação relacionada à acidificação da célula bacteriana e conseqüente, ruptura de membrana, inativação enzimática, e interferência

no processo de transporte de eletrons durante a fosforilação oxidativa (MUELLER, 2001; RANDHIR et al., 2004; VATTEM et al., 2004).

BRISKIN, (2000) menciona que produtos do metabolismo secundário envolvidos na defesa e possuidores de atividade citotóxica contra patógenos podem ser úteis como agentes antibacterianos. Além da atividade antimicrobiana de metabólitos extraídos de plantas, um novo conceito na utilização desses produtos vem sendo, a associação com antimicrobianos sintéticos (COUTINHO et al, 1999; MATIAS et al, 2010).

Os vários compostos do metabolismo dos líquens interessam ao homem principalmente por sua potencialidade em se tornar um produto terapêutico. Muitos desses componentes, quando utilizados em doses adequadas, podem converte-se em medicamentos (HONDA et al, 2010).

Desta forma este trabalho tem como meta contribuir para um maior conhecimento da ação antimicrobiana de *Cladina dendroides* e de seu produto o ácido barbático. Contribuindo para aprofundar os estudos a respeito do potencial biotecnológico da liquenoflora nordestina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características morfológicas dos líquens

Cladonia é o maior dos 12 gêneros reconhecidos para a família Cladoniaceae, e possui atualmente mais de 400 espécies conhecidas em todo o mundo, o gênero pode ser dividido em quatro Supergrupos: *Cladonia*, *Perviae*, *Cocciferae* e *Crustaceae*. (STENROOS *et.al.*, 2002). Supergrupo *Crustaceae* inclui o gênero *Cladina*, (AHTI 2000).

As substâncias liquênicas são responsáveis pela maioria das utilidades econômica e dos benefícios curativos advindos dos líquens (NASH III, 1996), tais como: atividade antitumoral, antibacteriana, antipirética, anti-inflamatória, antiviral, analgésica, e ainda como indicador biogeográfico, possui também a capacidade de produzir óleos essenciais e substâncias fixadoras de perfume, corantes de tecidos, graxas e óleos (MOTA-FILHO *et al.*, 2007).

Os líquens não é um grupo considerado uma unidade taxonômica, e sim um grupo biológico com um modo de nutrição compartilhada, possuindo características ímpares, o que os torna complexos (RAVEN, *et al.*, 1996). Sendo um grande desafio organizar fungos e algas liquenizadas e ao mesmo tempo os organismos não liquenizados, Pois o fungo é considerado dominante (DEPRIEST, 2004).

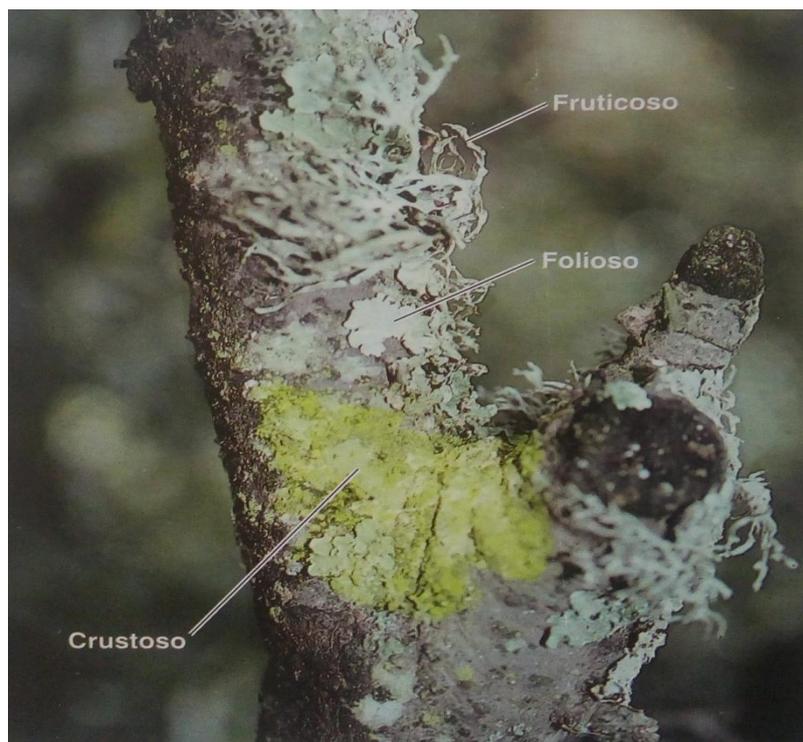
Líquens são organismos simbióticos compostos por um fungo (denominado micobionte) e algas ou cianobactérias (denominada fotobionte). Embora possuam uma descrição simples, estes organismos são, na verdade, comunidades extremamente complexas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

O componente fotossintético é constituído por algas unicelulares pertencentes às divisões *Chlorophycophyta* e *Cyanophycophyta*. Os fungos são na maioria *Ascomycota*, e em menor porção, *Basidio* e *Deuteromicota*, formadores dos Asco, Basídio e Deuterolíquens (NASH III, 1996).

