

Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt*

Emerson P. da Silva FALCÃO ¹, Nicácio H. da SILVA ^{1,2}, Norma B. de GUSMÃO ³,
Sheyla M. RIBEIRO ⁴, Neli K. HONDA ⁵, Eugênia C. PEREIRA ⁶ **.

¹ Curso de Mestrado em Bioquímica, ² Departamento de Bioquímica, ³ Departamento de Antibióticos,

⁴ Doutorado em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de
Pernambuco, ⁵ Departamento de Química; Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

⁶ Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal
de Pernambuco Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n Cidade Universitária, 50.740-530, Recife - PE, Brasil.

RESUMO. Ensaios de atividade antimicrobiana com extratos orgânicos de *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt, procedente de região semi-árida do Nordeste do Brasil (caatinga), revelaram ação destes contra bactérias Gram positivas, notadamente *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Tais microrganismos foram submetidos a ensaios de biocromatografia, onde foi possível indicar a atranorina e zeorina, substâncias identificadas por técnicas cromatográficas e espectroscópicas, como princípios ativos da espécie, inclusive sendo a elas atribuída uma possível ação sinérgica.

SUMMARY. "Antimicrobial Activity of Phenolic Compounds from the Lichen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt." Antimicrobial assays with crude extracts obtained from *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt coming from the semi arid region of Brazilian Northeastern (caatinga) revealed action of these compounds against Gram positive bacteria, mainly *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. These microorganisms were submitted to biocromatographic assays, by means of which was possible to detect the presence of atranorin and zeorin, afterwards identified by chromatographic and spectroscopic techniques as active principles of the species, including a possible synergic action attributed to them.

INTRODUÇÃO

A "época áurea" da terapia antimicrobiana iniciou-se em 1941. Desde então inúmeros pacientes foram curados de infecções potencialmente fatais usando-se um ou mais esquemas terapêuticos com antibióticos. Porém, o uso indiscriminado de tais drogas resultou no aparecimento de patógenos resistentes, o que tornou necessário o emprego, cada vez maior, de novos fármacos ¹. Daí a grande importância da pesquisa por novas substâncias com poder bactericida ou bacteriostático.

Líquens são referidos desde a antiguidade como plantas medicinais, inclusive citados por Dioscorides, cirurgião do exército de Nero ². Seus produtos são eficientes contra diversas enfermidades, e também usados na manufatura de medicamentos em alguns países da Europa ³.

A atividade antimicrobiana de líquens, ou de seus compostos isolados, tem sido estudada há muitos anos. Os primeiros estudos foram levados a cabo por Burkholder *et al.* ⁴. Em seguida, muitos outros pesquisadores obtiveram interessantes resultados. Por exemplo, verificou-se que extratos brutos de muitas espécies líquênicas eram ativos contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e ácido-álcool-resistentes como o bacilo da tuberculose (var. *bovis* e *hominis*) ⁵⁻⁷.

No Nordeste do Brasil são também encontrados líquens cujos metabólitos são eficientes contra neoplasias, inflamações; têm ação analgésica e hipoglicemiante, dentre outras utilidades ⁸. No estudo de ação antimicrobiana de espécies ocorrentes sobre solos arenosos de tabuleiros costeiros (vegetação tipo cerrado) do Estado da Paraíba (Nordeste do Brasil), Pereira *et al.* ^{9,10} detec-

PALAVRAS CHAVE: Atividade antimicrobiana, Atranorina, *Heterodermia leucomela*, Zeorina.
KEY WORDS: Antimicrobial activity, Atranorin, *Heterodermia leucomela*, Zeorin.

* Parte de dissertação de mestrado.

** Autor a ser endereçado.

taram ação antimicrobiana em extratos brutos de *Cladonia substellata* e *C. crispatula*, atribuindo ao ácido úsnico o princípio ativo das espécies. Tais preparados impediram o desenvolvimento de fungos e bactérias. Em relação a estas últimas, foram mais eficientes contra as Gram positivas, o que ratifica os dados da literatura.

Neste trabalho avaliou-se a atividade antibacteriana de extratos orgânicos e compostos fenólicos de *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt.

