

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS DE *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.)
VAINIO POR IMOBILIZAÇÃO DE FRAGMENTOS DO TALO**

RECIFE

2009

CINTHIA RENATA VIEIRA DE LIMA

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS DE *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.)
VAINIO POR IMOBILIZAÇÃO DE FRAGMENTOS DO TALO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal – Nível Mestrado, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Nicácio Henrique da Silva

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Eugênia Cristina Pereira

RECIFE

2009

Lima, Cinthia Renata Vieira

**Produção de metabólitos bioativos de Pseudocyphellaria aurata (Ach.)
Vainio por imobilização de fragmentos do talo / Cinthia Renata Vieira de
Lima – Recife: O Autor, 2009.**

80 folhas : il., fig., tab.

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Biologia Vegetal, 2009.**

Inclui bibliografia e anexos.

**1. Biologia Vegetal 2. Líquens 3. Pseudocyphellaria aurata
(Ach) Vainio 4. Metabólitos bioativos I. Título.**

.....
579.7 CDD (22.ed.)

**UFPE
CCB – 2009 - 181**

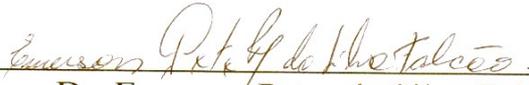
CINTHIA RENATA VIEIRA DE LIMA

“PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS DE
Pseudocyphellaria aurata (ACH.) VAINIO POR
IMOBILIZAÇÃO DE FRAGMENTOS DO TALO”

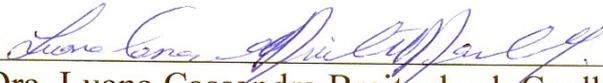
BANCA EXAMINADORA:



Dr. Nicácio Henrique da Silva (Orientador) – UFPE



Dr. Emerson Peter da Silva Falcão - UFPE



Dra. Luana Cassandra Breitenbach Coelho - UFPE

Recife- PE
2009

APRESENTAÇÃO

Este trabalho trata de biotecnologia de líquens, mais especificamente de métodos para produção de metabólitos liquênicos de interesse biológico sem a utilização de grandes quantidades de biomassa dificilmente renovável, tendo em vista a baixa taxa de crescimento que esses organismos, em geral, apresentam.

Após uma breve apresentação da questão e da espécie estudada, uma fundamentação teórica em formato de artigo de revisão, relatando desde a relação entre os simbioses e o metabolismo liquênico até o desenvolvimento de métodos para a produção de seus metabólitos de interesse, entre eles os sistemas de imobilização de fragmentos liquênicos.

Os capítulos que se seguem são artigos científicos a serem publicados contendo os resultados obtidos a partir dos experimentos com os sistemas de imobilização de fragmentos de talo liquênico, com e sem matriz de enclausuramento, visando estudar a viabilidade desse método de produção de metabólitos, estabelecer qual dos sistemas foi mais produtivo para a espécie estudada e a influência da matriz de enclausuramento na produtividade.

Ao mais lindo pedacinho de mim,
fonte de toda a força e coragem
que me faz ir mais além,

Paulinho Zamboni

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que tem iluminado a minha vida e permitido que tudo caminhe bem.

Aos dois amores da minha vida, Thiago e Paulo Zamboni, sem os quais a minha vida não teria sentido.

Aos meus pais e minhas irmãs, por todo apoio, dedicação, amor, e pelos ensinamentos que me levaram para o caminho do crescimento.

Aos meus queridos pais científicos, Prof^o. Nicácio Henrique da Silva e Prof^a. Eugênia Pereira, por tudo que fizeram por mim (e de mim!) ao longo de todos esses anos de orientação, apoio, confiança, amizade e carinho.

Ao Prof^o Emerson Peter, pelas idéias e discussões científicas que melhoraram meu trabalho.

Ao técnico de laboratório do Departamento de Bioquímica, Sr. João Virgínio, sempre presente e disposto a ajudar.

À Leninha, Patryk, Mônica e Polyhanna, amigos para todas as horas: adoro vocês!

Aos demais companheiros de laboratório (não menos importantes!), aos quais tento ensinar tudo que posso, mas que com certeza também me ensinam muito.

À Prof^a Marcela Cáceres e sua aluna Juliana, pela ajuda nos ensaios de vitalidade celular e pela disponibilidade do laboratório e equipamentos.

À Prof^a Laíse Andrade, pela disponibilidade de seu laboratório e equipamentos.

À banca examinadora, pela disponibilidade e interesse em avaliar o presente trabalho.

À PROPESQ e ao Programa de Pós-Graduação de Biologia Vegetal, pelos auxílios financeiros que possibilitaram minhas participações em eventos científicos.

Ao Departamento de Bioquímica, por disponibilizar o Laboratório de Produtos Naturais para o desenvolvimento da dissertação do curso de Mestrado.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro durante a minha vida acadêmica.

A todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a dar mais esse passo, agradeço.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	VI
1. APRESENTAÇÃO	1
2. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE ESTUDADA	2
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
4. TRABALHOS A SEREM SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO	6
4.1 Produção de metabólitos bioativos de líquens por sistemas de imobilização: uma alternativa biotecnológica para a preservação da micota liquenizada	7
4.2 Comparação de métodos para a produção de metabólitos secundários: <i>Pseudocyphellaria aurata</i> (Ach.) Vainio em sistema fixo	26
4.3 Comparação de métodos para a produção de metabólitos secundários: <i>Pseudocyphellaria aurata</i> (Ach.) Vainio em sistema móvel	41
4.4 Comparação de métodos para a produção de metabólitos secundários: <i>Pseudocyphellaria aurata</i> (Ach.) Vainio em sistema de fluxo contínuo	56
5. CONCLUSÕES	71
6. RESUMO	72
7. ABSTRACT	73
8. ANEXOS	74
8.1 Resumos em anais de congressos publicados durante o curso	74

1. APRESENTAÇÃO

Os líquens, entidades biológicas formadas pela simbiose entre fungo e alga, são pouco estudados em relação a outros grupos taxonômicos e, na maioria dos casos, conhecidos por sua capacidade de habitar substratos rochosos. No entanto, esses organismos possuem inúmeras utilidades medicinais e econômicas, além de uma interação notável com os elementos do ambiente (PEREIRA *et al.*, 2001).

Estes fungos liquenizados sintetizam metabólitos únicos na natureza, as substâncias liquênicas. A maioria delas é de natureza fenólica, sendo encontradas depositadas sobre hifas corticais e medulares, na forma de cristais. No talo liquênico, são responsáveis por mecanismos adaptativos; no entanto, quando isoladas, apresentam diversas atividades biológicas (HALE-JR, 1983; NASH, 1996; HUNECK, 1999; MÜLLER, 2001).

A eficiência e a possibilidade de utilização de substâncias liquênicas tornam esses seres de particular interesse à pesquisa. Por outro lado, a exploração desses recursos em busca de seus princípios ativos úteis às indústrias farmacêutica e cosmética, requer processos de cultivo ou reposição do material coletado (PEREIRA, 1998). Para o isolamento de um composto liquênico ativo, é necessária a coleta e destruição de uma grande quantidade de biomassa. A baixa taxa de crescimento dos líquens impossibilita a reposição rápida desta biomassa ao meio ambiente, podendo acarretar desequilíbrio ecológico, ou até mesmo extinção de espécies (HALE-JR, 1983; LEGAZ *et al.*, 2008).

Os sistemas de imobilização foram propostos a fim de produzir continuamente metabólitos de interesse usando quantidades de biomassa que justifiquem o processo (PEREIRA, 1998). O aperfeiçoamento das técnicas e o desenvolvimento de novos sistemas visam o aumento da produtividade e da viabilidade dos biorreatores, reduzindo os custos de produção e de biomassa requerida.

Pseudocyphellaria aurata (Ach.) Vainio é uma espécie de líquen de ampla distribuição e ocorre em áreas de ecótono do estado de Pernambuco. Produz metabólitos bioativos e, em ensaios de imobilização celular, respondeu de forma satisfatória aos sistemas imobilizados, produzindo suas substâncias principais (LIMA *et al.*, *in press*). Sabe-se que a imobilização de fragmentos do talo induz a uma maior eficácia e produtividade dos sistemas imobilizados, sendo uma alternativa à imobilização com células, que acarretava na perda parcial e/ou total dos simbiontes (PEREIRA *et al.*, 1999; FONTANIELLA *et al.*, 2000).

Canoparmelia texana e *Cladonia verticillaris* produziram de 7 a 35 vezes mais nestas condições (NASCIMENTO, 2007; MELO *et al.*, 2007). Por isso, neste trabalho objetivou-se imobilizar fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio em diferentes sistemas para produção de metabólitos (fixo, móvel e de fluxo contínuo) para avaliar a viabilidade e a eficiência de cada sistema para bioprodução de metabólitos da espécie estudada. Além disso, foi testada a influência da caulinita como matriz de enclausuramento.

2. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE ESTUDADA

Pseudocyphellaria aurata (Ach.) Vainio é um fungo liquenizado pela alga verde *Dictyochloropsis symbiotica* (CORDEIRO *et al.*, 2005), pertencendo à família Lobariaceae, que inclui macroliquens folhosos de gêneros relacionados (Figura 01). Possui hábito folhoso, podendo ser facilmente destacada de seu substrato, geralmente córtex de árvores ou arbustos. A superfície superior é esverdeada quando úmida, pardacenta ou castanho-avermelhada quando seco, com proeminente margem sorediada amarela. A reprodução se dá principalmente através da formação de numerosos sorédios granulares amarelos; apotécios são raros. As pseudocifelas irregulares e amarelas na parte inferior do talo são características da espécie, que revela também a coloração amarela da medula devido à presença de compostos secundários da via do ácido chiquímico. O tomento geralmente é curto, não denso, castanho claro. Pode ter a cianobactéria *Nostoc sp.* em cefalódios como fotobionte secundário, principalmente em exemplares de grandes altitudes (GALLOWAY, 1988; FLEIG, 1999; MONCADA & FORERO, 2006).



Figura 01. *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio. Espécime encontrado em Saloá – PE. Foto: C. Lima (2008).

P. aurata tem distribuição ampla em estados do sul e sudeste do Brasil, sobretudo em localidades cuja altitude proporcione a ocorrência de baixas temperaturas, e umidade relativa do ar alta (FLEIG, 1999). Em Pernambuco, o grupo de liquenologia da UFPE registrou ocorrência da espécie em brejos (Garanhuns, Poção, Arcoverde, Saloá), que possuem as características supracitadas para o sul e sudeste brasileiro (LIMA *et al.*, 2004).

Segundo Culberson (1969), as principais substâncias de *P. aurata*, muitas vezes relatada como *Sticta aurata*, são a calicina (Figura 02a), o ácido pulvínico (Figura 02c) e sua lactona (Figura 02b), esta última às vezes chamada de *stictaurina*. As três substâncias são derivadas do ácido pulvínico, compostos amarelos e laranjas, formadas pela via do ácido chiquímico. Huneck e Follmann (1967 *apud* CULBERSON, 1970) isolaram 1.2% de calicina e 3% de lactona do ácido pulvínico a partir de 5g de líquen. Huneck *et al.* (*apud* CULBERSON, 1977) relatam mais três substâncias, o durvilonol, o durvilodiol e uma outra substância neutra não identificada.

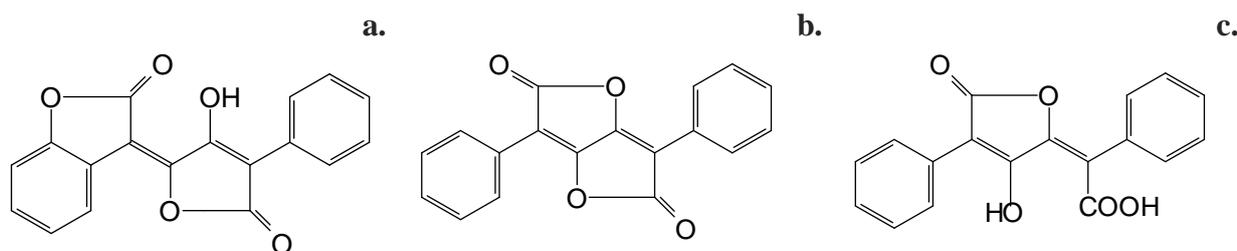


Figura 02. Estruturas moleculares das principais substâncias de *Pseudocyphellaria aurata*, segundo Huneck e Yoshimura (1996): **a.** calicina, **b.** lactona do ácido pulvínico e **c.** ácido pulvínico.

3. REFERÊNCIAS

CORDEIRO, L. M. C., MONTAI, A. V., GORIN, P.A. J., IACOMINI, M. Polysaccharide production by the chlorolichen *Pseudocyphellaria clathrata*. **Bryologist**, v. 108, n. 1, p. 118-122, 2005.

CULBERSON, C. F. **Chemical and Botanical Guide to Lichen Products**. North Carolina, USA, University of North Carolina Press Chapel Hill, 627 p., 1969.

CULBERSON, C.F. Supplement to Chemical and Botanical Guide of Lichen Products. **Bryologist**, v. 73, p. 177 -377, 1970.

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L.; JOHNSON, A. **Second supplement to chemical and botanical guide to lichen products**. St Louis, The American Bryological and Lichenological Society, Inc., 400p, 1977.

FONTANIELLA, B.; LEGAZ, M. E.; PEREIRA, E. C.; SEBASTIAN, B.; VICENTE, C. Requirements to produce fumarprotocetraric acid using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*. **Biotechnology Letters**, v.22, p.813-817, 2000.

FLEIG, M. O gênero *Pseudocyphellaria* (liquens) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas Botânicas**, n. 49, p. 163-179, 1999.

GALLOWAY, D. J. Studies in *Pseudocyphellaria* (lichens) I. The New Zealand species. **Bulletin of the British Museum (Natural History)**, Botany series, v. 17, p. 1-267, 1988.

HALE-JR., M. E. **The Biology of Lichens**. 3ed. London. Edward Arnold Pub., 1983, 90p.

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

HUNECK, S. & YOSHIMURA, I. **Identification of Lichen Substances**. Springer, 492p, 1996.

LEGAZ, M. E. G.; XAVIER-FILHO, L.; VICENTE, C. C. Metabolitos vegetales y microbianos para la industria – un enfoque biotecnológico. **Âmbito Cultural**, Rio de Janeiro, 304p, 2008.

LIMA, C. R. V.; MARQUES, A. M.; MARTINS, M. C. B.; LIMA, M. J. G.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C. G. **Anais - VII Reunião Regional da SBBq e 2º International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology – SBBq**, Recife, Brasil, 2004.

LIMA, C. R. V.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H. Emprego de métodos biotecnológicos para produção de fenóis por *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio. *Iheringia*, série Botânica, *in press*.

MELO, P.; SILVA, N., AMARAL, F. & PEREIRA, E. Produção de metabólitos de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. a partir de imobilização celular com manutenção da integridade do talo e análise das frações aquosas. **VIII Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liqueólogos – Libro de Resúmenes**. Lima – Perú, p. 34, 2007.

MONCADA, B. & FORERO, E. El género *Pseudocyphellaria* Vain. (Lobariaceae – Ascomycetes liquenizados) en Colombia. **Caldasia**, v. 28, n. 2, p. 197-215, 2006.

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

NASCIMENTO, A. T. S. Bioprodução de metabólitos de *Canoparmelia texana* (Tuck.) Elix & Hale a partir de imobilização celular. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2007.

NASH III, T. H. **Lichen Biology**., Cambridge, USA, Cambridge University Press, 1ed., 1996, 303p.

PEREIRA, E. C. Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae (líquen), a partir de imobilização celular. Tese de Doutorado em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 225p., 1998.

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; ANDRADE, L. C. Production of lichen metabolites by immobilized cells of *Cladonia clathrata*, *Phyton*, v. 39, p. 79-89, 1999.

PEREIRA, E. C. G. ; SANTOS, R. A. ; CRUZ, A. ; MONTEIRO, V. C. A. ; NÓBREGA, N. A. ; SILVA, N. H. Bioconservação e utilização econômica de líquens. *Anais do II Encontro Nordeste de Biogeografia*, Maceió, Brasil, p. 20-32, 2001.

4. TRABALHOS A SEREM SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO

**4.1 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS DE LIQUENS POR SISTEMAS
DE IMOBILIZAÇÃO: UMA ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA PARA A
PRESERVAÇÃO DA MICOTA LIQUENIZADA**

C. R. V. Lima; E. C. Pereira; N. H. Silva

Química Nova

Vol. 000 2009

PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS DE LIQUENS POR SISTEMAS DE IMOBILIZAÇÃO: UMA ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA PARA A PRESERVAÇÃO DA MICOTA LIQUENIZADA

Cinthia Renata Vieira de Lima

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife – PE, Brasil.

Eugênia Cristina Gonçalves Pereira*

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.

Nicácio Henrique da Silva

Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife – PE, Brasil.

PRODUCTION OF LICHEN BIOACTIVE METABOLITES THROUGH IMMOBILIZATION SYSTEM: A BIOTECHNOLOGICAL ALTERNATIVE TO PRESERVATION OF THE LICHENIZED MYCOTA. Immobilization systems had been proposed with objective of searching a viable alternative for the production of lichen substances with biological activity, without using a large amount of biomass. The aims of using biotechnology with lichens is obtaining a continuous production of bioactive metabolites, manipulate ideal precursors' concentrations of metabolic pathways for production of specific compounds, and increasing the productivity, associated to the lower cost of the process. Through cell and thallus fragments immobilizations, the continuous synthesis of metabolites with difficult acquisition had been possible from *in natura* lichens. This becomes able biological activity tests with bioactive metabolites without destroying the lichenized mycota, which infer the idea of preservation.

Keywords: lichens, bioactive metabolites, immobilization systems, lichen conservation.

INTRODUÇÃO

Líquens

Os líquens – fungos liquenizados – são entidades biológicas formadas pela simbiose entre dois seres bastante distintos: um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobiontes). Enquanto a alga, através do processo de fotossíntese, produz enormes quantidades de carboidratos para “alimentar” o fungo, este oferece um ambiente propício para o desenvolvimento das algas. Desse modo, produzem um talo de estrutura estável e funcionamento ímpar, não comparado a outros grupos taxonômicos, possibilitando a sobrevivência em ambientes onde nenhum dos dois simbiontes viveria isoladamente^{1,2}.

Os líquens podem ser encontrados desde o nível do mar até as montanhas mais altas. Porém, são relativamente escassos em altitudes acima de 5000m e em matas excessivamente escuras. Podem, também, ser encontrados em desertos onde a temperatura é bastante variável e, em regiões polares com temperaturas extremamente baixas. Seu limite de tolerância às oscilações climáticas é superior a qualquer outro organismo fotossintetizante^{3,4}.

A presença de líquens nos mais variados habitats depende da disponibilidade de fatores físicos e climáticos que proporcionem as condições necessárias para seu desenvolvimento. Muitos não apresentam especificidade para substrato, mas existem espécies que somente se desenvolvem sobre o córtex de árvores, outras sobre as folhas e muitas sobre rochas, alcalinas ou ácidas, necessitando ou não das características como rugosidade, porosidade, dureza, exposição à luz, pH do substrato, presença de partículas no ar, umidade, ventos e temperatura.⁵

Metabólitos liquênicos

Os líquens sintetizam muitas substâncias, oriundas de seu metabolismo tanto primário quanto secundário. O primeiro consiste na produção específica de um único carboidrato pela alga, a partir da fotossíntese, cuja transferência ao micobionte é rápida e em quantidade substancial para transformação e acúmulo.⁶

A partir do transporte massivo de carboidratos fornecidos pela alga, o fungo sintetiza dentro de suas hifas os metabólitos secundários conhecidos como substâncias liquênicas, que são logo excretadas e depositadas na sua superfície na forma de cristais. Estes, acumulados sobre as hifas do córtex superior, participam do mecanismo adaptativo de diversas espécies⁷. Esses cristais podem atuar na fotorrecepção, foto-seleção, impermeabilização, regulação de

temperatura, etc., e são formados por substâncias que caracterizam os líquens, responsáveis pelos diversos benefícios deles advindos^{6,8}.

São conhecidos aproximadamente 800 compostos provenientes do metabolismo de líquens: ácidos alifáticos, *meta-* e *para-*depsídeos, depsídonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico. Embora muitos desses compostos sejam também produzidos por fungos de vida livre e por plantas superiores, a maior parte é considerada exclusiva dos líquens⁹. A maioria dos metabólitos secundários presentes em líquens é derivada da rota acetato-polimalonato; outros são derivados da rota do ácido chiquímico ou da rota do ácido mevalônico¹⁰.

Aplicações dos líquens e suas substâncias

Há muito tempo os líquens são utilizados pela população de diversas partes em mundo como plantas medicinais e por produzirem substâncias oloríferas (óleos essenciais), ou produtos de degradação que geram perfumes muito apreciados. *Evernia furfuracea* era empregada para embalsamar cadáveres – mumificação – no Egito antigo. Fragmentos deste líquen foram encontrados em um vaso da 17ª dinastia egípcia, aproximadamente no século XVII a.C. Quanto ao emprego dos líquens na medicina popular, eram designados como “líquens verdadeiros” aqueles que Dioscorides, cirurgião do exército de Nero, indicava para tratamento de acordo com a semelhança que tivessem com a enfermidade, ou os órgãos afetados. Esta era a “Doutrina dos Sinais”^{11,12}.

Outros líquens como *Lobaria pulmonaria* e *Cetraria islandica* também são relatados para uso medicinal desde o século XVII, sendo incluídos em inúmeras farmacopéias até o século passado¹³. O uso de *Usnea longissima* como expectorante e para o tratamento local de ferimentos é relatado na China. Além disso, há relatos que o pigmento de *Usnea* sp é usado a mais de 50 anos com sucesso para o tratamento da tuberculose¹⁴. Na Finlândia, o extrato aquoso obtido a quente dos chamados musgos das renas (*Cladonia alpestris*, *C. rangiferina* ou *C. sylvatica*) é tradicionalmente usado como remédios para tuberculose¹⁵. O interessante é que posteriormente foi verificada a atividade bactericida de extratos de todos esses líquens.

Na década de 40, estudos de atividade antibiótica com diversos líquens constataram a eficácia desses contra diversas bactérias, principalmente as Gram-positivas¹⁶. O interesse pelas substâncias responsáveis por essa atividade impulsionou os trabalhos de isolamento dos ácidos liquênicos. Bustinza, discípulo de Fleming, foi também um dos precursores neste tema de investigação, estudando a eficiência antimicrobiana de compostos oriundos de líquens,

notadamente o ácido úsnico, isômeros e derivados^{17,13}. Outros pesquisadores da Europa, Estados Unidos e Japão se dedicaram ao estudo da atividade antimicrobiana de extratos e substâncias liquênicas, obtendo resultados bastante satisfatórios¹³. Recentemente, vários trabalhos continuam investigando a atividade bactericida desses organismos a fim de descobrir novos medicamentos, visto que é cada vez maior o número de microrganismos patogênicos resistentes aos tratamentos comuns¹⁸.

Logo foram iniciados estudos de verificação de atividade anticancerígena e antitumoral, cujos primeiros resultados foram publicados no final da década de 50, onde foi demonstrada a eficiência do ácido polipórico de *Sticta coronata* contra leucemia linfocítica¹⁹. Testes com extratos brutos e frações polissacarídicas contra tumores sólidos do tipo sarcoma-180 e adenocarcinoma de mama demonstraram resultados significativos²⁰. Alguns produtos liquênicos nitrogenados impediram por completo o desenvolvimento de tumores ascíticos do tipo carcinoma de Ehrlich; entretanto estes mesmos compostos foram ineficazes contra o sarcoma-180 do tipo sólido²¹.