Uma das características dos líquens é possuir uma alta afinidade com o ambiente em que vivem, indicando desde a umidade do ar até a acidez do substrato rochoso, além de demonstrarem alta sensibilidade a inúmeros tipos de poluentes, sendo portanto ótimos bioindicadores de ambientes e da qualidade do ar uma vez que possuem a capacidade de absorver e reter contaminantes atmosféricos em suas células, funcionando também como biomonitorios (MOTA-FILHO et al., 2007)

Os líquens podem ser agrupados em 3 categorias morfológicas, crustoso crescem incrustados no substratos, foliosos são mais parecidos com folhas e os fruticosos possuem projeções semelhantes a dedos. (TORTORA,et al, 2012).

Figura 1 - Líquens crustoso, folioso e fruticoso



Fonte: TORTORA, 2012, p.340.

Figura 2 - Líquen fruticoso do gênero Cladina dendroides



Fonte: Gumboski, 2009

2.2 Metabólitos secundários liquênicos

O estudo químico dos líquens foi iniciado no século XIX com os pesquisadores alemães (ZOPF, 1907) e (HESSE, 1912), (apud,PEREIRA 1996). Esses estudos continuaram no sentido de desenvolver métodos mais simples e específicos de extração, purificação e identificação de substâncias liquênicas, bem como técnicas cromatográficas específicas (ASAHINA; SHIBATA, 1954; CULBERSON, 1972; LEGAZ; VICENTE, 1983).

Mais de 800 metabólitos secundários liquênicos foram descobertos (HAUCK; HUNECK, 2007). Dentre estas moléculas são identificados depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos, ácidos úsnicos e derivados do ácido pulvínico (HONDA et al., 1998).

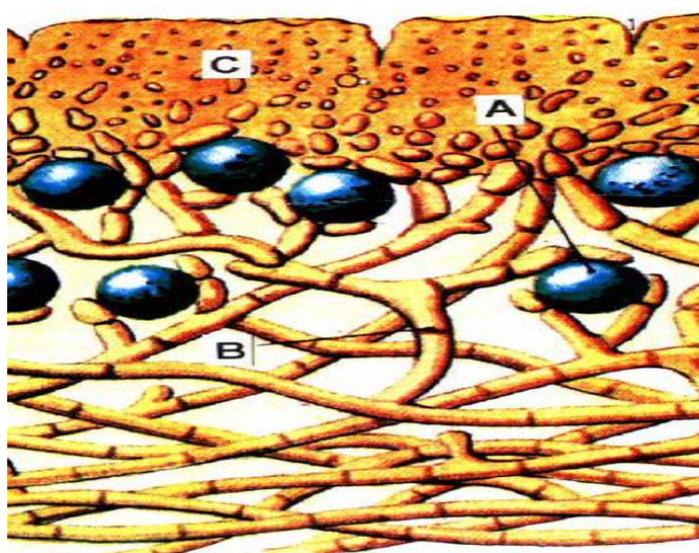
Diversos destes compostos são exclusivos da micota liquenizada (ELIX 1996). A produção de tais compostos varia em função de diversos fatores como a sazonalidade (PEREIRA, 1989), temperatura, umidade e luminosidade (RIBEIRO et al., 2006).

As substâncias químicas produzidas pelos líquens são agrupadas de acordo com a localização do talo em produtos intracelulares e extracelulares, sendo o talo liquênico uma estrutura composta. Alguns compostos são sintetizados pelo fungo outros pela alga. Os produtos intracelulares estão ligados a parede fungo (carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas) (HALE JR., 1983).

Os produtos extracelulares freqüentemente chamados de metabólitos secundários são encontrados na medula e no córtex do fungo. A concentração de metabólitos secundários pode variar de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo liquênico embora em alguns casos a concentração possa ser mais alta (HALE JR., 1983; HUNECK; YOSHIMURA, 1996). O estudo sistemático das substâncias químicas resultantes do metabolismo secundário teve início quando isolaram os ácidos pulvínico, picrolíquênico e úsnico respectivamente (YOSHIMURA et al., 1996).

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

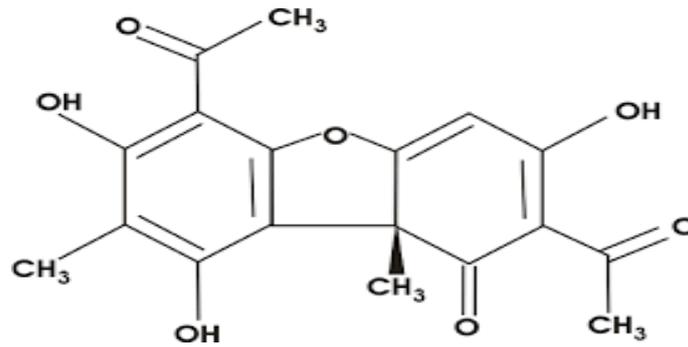
Figura 3 - Modelo esquemático da anatomia de um talo liquênico



Fonte: Pereira, 2000

Legenda: A - Alga; B - Hifas medulares; C – hifas corticais.