MATERIAL E MÉTODOS

Material liquênico

Heterodermia leucomela (L.) Poelt, foi coletada em região do semi-árido ("caatinga"), município de Alagoinha, estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. As amostras foram identificadas através da análise dos caracteres químicos e morfológicos do talo, pelo Dr. Marcelo Marcelli do Instituto de Botânica de São Paulo, sendo mantidas em caixas de papel até o tratamento químico.

Preparo dos extratos orgânicos

Os líquens foram secos à temperatura ambiente, sendo a fração fenólica extraída através da maceração de 30 g do talo seco com 100 mL dos solventes éter, clorofórmio e acetona, seguindo sua série eluotrópica. Os extratos orgânicos foram mantidos em dessecador até peso constante.

Isolamento e purificação da Atranorina de *Heterodermia leucomela*

A extração e purificação da atranorina procedeu-se por método de cristalização de Asahina & Shibata ¹¹, com modificações. A primeira extração foi realizada com éter dietílico, e os cristais obtidos foram posteriormente lavados com clorofórmio, em sucessivas recristalizações.

Atividade antimicrobiana

Os ensaios antimicrobianos foram realizados em triplicata, através do método de difusão em disco de papel em placas de Petri, contendo meio de agar Müller-Hinton, sendo o inóculo preparado segundo metodologia de Bauer *et al.* ¹². O meio foi previamente inoculado com suspensão dos microrganismos teste a 10^7 UFC.mL⁻¹. Os discos (6,0 mm) foram impregnados com 50 µl das soluções de cada extrato a 2,0 mg.mL⁻¹ e então incubados a 37 °C por 24 h. Placas com os discos impregnados com os solventes foram utilizadas como controle negativo, ou com 50 µl de ácido úsnico, atranorina e ácido difractáico

como controle positivo, fenóis liquênicos dotados de atividade antimicrobiana. Os resultados foram obtidos através da mensuração das zonas de inibição formadas ao redor dos discos, e expressos em milímetros (mm).

Microrganismos teste

Foram selecionados para os ensaios os microrganismos *Staphylococcus aureus* (DAUFPE-01), *Bacillus subtilis* (DAUFPE-16), *Streptococcus faecalis* (DAUFPE-138), como bactérias Gram-positivas; *Pseudomonas aeruginosa* (DAUFPE-39), *Klebsiella pneumoniae* (DAUFPE-396), *Escherichia coli* (DAUFPE-224), como bactérias Gram-negativas; *Mycobacterium smegmatis* (DAUFPE-71), bactéria ácido-álcool-resistente; e amostras de *Streptococcus β-hemolyticus* dos grupos sorológicos B e C (bactérias Gram-positivas) isolados clínicos identificados e cedidos pelo laboratório de Análises Clínicas, Setor de Microbiologia, do Hospital das Clínicas da UFPE. Foram ainda utilizadas cinco espécies de fungos filamentosos (dermatófitos), *Microsporon canis*, *M. gypsum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans*, *T. rubrum*, isolados clínicos cedidos pelo Departamento de Micologia da UFPE, e duas espécies de fungos leveduriformes do gênero *Candida*, sendo quatro cepas de *C. parapsilosis* (URM-3624, 3626, 3621 e 3627), e seis de *C. albicans* (DAUFPE-1007, 4741 e URM 3620, 3622, 3629, 3628).

Análise dos fenóis liquênicos

A análise da fração fenólica foi desenvolvida por meio de técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE).

Para os ensaios em CCD os extratos orgânicos (etéreo, clorofórmico e acetônico) foram diluídos até a concentração de 2,0 mg.mL⁻¹, sendo aplicados 50 µl da solução nas cromatoplas. de sílica Gel F Merck (20 x 20 cm; 0,25 mm de espessura). A fase móvel foi tolueno:dioxano:ácido acético (180:45:5, v/v), de acordo com a metodologia de Culberson ¹³. As bandas foram observadas sob luz UV de comprimento de onda curta e longa, e reveladas com ácido sulfúrico a 10% e aquecimento a 100 °C/10 min, sendo identificadas por suas reações de cor, e R_f comparados aos dos padrões de atranorina e zeorina.