Os compostos liquênicos de natureza fenólica são também eficazes contra neoplasias. O ácido úsnico apresentou alta atividade contra o carcinoma de Lewis²² e baixa para leucemia linfocítica P388.²³ Este ácido foi, ainda, o responsável pela ação antitumoral e citotóxica de extratos de *Usnea fasciata*, que possui altos teores do referido composto²⁴. A atranorina, bem como os ácidos protoliqueterínico e nefrosferínico, exibiram forte inibição contra o carcinoma de Ehrlich sólido²⁵.

No Brasil, líquens nordestinos e amazônicos vêm sendo avaliados quanto à presença de compostos antineoplásicos. A eficiência de diferentes extratos obtidos de Cladoniaceae contra tumores sólidos do tipo sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich, foi comprovada, bem como contra células KB (carcinoma nasofaríngeo)²⁶. Esses mesmos extratos foram altamente eficazes quando testados frente a mais quatro diferentes linhagens celulares (*in vitro*), notadamente os que continham maiores teores de atranorina e dos ácidos úsnico e estético²⁷. Líquens de distintas procedências como da Chapada da Diamantina (BA), Antártica e tabuleiros arenosos da Paraíba, demonstraram resultados altamente satisfatórios para testes com extratos brutos, onde a concentração dos princípios ativos é muito baixa²⁸.

Líquens da caatinga e de brejos nordestinos foram também estudados. *Teloschistes flavicans*, *Ramalina celastri* e *Heterodermia leucomela*, procedentes da caatinga, apresentaram extratos orgânicos e aquosos ativos contra o carcinoma de Ehrlich e células KB;

Ramalina complanata, ocorrente em brejo de altitude (PB), foi eficaz contra tumores e apresentou atividade contra as células mencionadas²⁹.

Nas últimas décadas, os líquens têm atraído o interesse da comunidade científica pelos vários relatos de atividade farmacológica e medicinal, entre elas: ação antiespasmódica, espamolítica, histamínica, hipotensiva, hipoglicemiante, neuromuscular e analgésica, tanto periférica como central³⁰. Também são relatadas na literatura atividades contra leishmaniose cutânea, antioxidante, antinociceptiva e tripanossomicida³¹. A capacidade fotoprotetora de metabólitos liquênicos tem sido demonstrada por métodos *in vitro* e *in vivo*³².

Os líquens concentram uma grande quantidade dessas substâncias bioativas em seu talo, porém a extração e a purificação de um composto são laboriosas e, as técnicas de isolamento de seus compostos proporcionam baixo rendimento³. Por isso, é necessária a destruição de grande quantidade de biomassa para a obtenção de um composto com atividade biológica^{33,1}. Além disso, algumas dessas substâncias são produzidas apenas durante certo período do ano, ou de acordo com o estado de fertilidade do talo³⁴.

A biotecnologia empregada aos líquens

O intuito de se empregar biotecnologia aos líquens é o de se obter uma produção contínua de metabólitos bioativos, utilizando-se o mínimo possível de biomassa liquênica, geralmente de crescimento lento e, assim, dificilmente renovável³³. Por isso, surgem problemas imediatos quanto ao uso industrial dos metabólitos liquênicos, o qual requer grandes quantidades de matéria prima. Estes problemas na proposição de seu uso para fins comerciais e medicinais podem ser contornados mediante recursos biotecnológicos como a cultura de tecidos e técnicas de imobilização, as quais têm se demonstrado promissoras.

As técnicas de ressíntese do talo liquênico, ou mesmo sua cultura *in vitro*, apesar de atualmente virem ocupando espaço, são dispendiosas e morosas. Estas metodologias não chegaram à reprodução do líquen segundo sua forma original. Muitos fenóis liquênicos são produzidos utilizando-se a técnica de cultura de tecidos, a partir de porções do talo liquênico³⁵. Mesmo nestes casos, não existe uma relação estrita entre os fenóis produzidos pela cultura de tecido e aqueles que correspondem ao talo no seu estado natural³⁶.

São também reportadas as imobilizações enzimáticas, que são baseadas na síntese de compostos resultantes da ação de uma enzima específica. Trata-se, normalmente, da separação da enzima das misturas de reação, o que diminui a ativação enzimática³⁷. A desvantagem desta técnica é que para a obtenção de uma enzima purificada são necessárias

inúmeras etapas de purificação, o que dificulta e encarece o processo. Além disso, existem poucas informações sobre enzimas que sintetizam ou catabolizam os compostos liquênicos e, menos ainda, se conhece sobre sua regulação metabólica, sendo também a pesquisa sobre a biossíntese de fenóis liquênicos é muito dificultada por estes seres crescerem muito lentamente³⁸.

Face à probabilidade de larga utilização econômica de produtos liquênicos, o interesse em sua produção vem aumentando com o passar dos anos. Outras metodologias foram desenvolvidas, como a cultura de tecidos e dos simbiontes, a ressíntese do talo e a imobilização celular de líquens *in natura*. Aqui será dada ênfase aos trabalhos de imobilização desenvolvidos pelo Grupo de Liqueologia Aplicada da Universidade Federal de Pernambuco – Brasil, que vem aprimorando a metodologia ao longo de 16 anos.

A técnica de imobilização celular

O desenvolvimento do método para bioprodução de metabólitos liquênicos, através de células imobilizadas, foi iniciado a partir da técnica de imobilização enzimática em diferentes matrizes. Esse tipo de imobilização tinha a vantagem de evitar todos os passos prévios de purificação enzimática, sem abrir mão da possibilidade de obter os mesmos produtos. Células de *Pseudevernia furfuracea* foram imobilizadas em poliacrilamida, uma matriz desvilatilizante, pois limitava a sobrevivência das células imobilizadas³⁹. Por isso, a poliacrilamida foi substituída por alginato de sódio de viscosidade média como matriz de imobilização para estudos de reações enzimáticas. Esta nova matriz era gelificada em presença de cloreto de cálcio e, as células unidas nesta matriz mantinham sua sobrevivência durante meses, inclusive se dividiam no interior da matriz. Neste processo, os autores conseguiram produtos de degradação da parietina, contida no líquen *Xanthoria parietina*⁴⁰.

Em etapa subsequente, o objetivo era a produção de açúcares pelas células imobilizadas, ao invés de produtos de degradação enzimática. Para isso, o precursor metabólico bicarbonato de sódio foi utilizado como estratégia de produção de polióis por células imobilizadas de *Cladonia verticillaris*. Estas produziram ribitol em quantidades significativas, entretanto, logo se observou que o aumento da concentração do precursor provocava a dissolução das esferas de alginato, visto que havia troca iônica entre o cálcio da matriz e o sódio do bicarbonato⁴¹.

Considerando este impedimento de se manipular a concentração do precursor, o que seria de vital importância para determinação das condições ideais para biossíntese de

substâncias, células de *C. substellata* foram imobilizadas em caulinita, introduzindo o uso desta como matriz de enclausuramento. Neste caso, utilizou-se como precursor o acetato de sódio, viabilizando a produção de fenóis biossintetizados pela via do acetato polimalonato. O ácido úsnico, principal substância da espécie, foi produzido notadamente na concentração de 10,0mM. Além disso, constatou-se a possibilidade do aumento da concentração do precursor sem danificar a estrutura da matriz de aprisionamento⁴².

A caulinita é um silicato do grupo do caulim, produto de degradação dos feldspatos. É uma argila de estrutura cristalina constituída de partículas finíssimas de natureza coloidal, de composição química $\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8\text{Al}_{14}$ ⁴³. A utilização da caulinita nas imobilizações demonstrou resultados satisfatórios, quando submetida aos referidos ensaios, por ser inerte ao precursor enzimático e às suas variações, além de ter um custo bem inferior ao do alginato.

Sistemas de imobilização

Sistema fixo ou tradicional

O primeiro biorreator usando caulinita como matriz de enclausuramento foi montado em colunas de vidro, contendo células isoladas a partir da maceração do talo e soluções de precursor acetato de sódio, em diferentes concentrações. O sistema, mantido sob luz branca continuamente, a fim de estimular a fotossíntese dos ficobiontes⁴², foi denominado sistema fixo ou tradicional (Figura 1).

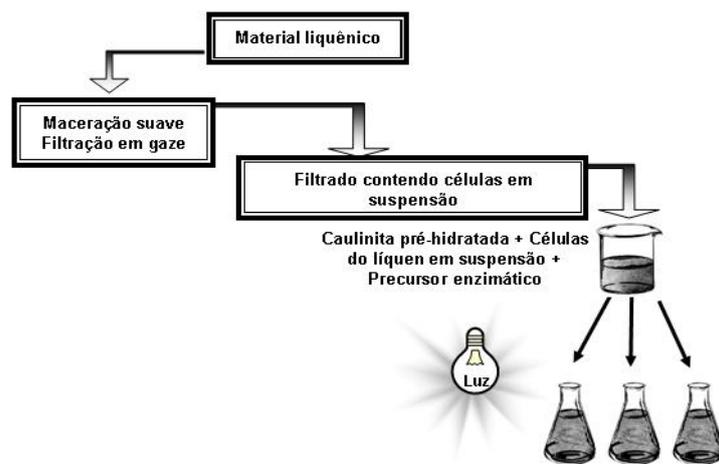


Figura 1: Esquema de imobilização celular em sistema fixo⁵².

Por este processo, muitos trabalhos foram desenvolvidos com diferentes espécies. A literatura relata produção de compostos fenólicos até o final do experimento em *Cladia*

aggregata, *Parmotrema andinum*, *Pseudocyphellaria aurata* e a maior parte das espécies testadas neste sistema⁴⁴⁻⁴⁶. Diferentemente, *Cladonia verticillaris* e *Canoparmelia texana* apresentaram vitalidade por alguns dias apenas para células imobilizadas neste sistema^{47,48}.

A concentração de precursor enzimático mais eficiente é variável de espécie para espécie. A concentração de 0,1mM foi a mais produtiva para *Cladonia salmonea* e *Pseudocyphellaria aurata*^{29,46}; para *Cladonia clathrata*, *Teloschistes flavicans*, *Ramalina aspera*, *Cladia aggregata* e *Canoparmelia texana* a 1,0mM^{49,44,50,48}; *Heterodermia leucomela* e *Cladonia substellata* a 10,0mM^{51,52}. Por outro lado, espécies como *Parmotrema andinum* e *Cladonia corallifera* apresentam produção estável, independentemente da concentração do precursor, enquanto *Cladonia verticillaris* e *C. salzmannii* apresentam produtividade crescente proporcionalmente à concentração do precursor.^{45,53,34}.

O desenvolvimento de novos sistemas

Com o objetivo de aumentar a produtividade da técnica de imobilização celular, através do maior contato entre as células e o precursor enzimático, foram desenvolvidos dois novos sistemas: o de fluxo contínuo e em movimento.

Sistema de fluxo contínuo

Quando se desenvolveu o sistema de fluxo contínuo, o objetivo a ser atingido era chegar a um sistema onde o precursor pudesse ser fornecido continuamente ao biorreator, para evitar longo contato com as células liquênicas. Com isso, elas não poderiam reaproveitar os metabólitos ali produzidos ao longo do experimento. O sistema de fluxo contínuo impossibilitava a saturação do meio com a produção de compostos a partir do precursor enzimático, porque ficavam em contato com as células por pouco tempo. É possível que os produtos secundários dos líquens possam ser reciclados e usados como substratos respiratórios. Dessa forma, pode ocorrer o consumo da acetil-CoA liberada, em caso da depressão da fotossíntese liquênica, ou da captação de nutrientes orgânicos⁵⁴. Metabólitos secundários podem ser catabolizados para suprir “déficits” energéticos e, associados à acetil-CoA podem ser utilizados em novos processos de síntese⁵⁵.

Os biorreatores, neste caso, consistiam de funis com placa porosa forrados com papel filtro e lã de vidro, visando não perder as células imobilizadas ou a caulinita. O precursor enzimático era armazenado acima dos biorreatores e conduzido por equipos, que controlavam seu fluxo. Abaixo dos biorreatores ficavam os depósitos de coleta das alíquotas, obtidas por

gotejamento, com fluxo dimensionado em função do número de dias requerido para cada coleta de fração (Figura 2). Os experimentos eram mantidos à temperatura ambiente e sob luz contínua fluorescente branca, por todo período⁵².

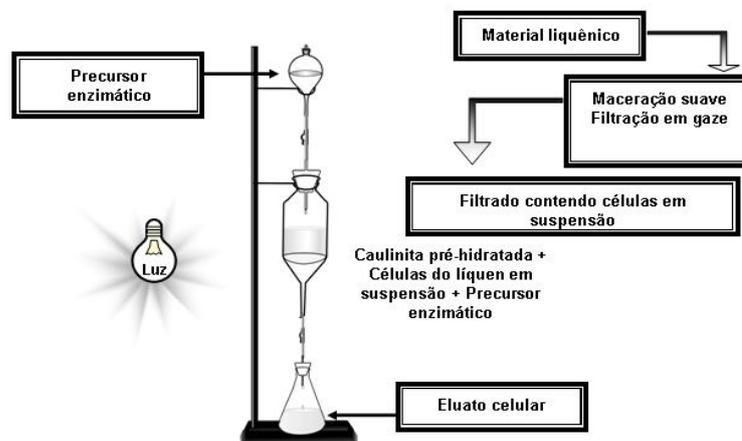


Figura 2: Esquema de imobilização celular em sistema de fluxo contínuo⁵².

No sistema de fluxo contínuo, *C. verticillaris* atinge a maior produtividade na concentração de 1,0mM⁴⁷. *C. substellata* tem a maior produtividade a 10,0mM de NaOAc, e a concentração de 1,0mM manteve-se ativa apenas por 21 dias⁵². A produção a 0,1mM de precursor se destaca para *P. aurata*, mas na concentração de 1,0mM as células perdem a vitalidade após o 11º dia⁵⁶. *C. texana* se comporta do mesmo modo nesse sistema, com produção inversamente proporcional ao aumento da concentração do precursor, mas com vitalidade por todo o período do experimento em todas as concentrações⁴⁸.

Sistema em movimento

Com este novo modelo de sistema, o objetivo era aumentar a superfície e o tempo de contato entre o precursor enzimático e as células liquênicas, através de uma rotação contínua dos biorreatores.

Neste sistema de imobilização, os biorreatores consistiam de tubos de ensaio com tampa submetidos à rotação contínua, numa roldana acoplada a um motor (5-6 rpm), aos quais eram adicionadas soluções de precursor enzimático em diferentes concentrações e a mistura de caulinita e células. Os biorreatores eram mantidos sob luz fluorescente branca e à temperatura ambiente, todo período do experimento (Figura 3)⁵².

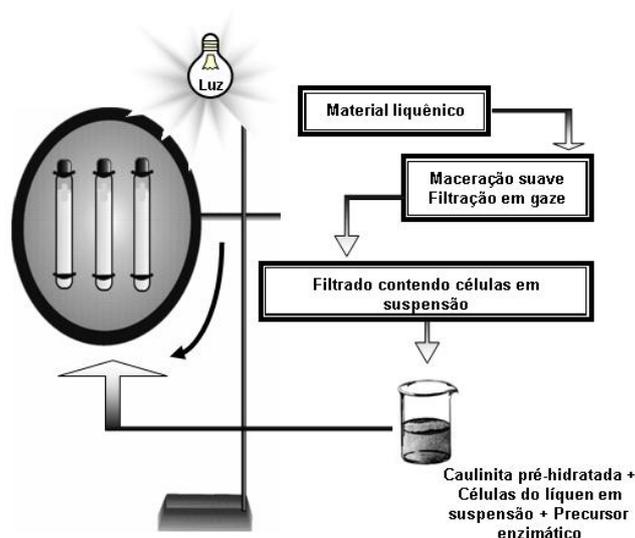


Figura 3: Esquema de imobilização celular em sistema em movimento⁵².

Nestes experimentos, *C. texana* apresentou a maior produtividade com a concentração de 10,0 mM de precursor enzimático⁴⁸. Para *P. aurata*, na concentração de 0,1 mM observou-se uma biossíntese praticamente contínua durante o período de imobilização, sendo a melhor em produtividade⁵⁷. *C. substellata* não produz significativamente na concentração de 0,1mM. Nas concentrações de 1,0 e 10,0 mM, apresentou picos de produtividade nos primeiros dias e, logo depois, uma queda brusca, indicando perda de vitalidade das células⁵². Nesse sistema, as células de *C. verticillaris* perdem a vitalidade após dois dias de experimento nas concentrações 1,0 e 10,0mM⁴⁷. Provavelmente, as células tiveram suas paredes celulares danificadas pelo atrito contínuo com as partículas de caulinita, provocando a sua morte.

Comparação entre a produtividade dos sistemas e concentrações de precursor enzimático

As espécies que tiveram suas células imobilizadas apenas em sistema fixo, em geral, apresentaram comportamento semelhante ao que ocorre na natureza, produzindo seus compostos principais. *C. corallifera* produziu os ácidos úsnico e didímico, *C. salmonea* produziu ácidos úsnico, barbático, rodocladônico e taminólico, *R. aspera* produziu ácido úsnico, *T. flavicans* produziu derivados da antraquinona, *C. aggregata* produziu ácido barbático, *H. leucomela* produziu atranorina e ácido salazínico, *C. salzmanii* produziu os ácidos taminólico e D-barbático e *C. salmonea* produziu ácido barbático^{53,34,50,51}. Uma

exceção a esse comportamento aconteceu com *Cladonia clathrata* que produz, em condições naturais, o ácido fumarprotocetrárico, porém este não foi observado nos eluatos celulares⁴⁹.

Para espécies que foram testadas em todos os sistemas, foi possível observar melhor o comportamento em relação às variações, tanto dos sistemas quanto das concentrações do precursor enzimático.

Para *P. aurata*, a concentração de precursor enzimática de 0,1mM foi a mais produtiva em todos os sistemas analisados⁵⁸. A concentração de 10,0mM de precursor era a mais viável para bioprodução em *Cladonia substellata* em qualquer um dos sistemas, enquanto *C. verticillaris* e *C. texana* não seguiam um padrão de produção em função da concentração do precursor metabólico ou do sistema de imobilização^{52,47,48}.

Para *C. substellata*, o sistema de fluxo contínuo foi mais eficiente. Nos eluatos obtidos das imobilizações foram identificados, por CCD e CLAE, ácido úsnico e este na forma reduzida, além do ácido estítico e ácido norstítico⁵². O ácido úsnico é o principal composto da espécie, enquanto as duas últimas substâncias são reportadas como acessórias⁵⁹.

Para *C. verticillaris*, o sistema mais produtivo foi o móvel, atingindo o dobro da produtividade dos demais sistemas. Porém, em todos os sistemas foi produzida atranorina em maiores teores do que o ácido fumarprotocetrárico, substância majoritária dessa espécie⁴⁷.

C. texana produziu atranorina e ácido divaricático, principais substâncias do talo *in natura*, por todos os sistemas de imobilização e em todas as concentrações de precursor enzimático. Porém, a maior eficiência de produção se dá no sistema de fluxo contínuo, atribuindo o fato à falta de longo contato entre suas substâncias produzidas e as células imobilizadas, pois estas, de alguma forma, devem utilizar os metabólitos como fonte de carbono para seu metabolismo^{48,54}.

Os sistemas fixo e de fluxo contínuo foram igualmente eficientes para bioprodução de metabólitos para *P. aurata*, que apresentou uma grande capacidade de adaptação às imobilizações. No sistema de fluxo contínuo, no entanto, houve produção tanto de ácido pulvínico quanto de sua lactona e calicina, principais substâncias da espécie. Desse modo, o sistema de fluxo contínuo deve ser considerado o mais eficiente para a espécie, já que ele consegue fazer com que as células ali imobilizadas produzam os principais compostos presentes em seu talo *in natura*, além de outros metabólitos⁵⁸.

Aperfeiçoamento da técnica: de células ao talo íntegro

Como a obtenção das células para os experimentos de imobilização implicaria perda de contato entre os simbioses e essa perda, por sua vez, dificultaria a transferência de enzimas e cofatores entre eles⁶⁰, optou-se por imobilizar fragmentos do talo líquênico para melhorar a performance dos sistemas imobilizados.

Comparando a produtividade de células de *C. verticillaris* contidas em fragmentos de seu talo com experimentos utilizando suas células isoladas, constatou-se, nos três sistemas de imobilização, uma bioprodução bastante superior das células contidas no talo íntegro, que variou de 4 a 35 vezes mais em relação aos sistemas elaborados com as células extraídas. Por isso, o sistema de imobilização mantendo a integridade do talo mostrou-se extremamente viável, demonstrando que o ácido fumarprotocetrárico, principal substância fenólica desta espécie, foi produzido em todos os sistemas e concentrações. Houve menos ocorrência de compostos intermediários e atranorina, sugerindo o talo íntegro comportar-se de forma mais semelhante ao encontrado sob condições naturais^{61,47}.

Tais dados corroboram os postulados de que a produção de metabólitos intermediários da biossíntese do ácido fumarprotocetrárico é atribuída à forma de obtenção das células, que levava à perda de contato entre os simbioses e prejuízo na síntese dos compostos principais da espécie⁴⁹.

No sistema fixo, *Canoparmelia texana* produz melhor a 1,0mM, enquanto no sistema em movimento a produtividade praticamente não variou com a concentração do precursor utilizada. Já no sistema de fluxo contínuo, *C. texana* produz ligeiramente melhor a 0,1mM do que nas outras concentrações de precursor. Assim como aconteceu nos sistemas utilizando apenas as células obtidas por maceração do talo, esta espécie produzia atranorina e ácido divaricático, principais substâncias do talo *in natura*, por todos os sistemas de imobilização e em todas as concentrações de NaOAc⁴⁸.

Atualmente, os trabalhos com imobilização de fragmentos do talo vêm sendo testados sem a utilização de caulinita como matriz de enclausuramento, já que em alguns casos ela parece perder a sua função inicial. Além disso, poderá ser possível estudar a influência dessa matriz nos sistemas.

O aperfeiçoamento da técnica caminha, cada vez mais, para a maior produtividade e menor custo final. O próximo passo, em execução, é o isolamento das substâncias líquênicas a partir dos eluatos oriundos das imobilizações e realização de testes biológicos com as substâncias bioproduzidas.

De uma maneira geral até o momento foram bioproduzidas substâncias das mais diversas, de líquens com ocorrência em ecossistemas distintos, com aplicação comprovada por trabalhos científicos (Tabela 1).

Tabela 1: Substâncias bioproduzidas por células e fragmentos do talo imobilizados de várias espécies de líquens.

SUBSTÂNCIA	ESPÉCIE/PROCEDÊNCIA	ATIVIDADE BIOLÓGICA
Atranorina	<i>Cladonia verticillaris</i> / cerrado (PB)	Anti-inflamatório
	<i>Heterodermia leucomela</i> /caatinga (PE)	Anticancerígeno
	<i>Parmotrema andinum</i> /cerrado (PE)	Antialérgico
		Fixador de perfume Inibidor tripsina e elastase
Ácido barbático	<i>Cladonia salzmannii</i> / cerrado (PB)	Antibacteriano
	<i>Cladonia salmonea</i> /campo rupreste (MG)	
	<i>Cladia aggregata</i> /campo rupreste (MG)	
Ácido taminólico	<i>Cladonia salzmannii</i> / cerrado (PB)	Antibacteriano
	<i>Cladonia salmonea</i> /campo rupreste (MG)	
Ácido úsnico	<i>Cladonia substellata</i> / cerrado (PB)	Antimicrobiano
	<i>Cladonia corallifera</i> /cerrado (AM)	Anticancerígeno
	<i>Cladia aggregata</i> /campo rupreste (MG)	Herbicida
	<i>Ramalina aspera</i> /caatinga (PE)	Protetor UV
Ácido didímico	<i>Cladonia corallifera</i> /cerrado (AM)	Antimicrobiano
Ácido rodocladônico	<i>Cladonia corallifera</i> /cerrado (AM)	Antibacteriano
	<i>Cladonia salmonea</i> /campo rupreste (MG)	
Telosquistina/ Falacinol	<i>Teloschistes flavicans</i> /caatinga (PE)	Anticancerígeno Antiinflamatório Antimicrobiano
Ácido fumarprotocetrárico	<i>Cladonia verticillaris</i> /caatinga (PE)	Antiinflamatório
Calicina	<i>Pseudocyphellaria aurata</i> /caatinga (PE)	Antibacteriano Protetor UV
Ácido pulvínico	<i>Pseudocyphellaria aurata</i> /caatinga (PE)	Antibacteriano
Ácido lecanórico	<i>Parmotrema andinum</i> /cerrado (PE)	Antibacteriano Inibidor de fotossíntese (PSII) Micotóxico

*Adaptada de Pereira *et al.* (2001)⁶².