Figura 4 - Estrutura química do ácido úsnico

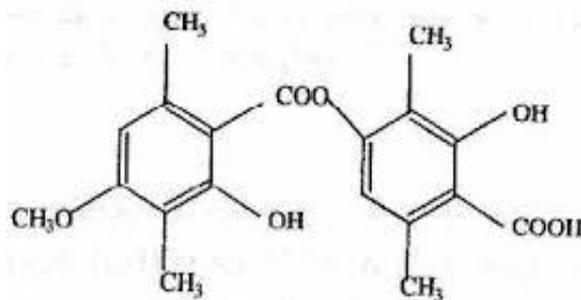


Fonte: Huneck, 1996.

Legenda: Modelo estrutural plano do ácido úsnico com destaque para o carbono quiral.

A estrutura do ácido úsnico 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. Possui um anel furano unindo os anéis A e B, seus cristais de cor amarela variam com solventes utilizados (ASAHINA.; SHIBATA, 1954).

Figura 5 - Estrutura química do ácido barbático



Fonte: Vasconcelos, 2005.

O ácido barbático figura 5, é um depsídeo formado por dois anéis aromáticos interligados entre si por uma ligação éster. Em um agrupamento do anel, apresenta um grupo carboxílico (PEREIRA, 1998) seus cristais possuem

cor amarelo pálido e dissolvem-se facilmente em éter, etanol, acetona e clorofórmio (HUNECK; YOSHIMA, 1996).

2.3 Atividades antimicrobianas

Antibióticos são compostos capazes de inibir o crescimento de microrganismos. Fármacos contra atividade antimicrobiana são extremamente relevantes na saúde humana, o desenvolvimento de tais moléculas é, sem dúvida, um marco na história científica humana. Desde o descobrimento da penicilina por Fleming, várias vidas foram salvas. Entretanto os antibióticos estão entre os fármacos mais indiscriminadamente prescritos. Uma vez que os microrganismos têm a capacidade de se adaptar uma consequência inevitável é a seleção de microrganismos mais resistentes (KATZUNG, 2006). Este fenômeno é chamado de resistência.

Antes mesmo do surgimento dos antibióticos, os líquens já eram usados como agentes antimicrobianos, sendo parte dos primeiros cuidados para com a saúde em países como Argentina, Etiópia e China. (AKINYEMI et al., 2005).

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

A presença dos derivados fenólicos do líquen é determinante para a sua atividade antimicrobiana. Estas substâncias geralmente acidificam a célula bacteriana consequentemente, rompem de membranas citoplasma causa, inativa as enzimas, e interfere no processo de transporte de elétrons e na oxidativo fosforilação (MUELLER, 2001; RANDHIR et ai,.2004; VATTEM et al., 2004).

O processo de dissociação de H^+ pode levar a uma acidificação da superfície da membrana plasmática do microrganismo, o que resulta em H^+ ATPase de ruptura que é necessário para a síntese de ATP (VATTEM et ai, 2004;. MAEDA et al., 1999).

As bactérias gram-positivas são mais sensíveis a estes compostos, apresentando uma membrana simples (VATTEM et al., 2004). Sabe-se que os compostos fenólicos, em geral, são capazes de dissociação iônica o que torna possível justificar a atividade antimicrobiana do ácido barbático (MUELLER, 2001, RANDHIR et al., 2004).

O extrato de *Cladina dendroides* e a atranorina, foram capazes de inibir as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Entretanto, não foram capazes de afirmar se a redução das contorções se deu por sedação, por mudanças da função motora ou por mecanismo periférico (MAIA et al., 2002).

Na maioria das bactérias gram-positivas, a parede celular consiste em muitas camadas de peptidoglicana, formando uma estrutura espessa e rígida e ácidos teicoicos. As gram-negativas consistem em uma ou poucas camadas de peptidoglicana e uma membrana externa (TORTORA et. al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos orgânicos de *Cladina dendroides* líquen, bem como caracteriza-los cromatograficamente.

3.2 Objetivos específicos

Obter os extratos quimicamente.

Obter e caracterizar cromatograficamente a composição fenólica dos extratos orgânicos do líquen *Cladina dendroides*.

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos orgânicos de *Cladina dendroides* líquen em bactérias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenções do material liquênicos

As amostras do líquen *Cladina dendroides* foram coletadas no município de Mamanguape, no estado da Paraíba, Brasil.

4.2 Preparações dos extratos orgânicos

Para obtenção dos extratos orgânicos, o material liquênico foi pesado e previamente limpo e seco com o peso (10,65g) sendo macerado e acondicionado em erlenmeyer. A este, adiciona-se 100 mL de éter dietílico, seguindo-se agitação por 10 minutos sendo posteriormente mantido a 6°C por 24h. Após esse tempo, a mistura filtrada em papel de filtro e o extrato etéreo obtido foi mantido à temperatura ambiente ($28\pm 3^{\circ}\text{C}$). Acrescenta-se ao resíduo liquênico 100 mL de clorofórmio sob as mesmas condições da extração anterior. Após 24h o processo deverá ser repetido com acetona. Os extratos são evaporados à temperatura ambiente em seguida colocado em dessecador até a obtenção de peso constante.