Os extratos orgânicos foram também analisados em CLAE sendo injetados 0,1 mg.mL⁻¹ das amostras em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado a um detector de UV da marca CG. As condições de cromatografia obedeceram à me-

metodologia de Legaz & Vicente ¹⁴, a citar: coluna de fase reversa MicroPack MCH-18 (300 mm x 4 mm I.D.), volume de injeção 20 µl; fase móvel metanol:água:ácido acético (80:19,5:0,5 v/v) em sistema isocrático; pressão 88 atm; temperatura ambiente (28° ± 3 °C); detector de UV a 254 nm; padrão interno atranorina a 0,1 mg.mL⁻¹.

A atranorina purificada foi analisada em cromatógrafo a gás GCQ Mat quadrupólio íon Trap acoplado a um espectrógrafo de massa, através do método de impacto eletrônico a 70 eV. Coluna DB-5 com 30 m e 0,25 mm. A velocidade linear do gás hélio foi de 40 cm.s⁻¹.

Espectroscopia no infravermelho

O espectro no infra-vermelho da atranorina purificada de *H. leucomela* e da atranorina padrão foi realizado em espectrógrafo Bruker IFS66, pela técnica de pastilhas de KBr, sendo utilizada a resolução de 4.0 cm⁻¹.

Biocromatografia

A biocromatografia foi desenvolvida utilizando-se o método de Homans e Fuchs ¹⁵, modificado por Costa-Filho ¹⁶. Os extratos mais ativos, identificados nos ensaios antibacterianos, foram aplicados em placas de sílica Gel F Merck, na concentração de 2,0 mg.mL⁻¹, e desenvolvido no sistema A de solventes (Culberson, 1972) ¹³. Estas foram armazenadas por 12 h, em condições assépticas, até a completa evaporação dos eluentes.

A suspensão microbiana das bactérias mais sensíveis nos testes em disco foi preparada pelo método de Bauer *et al.* ¹². As cromatoplasmas foram depositadas dentro de placas de Petri (18 cm), recebendo então uma camada de meio fundido (50 ml) pré-inoculado com 100 µl dos

microrganismos a 10⁷ UFC.mL⁻¹. As substâncias cromatograficamente separadas que exibiram atividade antibacteriana foram reconhecidas nos cromatogramas por meio da formação das zonas de inibição (halo) ao redor de suas bandas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de atividade antibacteriana mostraram que os extratos mais ativos foram o clorofórmico seguido pelo acetônico e o etéreo. Os três foram eficientes contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* Gram positivos (Tabela 1), e inativos contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* bacterias Gram negativas, bem como aos fungos patogênicos testados, e o *Mycobacterium smegmatis*, ácido álcool resistente. Estes dados ratificam os da literatura sobre a ação de substâncias líquênicas contra microrganismos. Bustinza ⁴ refere que o ácido úsnico quando associado à estreptomicina potencializa a ação deste antibiótico, inclusive contra cepas resistentes de *M. tuberculosis* e bactérias Gram negativas.

Na análise em CCD (Figura 1) dos extratos orgânicos de *H. leucomela* observou-se a presença da atranorina (Rf 92), confirmando os dados de Culberson ¹⁷. Este analisou 14 diferentes espécies do gênero *Heterodermia*, inclusive 8 amostras de *H. leucomela*. Nelas detectou atranorina, e a considerou-a como substância constante da espécie; observou também que 25% das amostras continham zeorina, entretanto considera seu teor maior nos extratos, o que não corresponde aos dados aqui obtidos. Foram ainda observadas bandas de Rf 54, 59, 70 e 84 que não foram identificadas.

EXTRATO	MICRORGANISMOS/ZONA DE INIBIÇÃO (mm)					
	<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Teste-1	Teste-2	Dp	Teste-1	Teste-2	Dp
Etéreo	9,0	9,0	0,0	11,0	12,0	0,70
Clorofórmico	8,0	7,0	0,70	12,0	12,0	0
Acetônico	9,0	8,0	0,70	10,0	11,0	0,70
Ácido úsnico	20,0	19,0	0,70	12,0	11,0	0,70
Atranorina	18,0	19,0	0,70	9,0	9,0	0
Ácido difractáico	10,0	9,0	0,70	8,0	7,0	0,70

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt.