CONCLUSÕES

A imobilização de células liquênicas vem respondendo satisfatoriamente ao problema de produção de metabólitos secundários de diferentes espécies de líquens. Os experimentos demonstram que cada espécie liquênica se comporta de uma maneira em cada um dos sistemas testados, o que demonstra a necessidade de mais estudos de seu comportamento em condições adversas. Os novos sistemas desenvolvidos e o aperfeiçoamento da técnica propiciam um aumento na produtividade com a utilização de cada vez menos biomassa, proporcionando o seu uso sustentado.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelas bolsas de mestrado e de produtividade em pesquisa de C.R.V. Lima e E.C. Pereira, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nash III, T. H.; *Lichen Biology*, 1ed., Cambridge University Press: Cambridge, 1996.
2. Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E.; *Biologia vegetal*, 7ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.
3. Hale-Jr., M. E.; *The Biology of Lichens*, 3ed., Edward Arnold Pub.: London, 1983.
4. Brodo, I. M. Em *The Lichens*; Ahmadjian, V. & Hale, M.E. eds.; Academic Press: New York, 1973.
5. Marcelli, M. P. Em *Biologia de líquens*, Xavier-Filho, L. Legaz, M. E.; Córdoba, C. V.; Pereira, E. C. eds.; Âmbito Cultural: Rio de Janeiro, 2006.
6. MacFarlane, J. D.; Kershaw, K. A. Em *Lichen Physiology and Cell Biology*, Brown, D. H. ed.: Plenum Press: N. York, 1984.
7. Lawrey, J. D.; *Bryologist*. **1986**, 2, 268.
8. Culberson, C. F.; Culberson, W. L.; Johnson, A. A.; *Second Supplement to Chemical and Botanical Guide of Lichen Products*, The American Bryological and Lichenological Society, Inc.: St. Louis, 1977.

9. Elix, J. A. Em *Lichen Biology*, Nash III, T. H. ed. Cambridge University Press: Cambridge, 1996; Huneck, S.; Yoshimura, I.; *Identification of Lichen Substances*. Springer-Verlag: Berlin, 1996; Honda, N. K.; Vilegas, W. *Química Nova*, **1998**, 2,110.
10. Honda, N. K. Em *Biologia de liquens*, Xavier-Filho, L. Legaz, M. E.; Córdoba, C. V.; Pereira, E. C. eds.; Âmbito Cultural: Rio de Janeiro, 2006.
11. Abrahan, E. P.; Florey, H. W.; *Antibiotic* **1949**, 13, 566.
12. Llano, G.A.; *Smithsonian Institution Publ.*, **1951**, 4, 385.
13. Bustinza, F.; *Ann. Inst. Bot. A. J. Cavanilles*, **1951**, 10,157.
14. Shibata, S.; Ukita, T.; Tamura, T.; Miura, Y.; *Jap. Med. J.*, **1948**, 2, 152.
15. Vartia, K. O.; *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn* **1950**, 28, 7.
16. Burkholder, P. R.; Evans, A. W.; MacVeigh, I.; Thornton, H. R.; *Proc. Nat. Acad. Sci. Was.*, **1944**, 30, 250; Burkholder, P. R. & Evans, A. W.; *Bull. Torrey Bot. Club*. **1945**, 72, 157.
17. Bustinza, F. & Caballero, A.; *Ann. Inst. Bot. Madrid*, **1948**, 7, 511.
18. Saenz, M. T.; Garcia, M. D. & Rowe, J. G.; *Fitoterapia* **2006**, 77, 156.
19. Cain, B. F.; *J. Chem. Soc.*, **1960**, 1, 936.
20. Takeda, T.; Funatsu, M.; Shibata, S.; Fukuoka, F.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1972**, 20, 2445.
21. Takahashi, K.; Kon, T.; Yokoto, I.; Shibata, S.; *Carbohydrate Research*, **1981**, 89:166.
22. Kupchan, S. M.; Koppermann, H. L.; *Experientia*, **1975**, 31, 625;
23. Takai, M.; Uehara, Y.; Beisler, J. A.; *J. Med. Chem.*, **1979**, 22, 1380.
24. Pereira, E. C.; Nascimento, S. C.; Lima, R. M. C.; Silva, N. H.; Oliveira, A. F. M.; Boitard, M.; Beriel, H.; Vicente, C. & Legaz, M. E.; *Tokai J. of Exp. and Clin. Medicine* **1994**, 19, 47.
25. Hirayama, T.; Fujikawa, F.; Kassahara, T.; Otsuka, M.; Nishida, N.; Mizuno, D.; *Yakugaku Zasshi*, **1980**, 100, 755; Santos, N. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 1996.
26. Lima, R.M.C.; Nascimento, S.C.; Pereira, E.C.; Campos-Takaki, G.M.; *Bol. Soc. Brot.*, **1990**, 63, 339.
27. Nascimento, S. C.; Pereira, E. C.; Oliveira, A. F. M.; Silva, N. H.; Boitard, M.; Bèriel, H.; *Acta Bot. Bras.*, **1994**, 8, 97.
28. Silva, N. H.; Santos, N. P.; Lima, R. C. & Pereira, E. C.; *Resumos da XVIII Reunião Nordestina de Botânica*, Areia, Brasil, 1994.

29. Pereira, E. C. Em *Lichenology in Latin America*; Marcelli, M. P. & Seaward, M. R. D. eds., Grupo Latino Americano de Liquenólogos (GLAL), International Association for Lichenology (IAL)/ CNPq/CETESB: Brasil, 1998a.
30. Appa-Rao, A. V. N.; Prabhakar, M. C.; *Fitoterapia*, **1987**, 58, 221; Silva, E.F.; Catanho, M. T. J.; Pereira, E. C. & Silva, N. H.; *Resumos do Terceiro Encontro do Grupo Latino-Americano de Liquenólogos (GLAL-3)*, Campos do Jordão, Brasil, 1997.
31. Fournet, A.; Ferreira, M. E.; Arias, A. R.; Ortiz, S. T.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Quilhot, W.; Fernández, E.; Hidalgo, M. E.; *Comp. Biochem. Physiol.*, **1997**, 116, 51; Odabasoglu, F.; Aslan, A.; Cakir, A.; Suleyman, H; Karagoz, Y.; Bayir, Y.; Halici, M.; *Fitoterapia*, **2005**, 76, 216; Maia, M. B. S.; Silva, N. H.; Silva, E. F.; *Acta Farmaceutica Bonaerense*, **2002**, 21, 259; Carvalho, E.A.B.; Andrade, P.P.; Silva, N.H.; Pereira, E.C.; Figueiredo, R.C.B.Q.; *Micron*. **2005**, 36, 155.
32. Fernández, E.; Quilhot, W.; González, I.; Hidalgo, M. E.; Molina, X.; Meneses, I. ; *Cosmetic Toil.*, **1996**, 111, 69; Racan, F.; Rosan, S.; Boehm, K., Fernández, E.; Hidalgo, E.; Quilhot, W.; Rubio, C.; Boehm, F.; Piazena, H.; Oltmanns.; *J. Photochem. Photobiol.*, **2002**, 68,133.
33. Vicente, C.; Solas, M. T.; Pereyra, M. T.; Pereira, E. C.; Pedrosa, M. M.; Em *Flechten Follmann. contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann*, Daniels, J. A.; Schulz, M.; Peine, J. eds., The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne: Germany, 1995.
34. Pereira, E. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil, 1998b.
35. Yamamoto, Y.; Em *Plant Cell Culture in Japan*, Komamine, A. ed., CMC Co. Ltd.: Tóquio, 1991.
36. Yoshimura, I.; Kurokawa, T.; Yamamoto, Y. & Kinoshita, Y.; *Bryologist*, **1993**, 96,412.
37. Mozhaev, V. V.; Berezin, I. V. & Martinek, K.; Em *Methods in Enzymology*, Mosbach, K. ed., Academic Press: New York, 1987.
38. Seaward, M. R. D.; *Lichen Ecology*, Academic Press: London, 1977; Hill, D. J. *Lichenologist*, **1984**, 16, 273.

39. García-Junceda, E.; Vicente, C.; *Plant Cell Reports*, **1986**, 5,155.
40. Vicente, C.; Molina, M. C.; *Bibl. Lichenol.*, **1993**, 53, 267.
41. Pereira, E. C.; Molina, M. C.; Pedrosa, M. M.; Solas, M. T.; Vicente, C.; Legaz, M. E.; *Anales de Química*, **1995a**, 91, 253.
42. Pereira, E. C.; Pereyra, M. T.; Matos, S. C.; Silva, N. H.; Andrade, L.; Vicente, C.; *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **1995b**, 64, 171.
43. Leinz, V.; Amaral, S. E.; *Geologia Geral*, Companhia Editora Nacional: São Paulo, 1978.
44. Monteiro, V. C. S.; Silva, N. H.; *Anais da VI Jornada de Iniciação Científica: ITEP 60 anos*, Recife, Brasil, 2002.
45. Nóbrega, N. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2002.
46. Lima, C. R. V.; Marques, A. M.; Martins, M. C. B.; Lima, M. J. G.; Silva, N. H.; Pereira, E. C. G.; *Anais - VII Reunião Regional da SBBq e 2º International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology – SBBq*, Recife, Brasil, 2004.
47. Amaral, F. M. ; Silva, N. H. ; Melo, P. ; Pereira, E. C. G.; *Anais da VIII Reunião Regional da SBBq e 3rd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology*, Natal, Brasil, 2006.
48. Nascimento, A. T. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2007.
49. Pereira, E. C.; Vicente, C.; Legaz, M. E.; Silva, N. H.; Silva, E. F. & Andrade, L. H. C.; *Phyton*, **1999b**, 39, 79.
50. Santos, R. A.; Pereira, E. C.; *Anais do VIII Congresso de Iniciação Científica – CONIC Propesq/UFPE*, Recife, Brasil, 2000; Santos, R. A.; Silva, N. H.; Cruz, A.; Pereira, E. C.; *Anais do 52º Congresso Nacional de Botânica*, João Pessoa, Brasil, 2001.
51. Cruz, A.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H.; Santos, R. A.; Ribeiro, S. M. A.; *Anais do XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Cuiabá, Brasil, 2002.
52. Lima, M. J. G.; *Dissertação de Mestrado em Bioquímica*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2004.
53. Pereira, E. C.; Silva, E. F.; Silva, M. I. L.; Vital, M. J. S.; Silva, N. H.; Vicente, C. & Andrade, L. H. C.; *Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas*,

- 1999a**, 2/3, 25; Cordeiro, A. P. R. & Pereira, E. C. G.; *Anais do XI Congresso de Iniciação Científica – CONIC UFPE*, Recife, Brasil, 2004.
54. Legáz, M. E.; Millanes, A. M.; Córdoba, C. V.; Em *Biologia de líquens*, Xavier-Filho, L. Legaz, M. E.; Córdoba, C. V.; Pereira, E. C. eds., *Âmbito Cultural*: Rio de Janeiro, 2006.
55. Vicente, C.; Ruiz, J. L.; Estévez, M. P. *Phyton*, **1980**, 39, 15.
56. Lima, C. R. V.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H.; *GLAL 7 - VII Encontro do Grupo Latinoamericano de Liqueólogos - Livro de resumos*, Curitiba, Brasil, 2005.
57. Oliveira, M. A. G. S.; Lima, C. R. V.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H.; *XXIX Reunião Nordestina de Botânica*, Mossoró, Brasil, 2006.
58. Lima, C. R. V.; Silva, N. H. & Pereira, E. C. G.; *GLAL 8 - VIII Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liqueólogos - Libro de Resúmenes*, Lima, Perú, 2007.
59. Ahti, T.; Stenroos, S.; Xavier-Filho, L.; *Tropical Biology*, **1993**, 7, 55.
60. Fontaniella, B.; Legaz, M. E.; Pereira, E. C.; Sebastián, B.; Vicente, C.; *Biotechnology Letters*, **2000**, 22, 813.
61. Melo, P.; Silva, N., Amaral, F. & Pereira, E.; *GLAL 8 - VIII Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liqueólogos – Libro de Resúmenes*, Lima, Perú, 2007.
62. Pereira, E. C. G. ; Santos, R. A. ; Cruz, A. ; Monteiro, V. C. A. ; Nóbrega, N. A. ; Silva, N. H.; *Anais do II Encontro Nordestino de Biogeografia*, Maceió, Brasil, 2001.

**4.2 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS: *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.) VAINIO EM SISTEMA FIXO**

C. R. V. Lima; E. C. Pereira; N. H. Silva

Comparação de métodos para a produção de metabólitos secundários: *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio em sistema fixo

Cinthia Renata Vieira de Lima; Eugênia Cristina Gonçalves Pereira*; Nicácio Henrique da Silva

Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE.

ABSTRACT

This study aimed to make a comparison of fix cell immobilization systems, with using or in absence of kaolinite as entrapment matrix, for production of secondary metabolites of Pseudocyphellaria aurata. In three bioreactors the thallus fragments were placed with kaolinite, or without this clay. In all cases, sodium acetate (NaOAc) was placed (0,1; 1,0 and 10,0 mM) as biosynthetic precursor. Samples collected during the experiment were extracted and read in spectrophotometer. Organic extracts (diethyl ether, chloroform and acetone) were obtained from in natura thallus, as well for purification of main compounds of P. aurata. The extracts were subjected to thin layer chromatography and HPLC. In both systems, with and without the use of kaolinite, the concentration of 10.0 mM NaOAc was the most productive. The system using kaolinite is about 25% more productive than the system without its use. It is possible that the kaolinite prevent friction damage to the thallus.

Key words: *Pseudocyphellaria aurata*, lichens, immobilization, fix system.

INTRODUÇÃO

Líquens – fungos liquenizados, são entidades biológicas formadas pela simbiose entre organismos bastante distintos: um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobiontes). Enquanto a

alga, através da fotossíntese, produz grandes quantidades de carboidratos para “alimentar” o fungo, este oferece um ambiente propício para o desenvolvimento das algas. Assim, produzem um talo de estrutura estável e funcionamento ímpar, não comparado a

outros grupos taxonômicos, possibilitando a sobrevivência em ambientes onde nenhum dos simbiontes viveria isoladamente (Nash, 1996; Seymour *et al.*, 2005).

Os líquens e suas substâncias foram utilizados na medicina tradicional de diversos povos por séculos, mas não tem sido bem aproveitados pela indústria farmacêutica moderna. Dificuldades no estabelecimento de culturas axênicas e de condições para um crescimento rápido impedem o seu uso rotineiro na maioria dos processos de “screening” convencionais (Miao *et al.*, 2001). Além disso, a extração e a purificação de um composto liquênico com atividade biológica requer a destruição de uma grande quantidade de biomassa dificilmente renovável devido ao lento crescimento dos líquens (Hale-Jr., 1983; Vicente *et al.*, 1995; Nash, 1996).

Os sistemas de imobilização celular foram propostos com o objetivo de obter uma produção contínua de metabólitos bioativos, manipular concentrações ideais de precursores de vias metabólicas para produção de compostos específicos, e aumentar a produtividade, associada ao baixo custo do processo (Pereira *et al.*, 1995a; 1995b).

Pseudocyphellaria aurata (Ach.) Vainio foi testada em vários sistemas de

imobilização celular, respondendo satisfatoriamente e, produzindo os compostos principais relatados para a espécie (Lima *et al.*, *in press*). A forma de obtenção das células para os experimentos de imobilização celular implica na perda de contato entre os simbiontes, o que dificulta a transferência de enzimas e cofatores entre eles (Fontaniella *et al.*, 2000). Por isso, optou-se por imobilizar fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* para aumentar o desempenho dos sistemas de imobilização. Foram testados dois sistemas, com e sem o uso de caulinita como matriz de aprisionamento, todos utilizando acetato de sódio (NaOAc), em diferentes concentrações, como precursor enzimático, para determinar as melhores condições para produção em sistema fixo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e armazenamento do material liquênico

Amostras de *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio foram coletadas na Serra da Prata – coordenadas 24L 0742998 e UTM 9001885 – município de Saloá-PE. Após a limpeza, o material liquênico foi acondicionado em sacos de papel até o momento de seu processamento. Parte do material foi

depositado no Herbário UFP, na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Obtenção dos extratos orgânicos do talo *in natura*

Os extratos orgânicos foram obtidos a partir de 1g do talo picotado de *P. aurata*. A extração foi realizada à temperatura ambiente, sob agitação mecânica por 1h e posterior descanso em refrigerador por 24h, seguindo a ordem eluotrópica dos solventes: éter (2x), clorofórmio (2x) e acetona (2x) (Pereira *et al.*, 1995b).

Sistema fixo para produção de metabólitos

Seis porções de 1g do talo *in natura* de *Pseudocyphellaria aurata* foram picotadas com tesoura e acondicionadas em colunas de vidro, biorreatores do sistema fixo. A estes foram adicionados 100 mL das soluções de acetato de sódio (NaOAc) nas concentrações de 0,1mM, 1,0mM e 10,0mM. A três delas, correspondendo às três concentrações, foram adicionadas 30g de caulinita previamente hidratada, lavada com água deionizada e aquecida a 100°C por 6h, constituindo o sistema com a utilização de matriz de aprisionamento. As outras três representaram o sistema

sem a utilização de matriz. O experimento foi mantido sob luz fluorescente branca e à temperatura ambiente por todo o período do experimento (Pereira, 1998).

Obtenção e análise das frações

Alíquotas de 30mL de todos os sistemas imobilizados foram coletadas às primeiras 24, 48, 72h e 96h. Após este período, as coletas foram realizadas num intervalo de 7 dias, a fim de completar 4 meses de experimento. Estas amostras permaneceram congeladas até o momento de seu processamento. À medida que se retiram as alíquotas do meio, o mesmo volume do precursor enzimático (acetato de sódio) era repostado.

As alíquotas tiveram seus metabólitos bioproduzidos extraídos conforme Pereira *et al.* (1995b), em duas etapas: a primeira éter/acetato de etila, 65:35, v/v e a segunda com clorofórmio/acetonitrila, 60:40, v/v. Os extratos orgânicos foram avaliados por espectrofotometria a 254nm e 310nm. Em seguida, os que possuíam a mesma concentração de precursor foram reunidos, postos a evaporar e pesados para quantificação da produção.

Cromatografias

Os extratos orgânicos obtidos do talo *in natura* e do talo após a

imobilização foram submetidos a cromatografia em camada delgada (CCD). As amostras foram aplicadas em placas de sílica gel F₂₅₄₊₃₆₆ e desenvolvidas no sistema de solventes A (tolueno / dioxano/ ácido acético, 180:45:5, v/v). As bandas evidenciadas foram reveladas sob luz UV curta e longa (254 e 366 nm).

Para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os extratos orgânicos obtidos do talo *in natura* foram injetados na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹, e os eluatos celulares a 1,0 mg.mL⁻¹, em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado a um detector de UV da marca CG. As condições de cromatografia foram: coluna de fase reversa MicroPack MHC-18 (300mm x 4mm I.D.), 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 254nm (Legaz e Vicente, 1983).

Percentual de morte celular na camada de algas

Para obter o percentual de morte celular na camada de algas, foi utilizado o corante supra vital vermelho neutro a 0,1%, de acordo com trabalhos realizados anteriormente com os mesmos objetivos (Le Blanc & Rao, 1973; Calvelo &

Liberatore, 2004). Como controle foi utilizado o material liquênico *in natura*.

Foram selecionados fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* de aproximadamente 1cm² de cada um dos sistemas de imobilização testados e do controle. Esses então foram corados e cortados para observação em microscópio óptico sob imersão. Foram observadas pelo menos 500 células de cada tratamento, sendo posteriormente calculado o percentual de células vivas e mortas.

Análise de clorofilas e feofitinas

Para quantificação de clorofilas e feofitinas nos fragmentos de *Pseudocyphellaria aurata* submetidos às imobilizações, cerca de 200mg do material liquênico foram separadas de cada tratamento. Esse material foi acondicionado em tubos de ensaio com tampa, onde foram adicionados 10 mL de acetona a 80% (acetona : água deionizada, 8 : 2, v/v). Protegidos da luz, os tubos foram guardados em geladeira por 48h, quando então foram submetidos a leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda 536, 645, 663 e 666 nm. Com os dados obtidos pelas leituras foi possível a quantificação das clorofilas A e B (Hill, 1963) e feofitinas A e B (Vernon, 1960). Os controles, representados pelo material

liquênico *in natura* após 24h e 12 dias da coleta em campo, receberam o mesmo tratamento das amostras de imobilização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias liquênicas são formadas por unidades fenólicas que têm origem a partir de ácidos carboxílicos policetônicos, derivados do ácido acético, que o sistema enzimático liquênico utiliza na forma de acetato (Honda, 2006). Por isso, utilizou-se acetato de sódio (NaOAc) como precursor para a síntese dos compostos fenólicos de interesse.

Por outro lado, a luz é a fonte de energia dos ficobiontes. A energia luminosa é convertida em carboidratos e produtos nitrogenados pelas algas, que repassa estes nutrientes ao fungo (Honneger, 1991).

A partir dos gráficos construídos com os dados espectrofotométricos é possível observar a produtividade dos fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* ao longo dos 123 dias de experimento, nos dois sistemas de produção de metabólitos. Foram detectadas substâncias produzidas em ambos os sistemas e em todas as concentrações de precursor enzimático utilizados. *Canoparmelia texana* e *Cladonia verticillaris* também

apresentaram resultados satisfatórios quando submetidas a este tipo de experimento, mantendo a produtividade dos sistemas por cerca de 2 meses (Nascimento, 2007; Melo *et al.*, 2007).

No sistema fixo utilizando caulinita como matriz de enclausuramento, a concentração de 10,0 mM foi a que induziu a maior produtividade, durante praticamente todo o experimento (Figura 1). Nesta concentração, a produtividade foi crescente até o 46º dia, onde observou-se o maior pico, seguido por uma brusca queda nos dias seguintes. Outro pico ocorre aos 102 dias, porém com menor intensidade. As concentrações de 0,1 e 1,0 mM de NaOAc seguiram basicamente o mesmo padrão de produtividade.

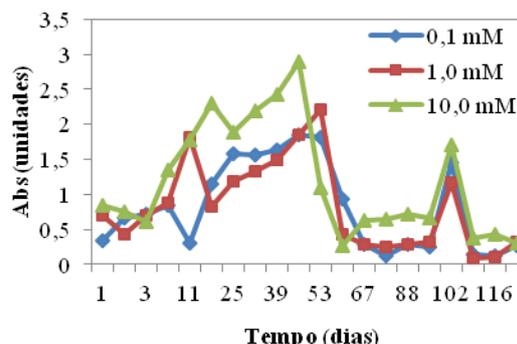


Figura 1. Comparação da produtividade de fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* no sistema fixo de imobilização, utilizando caulinita nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

Quando utilizadas células de *P. aurata* em diferentes sistemas de imobilização com caulinita, Lima *et al.* (*in press*) relatam uma maior produtividade na concentração de 0,1 mM de precursor acetato de sódio. Comparando a produtividade entre o sistema fixo de imobilização com células utilizando caulinita como matriz e a produtividade do sistema testado neste trabalho, constata-se um aumento de 3,5 vezes na produtividade.