4.3 Análises dos fenóis liquênicos de *Cladina dendroides*

A análise da composição fenólica os extratos orgânicos foi efetuada através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). As cromatografias foram realizadas utilizando-se placas de sílica gel Merck F254. A fase móvel utilizada era constituída de tolueno/dioxano/ácido acético (180:45:5 v/v), de acordo com a metodologia descrita por Culberson (1972). Os extratos orgânicos (éter, clorofórmio e acetona), foram diluídos em seus respectivos solventes e aplicados à placa (1ml), com o auxílio de capilares de vidro. Em seguida as placas foram colocadas em cuba apropriada para corrida e foi efetuada a eluição vertical da placa. Posteriormente as bandas submetesse á

visualização sob luz UV (254 e 366nm) e reveladas através da pulverização de solução de ácido sulfúrico a 10%, e posterior aquecimento a 100°C. As bandas foram identificadas através da análise de seus Rfs e reação de coloração, com comparação com aqueles do padrão de ácido barbático e ácido úsnico.

4.4 Ensaios antimicrobianos *in vitro*

4.4.1 Micro-organismo teste

Para a atividade antimicrobiana *in vitro* foram selecionadas dez bactérias para os ensaios. As bactérias selecionadas foram: *Acinetobacter baumannii* (ATCC-19606), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC-14028), *Shigella flexneri* (ATCC-12022), *Enterobacter cloacae* (ATCC-13047) como bactérias Gram- negativas. *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), *MRSA ferida* (cepa clínica) *Streptococcus pyogenes* (cepa clínica) *Staphylococcus aureus* (ATCC-29213) *Kocuria rhizophila* (ATCC-93041) como bactérias gram-positiva. Os testes foram realizados em duplicata e realizados no laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória – UFPE/CAV.

4.4.2 Teste de difusão em meio sólido com disco de papel

Os ensaios de atividade bacteriana foram efetuados seguindo-se a metodologia descrita por Kirby – Bauer (1966) seguindo o protocolo descrito na Norma Técnica M2-A8 da ANVISA (2003). Foi utilizado o meio de cultura caldo Muller-Hinton (HC) em placas de petri. As suspensões microbianas foram padronizadas de acordo com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias em solução salina a 0,9%, e posteriormente semeado com swab sobre o meio de cultivo. Após isso os discos de papel foram aplicados sobre o meio, previamente embebidos com 20µL de soluções a 1,0 mg.mL⁻¹ de cada extrato orgânico. Os discos foram preparados e mantidos em ambiente estéril até a evaporação dos solventes. Então as placas foram

incubadas a 37°C por 24h. Discos de cloranfenicol (30µg) foram utilizados como controle positivo. Os resultados analisados pela mensuração dos halos de inibição ao redor dos discos, sendo expressos em milímetros (mm), onde de 0-10 foram considerados com pouca atividade, 10 – 20mm atividade média e a partir de 20mm, é considerada de boa atividade. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.4.3 Teste de microtitulação

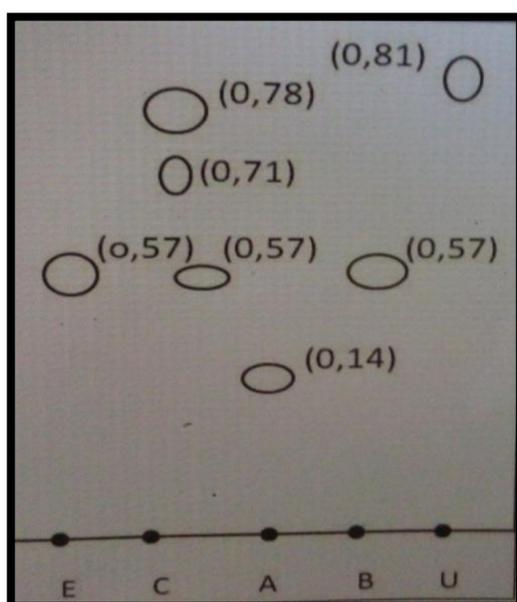
Para os testes da atividade antimicrobiana para microtitulação os ensaios de atividade bacteriana foram efetuados seguindo-se a metodologia descrita por Kirby – Bauer (1966) seguindo o protocolo descrito na Norma Técnica M7-A6 da ANVISA (2003). Foram selecionadas duas bactérias uma gram positiva e outra gram negativa. Na primeira etapa foram distribuídos 95 µL do meio caldo Mueller-Hinton em todos os poços da placa de 96 poços, em seguida foram adicionado 5 µL de bactérias diluídas a $1,5 \times 10^6$ UFC/ml nos poços menos o poço 12, em seguida, adicionou-se 0,0075 Mg do extrato clorofórmico, 0,0050 Mg do extrato acetônico e 0,0050 Mg do extrato éterio. Foi feita uma deluição seriada, foram utilizadas para a solução padrão, controles positivos e negativos do ensaio. As placas foram colocadas na estufa a 37°C por 24 hs. Nas placas de Petri contendo o meio Agar M.H foi semeados uma alçada de 1 µL do poço onde houve inibição visual do crescimento bacteriano a placa foi colocada na estufa a 37°C por 24 h, neste processo foi observado que os extratos tem a menor concentração bactericida (CBM).

