

A microscopic image of lichen cells, showing various structures and colors, serving as a background for the text.

Nadejda de Azevedo Nóbrega

Produção de compostos fenólicos
por células imobilizadas do líquen
Parmotrema andinum (Müll. Arg.) Hale

Recife
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Produção de compostos fenólicos
por células imobilizadas do líquen
Parmotrema andinum (Müll. Arg.)
Hale

MESTRANDA: NADEJDA DE AZEVEDO NÓBREGA
ORIENTADOR: NICÁCIO HENRIQUE DA SILVA
CO-ORIENTADOR: EUGÊNIA CRISTINA GONÇALVES PEREIRA

RECIFE
2002

Nadejda de Azevedo Nóbrega

Produção de compostos fenólicos por células imobilizadas do líquen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.)

Hale

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Bioquímica da
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado por: _____

Data: ____ / ____ / ____

“Queres aprender?
Estuda.
Queres saber mais?
Escolhe um bom mestre.
Queres saber melhor ainda?
Ensina aos outros o que aprendeste.”
(Chiara Lubich)

OFEREÇO

*Ao meu pai, Geraldo de
Oliveira Nóbrega
(in m e m o r i a n)*

*À minha mãe, Suzana e ao meu
irmão, Geraldo.
DEDICO*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	
<i>1.1 Líquens</i>	13
<i>1.2 Substâncias liquênicas</i>	14
<i>1.3 Utilização econômica</i>	14
<i>1.4 Imobilização celular</i>	15
2. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE ESTUDADA	18
3. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA	20
4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	20
5. OBJETIVOS	21
<i>5.1 Geral</i>	21
<i>5.2 Específicos</i>	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
7. TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	26
Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen <i>Parmotrema andinum</i> (Müll. Arg.) Hale e avaliação de ação antimicrobiana	27
8. CONCLUSÕES	40
9. ANEXOS	41
9.1 Trabalho completo publicado em anais de congresso	41
9.2 Normas do periódico Acta Farmacéutica Bonaerense	52

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os momentos de alegrias, e também pelas eventuais dificuldades, que nos trazem o amadurecimento pessoal.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, pelo apoio e compreensão para a realização do curso de Mestrado.

Aos meus orientadores minha eterna gratidão. Dr. Nicácio Henrique da Silva, por sua larga experiência, amizade e paciência e Dra. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira, pelo incentivo, otimismo e confiança.

Aos meus companheiros técnico-administrativos do Departamento de Bioquímica desta Universidade, pelo incentivo. Em especial, ao João Virgínio, por auxiliar em experimentos, e ao João Carneiro e Luiz Amâncio, pela compreensão em todos os momentos. Além de Neide, Djalma e Miron, que nunca deixaram de nos atender quando solicitados

Aos meus colegas do Curso de Mestrado em Bioquímica, pela união em todos os momentos, em especial, à Graça Paiva, por sua sincera amizade.

A todos que fazem parte do Laboratório de Produtos Naturais, pela maravilhosa convivência, especialmente à Renata Almeida, por sua tranqüilidade e segurança, à Sheyla Ribeiro, pelas horas intermináveis dedicados aos nossos experimentos e a Anderson, por sua paciência em momentos difíceis.

LISTA DE FIGURAS

1.	INTRODUÇÃO	
Figura 1 -	<i>Parmotrema andinum</i> (Müll. Arg.) Hale	19
Figura 2 -	Modelo estrutural do ácido lecanórico	19
Figura 3 -	Modelo estrutural da atranorina	19
Figura 4 -	Mapa de Pernambuco com indicativo da localização do município de Saloá	20
7.	TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	
	<i>Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen <u>Parmotrema andinum</u> (Müll. Arg.) Hale e avaliação de ação antimicrobiana</i>	
Figura 1 -	Produção de metabólitos por células de <i>Parmotrema andinum</i> imobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio 0,01 mM. (a) extrato éter/acetato de etila; (b) extrato clorofórmio/acetonitrila.	34
Figura 2 -	Produção de metabólitos por células de <i>Parmotrema andinum</i> imobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio 0,1 mM. (a) extrato éter/acetato de etila; (b) extrato clorofórmio/acetonitrila.	34
Figura 3 -	Produção de metabólitos por células de <i>Parmotrema andinum</i> imobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio 1,0 mM. (a) extrato éter/acetato de etila; (b) extrato clorofórmio/acetonitrila.	34
Figura 4 -	Produção de metabólitos por células de <i>Parmotrema andinum</i> imobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio 10,0 mM. (a) extrato éter/acetato de etila; (b) extrato clorofórmio/acetonitrila.	35
Figura 5 -	Produção de metabólitos por células de <i>Parmotrema andinum</i> imobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio 20,0 mM. (a) extrato éter/acetato de etila; (b) extrato clorofórmio/acetonitrila.	35

- Figura 6 - Produção total dos metabólitos por células de *P.andinum*, imobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio em diferentes concentrações. 36
- Figura 7 - Cromatograma em camada delgada dos eluatos celulares de *P.andinum* a 0,01 mM (1); 0,1 mM (2); 1,0 mM (3); 10,0 mM (4); 20,0 mM (5). Extratos etéreo (6), acetônico (7) e clorofórmico (8). Ácido lecanórico de *P. andinum* (9), atranorina de *P. andinum* (10), atranorina padrão (11). 36
- Figura 8 - Cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando amostras diluídas em éter etílico. A - extrato etéreo; B - extrato acetônico; C - extrato clorofórmico; D - atranorina. 37
- Figura 9 - Cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando amostras diluídas em metanol. A - extrato etéreo; B - extrato acetônico; C - extrato clorofórmico; D - ácido lecanórico. 37
- Figura 10 - Cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando eluatos celulares diluídos em metanol. A - 0,01 mM; B - 0,1 mM; C - 1,0 mM; D - 10,0 mM; E - 20,0 mM. 38
- Figura 11 - Biocromatogram utilizando extrato clorofórmico de *P. andinum* (1), padrões de atranorina (2), ácido lecanórico (3), ácido lecanórico (4), ácido úsnico (4), contra *Bacillus subtilis*. 39