De acordo com a Figura 2, no sistema fixo com caulinita notou-se uma maior produção dos metabólitos extraídos com a mescla de solventes clorofórmio : acetonitrila (60 : 40, v/v), e uma maior absorvância de material bioproduzido medido a 254 nm (Figura 2). Segundo Huneck & Yoshimura (1996), a calicina possui pico de absorção 253 nm, enquanto o ácido pulvínico e sua lactona possuem picos a 256 nm. A maior produtividade evidenciada pelas leituras a 254 nm demonstra que os fragmentos de *P. aurata* imobilizados neste sistema produziram estas substâncias.

No sistema onde a caulinita não foi utilizada como matriz, a produção de metabólitos foi proporcional ao aumento da concentração de precursor NaOAc. A concentração de 10,0 mM, a mais produtiva, apresentou um pico aos 53

dias, e outro menos intenso aos 102 dias de experimento (Figura 3).

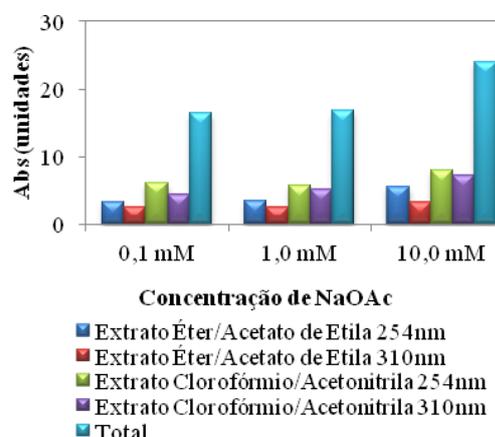


Figura 2. Produtividade total de fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* no sistema fixo de imobilização, utilizando caulinita nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

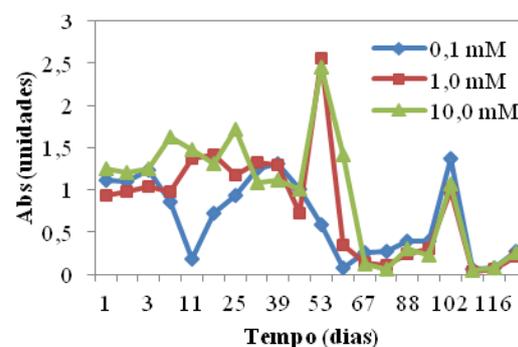


Figura 3. Comparação da produtividade de fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* no sistema fixo sem a utilização de caulinita, nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

Neste sistema notou-se uma maior produção dos metabólitos extraídos com a mescla de solventes clorofórmio : acetonitrila (60 : 40, v/v). Estes apresentaram absorbâncias equivalentes quando lidos a 254 e 310 nm (Figura 4). Vários compostos fenólicos apresentam pico de absorção na faixa dos 312 nm (Huneck, 1973). Possivelmente, neste sistema, houve tanto a produção de metabólitos intermediários quanto as substâncias principais da espécie.

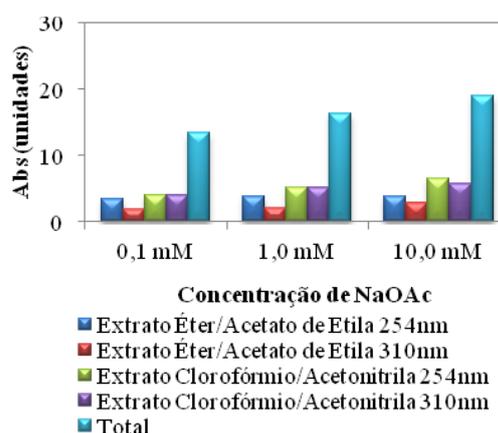


Figura 4. Produtividade total de fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* no sistema fixo sem a utilização de caulinita, nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

Ao comparar os sistemas para produção de metabólitos com e sem caulinita (Figura 5), observou-se que, em todas as concentrações, o sistema com caulinita apresentou produtividade maior

que aquele sem a matriz de aprisionamento. Na concentração de 10,0 mM de acetato de sódio, a mais produtiva em ambos os sistemas, a produtividade chegou a ser cerca de 25% maior no sistema com caulinita. A caulinita, mesmo sendo considerada uma argila inerte (Leinz & Amaral, 1978), parece interferir de alguma forma no metabolismo de *P. aurata*, aumentando a capacidade produtiva de seus fragmentos dentro dos biorreatores, o que demonstra a função de fixar/imobilizar validada.

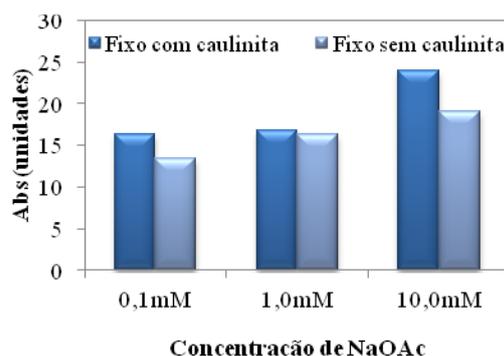


Figura 5. Comparação da produtividade total dos fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* nos sistemas com e sem caulinita, nas diferentes concentrações de precursor NaOAc.

As cromatografias em camada delgada indicaram que os extratos orgânicos obtidos a partir do material liquênico *in natura* e dos submetidos às imobilizações (Figuras 6 e 7) apresentaram as três substâncias principais da espécie: a calicina (Rf 78),

o ácido pulvínico (Rf 09) e sua lactona (Rf 80). Os valores de Rf obtidos são semelhantes aos reportados por Huneck & Yoshimura (1996) para as mesmas substâncias.

Além disso, os extratos dos fragmentos submetidos aos sistemas de produção de metabólitos, sobretudo os do sistema fixo sem caulinita, apresentaram diversas outras bandas, que possivelmente se tratam de compostos intermediários produzidos por eles nos biorreatores.

Certamente, as condições às quais os fragmentos de *P. aurata* foram submetidos nos sistemas de produção de metabólitos são diferentes daquelas encontradas em seu habitat natural, o que induziu a produção de diferentes compostos.

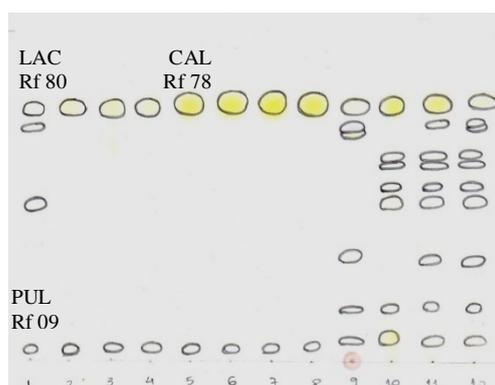


Figura 6. Cromatograma em camada delgada dos extratos orgânicos obtidos dos fragmentos de talo de *Pseudocyphellaria aurata in natura* e submetidos ao sistema fixo com caulinita em diferentes concentrações de precursor NaOAc. Legenda: 1- extrato éter talo *in natura*;

2- ext. éter talo imobilizado a 0,1 mM; 3- ext. éter talo imob. 1,0 mM; 4- ext. éter talo imob. 10,0 mM; 5- ext. clorofórmio talo *in natura*; 6- ext. clorof. talo imob. a 0,1 mM; 7- ext. clorof. talo imob. 1,0 mM; 8- ext. clorof. talo imob. 10,0 mM; 9- ext. acetônico talo *in natura*; 10- ext. acet. talo imobilizado a 0,1 mM; 11- ext. acet. talo imob. 1,0 mM; 12- ext. acet. talo imob. 10,0 mM. LAC: lactona, CAL: calicina, PUL: ácido pulvínico.

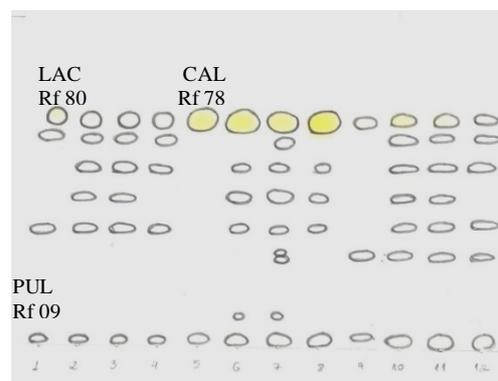


Figura 7. Cromatograma em camada delgada dos extratos orgânicos obtidos dos talos *in natura* e submetidos ao sistema fixo sem caulinita. Legenda: 1- extrato éter talo *in natura*; 2- ext. éter talo imobilizado a 0,1 mM; 3- ext. éter talo imob. 1,0 mM; 4- ext. éter talo imob. 10,0 mM; 5- ext. clorofórmio talo *in natura*; 6- ext. clorof. talo imob. a 0,1 mM; 7- ext. clorof. talo imob. 1,0 mM; 8- ext. clorof. talo imob. 10,0 mM; 9- ext. acetônico talo *in natura*; 10- ext. acet. talo imobilizado a 0,1 mM; 11- ext. acet. talo imob. 1,0 mM; 12- ext. acet. talo imob. 10,0 mM. LAC: lactona, CAL: calicina, PUL: ácido pulvínico.

Segundo Hale (1983), variações de temperatura, umidade e luminosidade podem interferir na atividade fisiológica dos líquens, afetando a síntese de seus

metabólitos. Além das condições ambientais, outros fatores podem influenciar a produção de metabólitos liquênicos, como por exemplo, a idade do talo e fatores genéticos (Quilhot & Guzmán, 1988; Ahti, 2000). Porém, a origem genética de variações químicas intraespecíficas permanece obscura (Miao *et al.*, 2005).

Em análises por CLAE de extratos orgânicos do talo *in natura* observou-se a presença dos três compostos principais relatados para *P. aurata*, apresentando um maior teor de ácido pulvínico. A figura 8 representa a CLAE do extrato clorofórmico, apresentando, após o pico do solvente, os picos do ácido pulvínico, da sua lactona e da calicina, respectivamente.

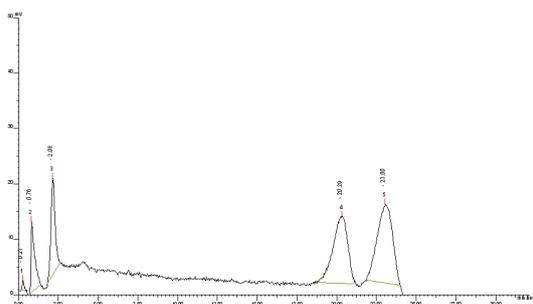


Figura 8. CLAE do extrato clorofórmico do talo *in natura* de *Pseudocyphellaria aurata* a $0,1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Dos eluatos obtidos dos sistemas imobilizados com ou sem caulinita, selecionaram-se os mais produtivos para identificar as substâncias bioproduzidas

(Figuras 9 e 10). Ambos apresentam um pico maior referente ao ácido pulvínico, além de outras bandas intermediárias de compostos não identificados, porém a lactona do ácido pulvínico e a calicina não foram detectadas. É possível que estas substâncias se convertam no ácido pulvínico quando as amostras permanecem solubilizadas e sob iluminação por um longo período, já que estas puderam ser detectadas por CCD após a leitura em espectrofotômetro.

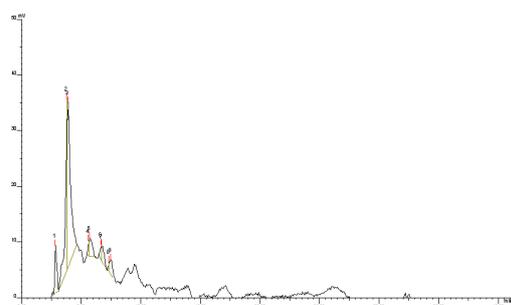


Figura 9. CLAE dos eluatos dos fragmentos de *Pseudocyphellaria aurata* imobilizados em sistema fixo com caulinita, na concentração de $10,0\text{mM}$ de acetato de sódio.

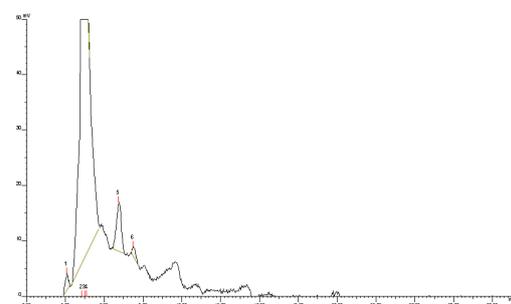


Figura 10. CLAE dos eluatos dos fragmentos de *Pseudocyphellaria aurata* imobilizados em sistema fixo sem

caulinita, na concentração de 10,0 mM de acetato de sódio.

A quantificação de clorofilas e feofitinas revelou que o sistema que utiliza caulinita induz um drástico aumento na produção de clorofilas dos fotobiontes (Figura 11). Provavelmente a caulinita diminui a quantidade de luminosidade disponível aos fragmentos do líquen dentro do biorreator. Dessa forma, as células algais devem ser obrigadas a se adaptar ao novo meio, tendo que produzir uma maior quantidade de clorofilas para aumentar a sua eficiência fotossintética. A dosagem de feofitinas encontrada, apesar de alta, parece ser proporcional àquela encontrada nos controles, se considerar-se a também alta dosagem das clorofilas.

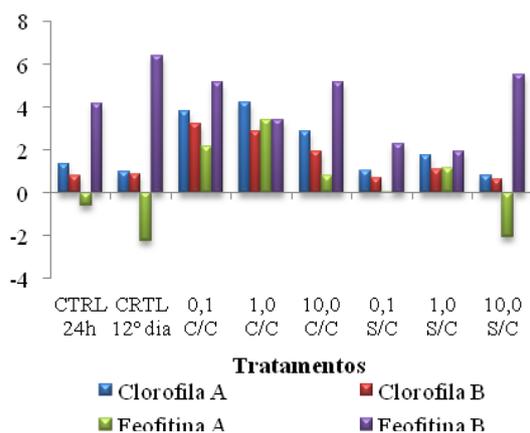


Figura 11. Comparação das quantidades de clorofilas e feofitinas de *Pseudocyphellaria aurata* em fragmentos de seu talo *in natura* e submetidos às

imobilizações. CTRL: controle; C/C: com caulinita; S/C: sem caulinita. Concentrações de NaOAc em mM.

As concentrações de 0,1 e 10,0 mM de NaOAc do sistema fixo sem caulinita apresentaram as quantidades de clorofilas e feofitinas mais próximas daquelas encontradas nos controles. Isso pode indicar uma adaptação mais leve ao sistema, que não apresentava obstáculos para a captação de luz pelas clorofilas.

Quando observadas por microscopia óptica, as células da camada de algas, sobretudo aquelas dos fragmentos submetidos ao sistema fixo com caulinita, apresentaram uma coloração em tons de verde mais escuro do que aqueles encontrados no controle. Provavelmente, isso é um indicativo do aumento na concentração de pigmentos, principalmente feofitinas, o que concorda com as quantificações dessas substâncias.

A Tabela 1 sumariza os dados obtidos pelo teste de viabilidade das células de algas. Em todos os casos foram observadas percentagens de vitalidade superior a 90%. Isso indica que os fragmentos de *P. aurata* continuam capazes de manter a produção de metabólitos dentro dos biorreatores, mesmo após 4 meses de experimento.

O baixo percentual de células algais mortas demonstrou que *P. aurata*

tem uma grande capacidade de adaptação aos sistemas para produção de metabólitos secundários, sobrevivendo mesmo em meio aquoso. Líquens como *Hypogymnia physodes* e *Xanthoria aureola*, ambos com *Trebouxia* como fotobionte, demonstraram um forte declínio em várias características fisiológicas quando submetidas a constante saturação de água. *Peltigera horizontalis*, um líquen de habitat úmido e que contém a cianobactéria *Nostoc* como fotobionte, sob as mesmas condições apresenta um leve declínio dessas características quando comparada às condições iniciais (Farrar, 1976). Isso indica que cada líquen responde de uma maneira diferente a situação de saturação constante de água, e que as condições fisiológicas durante os experimentos dependem tanto das condições a que o talo líquênico é submetido como de sua história ambiental prévia.

A análise conjunta dos dados permite concluir que os sistemas para produção de metabólitos testados neste trabalho induzem a produção dos metabólitos principais e intermediários de *Pseudocyphellaria aurata*, sobretudo o sistema com caulinita. O emprego de outras espécies e o aperfeiçoamento da técnica devem ser conduzidos de modo a aumentar cada vez mais a produtividade

de compostos de interesse, diminuindo o impacto ocasionado pela retirada de biomassa na micota liquenizada para obtenção de substâncias bioativas.

Tabela 1. Comparação do percentual de morte celular na camada de algas entre fragmentos de talo de *Pseudocyphellaria aurata in natura* e submetidos a sistemas de produção de metabólitos.

Tratamentos	Células vivas (%)	Células mortas (%)
Controle	100	0
0,1 mM C/C	100	0
1,0 mM C/C	100	0
10,0 mM C/C	100	0
0,1 mM S/C	91	9
1,0 mM S/C	96,43	3,57
10,0 mM S/C	100	0

C/C: com caulinita; S/C: sem caulinita.

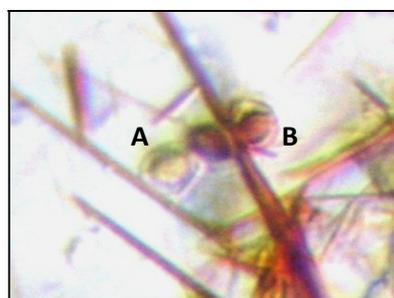


Figura 12. Microscopia óptica diferenciando células de algas do líquen *Pseudocyphellaria aurata* vivas (A) e

mortas (B), após coloração com vermelho neutro (aumento 1000x).

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelas bolsas de Mestrado de Lima e de Produtividade em Pesquisa de Pereira, e à Prof. Marcela Cáceres pelo auxílio nos ensaios de vitalidade celular.

RESUMO

Este trabalho comparou a eficiência do sistema de fixo de imobilização com e sem a utilização de caulinita para produção de metabólitos de *Pseudocyphellaria aurata*, utilizando fragmentos de seu talo. Os extratos etéreo, clorofórmico e acetônico foram obtidos a partir de 1g do material liquênico. Os biorreatores, cada um com 1g do material liquênico, tiveram o acetato de sódio (NaOAc) como precursor enzimático a 0,1mM, 1,0mM e 10,0mM, mantidos sob luz branca. Alíquotas coletadas ao longo do experimento foram extraídas e lidas em espectrofotômetro. Os extratos foram submetidos à cromatografia em camada delgada. Em ambos os sistemas, com e sem a utilização de caulinita, a concentração de 10,0mM de NaOAc foi a

mais produtiva. O sistema utilizando caulinita é cerca de 25% mais produtivo do que o sistema que não a utiliza. É possível que a caulinita forneça micronutrientes aos fragmentos do líquen ou previna atrito que danifique o talo.

Palavras-chave: *Pseudocyphellaria aurata*, líquens, imobilização, sistema fixo.

REFERÊNCIAS

- AHTI, T. (2000). Cladoniaceae. Flora Neotropica, Monograph 78. Organization for Flora Neotropica, New York Botanical Garden, New York.
- CALVELO, S. & LIBERATORE, S. (2004). Applicability of in situ or transplanted lichens for assessment of atmospheric pollution in Patagonia, Argentina. *Journal of Atmospheric Chemistry*, **49**, 199-210.
- FARRAR, J. F. (1976). Ecological physiology of the lichen *Hypogymnia physodes*. I. Some effects of constant water saturation. *New Phytologist*, **77**, 93-103.
- FONTANIELLA, B.; LEGAZ, M. E.; PEREIRA, E. C.; SEBASTIAN, B.; VICENTE, C. (2000). Requirements to produce fumarprotocetraric acid using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*. *Biotechnology Letters*, **22**, 813-817.
- HALE-JR., M. E. (1983). *The Biology of Lichens*, 3ed. Edward Arnold Pub., London.

- HILL, R. (1963) Chlorophyll. In: Florkin, M; Stotz, H. (Eds.) **Comprehensive Biochemistry**, vol. 9, pp.73.
- HONDA, N. K. (2006), A natureza das substâncias produzidas por líquens. In- *Biologia de líquens*, ed. Xavier-Filho, L. et al., Âmbito Cultural, Rio de Janeiro, pp. 345-388.
- HONEGGER, R. (1991), Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **42**, 553-578.
- HUNECK, S. (1973). Nature of Lichens Substances. In- *The lichens*, ed. Ahmadjian, V. & Hale-Jr., M. E, Academic Press, London, pp. 495-546.
- HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. (1996), Identification of Lichen Substances. Springer-Verlag, Berlin.
- LeBLANC, F. & RAO, D. N. 1973. Effects of sulphur dioxide on lichen and moss transplants. *Ecology*. **54** (3), 612-617.
- LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. (1983), Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiol.*, **71**, 300-302.
- LEINZ, V. & AMARAL, S. E. (1978), Geologia Geral. Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- LIMA, C. R.V.; PEREIRA, E. C. P.; SILVA, N. H. (*In press*), Emprego de métodos biotecnológicos para produção de fenóis por *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio. *Iheringia*, série Botânica.
- MELO, P.; SILVA, N., AMARAL, F. & PEREIRA, E. 2007. Produção de metabólitos de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. por imobilização de fragmentos do talo e análise das frações aquosas. Resumo apresentado no VIII Encuentro del Grupo Latinoamericano de Líquencólogos, 26 a 30 de Noviembre, Lima, Perú.
- MIAO, V.; CÖEFFET-LE GAL, M. F.; BROWN, D.; SINNEMANN, S.; DONALDSON, G.; DAVIES, J. (2001). Genetic approaches to harvesting lichen products. *Trends in Biotechnology*, **19** (9), 349-355.
- NASCIMENTO, A. T. S. (2007), Bioprodução de metabólitos de *Canoparmelia texana* (Tuck.) Elix & Hale a partir de imobilização celular. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- NASH, T. H. (1996), Lichen Biology, 1ed. Cambridge University Press., Cambridge.
- PEDROSA, M. M.; LEGAZ, M. E. (1991), Chemical stability of a lichen depside, evernic acid, in buffered conditions, analyzed by high-performance liquid chromatography. *Plant Physiology (Life Sci Adv)*, **10**, 57-62.
- PEREIRA, E. C. (1998), Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae a partir de imobilização celular. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.
- PEREIRA, E. C.; ANDRADE, L.; PEDROSA, M. M.; SOLAS, M. T.; VICENTE, C.; LEGÁZ, M. E. (1995a). Production of ribitol by alginate-

- immobilized cells of the lichen *Cladonia verticillaris*. *Annales de Chimie*, **91**, 253-259.
- PEREIRA, E. C.; PEREYRA, M. T.; MATOS, S. C.; SILVA, N. H.; ANDRADE, L.; VICENTE, C. (1995b). Bioproduction of usnic acid from acetate by kaolinite immobilized cells of *Cladonia substellata* Vainio. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **64** (2), 171-174.
- QUILHOT, W.; GÚZMAN, G. (1988). Factores que determinan la variabilidad de las concentraciones de los metabolitos liquenicos. *Revista Latinoamericana de Química*, **19**, 19-22.
- SEYMOUR, F. A.; CRITTENDEN, P.; DYER, P. S. (2005), Sex in the extremes: lichen-forming fungi. *Mycologist*. **19** (2), 51-58.
- VERNON, L. P. (1960) Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Anal. Biochem.*, **32**:1142.
- VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; PEREYRA, M. T.; PEREIRA, E. C.; PEDROSA, M. M. (1995). Immobilization of lichen cells and enzymes for bioproduction of lichen metabolites: technical requirements and optimization of product recovering. In- *Flechten Follmann. contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann*. ed. Daniels, J. A. et al., The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Germany, pp. 97-110.