5 RESULTADOS E DISCURSSÃO

5.1 Análises dos fenóis liquênicos de *Cladina dendroides*

O método de extração mostrou-se eficiente sendo o melhor rendimento obtido para o extrato etéreo (1,023%) seguido pelo clorofórmico (0,084%) e acetônico (0,075%). A análise cromatográfica dos extratos apresentou um padrão de bandas distinto para os três extratos. Sendo observada a presença do ácido barbático (Rf 0,57) nos extratos etéreo e clorofórmico. Foram observadas ainda três bandas não identificadas, duas no extrato clorofórmico (Rfs 0,71 e 0,78) e uma banda no extrato acetônico (Rf 0,14). Não foi identificada a presença da ácido úsnico (Rf. 0,81) na amostra analisada (Figura 6). Pode ser observado o desenvolvimento dos extratos de *Cladina dendroides*. (HUOVINEN; AHTI 1986) atribuem para esta espécie a atranorina como principal componente, assim como a presença dos ácidos protocetrárico e fumarprotocetrárico. Por outro lado, (LEGAZ et al, 1987) referem a presença do ácido úsnico em *Cladina dendroides*. Estes dados foram confirmados por (PEREIRA, 1989). Entretanto, nos testes aqui realizados, estes compostos não foram detectados.

Figura 6- Cromatografia em camada delgada dos extatos



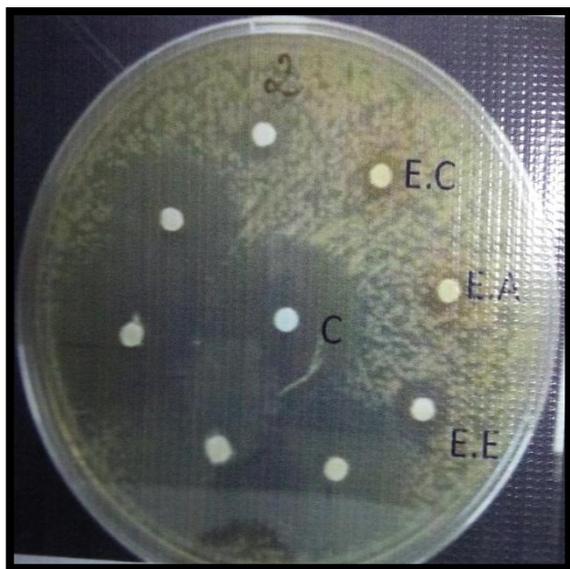
Legenda:
E. representa o extrato etéreo,
C. o Clorofórmico,
A. o Acetônico,
B. e U. são os padrões de
ácido úsnico e ácido babártico
com seus Rfs respectivamente

Fonte: Santos Neto, 2015

5.2 Atividade antimicrobiana pelo Teste de difusão em meio sólido com disco de papel

Os halos de inibição são apresentados na tabela 1, na forma de média. Os resultados mostraram que apenas o extrato etéreo de *Cladina dendroides* mostrou-se ativo frente as bactérias gram- negativa estudadas, sendo pouco efetivo para *Acinetobacter baumannii*, (10 mm), dados apresentados na figura 7. Pode-se observar ainda que os extratos acetônico e clorofórmico não apresentaram atividade, pois estes compostos não apresentam a mesma composição química que o extrato etéreo, sugere-se que o princípio ativo da espécie corresponda ao ácido barbático, ausentes nestes extratos e presentes no extrato etéreo. Os extratos, entretanto, foram menos ativos que o cloranfenicol que apresentou 30 mm e 40 mm de halo de inibição frente às respectivas cepas. Os extratos clorofórmico e acetônico não demonstraram nenhum potencial inibitório. Estes resultados estão de acordo com, (NÓBREGA 2012) que comprovou a atividade antimicrobiana de *Parmotrema andinum* principalmente com o extrato etéreo, contra linhagens de *Micrococcus lutteus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* com halos de inibição entre 8 e 13 mm de diâmetro. (FALCÃO 2002) comprovou a atividade dos extratos orgânicos de *Heterodermia leucomela*, assim como dos ácidos difráctáico, úsnico, e da atranorina frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, que são bactérias gram-positivas, com halos de inibição tiveram variação de 10 a 20 mm.

Figura 7 - Halos de inibição do extrato do líquen *Cladina dendroides* frente à *Acinetobacter baumani* no teste de difusão em meio sólido



Legenda:
 C. clorafenicol,
 E.A extrato acetônico,
 E.C Extrato clorofórmico
 E.E extrato etéreo.