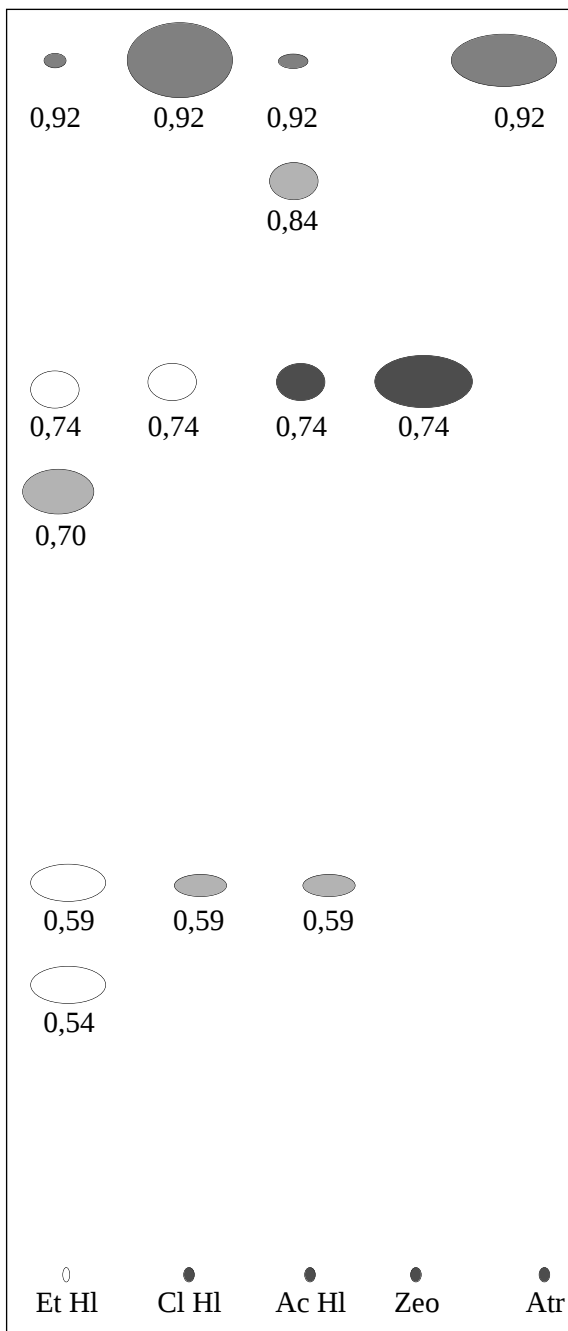


Figura 1. Cromatografia em camada delgada dos extratos orgânicos de *Heterodermia leucomela*. Et HI = extrato etéreo; Cl HI = extrato clorofórmico; AcHI = extrato acetônico; Zeo = zeorina; Atr = atranorina

As análises em CLAE dificultaram a identificação da atranorina, visto que esta substância apresentou Tempo de Retenção (TR) de 18 min em ensaios com seu padrão. Por outro lado, esta substância quando contida nos extratos brutos aumentou seu TR para 20 min (Figura 2).

Este fato pode ser atribuído à substância estar associada às demais da espécie, dificultando