**4.3 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS: *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.) VAINIO EM SISTEMA
MÓVEL**

C. R. V. Lima; E. C. Pereira; N. H. Silva

Plant Physiology and Biochemistry

Vol. 000 2009

Comparação de Métodos para a Produção de Metabólitos: *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio em Sistema Móvel

Cinthia Lima^a; Eugênia Pereira^{b*}; Nicácio Silva^a.

^aLaboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife-P; ^b Departamento de Ciências Geográficas – Universidade Federal de Pernambuco.

ABSTRACT

Immobilization systems of lichen cells were developed for the purpose of minimizing the damages caused on the lichenized mycota resulting from extraction of their secondary bioactive compounds, since that is necessary the use of a large biomass amount, hardly renewed. This study compared the efficiency of the movement immobilization system with and without the use of kaolinite for production of metabolites of *Pseudocyphellaria aurata*, using fragments of its thallus. The diethyl ether, chloroform and acetone extracts were obtained from 1g of lichen material. The bioreactors, each one with lichen thallus fragments (1g), had the sodium acetate (NaOAc) as metabolic precursor at 0.1 mM, 1.0 mM and 10.0 mM, kept under white light. Samples collected during the experiment were extracted and read in spectrophotometer. The extracts were subjected to thin layer chromatography. In both systems, with and without the use of kaolinite, the concentration of 10.0 mM NaOAc was the most productive. Test of cell viability in the layer of algae and chlorophyll and phaeophytins analysis showed that the immobilized fragments still were suitable for production of metabolites, despite the use or not of kaolinite.

Key words: immobilization, lichens, movement system, *Pseudocyphellaria aurata*.

INTRODUÇÃO

A simbiose característica dos líquens possibilita a produção de uma grande variedade de compostos, conhecidos como substâncias liquênicas. A literatura dispõe de

vários trabalhos sobre a atividade biológica dessas substâncias [17, 13]. Porém, a utilização dessas substâncias em larga escala a partir de líquens in natura se torna ecologicamente inviável, considerando o lento crescimento que estes apresentam [19, 6, 23].

Nas últimas décadas, diversos métodos de cultura de micobiontes e tecidos líquênicos foram desenvolvidos, com o objetivo de produzir metabólitos de difícil aquisição [2, 24]. Outra técnica que pode se revelar promissora é a transferência de genes responsáveis pela síntese de substâncias líquênicas para organismos de crescimento rápido [9, 16]. Estas técnicas, no entanto, são caras e laboriosas, o que elevaria o valor dos produtos finais.

Os sistemas de imobilização celular foram propostos a fim de aumentar a eficiência de produção de metabólitos líquênicos e diminuir os custos. O aperfeiçoamento da técnica levou ao desenvolvimento de novos sistemas, com o objetivo de aumentar a produtividade e diminuir a quantidade de biomassa utilizada, aumentando a eficiência do processo. O sistema móvel de produção de metabólitos foi desenvolvido para aumentar o contato entre as células imobilizadas e o precursor enzimático, através de uma rotação contínua dos biorreatores. *Cladonia substellata* e *Canoparmelia texana* apresentaram resultados bastante satisfatórios quando submetidas a este sistema de produção de metabólitos [14, 18].

Fontaniella *et al.* [5] relatam que a forma de obtenção das células para os experimentos de imobilização celular implica a perda de contato entre os simbiontes. A transferência de enzimas e cofatores entre eles é dificultada, e a síntese de compostos de interesse pode não ser realizada [21]. Tentando contornar esses obstáculos, optou-se por imobilizar fragmentos do talo líquênico para melhorar o desempenho dos sistemas. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a viabilidade de produção de metabólitos secundários de fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* pelo sistema móvel com e sem a utilização de caulinita como matriz de aprisionamento, induzidos por diferentes concentrações de precursor acetato de sódio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie demonstrou estar bem adaptada à produção nos biorreatores, visto que os ensaios espectrofotométricos detectaram substâncias produzidas em ambos os

sistemas e em todas as concentrações de precursor NaOAc, até o final do experimento. Nascimento [18] relata o mesmo comportamento para os fragmentos do talo de *Canoparmelia texana* submetidos ao sistema fixo com caulinita durante dois meses de experimento.

No sistema móvel com caulinita foi possível observar uma produtividade crescente a partir da primeira semana de experimento, que se estendeu até o 53º dia, evidenciando um pico de produtividade aos 46 dias na concentração de mais produtiva, a 10,0 mM de acetato de sódio. Uma brusca queda é observada na leitura da amostra da semana seguinte, que é logo recuperada. As últimas leituras apresentaram valores de absorvâncias similares àqueles dos primeiros dias de experimento, o que demonstra que o sistema continuava viável para produção de metabólitos. A amostra na concentração de 1,0 mM do 25º dia foi perdida durante o processamento da amostra, por isso a produção não é detectada no gráfico (Figura 1).

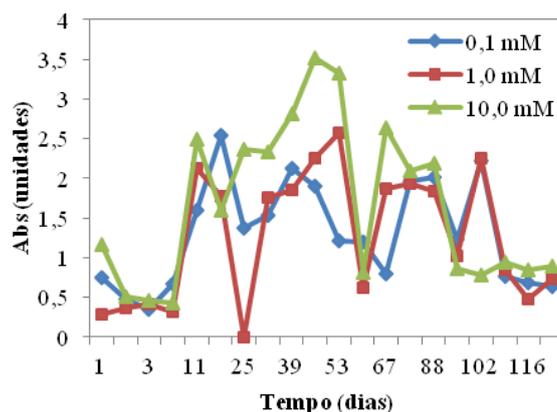


Figura 1. Comparação da produtividade de fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* no sistema móvel de imobilização, utilizando caulinita nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

A mescla de solventes clorofórmio/acetoneitrila (60/40, v/v) teve maior afinidade pelos compostos produzidos pelos fragmentos nos biorreatores do sistema móvel com caulinita. A cromatografia em camada delgada mostra que o extrato clorofórmico possui todas as substâncias majoritárias da espécie (Figuras 5 e 6). Hidalgo et al. [7] determinando as propriedades fotoquímicas, fotofísicas e termodinâmicas da calicina, reportaram a acetoneitrila como solvente de melhor solubilidade para o composto.

A leitura dos eluatos a 254 nm se destacou na concentração de 10,0 mM, o que indica que as células imobilizadas neste sistema produziram as substâncias principais

relatadas para a espécie (Figura 2). De acordo com Huneck & Yoshimura [10], a calicina possui pico de absorção 253 nm, enquanto o ácido pulvínico e sua lactona possuem picos a 256 nm.

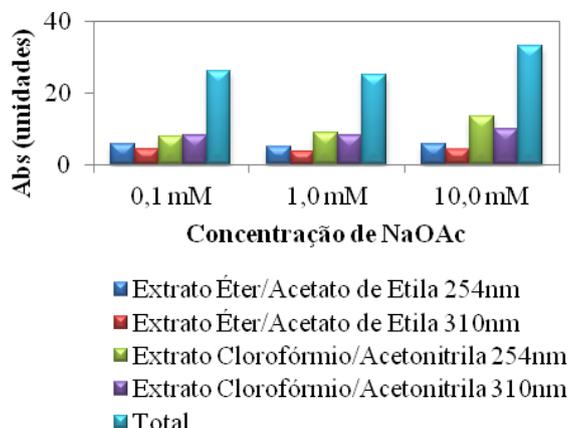


Figura 2. Produtividade total de fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* no sistema móvel de imobilização, utilizando caulinita nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

O sistema móvel sem caulinita inicialmente apresentou a maior produtividade na concentração de 1,0 mM. No entanto, após o primeiro mês de experimento a concentração de 10,0 mM teve um incremento de produtividade que foi constatado até o final do experimento, tornando-a, no geral, a concentração mais produtiva. As três concentrações apresentaram comportamentos semelhantes ao longo do experimento, apresentando uma alta produtividade nos primeiros dias e um lento decréscimo de produtividade nas leituras subsequentes. Isso pode indicar que o sistema poderia se tornar improdutivo a longo prazo (Figura 3).

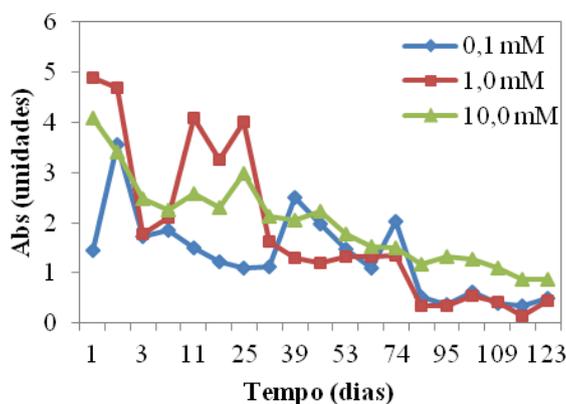


Figura 3. Comparação da produtividade de fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* no sistema móvel sem a utilização de caulinita, nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

A maior produtividade evidenciada pelas leituras a 254 nm demonstra, igualmente ao sistema que utiliza caulinita, que as células produziram as substâncias principais relatadas para a espécie (Figura 2). A equivalência nas absorvâncias das mesclas éter/acetato de etila e clorofórmio/acetonitrila, indica que foram produzidos outros compostos além dos majoritários.

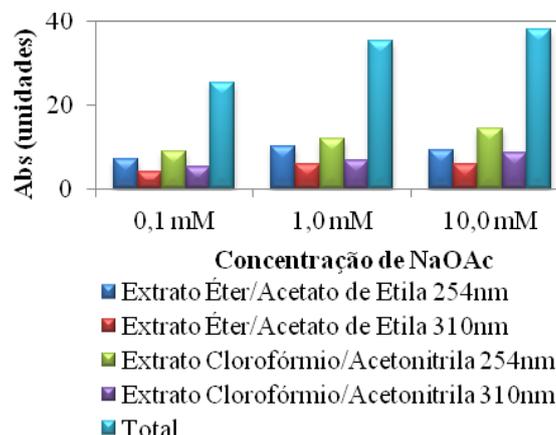


Figura 4. Produtividade total de fragmentos do talo de *Pseudocypbellaria aurata* no sistema móvel sem a utilização de caulinita, nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

Comparando os sistemas com e sem a utilização de caulinita, observou-se que aqueles sem a utilização de caulinita são mais produtivos (Figura 5). Isso pode ser devido ao fato de que, num sistema sob rotação contínua, a caulinita perde a função de imobilizar os fragmentos, sendo apenas um empecilho à captação de luminosidade.

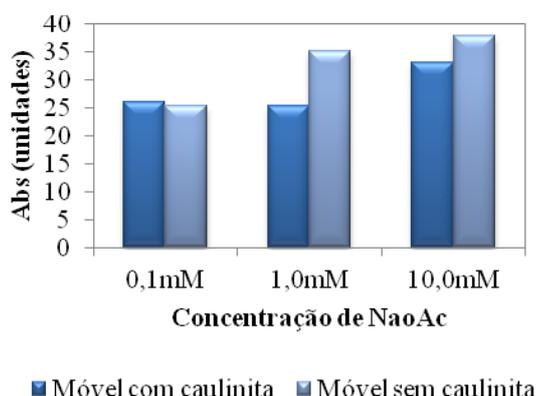


Figura 5. Comparação da produtividade total dos fragmentos do talo de *Pseudocypbellaria aurata* nos sistemas com e sem caulinita, nas diferentes concentrações de precursor NaOAc.

Os sistemas apresentados neste trabalho, quando comparados ao sistema de imobilização celular [15], mostraram ser mais viáveis para produção de metabólitos para *P. aurata*. A produtividade é mais de 3 vezes maior quando do que de imobilização celular comparando as concentrações mais produtivas com a utilização de caulinita, e quase 4 vezes maior quando comparada ao sistema sem caulinita. A formação de cristais chegou a ser observada nos eluatos de ambos os sistemas (Figura 6).

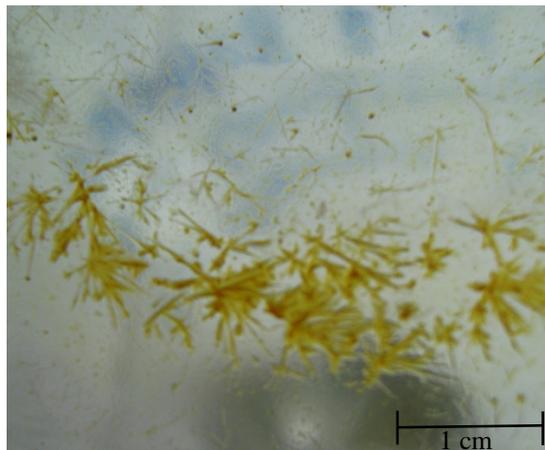


Figura 6. Cristais obtidos após evaporação dos eluatos do sistema móvel de produção de metabólitos sem a utilização de caulinita.

A análise dos extratos orgânicos dos fragmentos do talo submetidos aos sistemas de produção de metabólitos por CCD revela a presença de substâncias não observadas no talo in natura de *P. aurata*, sobretudo no sistema que não utiliza caulinita (Figuras 7 e 8). Variações químicas intraespecíficas podem ser ocasionadas por mecanismos adaptativos, porém sua origem permanece obscura. Os significados de cada variação motivaram vários esforços rumo a um quadro mais compreensível para o entendimento da genética dos líquens [16].

O impacto da situação nutricional no metabolismo e, em particular, na química secundária dos líquens tem sido frequentemente discutido, no entanto existem poucos estudos que investigam como diferentes fatores influenciam os líquens e como acontece a reação dos líquens a eles. Brunauer *et al.* [3] buscaram identificar fatores estimulantes da síntese de policetídeos de *Xanthoria elegans*, e mostraram que a cultura do micobionte apresentou 70% mais compostos do que nos experimentos de ressíntese do talo, com o mesmo padrão de substâncias majoritárias. Além disso, a adição de diferentes polióis aos meios de cultura proporcionava a produção de diferentes

compostos relacionados. Para explicar como o metabolismo dos líquens responde a diferentes fatores, são necessárias mais informações sobre os mecanismos responsáveis pela modulação da biossíntese de metabólitos secundários.

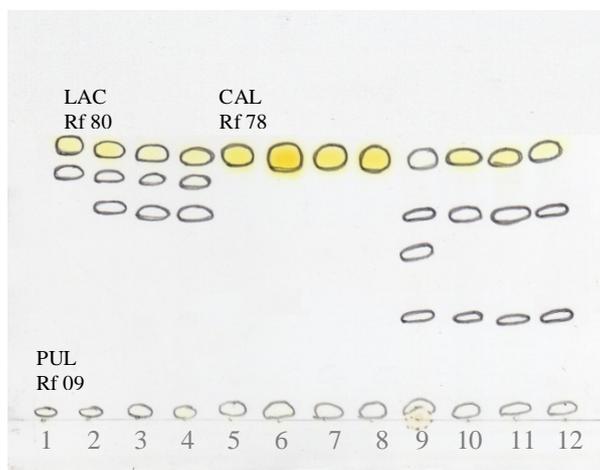


Figura 7. Cromatograma em camada delgada dos extratos orgânicos dos fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* in natura e dos submetidos ao sistema móvel com caulinita, em diferentes concentrações de precursor. Legenda: 1- extrato éter talo *in natura*; 2- ext. éter talo imobilizado a 0,1 mM; 3- ext. éter talo imob. 1,0 mM; 4- ext. éter talo imob. 10,0 mM; 5- ext. clorofórmio talo *in natura*; 6- ext. clorof. talo imob. a 0,1 mM; 7- ext. clorof. talo imob. 1,0 mM; 8- ext. clorof. talo imob. 10,0 mM; 9- ext. acetônico talo *in natura*; 10- ext. acet. talo imobilizado a 0,1 mM; 11- ext. acet. talo imob. 1,0 mM; 12- ext. acet. talo imob. 10,0 mM. LAC: lactona do ácido pulvínico, CAL: calicina, PUL: ácido pulvínico.

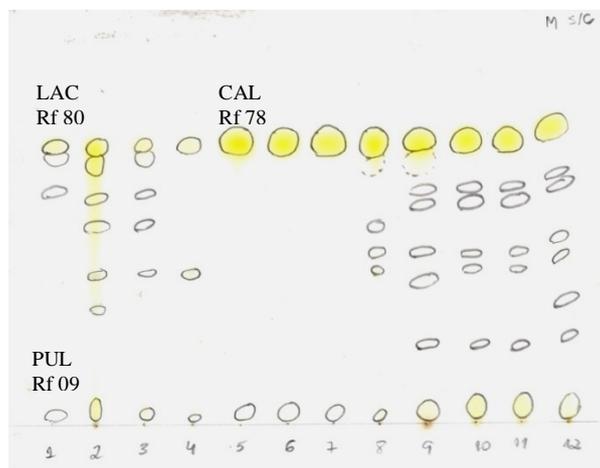


Figura 8. Cromatograma em camada delgada dos extratos orgânicos dos fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* in natura e dos submetidos ao sistema móvel sem caulinita, em diferentes concentrações de precursor. Legenda: 1- extrato éter talo *in natura*; 2- ext. éter talo imobilizado a 0,1 mM; 3- ext. éter talo imob. 1,0 mM; 4- ext. éter talo imob. 10,0 mM; 5- ext. clorofórmio talo *in natura*; 6- ext. clorof. talo imob. a 0,1 mM; 7- ext. clorof. talo imob. 1,0 mM; 8- ext. clorof. talo imob. 10,0 mM; 9- ext. acetônico talo *in natura*; 10- ext. acet. talo imobilizado a 0,1 mM; 11- ext. acet. talo imob. 1,0 mM; 12- ext. acet. talo imob. 10,0 mM. LAC: lactona do ácido pulvínico, CAL: calicina, PUL: ácido pulvínico.

As análises por CLAE de extratos orgânicos do talo *in natura* apresentaram os três compostos principais relatados para *P. aurata*, apresentando um maior teor de ácido pulvínico. A figura 9 representa o CLAE do extrato clorofórmico, apresentando, após o pico do solvente, os picos do ácido pulvínico, da sua lactona e da calicina, respectivamente.

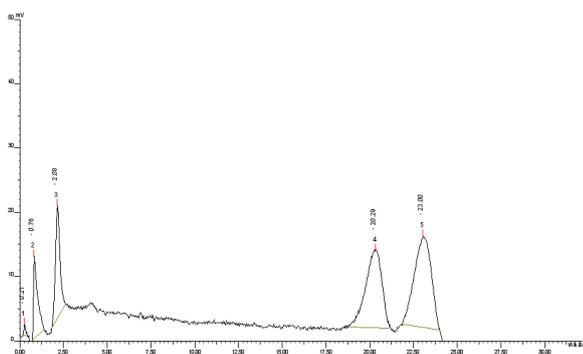


Figura 9. CLAE do extrato clorofórmico do talo *in natura* de *Pseudocyphellaria aurata*.

Dos eluatos obtidos dos sistemas imobilizados com ou sem caulinita, selecionaram-se os mais produtivos para identificar as substâncias bioproduzidas (Figuras 10 e 11). Ambos apresentam um pico maior referente ao ácido pulvínico, porém a lactona do ácido pulvínico e a calicina não foram detectadas. É possível que estas substâncias se convertam no ácido pulvínico quando as amostras permanecem solubilizadas e sob iluminação por um longo período. O eluato do sistema móvel com caulinita apresentou mais picos de substâncias intermediárias não identificadas do que o sistema sem caulinita.

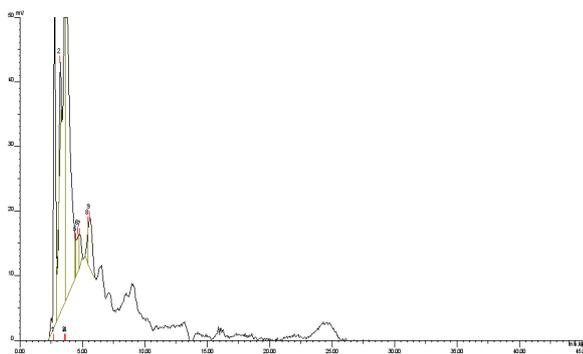


Figura 10. CLAE do eluato de fragmentos de *Pseudocyphellaria aurata*, imobilizados em sistema móvel com caulinita, na concentração de 10,0 mM de acetato de sódio.

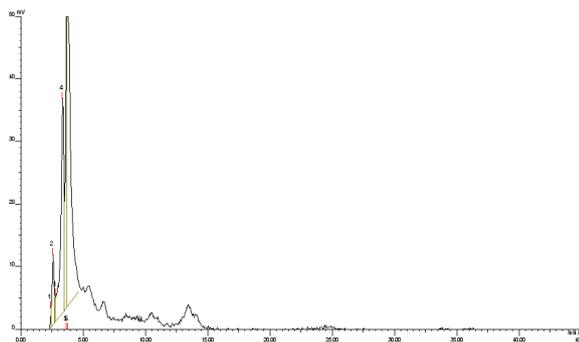


Figura 11. CLAE do eluato de fragmentos de *Pseudocypbellaria aurata* imobilizados em sistema móvel sem caulinita, na concentração de 10,0 mM de acetato de sódio.

Conforme mostra a figura 12, pode-se observar que os níveis de clorofilas a e b quantificados nos fragmentos do talo de *P. aurata* após o experimento não foram significativamente diferentes daqueles encontrados nos controles. A constante rotação deste sistema pode ter propiciado um aumento na oxigenação do meio aquoso ao qual os fragmentos estavam submetidos, o que deve ter melhorado as condições de troca gasosa e permitido uma adaptação menos estressante ao sistema.

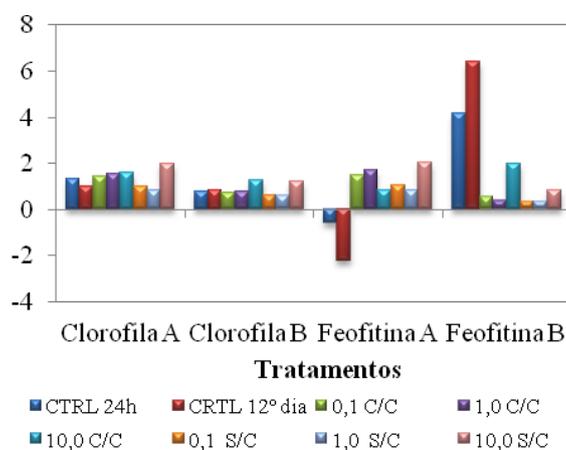


Figura 12. Quantificação de clorofilas e feofitinas de *Pseudocypbellaria aurata* em fragmentos de seu talo in natura e submetidos às imobilizações. C/C: com caulinita; S/C: sem caulinita.

O teste de viabilidade celular na camada de algas revelou que o sistema sem caulinita parece ser mais agressivo do que o sistema com caulinita (tabela I). A rotação contínua em meio aquoso deve fazer com que os fragmentos deste sistema se tornem mais vulneráveis a danos à sua superfície externa do que o que utiliza a matriz. A caulinita parece impregnar os fragmentos no sistema em que a utiliza, funcionando

como um cimento que mantém o fragmento intacto ou que ao menos confere uma maior proteção ao atrito com a água.

Tabela I. Comparação do percentual de morte na camada de algas entre fragmentos de talo de *Pseudocyphellaria aurata* in natura e submetidos aos sistemas móveis com e sem caulinita. C/C: com caulinita; S/C: sem caulinita. Concentrações de NaOAc em mM.