Fonte: Santos Neto, 2015

Tabela 1 - Determinação do halo de inibição dos extratos orgânicos frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas no teste difusão em meio sólido com disco de papel, em relação, ao fármaco cloranfenicol.

Atividade antibacteriana de difusão em meio sólido com disco de papel líquen <i>Cladina dendroides</i> .				
Espécies bacterias	Diâmetro dos halos de inibição em milímetros dos extratos orgânicos.			
	Acetônico	Clorofórmico	Etérico	Cloranfenicol
<i>A.baumani</i>	0	0	10	40
<i>K. rhizophila</i>	0	0	0	33
<i>Salmonella</i>	0	0	0	32
<i>E. coli</i>	0	0	0	30
<i>S. flexneri</i>	0	0	0	32
<i>E. cloacae</i>	0	0	0	30
<i>MRSA ferida</i>	0	0	0	21
<i>S. aureus</i>	0	0	0	30
<i>S. pyogenes</i>	0	0	0	32
<i>E. fecalis</i>	0	0	0	30

Fonte: Santos Neto, 2015

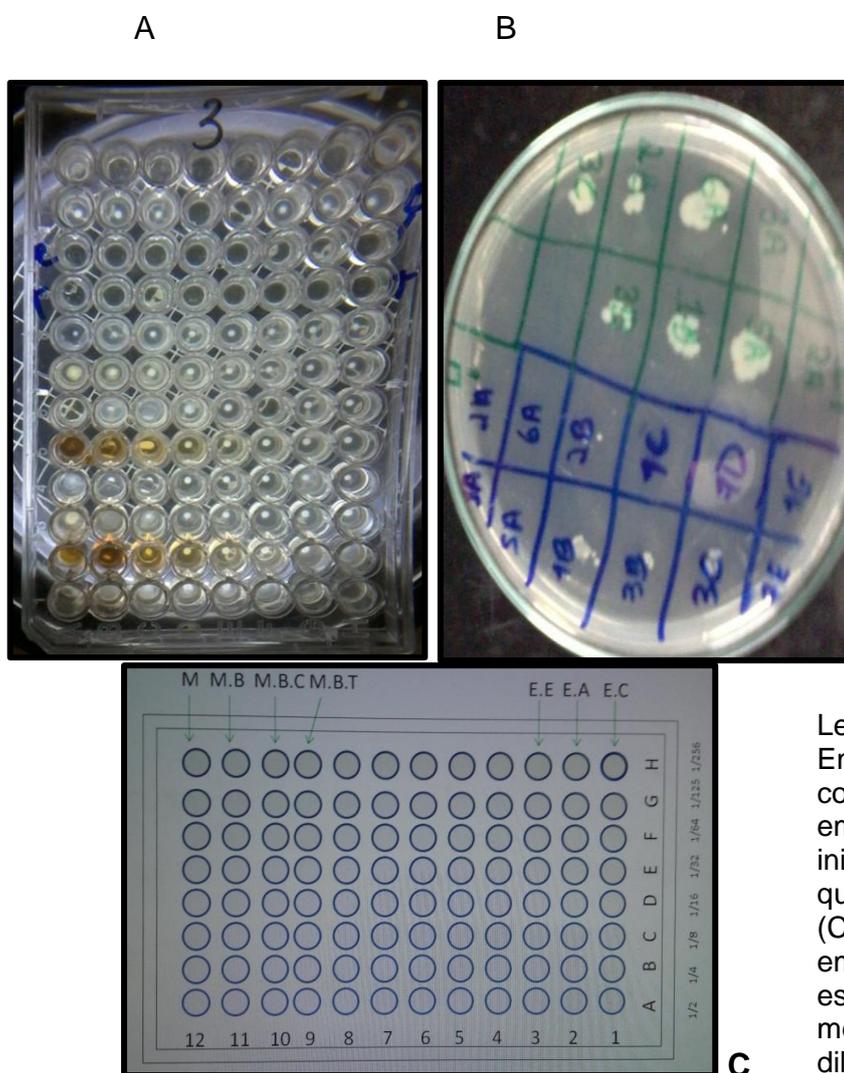
No teste de difusão usou-se uma maior concentração, os extratos clorofórmico e acetônico nem mesmo apresentaram atividade inibitória quando foram utilizados nos testes de difusão. A ausência de uma zona de inibição não significa necessariamente que o extrato seja inativo frente ao micro-organismo

testado, mas sim que a difusão não pode ter sido completa, especialmente para os compostos menos polares que se difundem mais lentamente no meio de cultura. Apenas o extrato etéreo apresentou inibição frente *A. baumani*. Outros fatores que interferem no teste de difusão em papel são: tamanho das moléculas no extrato e polaridade.