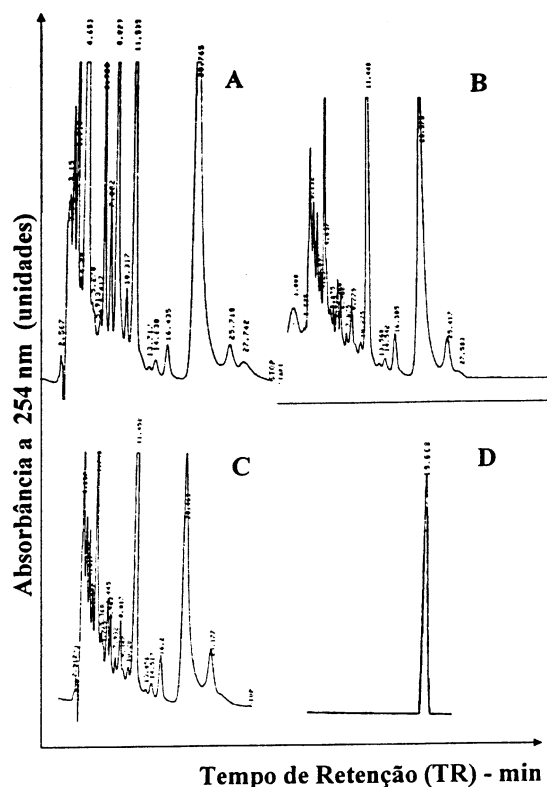


Figura 2. Cromatografias de alta resolução (HPLC) dos extratos etéreo (A), clorofórmico (B), e acetônico (C) de *Heterodermia leucomela*. Padrão de atranorina (D).

sua saída da coluna. Para ratificar esta hipótese foi isolada e purificada a atranorina contida em *H. leucomela*. A amostra foi analisada por Cromatografia Gasosa (CG) e espectroscopia no infra-vermelho (IV). Nos ensaios de CG tanto a atranorina padrão, como a purificada apresentaram TR de 13,43 min (Figura 3); os espectros de massa obtidos (Figura 4) foram idênticos, sendo a massa do pico básico igual a 164 m/e e a massa do maior fragmento igual a 196 m/e, apesar do peso do íon molecular da atranorina ser igual a 374m/e. Isto pode ser explicado pelo fato de que depsídeos liquênicos têm baixa volatilidade e se degradam a altas temperaturas na câmara de vaporização. Assim, a molécula é quebrada antes de sua ionização, e portanto é bastante difícil determinação de sua massa por este método^{18,19}. A massa calculada, porém foi bastante semelhante àquela obtida por Bolognese *et al.*²⁰ que estudaram cristais de atranorina (pf = 193-194 °C) obtendo um pico básico com 196 m/e e picos iônicos significantes de 165 e 136 m/e. Os espectros no infravermelho da atranorina purificada e padrão foram muito simila-

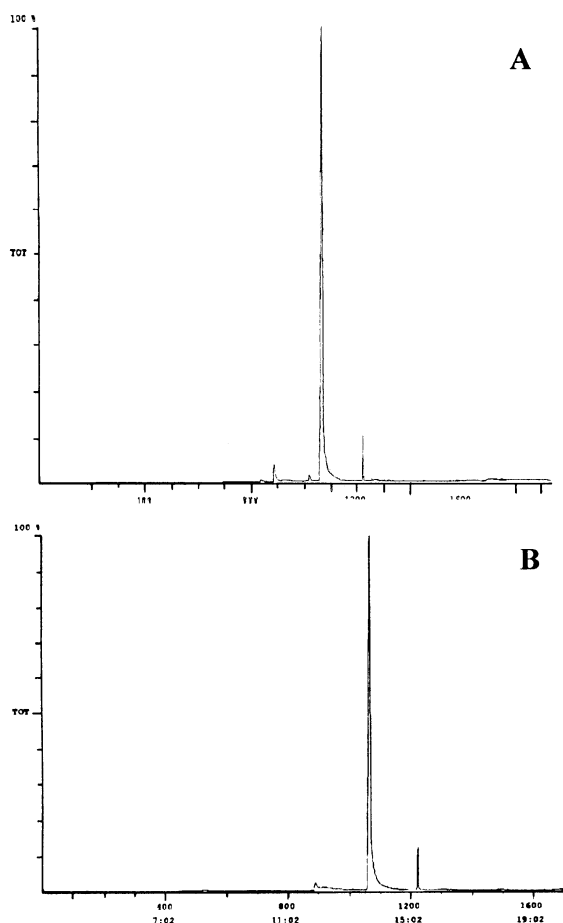


Figura 3. Cromatografias gasosas da atranorina purificada de *Heterodermia leucomela* (A) e substância padrão (B).

res (Figura 5). Além disso, em ambos os casos, é possível observar dois picos principais, correspondentes aos grupos metílicos (2957.1 e 2885.5 cm^{-1}) com absorções de carbonila aldeídica (1651.6 cm^{-1}), e de grupos aromáticos (1454.8 e 1582.3 cm^{-1}) que correspondem aos dados apresentados por Nakanishi²¹ e Huneck e Yoshimura²².