Estado das células (%)	Controle	0,1 C/C	1,0 C/C	10,0 C/C	0,1 S/C	1,0 S/C	10,0 S/C
Células vivas	100	89,2	84,59	93,97	68	84,7	82,7
Células mortas	0	10,8	15,41	6,03	32	15,3	17,3

Conclusões

Pseudocyphellaria aurata demonstrou estar bastante adaptada aos sistemas de produção de metabólitos. O sistema sem caulinita é mais produtivo, sobretudo na concentração de 10,0 mM de acetato de sódio. Apesar disso, o sistema com caulinita parece ser viável por um período de tempo maior, visto que a produção ao longo dos 4 meses de experimento foi mais regular, quando comparada ao sistema sem caulinita, que teve uma produtividade alta porém decrescente. A análise da vitalidade de células algais indica o mesmo, já que o percentual de células mortas foi maior no sistema sem caulinita.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e armazenamento do material liquênico

As amostras de *Pseudocyphellaria aurata* foram coletadas no município de Saloá –PE, limpas e acondicionadas em sacos de papel até seu processamento. Parte do material foi depositado no Herbário UFP do Departamento de Botânica da UFPE.

Obtenção dos extratos orgânicos do talo in natura

Os extratos orgânicos foram obtidos a partir de 1g de talo in natura de *P. aurata*, seguindo a ordem eluotrópica dos solventes éter, clorofórmio e acetona [20].

Sistema móvel

Seis porções de 1g do talo liquênico in natura foram picotadas com tesoura e acondicionadas em tubos de ensaio com tampa. A três deles foram adicionadas 10 g de caulinita previamente hidratada, lavada (com água deionizada) e esterilizada a 100°C por 6h, que consistiram dos biorreatores com matriz de enclausuramento. Em todos os casos foram adicionados 60mL das soluções de acetato de sódio (NaOAc) nas concentrações de 0,1mM, 1,0mM e 10,0mM.

Este experimento foi submetido à rotação contínua (5-6 rpm) e mantido sob luz fluorescente branca e à temperatura ambiente por todo o período do experimento [14].

Obtenção e análise das frações

Alíquotas de 30mL de todos os sistemas imobilizados foram coletadas às primeiras 24, 48, 72h e 96h. Após este período, as coletas foram realizadas num intervalo de 7 dias, a fim de completar 4 meses de experimento. Estas amostras permaneceram congeladas até o momento de seu processamento. À medida que se retiram as alíquotas do meio, o mesmo volume do precursor enzimático (acetato de sódio) era repostado.

As alíquotas tiveram seus metabólitos bioproduzidos extraídos em duas etapas: a primeira éter/acetato de etila, 65:35, v/v e a segunda com clorofórmio/acetoneitrila, 60:40, v/v [20]. Os extratos orgânicos foram avaliados por espectrofotometria a 254nm e 310nm. Em seguida, os que possuíam a mesma concentração de precursor foram reunidos, postos a evaporar e pesados para quantificação da produção.

Cromatografias

Os extratos orgânicos obtidos do talo in natura, do talo após a imobilização e dos eluatos celulares foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD). As amostras foram aplicadas em placas de sílica gel F₂₅₄₊₃₆₆ e desenvolvidas no sistema de solventes A (tolueno / dioxano/ ácido acético, 180:45:5, v/v). As bandas evidenciadas foram reveladas sob luz UV curta e longa (254 e 366 nm).

Para análise em CLAE, os eluatos celulares foram injetados na concentração de 1,0mg.mL⁻¹, e os extratos orgânicos obtidos do talo in natura a 0,1mg.mL⁻¹, em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado a um detector de UV da marca CG. As condições de cromatografia foram: coluna de fase reversa MicroPack MHC-18 (300mm

x 4mm I.D.), fase móvel metanol:água:ácido acético (80:19,5:0,5 v/v) em sistema isocrático, pressão 88 atm, temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$), detector de UV a 254nm [12].

Percentual de morte celular na camada de algas

Para obter o percentual de morte celular na camada de algas, foi utilizado o corante supravital vermelho neutro a 0,1%, onde as células mortas se coram em vermelho escuro e células vivas em vermelho tênue na periferia [11, 4]. Como controle foi utilizado o material liquênico in natura.

Foram selecionados fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* de aproximadamente 1cm^2 de cada um dos sistemas de imobilização testados e do controle. As células de algas foram separadas do componente fúngico seguindo o método de Ahmadjian [1], quando então foram corados e observados em microscópio óptico sob imersão (aumento 1000x). Foram observadas pelo menos 200 células em cada tratamento.

Análise de clorofilas e feofitinas

Para quantificação de clorofilas e feofitinas nos fragmentos de *Pseudocyphellaria aurata* submetidos às imobilizações, cerca de 200mg do material liquênico foram separadas de cada tratamento. Esse material foi acondicionado em tubos de ensaio com tampa, onde foram adicionados 10 mL de acetona a 80% (acetona : água deionizada, 8 : 2, v/v). Protegidos da luz, os tubos foram guardados em geladeira por 48h, quando então foram submetidos a leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda 536, 645, 663 e 666 nm. Com os dados obtidos pelas leituras foi possível a quantificação das clorofilas A e B [8] e feofitinas A e B [22].

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelas bolsas de Mestrado de Lima e de Produtividade em Pesquisa de Pereira.

REFERÊNCIAS

- [1] Ahmadjian, V. The lichen symbiosis, Blaisdell Publishing Company, 1967.
- [2] Ahmadjian, V.; Jacobs, J. B. Artificial reestablishment of lichens. VI. Comparison between natural and synthetic thalli of *Usnea strigosa*. *Lichenologist*, 17 (1981) 149-166.
- [3] Brunauer, G.; Hager, A.; Grube, M.; Türk, R.; Stocker-Wörgötter, E., Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45 (2007) 146-151.
- [4] Calvelo, S. & Liberatore, S., Applicability of in situ or transplanted lichens for assessment of atmospheric pollution in Patagonia, Argentina. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 49, (2004)199-210.
- [5] Fontaniella, B.; Legaz, M. E.; Pereira, E. C.; Sebastian, B.; Vicente, C., Requirements to produce fumarprotocetraric acid using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*. *Biotechnology Letters*, 22, (2000) 813-817.
- [6] Hale-Jr., M. E. The Biology of Lichens, 3ed. Edward Arnold Pub., London, 1983.
- [7] Hidalgo, M. E.; Fernández, E.; Ponce, M.; Rubio, C.; Quilhot, W. Photophysical, photochemical and thermodynamic properties of shikimic acid derivatives: calycin and rhizocarpic acid (lichens). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66 (2002) 213-217.
- [8] Hill, R. Chlorophyll, in: Florkin, M., Stotz, H. (Eds.) *Comprehensive Biochemistry*, v. 9, 1963, pp.73.
- [9] Huneck, S., Nature of Lichens Substances, in: Ahmadjian, V. & Hale-Jr., M. E (Eds.), *The lichens*, Academic Press, London, 1973, pp. 495-546.
- .
- [10] Huneck, S.; Yoshimura, I., *Identification of Lichen Substances*. Springer-Verlag, Berlin, 1996.
- [11] LeBlanc, F. & Rao, D. N. Effects of sulphur dioxide on lichen and moss transplants. *Ecology*. 54 (3), (1973) 612-617.
- [12] Legaz, M. E.; Vicente, C., Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiol.*, 71 (1983) 300-302.
- [13] Legaz, M. E. G.; Xavier-Filho, L.; Vicente, C. C. Metabolitos vegetales y microbianos para la industria – un enfoque biotecnológico. *Âmbito Cultural*, Rio de Janeiro, 304p, 2008.

- [14] Lima, M. J. G.; Produção do ácido úsnico de *Cladonia substellata* Vainio (líquen) por imobilização celular, utilizando diferentes métodos. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2004.
- [15] Lima, C. R.V.; Pereira, E. C. P.; Silva, N. H. Emprego de métodos biotecnológicos para produção de fenóis por *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio. Iheringia, série Botânica, *in press*.
- [16] Miao, V.; Cöeffet-Legal, M. F.; Brown, D.; Sinnemann, S.; Donaldson, G.; Davies, J., Genetic approaches to harvesting lichen products. Trends in Biotechnology, 19 (9) (2001) 349-355.
- [17] Müller, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. Applied Microbiology and Biotechnology. 56 (2001) 9-16.
- [18] Nascimento, A. T. S., Bioprodução de metabólitos de *Canoparmelia texana* (Tuck.) Elix & Hale a partir de imobilização celular. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2007.
- [19] Nash, T. H., Lichen Biology, 1ed. Cambridge University Press., Cambridge, 1996.
- [20] Pereira, E. C.; Pereyra, M. T.; Matos, S. C.; Silva, N. H.; Andrade, L.; Vicente, C.. Bioproduction of usnic acid from acetate by kaolinite immobilized cells of *Cladonia substellata* Vainio. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 64 (2) (1995) 171-174.
- [21] Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Andrade, L. C. Production of lichen metabolites by immobilized cells of *Cladonia clathrata*, Phytion, 39 (1999) 79-89.
- [22] Vernon, L. P., Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. Anal. Biochem., 32 (1960) 1142.
- [23] Vicente, C.; Solas, M. T.; Pereyra, M. T.; Pereira, E. C.; Pedrosa, M. M.. Immobilization of lichen cells and enzymes for bioproduction of lichen metabolites: technical requirements and optimization of product recovering, in: Daniels, J. A. et al. (Eds.), Flechten Follmann. contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann, The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Germany, 1995, pp. 97-110.
- [24] Yamamoto, Y. Production of lichen substances, in: Komamine, A. (Ed.), Plant Cell Culture in Japan, Tóquio, CMC Co. Ltd., 1991. p. 58-71.

**4.4 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS: *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.) VAINIO EM SISTEMA DE
FLUXO CONTÍNUO**

C. R. V. Lima; E. C. Pereira; N. H. Silva

**Acta Botanica Brasilica
Vol. 000 2009**

Comparação de métodos para a produção de metabólitos: *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio em sistema de fluxo contínuo¹

Cinthia Renata Vieira de Lima²; Eugênia Cristina Pereira^{3*}; Nicácio Henrique da Silva⁴

RESUMO – (Comparação de métodos para a produção de metabólitos: *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio em Sistema de Fluxo Contínuo). Os sistemas de imobilização consistem de uma alternativa acessível para a produção de metabólitos liquênicos sem destruição de biomassa. Sabendo que a obtenção de células para experimentos de imobilização causava danos à simbiose, este trabalho teve o objetivo de produzir metabólitos de *Pseudocyphellaria aurata* a partir da imobilização de fragmentos do seu talo através do uso de biorreatores com sistema de fluxo contínuo, com e sem a utilização de caulinita como matriz. O material liquênico foi coletado em Saloá – PE. Os biorreatores foram montados utilizando ou não caulinita como matriz de enclausuramento e acetato de sódio, a 0,1, 1,0 e 10,0mM, como precursor enzimático. Para cada alíquota coletada a mesma quantidade de precursor, em igual concentração, foi reposta aos biorreatores, mantido sob luz branca. 1 g do talo liquênico triturado foi utilizado para a obtenção a frio dos extratos orgânicos etéreo, clorofórmico e acetônico. Os extratos orgânicos do talo e os eluatos foram analisados por cromatografia. A concentração mais produtiva, em ambos os sistemas, foi a de 0,1mM. O sistema com caulinita foi mais produtivo. A argila deve ter conferido maior proteção aos fragmentos imobilizados, tendo a função de fixar/imobilizar validada.

Palavras-chave: imobilização, *Pseudocyphellaria aurata*, líquens, bioprodução.

ABSTRACT – (Comparison of methods for production of metabolites: *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio in continuous flow system). Immobilization systems are a available alternative for the production of lichen metabolites without destruction of biomass. Knowing that obtaining cells for experiments of immobilization caused damage to the symbiosis, this work aimed to produce metabolites of *Pseudocyphellaria aurata* from fragments of its thallus through the use of bioreactors with continuous flow system, with and without the use of kaolinite as matrix. The lichen material was collected in Saloá-PE. The bioreactors were assembled using or not as kaolinite matrix of entrapment, and sodium acetate, to 0.1, 1.0 and 10.0 mM, as enzymatic precursor. For each aliquot collected the same amount of precursor, at the same concentration, was restored to bioreactors, kept under white light. 1 g of the lichen thallus was used to obtain organic extracts of ether, chloroform and acetone. The organic extracts of the thallus and the eluates were analyzed by chromatography. The concentration most productive, in both systems, was of 0.1 mM. The system was more productive with kaolinite. The clay must be given greater protection to detained fragments, and the function of fix / immobilize was validated.

Key words: immobilization, *Pseudocyphellaria aurata*, lichens, Bioproduction.

¹ Parte da dissertação de mestrado da primeira autora

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Depto. Ciências Geográficas

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Depto. Bioquímica

Introdução

A eficiência e a possibilidade de utilização de substâncias liquênicas tornam os fungos liquenizados de particular interesse à pesquisa. Por outro lado, a exploração de recursos naturais em busca de compostos úteis à indústria farmacêutica e cosmética requer processos de cultivo ou reposição do material coletado (Vicente *et al.*, 1995, Nash, 1996). Uma solução viável é a produção destes compostos a partir de imobilização, onde se utiliza pequenas quantidades de material liquênico.

É possível que os produtos secundários dos líquens possam ser reciclados e usados como substratos respiratórios (Legaz *et al.*, 2006). Para evitar este problema nos sistemas de imobilização, foi desenvolvido o sistema de fluxo contínuo, onde o precursor é fornecido continuamente ao biorreator, evitando longo contato entre o material produzido e as células liquênicas (Lima, 2004).

Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência da caulinita, uma argila de textura muito fina, nos experimentos de imobilização e produção de substâncias liquênicas (Pereira *et al.*, 1999; Lima, 2004; Nascimento, 2007). Além disso, seu custo é bem inferior ao de outras matrizes utilizadas em sistemas de imobilização, como o alginato e a poliacrilamida. Entretanto, a influência desta matriz neste tipo de sistema nunca foi avaliada.

A forma de obtenção de células para os experimentos de imobilização causava danos à estrutura da simbiose liquênica (Fontaniella *et al.*, 2000). Para evitá-los, sistemas utilizando fragmentos de talos liquênicos vêm sendo testados com sucesso (Nascimento, 2007).

Com base nessas informações, o objetivo deste trabalho foi induzir a produção de metabólitos por fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* utilizando diferentes concentrações de acetato de sódio, com ou sem a utilização de caulinita como matriz de enclausuramento.

Materiais e métodos

Coleta e armazenamento do material liquênico – As amostras de *Pseudocyphellaria aurata* foram coletadas no município de Saloá –PE, limpas e acondicionadas em sacos

de papel até seu processamento. Parte do material foi depositada no Herbário UFP do Departamento de Botânica da UFPE.

Obtenção dos extratos orgânicos do talo *in natura* – Os extratos orgânicos foram obtidos a partir de 1 g de talo *in natura* de *P. aurata*, seguindo a ordem eluotrópica dos solventes éter, clorofórmio e acetona (Pereira *et al.*, 1995).

Sistema de fluxo contínuo – Seis porções de 1 g do talo liquênico *in natura* foram picotadas com tesoura e acondicionadas em funis de fundo de fundo poroso G2. A três deles foram adicionadas 30 g de caulinita previamente hidratada, lavada (com água deionizada) e esterilizada a 100°C por 6h, que consistiram dos biorreatores com matriz de enclausuramento. Em todos os casos foram adicionados 60 mL das soluções de acetato de sódio (NaOAc) nas concentrações de 0,1 mM, 1,0 mM e 10,0 mM. O precursor enzimático foi armazenado acima dos biorreatores e conduzido por equipos, que controlavam seu fluxo. Abaixo dos biorreatores ficavam os depósitos de coleta das alíquotas, obtidas por gotejamento, com fluxo dimensionado em função do número de dias requerido para cada coleta de fração. O experimento foi mantido sob luz fluorescente branca e à temperatura ambiente por todo o período (modificado de Lima, 2004).

Obtenção e análise das frações – Alíquotas de 30 mL de todos os sistemas imobilizados foram coletadas às primeiras 24, 48, 72 e 96h. Após este período, as coletas foram realizadas num intervalo de 7 dias, a fim de completar 102 dias de experimento. Estas amostras permaneceram congeladas até o momento de seu processamento. À medida que se retiram as alíquotas do meio, o mesmo volume do precursor enzimático (acetato de sódio) era repostado. As alíquotas tiveram seus metabólitos bioproduzidos extraídos em duas etapas: a primeira éter/acetato de etila, 65 : 35, v/v e a segunda com clorofórmio/acetonitrila, 60 : 40, v/v (Pereira *et al.*, 1995). Os extratos orgânicos foram avaliados por espectrofotometria a 254 nm e 310 nm. Em seguida, os que possuíam a mesma concentração de precursor foram reunidos, postos a evaporar e pesados para quantificação da produção.

Cromatografias – Os extratos orgânicos obtidos do talo in natura, do talo após a imobilização e dos eluatos celulares foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD). As amostras foram aplicadas em placas de sílica gel F₂₅₄₊₃₆₆ e desenvolvidas no sistema de solventes A (tolueno / dioxano/ ácido acético, 180 : 45 : 5, v/v). As bandas evidenciadas foram reveladas sob luz UV curta e longa (254 e 366 nm). Para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os extratos orgânicos obtidos do talo in natura injetados a 0,1 mg.ml⁻¹, e os eluatos celulares na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹, em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado a um detector de UV da marca CG. As condições de cromatografia foram: coluna de fase reversa MicroPack MHC-18 (300mm x 4mm I.D.), fase móvel metanol/água/ácido acético (80 : 19,5 : 0,5 v/v) em sistema isocrático, pressão 88 atm, temperatura ambiente, detector de UV a 254 nm (Legaz e Vicente, 1983).

Percentual de morte celular na camada de algas - Para obter o percentual de morte celular na camada de algas, foi utilizado o corante supravital vermelho neutro a 0,1%, onde as células mortas se coram em vermelho escuro e células vivas em vermelho têmue na periferia (Le Blanc & Rao, 1973; Calvelo & Liberatore, 2004). Como controle foi utilizado o material liquênico in natura. Foram selecionados fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* de aproximadamente 1cm² de cada um dos sistemas de imobilização testados e do controle. Esses fragmentos foram submetidos ao método de Ahmadjian (1967) para separação dos simbioss, corados e observados em microscópio óptico sob imersão (aumento 1000x). Foram observadas pelo menos 200 células em cada tratamento.

Análise de clorofilas e feofitinas – Para quantificação de clorofilas e feofitinas nos fragmentos de *Pseudocyphellaria aurata* submetidos às imobilizações, cerca de 200 mg do material liquênico foram separadas de cada tratamento. Esse material foi acondicionado em tubos de ensaio com tampa, onde foram adicionados 10 mL de acetona a 80% (acetona/água deionizada, 8 : 2, v/v). Protegidos da luz, os tubos foram guardados em geladeira por 48h, quando então foram submetidos a leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda 536, 645, 663 e 666 nm. Com os dados obtidos pelas leituras foi possível a quantificação das clorofilas A e B (Hill, 1963) e feofitinas A e B (Vernon, 1960).

Resultados e discussão

O sistema de fluxo contínuo foi criado para impossibilitar a saturação do meio com a produção de compostos a partir do precursor enzimático, de modo que o material produzido no biorreator não fique em contato com os fragmentos por um tempo muito longo (Lima, 2004). É possível que os produtos secundários dos líquens possam ser reciclados e usados como substratos respiratórios. Dessa forma, pode ocorrer o consumo da acetil-CoA liberada, em caso da depressão da fotossíntese líquênica, ou da captação de nutrientes orgânicos (Legaz *et al.*, 2006). Metabólitos secundários podem ser catabolizados para suprir “déficits” energéticos e, associados à acetil-CoA podem ser utilizados em novos processos de síntese, já que o sistema líquênico utiliza essa molécula, como subunidades, na síntese de uma grande parte dos compostos líquênicos (Vicente *et al.*, 1980; Honda, 2006).

Durante o primeiro mês, o sistema fixo com caulinita teve a maior produção com a concentração de 10,0 mM de acetato de sódio. A partir daí, a produtividade se tornou estável, e a concentração de 0,1 mM apresentou um aumento substancial na produtividade, o que a tornou a concentração mais produtiva ao final do experimento, igualmente ao sistema de imobilização celular (Lima *et al.*, *in press*). A concentração de 1,0 mM apresentou uma produtividade levemente decrescente ao longo do experimento, tendo que ser interrompido aos 46 dias por causa de uma contaminação (Fig. 1).

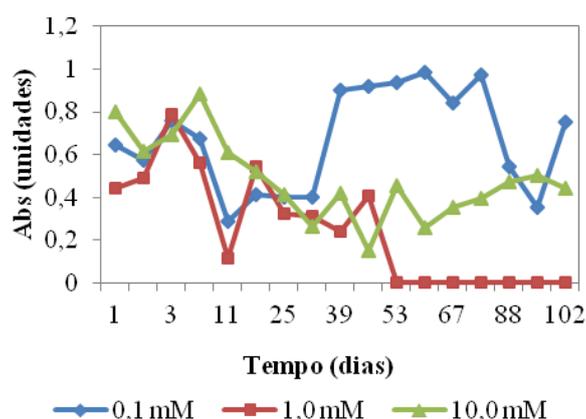


Figura 1. Comparação da produtividade de fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* no sistema de fluxo contínuo de imobilização, utilizando caulinita nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

A mescla de solventes éter/acetato de etila (65/35, v/v) teve maior afinidade pelos compostos produzidos pelos fragmentos nos biorreatores do sistema de fluxo contínuo com caulinita.

A leitura dos eluatos a 254 nm se destacou em todas as concentrações, o que indica que as células imobilizadas neste sistema produziram as substâncias principais relacionadas para a espécie (Fig. 2). De acordo com Huneck & Yoshimura (1996), a calicina possui pico de absorção 253 nm, enquanto o ácido pulvínico e sua lactona possuem picos a 256 nm.

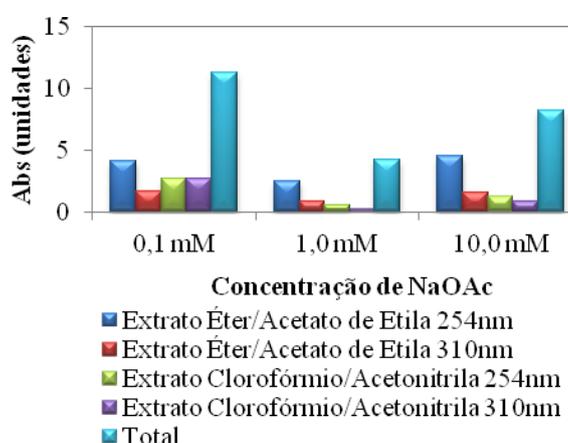


Figura 2. Produtividade total de fragmentos do talo de *Pseudocypbellaria aurata* no sistema móvel de imobilização, utilizando caulinita nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

As três concentrações de precursor utilizadas no sistema sem caulinita demonstraram um mesmo comportamento em relação à produtividade ao longo do experimento, levemente decrescente (Fig. 3). Isso pode indicar que o sistema poderia se tornar improdutivo a longo prazo. Destaca-se apenas um pico ao 11º dia na concentração de 0,1 mM, que foi a mais produtiva.

A maior produtividade evidenciada pelas leituras a 254 nm demonstra, igualmente ao sistema que utiliza caulinita, que as células produziram as substâncias principais relacionadas para a espécie (Fig. 4). As maiores absorbâncias obtidas com a mescla éter/acetato de etila indica que foram produzidos outros compostos além dos majoritários, já que as substâncias principais são mais bem extraídas com a mescla clorofórmio/acetonitrila.