5.3 Teste de microtitulação

As concentrações mínima inibitória (MIC) são apresentados na tabela 2, na forma de diluição em mg/mL. Os resultados mostraram que o extrato etéreo de *Cladina dendroides* mostrou-se mais ativo frente às bactérias gram-positiva e gram-negativa estudado, sendo mais efetivo contra as bactérias *Salmonella* com uma concentração mínima de 0,078 mg/mL, *Staphylococcus aureus* 0,16 mg/mL e *MRSA ferida* com uma concentração mínima 0,009mg/ml. O extrato etéreo, entretanto, foi mais ativos que o padrão cloranfenicol e a tetraciclina que apresentavam concentração mínima padrão de 0,39 mg/ml frente às respectivas cepas. Estes resultados está de acordo com, (PIOVANE 2002) que verificou baixa MIC (15-17µg / mL) de ácido divaricatico contra *S. aureus*. Os extratos clorofórmico e acetônico demonstrou potencial inibitório mas não com uma concentração mínima em relação aos padrões. O extrato etéreo apresentou uma eficiente atividade inibitória frente as bactérias Gram-negativa e bactéria Gram-positiva. É de grande importância resultados positivos para bactérias gram-negativas, pois a maioria das drogas e extratos são utilizados mais para bactérias gram positivas, pois são poucas eficientes para sua inibição. (HALE 1983) Eles verificaram baixa eficiência dos compostos liquênicos frente a bactérias Gram-negativas como *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella*. Desta forma, no nosso estudo observou-se excelentes resultados antimicrobiano com o extrato etéreo, sugerindo que a atividade do extrato etéreo, estaria relacionada com a presença de ácido barbático. (ESIMONE;ADIKWUU 2002) publicaram resultados relevantes em relação às atividades antibacteriana, frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* de *Ramalina farinace*.

Figura 8 - Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (CBM).



Legenda:
 Em (A) placa de microtitulação com inibição visual (MIC) em (B) placa de petri com inibição bactericida dos poços que houve inibição visual (CBM) em (C) representação esquemática das diluições dos metabólitos e cálculo das diluições

Fonte: Santos Neto, 2015

Tabela 2 -Determinação da concentração mínima inibitória dos extratos orgânicos frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas no teste de microtitulação, em relação ao fármaco padrão cloranfenicol e tetraciclina.

Atividade antibacteriana do teste de microtitulação <i>Líquên Cladina dendroides</i> .						
Espécies bacterianas	Concentração mínima inibitória (MIC) em mg/ml					
	Acetônico	Clorofórmico	Etéreo	Cloranfenicol	Tetraciclina	
<i>A.baumani</i>	0,63	0,94	0	0,39	0,39	
<i>K. rhizophila</i>	0,63	0,47	0	0,39	0,39	
<i>Salmonella</i>	0,63	1,88	0,078	0,39	0,39	
<i>E. coli</i>	0	0	0	0,39	0,39	
<i>S. flexneri</i>	0,63	0,47	0	0,39	0,39	
<i>E. cloacae</i>	0,63	1,88	0	0,39	0,39	

<i>MRSA ferida</i>	0,63	0,94	0,009	0,39	0,39
<i>S. aureus</i>	0,63	1,88	0,16	0,39	0,39
<i>S. pyogenes</i>	1,30	1,88	0	0,39	0,39
<i>E. fecalis</i>	0	0	0	0,39	0,39

Fonte: Santos Neto, 2015

O método de microdiluição em caldo possibilitou a visualização da atividade inibitória dos extratos em menores concentrações. Pode ser observado que os extratos clorofórmico e acetônico apresentaram atividade inibitória quando foram utilizados em menor concentração, mas não tiveram um excelente resultado em relação aos padrões. Além disso, os extratos clorofórmico e acetônico foram ativos contra mais espécies de bactérias. O extrato etéreo mostrou excelente atividade antimicrobiana, principalmente para bactéria gram-negativa *Salmonella* (0,078 mg/mL) e gram-positivas *MRSA ferida* (0,009mg/mL) e *Staphylococcus aureus* (0,16 mg/mL).

6 CONCLUSÃO

A análise em cromatografia em camada delgada identificou a presença de ácido barbático no extrato etéreo e clorofórmico, além de três bandas não identificadas, uma no extrato acetônico e duas no extrato clorofórmico. Dentre os três extratos de *Cladina dendroides*, o etéreo demonstrou excelente atividade antimicrobiana nos dois testes realizados frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas. O extrato etéreo demonstrou relevante potencial antimicrobiano, uma vez que é constituído por ácido barbático é possível que este composto seja o responsável pela ação antimicrobiana observada.

REFERÊNCIAS

AHTI, T. 2000. Cladoniaceae. **Flora Neotropica** 78:1-362.

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

AKINYEMI, K. O.; Screening of crude extractus of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 6, p. 2005.

BAUER, A. W.,; Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, **American Journal of Clinical al Pathology**, v, 45, p.493-496,1966.

BRISKIN, D.P. Medical plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human healthy. **Plant Physiology**, v. 124, p. 507-514, 2000.

COUTINHO, W.M.; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeito de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos Benomyl e Captan sobre a microflora e qualidade fisiológica de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).**Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p.560-568, 1999.

CULBERSON,C.F. Improved conditions and new data for the identification products by standardize thin layer chromatographic method. **Journal of chromatography** ,v.72, p 113-125,1972.