Os resultados apresentados ratificam os ensaios em CCD que mostraram a presença da atranorina nos extratos orgânicos de *H. leucomela* e sua interação com outras substâncias, modificando seu TR.

Os dados de detecção de atividade antimicrobiana, associados aos ensaios químicos indicam que o composto fenólico majoritário em *H. leucomela*, a atranorina, pode ser responsável pela atividade observada. Shibata e Miura²³ e Cavalcanti *et al.*²⁴ reportam a ação *in vitro* da atranorina contra microrganismos, o que possibilitou indicar esta substância como princípio ativo de *H. leucomela*, entretanto a composição dos extratos orgânicos continha outros compos-

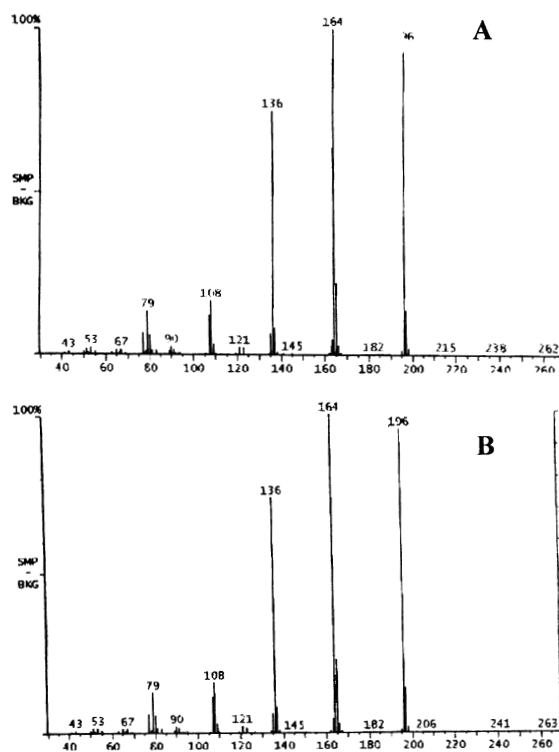


Figura 4. Espectros de massa da atranorina purificada de *Heterodermia leucomela* (A), e substância padrão (B).

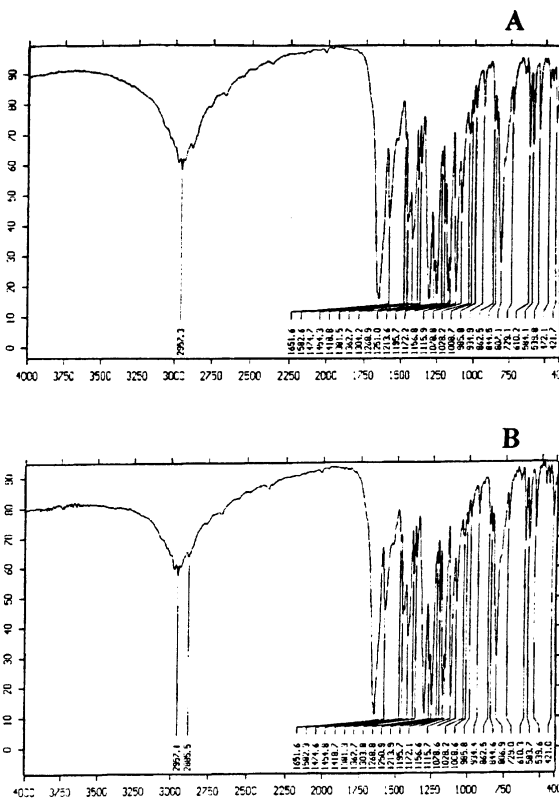


Figura 5. Espectros em infravermelho da atranorina purificada de *Heterodermia leucomela* (A), e substância padrão (B).