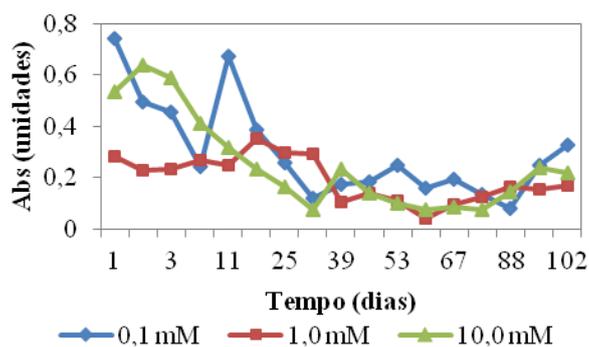


Figura 3. Comparação da produtividade de fragmentos do talo de *Pseudocypbellaria aurata* no sistema de fluxo contínuo sem a utilização de caulinita, nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

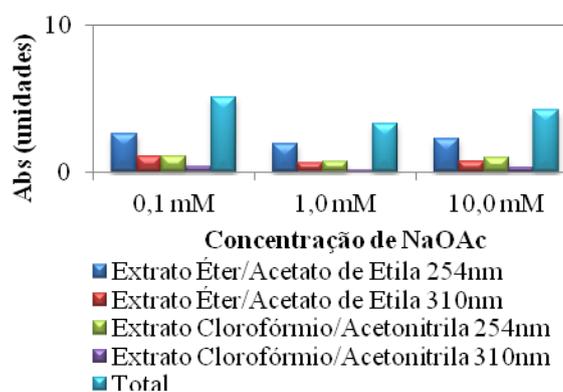


Figura 4. Produtividade total de fragmentos do talo de *Pseudocypbellaria aurata* no sistema móvel sem a utilização de caulinita, nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo do experimento.

Comparando os sistemas com e sem a utilização de caulinita, observou-se que aqueles com a utilização da argila são mais produtivos (Fig. 5). A função de imobilizar os fragmentos dentro dos biorreatores parece ter influenciado positivamente a produção de metabólitos no sistema que a utilizou. Enquanto o sistema com caulinita teve a produtividade 100% maior do que o sistema de imobilização com células (Lima, in press), o sistema sem a matriz apresentou uma produtividade total equivalente, demonstrando que a caulinita deve ter um papel importante na fixação dos fragmentos dentro dos biorreatores.

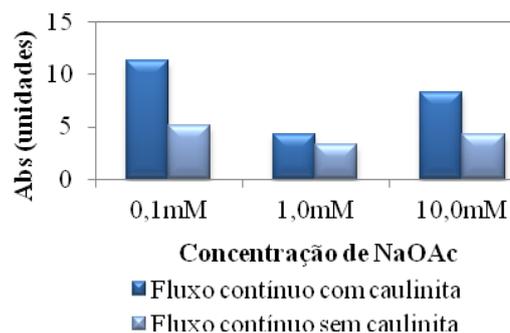


Figura 5. Comparação da produtividade total dos fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* nos sistemas de fluxo contínuo com e sem caulinita, nas diferentes concentrações de precursor NaOAc.

A análise dos extratos orgânicos dos fragmentos do talo submetidos aos sistemas de produção de metabólitos por CCD revela a presença de substâncias não observadas no talo *in natura* de *P. aurata*, sobretudo no sistema que não utiliza caulinita (Fig. 6 e 7). Variações químicas intraespecíficas podem ser ocasionadas por mecanismos adaptativos, porém sua origem permanece obscura (Miao et al., 2001). Para explicar como o metabolismo dos líquens responde a diferentes fatores, são necessárias mais informações sobre os mecanismos responsáveis pela modulação da biossíntese de metabólitos secundários (Brunauer et al., 2007).

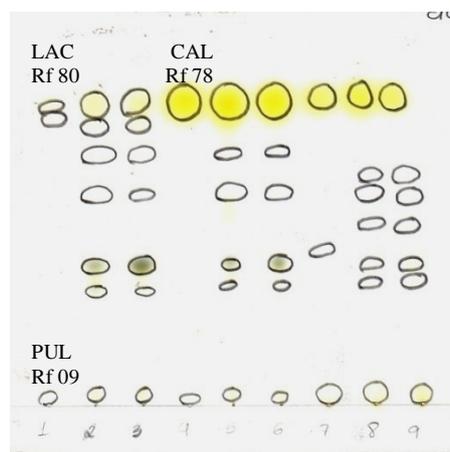


Figura 6. Cromatograma em camada delgada dos extratos orgânicos dos fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* *in natura* e dos submetidos ao sistema de fluxo contínuo com caulinita, em diferentes concentrações de precursor. Legenda: 1- extrato éter talo *in natura*; 2- ext. éter talo imobilizado a 0,1 mM; 3- ext. éter talo imob. 10,0 mM; 4- ext. clorofórmio talo *in natura*; 5- ext. clorof. talo imob. a 0,1 mM; 6- ext. clorof. talo imob. 10,0 mM; 7- ext. acetônico talo *in natura*; 8- ext. acet. talo imobilizado a 0,1 mM; 9- ext. acet. talo imob. 10,0 mM. LAC: lactona do ácido pulvínico, CAL: calicina, PUL: ácido pulvínico. As amostras do talo imobilizado a 1,0 mM não foram analisadas por conta da contaminação.

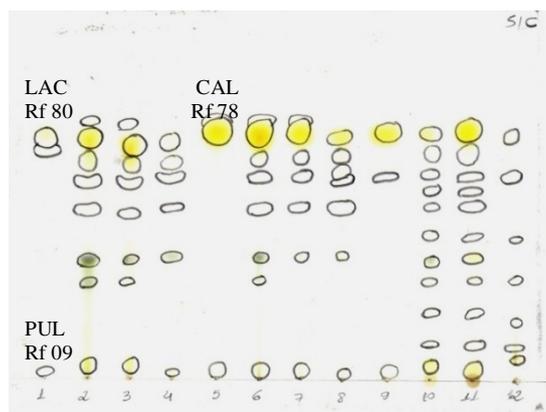


Figura 7. Cromatograma em camada delgada dos extratos orgânicos dos fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* in natura e dos submetidos ao sistema de fluxo contínuo sem caulinita, em diferentes concentrações de precursor. Legenda: 1- extrato éter talo *in natura*; 2- ext. éter talo imobilizado a 0,1 mM; 3- ext. éter talo imob. 1,0 mM; 4- ext. éter talo imob. 10,0 mM; 5- ext. clorofórmio talo *in natura*; 6- ext. clorof. talo imob. a 0,1 mM; 7- ext. clorof. talo imob. 1,0 mM; 8- ext. clorof. talo imob. 10,0 mM; 9- ext. acetônico talo *in natura*; 10- ext. acet. talo imobilizado a 0,1 mM; 11- ext. acet. talo imob. 1,0 mM; 12- ext. acet. talo imob. 10,0 mM. LAC: lactona do ácido pulvínico, CAL: calicina, PUL: ácido pulvínico.

As análises por CLAE de extratos orgânicos do talo *in natura* apresentaram os três compostos principais relatados para *P. aurata*, apresentando um maior teor de ácido pulvínico. A Fig. 8 representa o CLAE do extrato clorofórmico, apresentando, após o pico do solvente, os picos do ácido pulvínico, da sua lactona e da calicina, respectivamente.

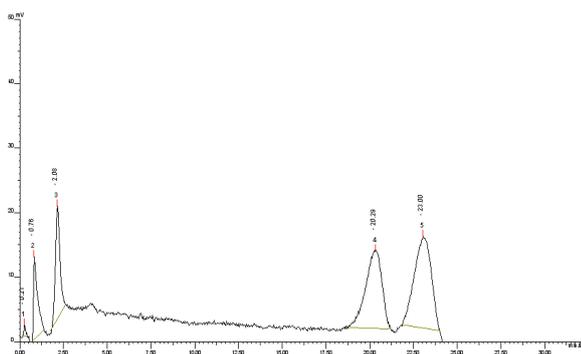


Figura 8. CLAE do extrato clorofórmico do talo *in natura* de *Pseudocyphellaria aurata*.

Dos eluatos obtidos dos sistemas imobilizados com ou sem caulinita, selecionaram-se os mais produtivos para identificar as substâncias bioproduzidas (Fig. 9 e 10). Ambos apresentam um pico maior referente ao ácido pulvínico, porém a lactona do ácido pulvínico e a calicina não foram detectadas. É possível que estas substâncias se

convertam no ácido pulvínico quando as amostras permanecem solubilizadas e sob iluminação por um longo período. O eluato do sistema sem caulinita apresentou mais picos de substâncias intermediárias não identificadas do que o sistema que utiliza esta matriz.

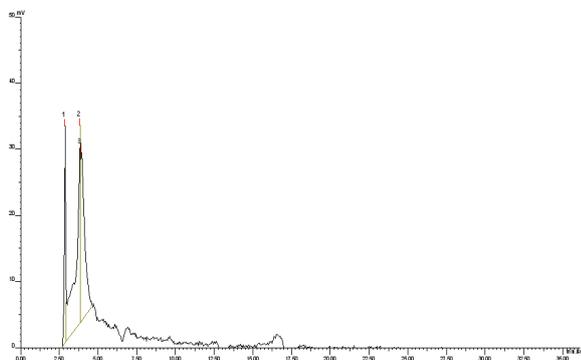


Figura 9. CLAE do eluato de fragmentos de *Pseudocypbellaria aurata*, immobilizados em sistema de fluxo contínuo com caulinita, na concentração de 0,1 mM de acetato de sódio.

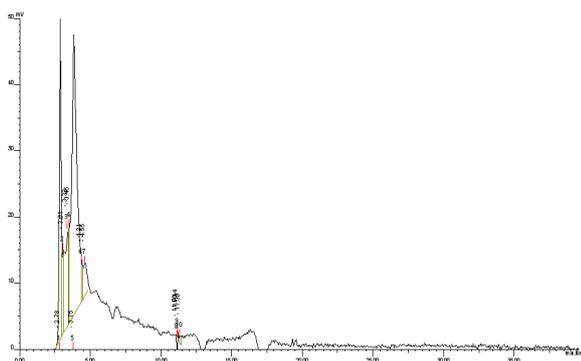


Figura 10. CLAE do eluato de fragmentos de *Pseudocypbellaria aurata*, immobilizados em sistema de fluxo contínuo sem caulinita, na concentração de 0,1 mM de acetato de sódio.

Os níveis de clorofilas a e b e feofitina a encontrados nos fragmentos do talo submetidos ao sistema de fluxo contínuo com caulinita foram muito superiores àqueles encontrados nos controles (Figura 11). A caulinita, exercendo a sua função de imobilizar os fragmentos dentro dos biorreatores, acabava por se tornar também uma barreira à incidência da luz. Assim, as algas produziram um maior teor de clorofila, para que a eficiência fotossintética não fosse prejudicada. Por outro lado, o sistema sem a utilização de caulinita permaneceu com os níveis de clorofilas muito próximos aos dos controles, indicando a não necessidade de maior produção destas.

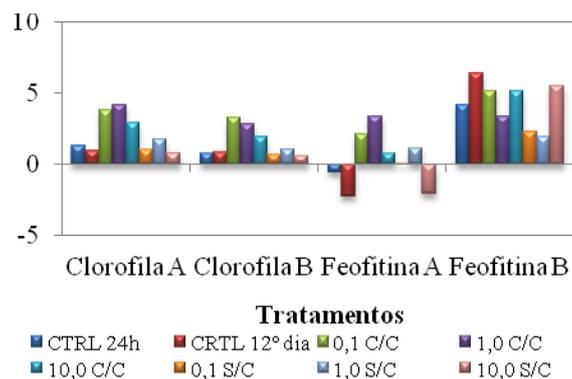


Figura 11. Quantificação de clorofilas e feofitinas de *Pseudocyphellaria aurata* em fragmentos de seu talo in natura e os submetidos às imobilizações. C/C: com caulinita; S/C: sem caulinita.

A análise do percentual de células algais mortas revelou que o sistema que utiliza caulinita apresenta uma mortalidade menor do que o sistema que não a utiliza. Esses dados concordam com os gráficos de produtividade, que indicavam que o sistema sem caulinita perderia a vitalidade mais rápido ao longo do tempo.

Tabela 1. Comparação do percentual de morte celular na camada de algas entre fragmentos de talo de *Pseudocyphellaria aurata* in natura e submetidos aos sistemas de fluxo contínuo de produção de metabólitos. C/C: com caulinita; S/C: sem caulinita. Concentrações de NaOAc em mM.

Estado das células (%)	Controle	0,1 C/C	1,0 C/C	10,0 C/C	0,1 S/C	1,0 S/C	10,0 S/C
Células vivas	100	69,4	78,6	79,4	60,7	63,4	65
Células mortas	0	30,6	21,4	20,6	39,3	36,6	35

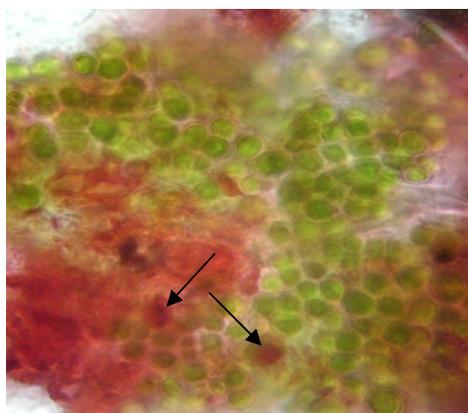


Figura 12. Microscopia óptica de células de algas do líquen *Pseudocyphellaria aurata* vivas e mortas, após coloração com vermelho neutro (aumento 1000x). Setas apontam células mortas.

Os sistemas testados neste trabalho são viáveis para a produção dos metabólitos de interesse de *Pseudocyphellaria aurata*, sobretudo aquele que utiliza a caulinita como matriz de aprisionamento. A caulinita parece influenciar positivamente a produção dentro dos biorreatores, exercendo o papel de imobilizar os fragmentos. A utilização de fragmentos do talo liquênico, ao invés de células, aumentou a produtividade e facilitou a produção dos compostos principais, considerando que o dano à simbiose durante a montagem do experimento é mínimo. A produção de compostos intermediários não identificados devido às variações ambientais deve ser investigada a fim de ser descoberta sua origem genética.

Agradecimentos

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelas bolsas de Mestrado de Lima e de Produtividade em Pesquisa de Pereira.

Referências bibliográficas

Ahmadjian, V. 1967. **The lichen symbiosis**. Blaisdell Publishing Company.

Brunauer, G.; Hager, A.; Grube, M.; Türk, R.; Stocker-Wörgötter, E. 2007. Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45:146-151.

Calvelo, S. & Liberatore, S. 2004. Applicability of in situ or transplanted lichens for assessment of atmospheric pollution in Patagonia, Argentina. **Journal of Atmospheric Chemistry**, 49:199-210.

Fontaniella, B.; Legaz, M. E.; Pereira, E. C.; Sebastian, B.; Vicente, C. 2000. Requirements to produce fumarprotocetraric acid using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*. **Biotechnology Letters**, 22:813-817.

Hill, R. 1963. Chlorophyll. Pp.73. In: M. Florkin & H. Stotz (eds.). **Comprehensive Biochemistry**.

- Honda, N. K. 2006. A natureza das substâncias produzidas por líquens. Pp. 345-388. In: L. Xavier-Filho, M. E. Legaz, C. Vicente, E. C. Pereira (eds.). **Biologia de líquens**. Rio de Janeiro, Âmbito Cultural.
- Huneck, S.; Yoshimura, I. 1996. **Identification of Lichen Substances**. Berlin, Springer-Verlag.
- LeBlanc, F. & Rao, D. N. 1973. Effects of sulphur dioxide on lichen and moss transplants. **Ecology**. 54(3):612-617.
- Legáz, M. E.; Millanes, A. M. & Vicente, C. C. 2006. Fisiologia dos líquens. Pp. 147-252. In: L. Xavier-Filho; M. E. Legáz; C. C. Vicente; E. C. Pereira. **Biologia de líquens**. Rio de Janeiro, Âmbito Cultural.
- Legaz, M. E.; Vicente, C. 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant Physiology**, 71:300-302.
- Lima, M. J. G. 2004. **Produção do ácido úsnico de *Cladonia substellata* vainio (líquen) por imobilização celular, utilizando diferentes métodos**. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- Lima, C. R.V.; Pereira, E. C. P.; Silva, N. H. *In press*. Emprego de métodos biotecnológicos para produção de fenóis por *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio. **Iheringia**, série Botânica.
- Miao, V.; Cœffet-Legal, M. F.; Brown, D.; Sinnemann, S.; Donaldson, G.; Davies, J. 2001. Genetic approaches to harvesting lichen products. **Trends in Biotechnology**, 19 (9):349-355.
- Nascimento, A. T. S. 2007. **Bioprodução de metabólitos de *Canoparmelia texana* (Tuck.) Elix & Hale a partir de imobilização celular**. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Nash, T. H. 1996. **Lichen Biology**, 1ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- Pereira, E. C.; Pereyra, M. T.; Matos, S. C.; Silva, N. H.; Andrade, L.; Vicente, C. 1995. Bioproduction of usnic acid from acetate by kaolinite immobilized cells of *Cladonia substellata* Vainio. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, 64 (2):171-174.

Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Andrade, L. C. 1999. Production of lichen metabolites by immobilized cells of *Cladonia clathrata*. **Phyton**, 39:79-89.

Vernon, L. P. 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Anal. Biochem.*, 32:1142.

Vicente, C.; Ruiz, J. L.; Estévez, M. P. 1980. Mobilization of usnic acid in *Evernia prunastri* under critical conditions of nutrient availability. **Phyton**, 39:15-20.

Vicente, C.; Solas, M. T.; Pereyra, M. T.; Pereira, E. C.; Pedrosa, M. M. 1995. Immobilization of lichen cells and enzymes for bioproduction of lichen metabolites: technical requirements and optimization of product recovering. Pp. 97-110. In: J. A. Daniels, et al. (Eds.). **Flechten Follmann. Contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann**. Germany, The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne.

5. CONCLUSÕES

- O sistema móvel apresentou a melhor produtividade entre os sistemas testados;
- Em geral, a concentração de 10,0 mM de acetato de sódio foi a mais produtiva, exceto para o sistema de fluxo contínuo, que teve a maior produção a 0,1 mM;
- A caulinita parece influenciar positivamente os sistemas que a utilizam, seja imobilizando os fragmentos dentro dos biorreatores, seja evitando a fragmentação destes quando em contato permanente com o meio aquoso.
- A imobilização utilizando fragmentos do talo ao invés de células demonstrou ser bastante viável para a produção dos metabólitos de interesse de *Pseudocyphellaria aurata*, apresentando um aumento substancial na produtividade de todos os sistemas analisados.

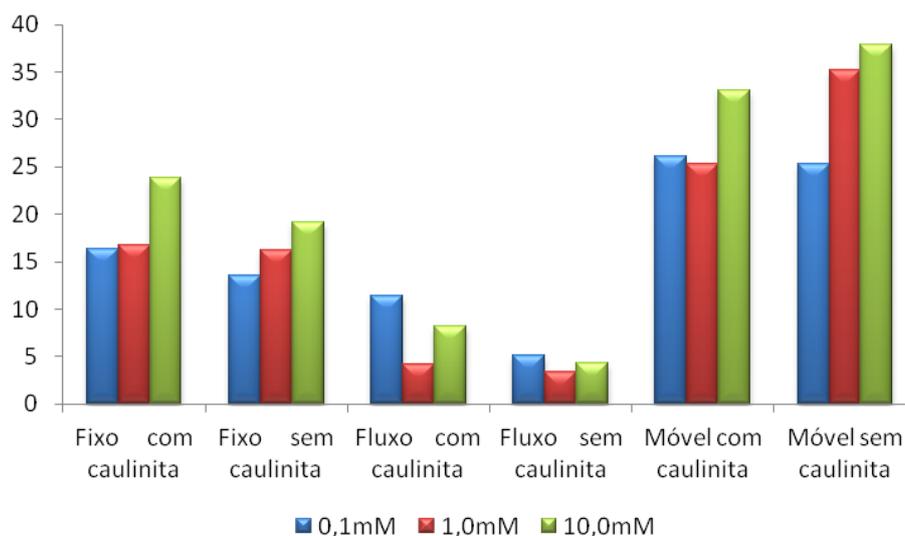


Figura 1. Comparação entre a produtividade total de fragmentos do talo de *Pseudocyphellaria aurata* nos sistemas fixo, móvel e de fluxo contínuo, com e sem a utilização de caulinita, nas diferentes concentrações de precursor enzimático NaOAc ao longo dos experimentos.

6. RESUMO

Existem alternativas viáveis para a obtenção de compostos liquênicos bioativos sem a destruição de grande quantidade de biomassa; os sistemas de imobilização consistem de uma alternativa acessível e barata. Sabendo que a obtenção de células para experimentos de imobilização causava danos à simbiose, este trabalho teve o objetivo de produzir metabólitos de *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio, ocorrente em Saloá (PE), a partir da imobilização de fragmentos do seu talo, em biorreatores com sistemas fixo, de fluxo contínuo e em movimento, com e sem a utilização de caulinita como matriz e, o acetato de sódio (NaOAc) como precursor enzimático, mantidos sob luz branca. Alíquotas coletadas dos biorreatores foram extraídas com solventes orgânicos e lidas em espectrofotômetro. A partir do talo liquênico obtiveram-se extratos orgânicos. Estes e os resultantes das imobilizações foram submetidos a cromatografias em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE). O sistema móvel mostrou ser o mais produtivo, sobretudo na concentração de 10,0mM de NaOAc, independentemente do uso da matriz de aprisionamento. A oxigenação provocada pela rotação contínua deste sistema deve ser importante para as trocas gasosas dos fragmentos do líquen sob constante saturação de água. Os níveis de clorofila dos fragmentos deste sistema não foram alterados significativamente, ao contrário do que aconteceu nos demais sistemas. Apesar disso, o sistema fixo foi o que apresentou maiores percentagens de vitalidade celular na camada de algas, principalmente no sistema com caulinita. Esta deve ter conferido maior proteção aos fragmentos imobilizados, tendo a função de fixar/imobilizar validada. O sistema de fluxo contínuo foi o menos produtivo quando comparado aos demais, porém a técnica utilizando fragmentos do talo demonstrou ser bem mais produtiva do que com células. A CCD dos extratos orgânicos apresentou calicina, ácido pulvínico e sua lactona no talo *in natura* e no talo após as imobilizações, além de várias bandas não identificadas de compostos intermediários produzidos nos biorreatores. Durante a realização da CLAE foi observado que a calicina e a lactona do ácido pulvínico podem se converter em ácido pulvínico. Por este motivo não foi detectada a presença dessas substâncias nas CLAEs, visto que até a preparação para a cromatografia os eluatos ficaram solubilizados até a evaporação e sob iluminação natural, o que deve ter sido responsável pela conversão entre os compostos produzidos.

Palavras-chave: líquens, metabólitos bioativos, sistemas de imobilização.