DEPRIEST, P. T. Early Molecular Investigatin of Lichen Forming Simbiosis. **Annu. Rev. Microbiology**, v. 58, p. 273-301, 2004.

ESIMIONE, C. O.; ADKWU, M.U. Susceptibility of some clinical isolates of *Staphylococcus aureus* to bioactive column fractions from the lichen *Ramalina farinace* (L). **Ach. Phytotherapy Research** , v. 16, p 494-496; 2007

FAHSET, D. Secondary biochemistry of lichens. **Symbiosis**, v.16, p. 117 – 165, 1994.

FALCÃO, E.P.S.; Atividade antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) **Poelt. Acta Farmaceutica Bonarense**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2002.

FRANKOS , V.H. Nomination for Usnic Acid and *Usnea barbata* Herb. (NTP) **Us National Toxicology Program** , v. n. p., 2005.

GAYATHRI, D.; SWAMY, C. T. Lichens: A novel potential source as antimicrobials for human use. **J. Phytol**, v. 4, p. 38-43, 2012.

HALLE JR. M.E. **The Biology of Lichens**.3. ed. London: Edwaed Arnold Pub, 1983.

HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J.; **The lichen forming fungi**. Glasgow: Blackie & Sons, 1984.

HONDA, NK; **Antimycobacterial activity of lichen substances**. Phytomedicine, 2010.

HUNERCK, S .; YOSHIMURA, Y .**Indentificacion of lichen substancesn**. Berlin: Heidelberg; New York: Sringer, 1996. p, 351-352.

HUOVINEN, K. ; AHTI, T. The composition and contents of aromalic lichen substances in the genus *C/adilla*. **AIII. Bor. Fel/li.**, v. 23, p. 93- 106, 1986.

KATZUNG, B.G.; **Farmacologia Básica e Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. P.

LEGAZ, M. E.; Liçhen phenols from *Cladonia dendroides* thalli. **Lichen Physiol. Biochelll**, v. 2, p. 13-21. 1987.

MAIA, MBS ; Antinociceptive Activity of Crude Extracts and Atranorin Obtained from the Lichen *Cladina dendroides* (des Abb) Ahti. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Argentina, v. 21, n.4, p. 259-264, 2002.

MATIAS, E. F. F.; Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L.. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 09, p. 13-16, 2010.

MORENO, S.; Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, Buenos Aires, v.40, p.223-231, 2006.

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.

MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**. local , v. 56, p. 9-16, 2001.

NASH III, T.H. Introduction. In: NASH, T.H.(ed) **Lichen Biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. p. 1-7.

NÓBREGA, N. A.; Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale e avaliação de atividade antimicrobiana, **Acta Bot. Bras.** Feira de Santana, v. 26, n.1, p. Jan./Mar. 2012.

Norma Técnica M2-A8 da ANVISA (2003)M2-A8 Vol. **23 No 1 Substitui a Norma M2-A7** Vol. 20 No. 1

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Genebra: OMS, 2002.

PEREIRA, E. C. G. ; SILVA, N. H. ; SANTOS, RA. Determination of *Teloschistes flavicans* (sw) norm anti-inflammatory activity. **Pharmacognosy Research**, v. 2, p. 205- final, 2010.

PEREIRA, E. C.; Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos I: *Cladonia corallifera* e *Cladonia substellata*. **Revista da Universidade do Amazonas**, Série Ciências Biológicas, , v.1, p.65 –77, 1996.

PEREIRA, E.C., **Biologia de Líquens**. Apostila Do Curso Oferecido Pelo Departamento De Ciências Geográficas, Centro De Ciências Humanas da UFPE. Recife: UFPE, 2000.

PIOVANO, M., J. A.; Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v., 47, p. 235-240, 2002

RANDHIR, R.; Y-T. LIN; K. SHETTY. Stimulation of phenolic, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 637-646, 2004

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHLORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 724p.

RIBEIRO, S.M.; Produção de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio, **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 265-272, 2006.

STENROOS, S.; Phylogeny of the genus *Cladonia* s.lat. (Cladoniaceae, Ascomycetes) inferred from molecular, morphological, and chemical . **Cladistics**, v.18, p.237-278, 2002

TORTORA, Gerad J., **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VASCONCELOS, C.F.B. **Atividade tripamossomicida in vitro do extrato orgânico e do ácido barbático de *Cladonia salmannii***. p. 155-161. Dissertação (Mestrado) – programa de pós-graduação, Universidade Federal de Pernambuco- Recife, 2005.

VARTIA, K.O. Antibiotics in lichens. In: AHMADJIAN, V.; HALE, M.E. (Eds.), **The lichens**. New York: Academic Press, 1973. p. 547.

VATTEM, D. A.; 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**, v. 5, p. 81-91. 2004

YOSHIMURA, I.; Analysis of Secondary Metabolites from Lichen by High Performance Liquid Chromatography with a Photodiode Array Detector. **Phytochemistry Anal**, v. 5, p. 197-205. 1996.