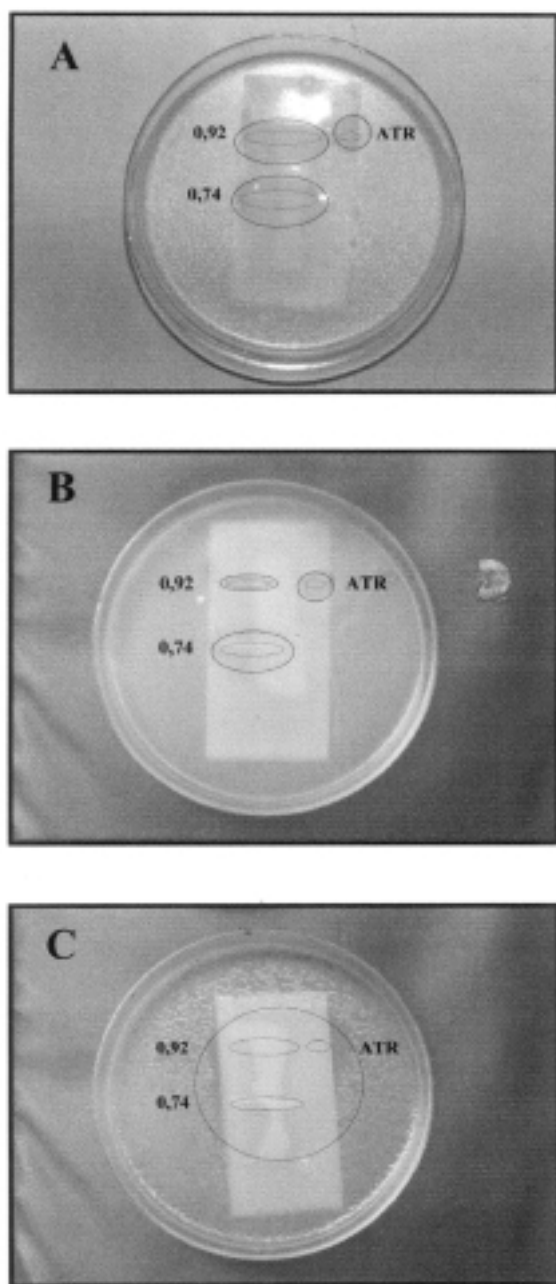


Figura 6. Biocromatograma dos extratos brutos de *Heterodermia leucomela*. Extratos clorofórmico (A) e acetônico (B) contra *Staphylococcus aureus*; extrato etéreo (C) contra *Bacillus subtilis*.

tos, dentre eles a zeorina, referida para a espécie na literatura. Por outro lado, dados da CLAE indicam esta substância sempre em maior teor nos extratos orgânicos, sobretudo no clorofórmico com 36,16%, enquanto no etéreo e acetônico foi detectado 11,6% e 20,59% respectivamente.

Para a indicação mais precisa dos princípios

ativos (p.a.) de *H. leucomela* procederam-se os ensaios biocromatográficos, utilizando-se cromatogramas dos extratos de maior atividade (clorofórmico e acetônico) sobre os quais depositou-se o meio de cultura pré inoculado com microrganismos mais sensíveis nos testes de disco: *S. aureus* ou *B. subtilis*.

Nos testes biocromatográficos foram observados halos de inibição em torno das bandas correspondentes à atranorina e zeorina, para ambos microrganismos testados, notadamente o extrato etéreo contra o *B. subtilis*, onde há indícios de uma ação sinérgica entre tais fenóis (Figura 6). O sinergismo da atranorina é referido por Silva²⁵, onde estuda a ação antiinflamatória e analgésica de *Cladina dendroides* (des Abb.) Ahti, que possui altos teores desta substância em sua composição. Refere, ainda, sua baixa toxicidade, o que permite indicar tal produto como promissor na investigação de produtos bioativos de líquens.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir que *H. leucomela* tem ação antibacteriana, notadamente contra microrganismos Gram positivos, e suas substâncias principais, atranorina e zeorina, podem ser consideradas como princípios ativos da espécie.