7. ABSTRACT

There are viable alternatives to obtain lichen compounds without the destruction of large quantities of biomass; immobilization systems are an accessible and cheap alternative. Knowing that obtaining cells for experiments of immobilization caused damage to the symbiosis, this work aimed to produce metabolites of *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio, occurred in Saloá (PE), from its thallus immobilization through the use of bioreactors with fixed, continuous flow and movement systems, with and without the use of kaolinite as a matrix, and the sodium acetate (NaOAc) as enzymatic precursor, kept under white light. Collected aliquots from bioreactors were extracted with organic solvents and measured in spectrophotometer. From lichen thallus organic extracts were also obtained. These ones and the others from immobilization systems were submitted to thin layer (TLC) and high performance liquid (HPLC) chromatographies. The mobile system has proved the most productive, especially in the concentration of 10.0 mM of NaOAc, regardless of the entrapment matrix using. The oxygenation caused by continuous rotation of this system should be important for gas exchange of lichen fragments under constant saturation of water. The chlorophyll levels of fragments of this system were not changed significantly, unlike what happened in other systems. However, the fixed system showed the largest percentage of cell vitality in algal layer, especially in the system with kaolinite. This one should given highest protection to immobilized fragments, and the function of fix / immobilize validated. The continuous flow system was the less productive when compared to the others, but the technique using the thallus fragments has proved be more productive than with cells. TLC of the organic extracts showed calycin, pulvinic acid and its lactone in thallus *in natura* and in the thallus after immobilizations, besides several spots of unidentified intermediate compounds produced in bioreactors. During the HPLC was observed that the pulvinic acid lactone and calycin can convert into pulvnic acid. For this reason it was not detected the presence of such substances in HPLCs, due to the preparation for chromatography the eluates were diluted, evaporated and kept under natural light, which should have been responsible for the conversion of produced compounds.

Keywords: lichens, bioactive metabolites, immobilization systems.

8. ANEXOS

8.1 Resumos publicados em anais de congressos durante o curso

58º Congresso Nacional de Botânica, 28 de outubro a 02 de novembro de 2007, São Paulo - Brasil.

PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.) VAINIO A PARTIR DE IMOBILIZAÇÃO DO TALO NO SISTEMA EM MOVIMENTO

Lima, C.R.V.¹, Lourdes², Pereira, E.C.G.³, Silva, N.H.⁴

¹ cinthia.lima@ufpe.br, Mestranda em Biologia Vegetal PPGBV/UFPE – Bolsista /CNPq; ²Graduanda em Bel. Ciências Biológicas/UFPE – Bolsista /CNPq; ³Departamento de Geografia /UFPE; ⁴Departamento de Bioquímica /UFPE.

Sistemas de imobilização têm sido propostos a fim de buscar alternativa viável para produção de substâncias liquênicas, de difícil aquisição. Um dos sistemas testados foi o sistema em movimento, onde as células liquênicas eram obtidas por maceração do talo e então imobilizadas. Buscando uma otimização da metodologia, este trabalho teve o objetivo de verificar a viabilidade do sistema em movimento de imobilização utilizando, ao invés de células, fragmentos do talo liquênico para produção de metabólitos de *Pseudocyphellaria aurata*. Utilizaram-se 10g do material liquênico triturado para a obtenção a frio dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico, seguindo a ordem eluotrópica. Outras 3g do material liquênico foram trituradas e colocadas nos biorreatores, que consistiam em tubos de ensaio com água deionizada, tendo acetato de sódio (NaOAc) como precursor enzimático a 0,1mM e 1,0mM. Os biorreatores foram mantidos sob luz branca. Alíquotas foram coletadas às 24, 48, 72, 96h e, a partir daí, a cada 7 dias de intervalo durante 28 dias. Estas foram extraídas com as mesclas éter/acetato de etila (65:35, v/v) e clorofórmio/acetoneitrila (60:40, v/v), e lidas em espectrofotômetro a 254nm e 310nm. Os eluatos celulares e os extratos orgânicos do talo foram submetidos a cromatografia em camada delgada (CCD), desenvolvida no sistema A de solventes (tolueno: dioxano: ácido acético, 180:45: 5,v/v). As bandas foram evidenciadas sob luz UV e reveladas com H₂SO₄ a 10% e aquecimento a 100°C. As análises por espectrofotometria revelaram que houve produção de metabólitos em ambas as concentrações de precursor até o final do experimento. Em relação à produtividade das células a concentração de 0,1 mM foi a mais eficiente, apesar da concentração de 1,0mM ter apresentado uma produção bastante satisfatória. Experimentos anteriores com esta espécie neste sistema de imobilização, utilizando as células liquênicas obtidas por maceração, demonstraram resultados idênticos para a melhor concentração enzimática. O aperfeiçoamento do sistema em movimento aqui apresentado possibilitou um aumento de 100% na produção dos metabólitos em relação aos experimentos com imobilização de células. Possivelmente, isto deve-se ao fato da permanência do contato íntimo entre a alga e o fungo, que possibilita a transferência de enzimas e cofatores entre os simbioses.

Apoio: CNPq

GLAL 8 – VIII Encuentro Latinoamericano de Liquenólogos, 24 a 30 de noviembre de 2007, Lima - Perú.

COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES SISTEMAS DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.) VAINIO

Cinthia R. V. Lima¹, Eugênia C. G. Pereira², Nicácio H. Silva³.

¹Mestranda em Biologia Vegetal PPGBV – UFPE; ²Departamento de Ciências Geográficas – UFPE; ³Departamento de Bioquímica – UFPE.

Os sistemas de imobilização de células liquênicas foram desenvolvidos a fim de minimizar os danos causados à micota liquenizada resultante da extração de seus compostos secundários bioativos, visto que para isso é necessária a utilização de grande quantidade de biomassa dificilmente renovável. Conhecendo o êxito desses experimentos, este trabalho teve o objetivo de produzir metabólitos de *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio, a partir da imobilização de células, através do uso de biorreatores com sistema fixo, de fluxo contínuo e em movimento. O material liquênico foi coletado em Saloá – PE. Os biorreatores foram montados utilizando caulinita como matriz de enclausuramento e acetato de sódio, a 0,1, 1,0 e 10,0mM, como precursor enzimático. Para cada alíquota coletada, a mesma quantidade de precursor, em igual concentração, foi reposta aos biorreatores, mantido sob luz branca. As alíquotas foram extraídas com as mesclas éter/acetato de etila (65:35, v/v) e clorofórmio/acetoneitrila (60:40, v/v), e lidas em espectrofotômetro a 254nm e 310nm. Utilizaram-se 10g do talo liquênico triturado para a obtenção a frio dos extratos orgânicos etéreo, clorofórmico e acetônico. Os eluatos celulares e os extratos orgânicos do talo foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD), desenvolvida no sistema A de solventes (tolueno: dioxano: ácido acético, 180:45: 5, v/v). As bandas foram evidenciadas sob luz UV e reveladas com H₂SO₄ a 10% e aquecimento a 100°C. Exceto pelo experimento a 1,0mM do sistema de fluxo contínuo, que cessou a produção a partir da primeira semana, pode-se afirmar que a espécie manteve uma biossíntese contínua durante todo o período dos experimentos. As células imobilizadas sintetizaram substâncias em todos os sistemas de imobilização e em todas as concentrações do precursor. Em geral, a concentração de precursor enzimática de 0,1mM foi a mais produtiva em todos os sistemas analisados. Os sistemas fixo e de fluxo contínuo foram igualmente eficientes para bioprodução de metabólitos para esta espécie, que apresentou uma grande capacidade de adaptação às imobilizações.

Apoio: CNPq

III REBEL – Reunião Brasileira de Estudos Liquenológicos, 04 a 10 de maio de 2008, Mogi-Guaçú, Brasil.

Imobilização: uma alternativa biotecnológica para a preservação da micota liquenizada.

Cinthia Renata Viera de LIMA, Patryk MELO, Eugênia Cristina Gonçalves PEREIRA, Nicácio Henrique da SILVA.

Produtores de compostos secundários únicos, muitas vezes referidos como ativos contra microrganismos e/ou neoplasias, os líquens têm crescimento lento, o que requer cautela na sua utilização para produção de suas substâncias em grande escala. Para o isolamento de um composto ativo, utiliza-se grande quantidade de biomassa dificilmente renovável. Os sistemas de imobilização têm sido propostos a fim de buscar uma alternativa viável para produção dessas substâncias liquênicas. Conhecendo o êxito desses experimentos, este trabalho tem o objetivo de revisar as metodologias empregadas em sistemas de imobilização para produção de metabólitos. O intuito de se empregar biotecnologia aos líquens é o de se obter uma produção contínua de metabólitos bioativos, utilizando-se o mínimo possível de biomassa liquênica, manipular concentrações ideais de precursores de rotas metabólicas para a produção de compostos específicos, ou aumentar a produtividade, associado ao baixo custo do processo. O sistema fixo ou tradicional, sendo a primeira metodologia empregada, tem o objetivo de confinar o material liquênico e o precursor, afim de haver uma produção metabólica. Esse sistema consolidou a utilização da caulinita como matriz de enclausuramento das células no biorreator. O sistema em movimento tem como objetivo aumentar a superfície de contato entre o precursor e os simbiontes, almejando uma maior produtividade. O sistema de fluxo contínuo impossibilita a saturação do meio com a produção dos metabólitos, já que as soluções de precursor enzimático ficam em contato com as células por pouco tempo. É possível que os compostos secundários dos líquens possam ser reciclados e usados como substratos respiratórios. Dessa forma, pode ocorrer o consumo da acetil-CoA liberada, em caso da depressão da fotossíntese liquênica, ou da captação de nutrientes orgânicos. O aperfeiçoamento da técnica com a utilização do talo possibilita um aumento na produção dos metabólitos em relação aos experimentos com imobilização de células. Possivelmente, isto deve-se ao fato da permanência do contato íntimo entre a alga e o fungo, que possibilita a transferência de enzimas e cofatores entre os simbiontes. Através de imobilizações celulares e do talo liquênico têm sido possível a síntese contínua de metabólitos de difícil aquisição, a partir de líquens *in natura*. Isto viabiliza testes de atividade biológica com metabólitos bioativos sem destruição da micota liquenizada, o que infere idéia de preservação.

Apoio: CNPq, PIBIC-UFPE.

GBL 4 – Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 24 e 25 de outubro de 2008, Curitiba – Brasil.

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS LIQUÊNICOS: *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.) VAINIO EM SISTEMA MÓVEL.

Lima, C. R. V.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H. ¹Mestranda em Biologia Vegetal PPGBV – UFPE;

²Departamento de Ciências Geográficas – UFPE; ³Departamento de Bioquímica – UFPE.

Produtores de compostos secundários únicos, os líquens têm crescimento lento, o que requer cautela na sua utilização para obtenção de suas substâncias em grande escala. Para o isolamento de um composto ativo, utiliza-se grande quantidade de biomassa dificilmente renovável. Conhecendo o êxito dos sistemas de imobilização para produção de substâncias a partir de líquens *in natura*, este trabalho teve o objetivo de comparar a eficiência do sistema móvel de imobilização com e sem a utilização de caulinita para produção de metabólitos de *Pseudocyphellaria aurata*, utilizando fragmentos de seu talo. Utilizou-se 1g do material líquênico triturado para a obtenção a frio dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico, seguindo a ordem eluotrópica. Outras 6g do material líquênico foram picotadas com tesoura e divididas em seis porções iguais. A três delas adicionaram-se caulinita e às três outras não, sendo posteriormente cada uma colocada no biorreator equivalente a concentração do precursor. O acetato de sódio (NaOAc) foi utilizado como precursor a 0,1mM, 1,0mM e 10,0mM, fornecido continuamente aos biorreatores, mantidos sob luz branca. Alíquotas foram coletadas às 24, 48, 72, 96h e, a partir daí, a cada 7 dias de intervalo durante 3 meses. Estas foram extraídas com as mesclas éter/acetato de etila (65:35, v/v) e clorofórmio/acetoneitrila (60:40, v/v), e lidas em espectrofotômetro a 254nm e 310nm. Os eluatos celulares e os extratos orgânicos do talo foram submetidos a cromatografia em camada delgada (CCD), desenvolvida no sistema A de solventes (tolueno: dioxano: ácido acético, 180:45: 5,v/v). As bandas foram evidenciadas sob luz UV curta e longa. No sistema móvel utilizando caulinita, a concentração de precursor mais produtiva foi a de 10,0 mM, com pico de produtividade aos 46 dias. No sistema móvel sem a utilização da matriz de enclausuramento, a concentração de 1,0 mM de acetato de sódio foi melhor em produtividade, com pico de produção às 24h. Os compostos extraídos com a mescla clorofórmio : acetoneitrila (60 : 40, v : v) se destacaram entre os metabólitos produzidos, lidos principalmente a 310nm. Na CCD realizada com os eluatos é possível observar bandas com R_fs compatíveis ao ácido pulvínico e sua lactona e/ou a calicina nessa mescla de solventes. Comparando os dois sistemas, podemos observar que o sistema onde não se utiliza caulinita apresenta a produtividade um pouco superior àquele que utiliza a matriz. Apesar disso, o sistema com caulinita demonstra evidências de que tem maior capacidade de produtividade ao longo do tempo, já que as últimas amostras analisadas ainda apresentam absorvância relativamente maior que as do sistema sem a utilização de caulinita.

Apoio: CNPq.

GBL 4 – Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 24 e 25 de outubro de 2008, Curitiba – Brasil.

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS LIQUÊNICOS: *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.) VAINIO EM SISTEMA DE FLUXO CONTÍNUO

Lima, C. R. V.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H. ¹Mestranda em Biologia Vegetal PPGBV – UFPE;

²Departamento de Ciências Geográficas – UFPE; ³Departamento de Bioquímica – UFPE.

Sistemas de imobilização têm sido desenvolvidos com o intuito de produzir substâncias de interesse a partir de líquens *in natura*, preservando a micota liquenizada, que possui produção de biomassa muito lenta. Este trabalho teve o objetivo de comparar a eficiência do sistema de fluxo contínuo de imobilização com e sem a utilização de caulinita como suporte para produção de metabólitos de *Pseudocyphellaria aurata*, utilizando fragmentos de seu talo. Utilizou-se 1g do material liquênico triturado para a obtenção a frio dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico, seguindo a ordem eluotrópica. Outras 6g do material liquênico foram picotadas com tesoura e divididas em seis porções iguais. A três delas adicionaram-se caulinita e às três outras não, sendo posteriormente cada uma colocada no biorreator equivalente a concentração do precursor. O acetato de sódio (NaOAc) foi utilizado como precursor a 0,1mM, 1,0mM e 10,0mM, fornecido continuamente aos biorreatores, mantidos sob luz branca por todo o período do experimento. Alíquotas foram coletadas às 24, 48, 72, 96h e, a partir daí, a cada 7 dias de intervalo durante 3 meses. Estas foram extraídas com as mesclas éter/acetato de etila (65:35, v/v) e clorofórmio/acetoneitrila (60:40, v/v), e lidas em espectrofotômetro a 254nm e 310nm. Os eluatos celulares e os extratos orgânicos do talo foram submetidos a cromatografia em camada delgada (CCD), desenvolvida no sistema A de solventes (tolueno: dioxano: ácido acético, 180:45: 5,v/v). As bandas foram evidenciadas sob luz UV curta e longa. Em ambos os sistemas testados a concentração mais produtiva foi a de 0,1mM. No sistema de fluxo contínuo utilizando caulinita o pico de produtividade ocorreu aos 60 dias. No sistema sem a utilização da matriz de enclausuramento o pico de produção foi observada no 11º dia. Os compostos extraídos com a mescla éter/acetato de etila se destacaram entre os metabólitos produzidos, lidos principalmente a 254nm. Na CCD realizada com os eluatos é possível observar bandas com Rf's compatíveis ao ácido pulvínico e sua lactona e/ou a calicina nessa mescla de solventes. Comparando os dois sistemas, podemos observar que a produtividade do sistema utilizando caulinita é cerca de 20% maior do que o sistema que não utiliza caulinita. Além disso, o sistema com caulinita demonstra evidências de que tem maior capacidade de produtividade ao longo do tempo, já que as últimas amostras analisadas ainda apresentam absorvância relativamente maior que as do sistema sem a utilização de caulinita. É possível que a caulinita, um produto mineral, forneça algum micronutriente aos fragmentos do líquen, provocando esse aumento na produtividade, ou que ela o proteja do excesso de luminosidade.

Apoio: CNPq.

GBL 4 – Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 24 e 25 de outubro de 2008, Curitiba – Brasil.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FENÓIS ATIVOS DO LÍQUEN *Ramalina aspera*

Alexsandra Nascimento Carvalho, Centro Acadêmico de Vitória – UFPE; Amanda Camilla Garcia Rodrigues, Graduação em Química - UFPE; Cinthia Renata Vieira de Lima, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal – UFPE; Emerson Peter da Silva Falcão, Centro Acadêmico de Vitória – UFPE; Eugênia Cristina Gonçalves Pereira, Depto. Ciências Geográficas – UFPE; Nicácio Henrique da Silva, Depto. Bioquímica – UFPE; Norma Buarque Gusmão, Depto. Antibióticos – UFPE.

A literatura científica descreve a atividade de compostos liquênicos contra vários tipos de organismos. Reconhecendo os líquens como um grupo com grande potencial para produção de fármacos, este trabalho descreve a análise cromatográfica de extratos orgânicos de *Ramalina aspera* e a avaliação da atividade antimicrobiana destes frente a microrganismos Gram-positivos e negativos, bem como ácido-álcool-resistentes e leveduras. Os testes cromatográficos foram realizados utilizando-se a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE). Na CCD, a fase móvel utilizada foi o sistema tolueno : dioxano : ácido acético (180 : 45 : 5, v/v), sendo as bandas posteriormente visualizadas sob luz UV, de comprimento de onda curta e longa, e reveladas com ácido sulfúrico a 10% e aquecimento a 100 °C. As bandas foram identificadas por suas reações de cor e Rf comparados aos dos padrões. No tocante à análise em CLAE, foi injetado 0,1mg.mL⁻¹ das amostras em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado a um detector de UV da marca CG. As condições de cromatografia foram: coluna de fase reversa MicroPack MCH-18 (300mm x 4mm I.D.), volume de injeção 20µl; 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 254nm. Para os ensaios de atividade antimicrobiana utilizou-se a metodologia de difusão em meio sólido utilizando-se discos de papel impregnados com 50µl dos extratos orgânicos (etéreo, clorofórmico e acetônico) e padrões de atividade antimicrobiana conhecida, todos na concentração de 2mg.mL⁻¹. Os organismos teste foram *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Os resultados obtidos por cromatografia demonstraram a presença de cinco substâncias, sendo o ácido divaricático o composto majoritário da espécie cuja maior concentração foi detectada nos extratos etéreo e clorofórmico. Os resultados evidenciaram a atividade dos extratos etéreo e clorofórmico do líquen somente frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, com halos de 11mm e 9mm respectivamente. A atividade observada pode estar relacionada com as concentrações do citado composto, observadas nos ensaios de CLAE o que pode ser um indicativo de que o ácido divaricático seja o metabólito secundário responsável pela atividade observada.

VI Congreso Latinoamericano de Micología, 10 a 13 de noviembre de 2008, Mar del Plata - Argentina.

Comparação de métodos para produção de metabólitos liquênicos: *Pseudocyphellaria aurata* (Ach.) Vainio em sistema fixo

Lima, CRV^{*1}; Pereira, ECG¹; Silva, NH². ¹Depto. Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco;

²Depto. Ciências Geográficas – Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: cinthiarvlima@yahoo.com.br

Conhecendo o êxito dos sistemas de imobilização para produção de substâncias a partir de líquens *in natura*, este trabalho teve o objetivo de comparar a eficiência do sistema de fixo de imobilização com e sem a utilização de caulinita para produção de metabólitos de *Pseudocyphellaria aurata*, utilizando fragmentos de seu talo. Utilizou-se 1g do material liquênico triturado para a obtenção a frio dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico. Foram montados seis biorreatores, cada um com 1g do material liquênico. A três deles adicionaram-se caulinita e às três outras não. O acetato de sódio foi utilizado como precursor a 0,1mM, 1,0mM e 10,0mM, fornecido continuamente aos biorreatores, mantidos sob luz branca. Alíquotas coletadas ao longo dos quatro meses de experimento foram extraídas e lidas em espectrofotômetro. Todos os extratos foram submetidos a cromatografia em camada delgada. Em ambos os sistemas, com e sem a utilização de caulinita, a concentração de 10,0mM de acetato de sódio foi a mais produtiva. O sistema utilizando caulinita é cerca de 20% mais produtivo do que o sistema que não utiliza caulinita. É possível que a caulinita, um produto mineral, forneça algum micronutriente aos fragmentos do líquen, provocando esse aumento na produtividade.

Micota liquenizada de um afloramento rochoso no semi-árido nordestino, Brasil: dados preliminares

Lima, CRV^{*1}; Gomes, PRS^{*2}; Cáceres, M³. ¹Depto. Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco;

²Depto. Botânica – Universidade Federal de Pernambuco; ³Depto. Micologia, Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: cinthiarvlima@yahoo.com.br

Este estudo tem por objetivo o inventário da micota liquenizada da Pedra do Guariba (08°22'S - 35°50' W; 685m), limite Caruaru-Agrestina, semi-árido de PE. Escolpro e martelo foram utilizados para a coleta das espécies crustosas, enquanto os foliosos e fruticosos foram coletados com o auxílio de canivete. Os espécimes coletados foram identificados de acordo com bibliografia especializada, por meio de análise macro e microscópica, além da observação de reações positivas com solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% e lugol (iodo), conforme as necessidades de cada grupo. Ao todo foram encontrados representantes de 12 famílias: *Agyriaceae*, *Arthoniaceae*, *Cladoniaceae*, *Graphidaceae*, *Lecanoraceae*, *Parmeliaceae*, *Physciaceae*, *Pyrenulaceae*, *Ramalinaceae*, *Teloschistaceae*, *Trypetheliaceae* e *Usneaceae*. Foram identificadas até o presente momento as seguintes espécies de fungos liquenizados, todas de hábito crustoso: *Dirinaria leopoldii* (Stein) D.D. Awasthi, *Graphis lumbricina* Vain., *Haematomma personii* (Fée) A. Massal., *Herpothallon rubrocinctum* (Ehrenb.) Aptroot & Lücking, *Pertusaria flavens* Nyl., *Pyrenula ochraceoflava* (Nyl.) R.C. Harris, *Pyrrhospora haematites* (Fée) Kalb, *Vainionora flavovirens* (Fée) Kalb e *Trypethelium eluteriae* Spreng. Esses registros são de grande importância, visto a escassez de dados sobre a ocorrência de espécies de líquens, além ausência de informações sobre os que colonizam afloramentos rochosos no Nordeste do Brasil.

Uso do acetato de sódio para reativação metabólica de *Cladonia substellata* Vainio após extração orgânica (dados preliminares)

Silva HPB^{1*}; Melo P²; Lima, CRV³; Pereira E²; Silva NH³; Colaço W¹. 1: Depto. Energia Nuclear – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). 2: Depto. Geografia – UFPE. 3: Depto. Bioquímica – UFPE. E-mail: eugenia.pereira@pq.cnpq.br

O ácido úsnico é relatado na literatura como um dos mais bioativos compostos liquênicos, sendo abundante no líquen *Cladonia substellata*. Conhecendo os problemas para obtenção desses produtos, a partir de líquens *in natura*, o conhecimento do mecanismo de reativação metabólica, após retirada de seus fenóis, possibilitará reuso de material em laboratório, ou sua recuperação em ambientes degradados. *Cladonia substellata* foi submetida à extração com éter, clorofórmio e acetona, seguindo a ordem eluotrópica. O material resultante da extração foi dividido em três porções de 5g. Cada porção foi borrifada com acetato de sódio (NaOAc) a 0,1mM, 1,0mM e 10,0mM, respectivamente, 3 vezes por semana por um período de 45 dias, quando foram realizadas coletas de 1g de líquen em cada um dos experimentos. Esse material foi macerado e extraído com 20mL de éter, por 45 minutos sob agitação mecânica. Os extratos orgânicos do talo *in natura* e do talo exaurido foram pesados e analisados por cromatografia em camada delgada. Até o momento, a concentração de precursor enzimático que melhor induziu a reativação do metabolismo do líquen foi a de 0,1mM. O ácido úsnico foi observado por CCD em todas as amostras.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.