Agradecimentos. Este trabalho é o resultado da cooperação entre os Departamentos de Bioquímica, Antibióticos e Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ainda o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), tendo recebido suporte financeiro pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Um dos autores (E. C. Pereira) é bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goodman, L.S. & A. Gilman. (1990) "The Pharmacological Basis of Therapeutic", 8ª ed. p. 1018.
2. Abraham, E.P. & H.W. Florey (1949) Antimicrobial substances from lichens and algae. In: "Antibiotic" v. 1, cap. 13, p. 566-75. Oxford Medical Publications, Geoffrey Cumberlege. Oxford University Press. London, New York, Toronto.
3. Llano, G.A. (1944) *Bot. Rev.* **10**: 1-37.
4. Burkholder, P.R., A.W. Evans, I. Macveigh & H.R. Thorton (1944) *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* **30**: 250-5.
5. Bustinza, F. (1951) *Anales del Instituto Botánico A.J. Cavanilles* **10**: 157-75.

6. Capriotti, A. (1961) *Antib. Chemother.* **11**: 409-10.
7. Silva, J.O., J.E.M. Leite, M.Q. Paulo & L. Xavier-Filho (1986) *Bol. Soc. Broteriana* **59**: 87-96.
8. Pereira, E.C. (1998) "Lichens from Brazilian Northeast (NE) - studies and applications", en: "Lichenology in Latin America" (Marcelli, M. P. & Seaward, M. R. D., eds), Grupo Latino Americano de Liqueñólogos (GLAL). International Association for Lichenology (IAL)/CNPq/CE-TESB. Brasil, págs. 65-70.
9. Pereira, E.C.; G.M. Campos-Takaki, N.H. Silva & C. Vicente (1991) *Bol. Soc. Brot. Portugal* **64**: 173-86.
10. Pereira, E.C., N.H. Silva, G.M. Campos Takaki, L. Xavier-Filho, M.E. Legaz & C. Vicente (1997) *Bol. Ecot. Ecos. Tropi.* **31**: 9-19.
11. Asahina, Y. & S. Shibata. (1954) "Chemistry of Lichen Substances", Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, págs. 1-240.
12. Bauer, A.W.; W.M.M. Kirby, J.C. Sherris & M. Truck (1966) *Amer. J. Clin. Pathol.* **45**: 493-6.
13. Culberson, C.F. (1972) *J. Chromatog.* **72**: 113-25.
14. Legaz, M.E. & C. Vicente (1983) *Plant Phisiol.* **71**: 300-2.
15. Homans, A.L. & A. Fuchs (1970) *J. Chromatog.* **51**: 327-9.
16. Costa-Filho, L. (1991) "Atividade antimicrobiana de substâncias liquênicas". Monografia de Bacharelado em Ciências biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE (Brasil), págs. 1-61.
17. Culberson, W.L. (1966) *Bryologist* **69**: 472-87.
18. Gottlieb, O., R. (1970) "Introdução a Espectrometria de Massa das Substâncias Orgânicas". Ed. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. págs. 5-25.
19. Fahselt, D. (1975) *Bryologist* **78**: 452-5.
20. Bolognese, A., F. Chioccare & G. Scherillo (1974) *Phytochemistry* **13**: 1989-90.
21. Nakanishi, K. (1962) "Infrared Absorption Spectroscopy -Practical". Holden-Day Inc. San Francisco, págs.44-5.
22. Hunnek, S. & I. Yoshimura (1996) "Identification of lichen substances". Springer Verlag, Berlin. págs. 1- 504.
23. Shibata, S. & Y. Miura (1948) *Jap. Med. J. Sci. Biol.* **2**: 22-4.
24. Cavalcanti, L.H., R.F. Maia, E.O. Lima & L. Xavier-Filho (1983) *Rev. Microbiol. São Paulo* **14**: 168-71.
25. Silva, E.F.(1998) "Atividade antiinflamatória e analgésica de extratos orgânicos e substância purificada (atranorina) de *Cladina dendroides* (líquen)". Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, p. 1-67.