LISTA DE TABELA

7. **TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO**

Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen Parmotrema andinum (Müll. Arg.) Hale e avaliação de ação antimicrobiana

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana de extratos de <i>P. andinum</i> após 24 horas (mm)	38
--	-----------

RESUMO

Este estudo teve como objetivos produzir compostos fenólicos de *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale, através de imobilização celular, utilizando acetato de sódio como precursor, e testar a atividade antibacteriana de extratos orgânicos do talo *in natura*, eluatos celulares e substâncias purificadas da espécie. Células foram extraídas de *P. andinum*, e imobilizadas em caulinita previamente hidratada. Com este material foram montados 5 bioreatores, e em cada um foram adicionados 50 mL de acetato de sódio a 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 e 20,0 mM, como precursor biossintético das substâncias típicas da espécie. Alíquotas retiradas, a diferentes intervalos de tempo, foram extraídas com éter/acetato de etila e clorofórmio/acetonitrila, e lidas em espectrofotômetro a 254 e 366 nm. Os extratos, após evaporados, foram avaliados por cromatografias de camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE). Ensaio antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, através do teste de difusão em meio sólido, foram realizados utilizando os extratos brutos dos eluatos obtidos de imobilização celular, bem como do talo *in natura* e fenóis purificados. Os extratos mais ativos e microrganismo mais sensível foram submetidos a ensaios de biocromatografia para indicação do princípio ativo da espécie. Foi verificado que as concentrações utilizadas do precursor não influenciam na produtividade das células imobilizadas. Não houve bioprodução das substâncias, atranorina e ácido lecanórico, referidas na literatura consultada para a espécie, porém estão presentes nos extratos brutos do talo *in natura*. Também foi observada a presença de substâncias não identificadas nos extratos do talo natural, principalmente no clorofórmico. Não foi observada atividade antimicrobiana nos eluatos celulares, e o extrato bruto mais ativo foi o clorofórmico, seguido pelo etéreo, sobretudo contra bactérias Gram positivas. No ensaio biocromatográfico realizado com o extrato clorofórmico e *B. subtilis* houve formação de halo inibitório em torno da banda correspondente ao ácido lecanórico, e à substância não identificada presente no extrato. No caso dos eluatos celulares, os compostos não identificados podem ser considerados intermediários das vias metabólicas de compostos principais da espécie. Substâncias adicionais às referidas na literatura, e detectadas neste trabalho, sugerem estudos posteriores detalhados da química de *P. andinum*. A produção de compostos intermediários que permitam seu uso comercial, ou a síntese de outra substância, já é uma resposta positiva à técnica empregada, além de ser *P. andinum* uma espécie que responde satisfatoriamente aos ensaios de imobilização celular.

Palavras-chave: *Parmotrema andinum*, imobilização celular, atividade antimicrobiana, atranorina e ácido lecanórico

ABSTRACT

This study had the objective to produce phenolic compounds by cell immobilization of *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale, using sodium acetate as precursor, and to test the antibacterial activity of organic extracts obtained from the *in natura* thallus, cell washes and purified substances from the species. Cells were extracted from *P. andinum* and immobilized in kaolinite previously hydrated. From this material there were constructed 5 biorreactors, and in each one were added 50 mL of sodium acetate at 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 and 20,0 mM, as biosynthetic precursor of common substances of the species. Aliquots were subtracted at different time periods, and extracted with organic solvents ether/ ethyl acetate and chloroform/ acetonitril, and measured in spectrophotometer at 254nm and 366nm. The extracts were evaporated and evaluated through thin layer (TLC) and liquid chromatographies (HPLC). Antimicrobial assays against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, through solid medium diffusion test were realized using the organic extracts and purified phenolics. The most active extracts and the sensible microorganism were submitted to biochromatography assays for indicating the active principle of the species. It was verified that the precursor concentration did not influence in the productivity of immobilized cells. Did not occur the bioproduction of substances refereed in the literature for *P. andinum*, atranorin and lecanoric acid, but these compounds were detected in the organic extracts of *in natura* thallus, mainly in chloroformic one. It was not observed antimicrobial activity in the cell washes, and the more active organic extract was the chloroformic, followed by the ethereous, principally against Gram positive bacteria. In the biochromatographic assay realized with the chloroformic extract and *B. subtilis* the halo formation occurred around the spot that corresponded to lecanoric acid, and to the non identified substance present in the extract. In the cell washes case, the unidentified compounds produced can be considered intermediary of metabolic pathways of main substances of the species. Additional substances to the referred in the literature, and detected in this work, suggest future detailed studies about *P. andinum* chemistry. The production of intermediary compounds that permit their commercial use, or the synthesis of other substance, is yet a positive answer to the used technique, beside to be *P. andinum* a species that has positive response to cell immobilization assays.

Key words: *Parmotrema andinum*, cell immobilization, antimicrobial activity, atranorin and lecanoric acid

1. INTRODUÇÃO

O interesse por substâncias liquênicas tem aumentado sensivelmente na comunidade científica, que atua na farmacologia e química de produtos naturais, por conta de seus evidentes efeitos terapêuticos. No entanto, alguns inconvenientes desfavorecem o uso de tais compostos, uma vez que as técnicas para isolamento de compostos fenólicos proporcionam baixo rendimento, pois dependem do procedimento utilizado e dos solventes empregados. Algumas espécies também dependem de coleta no momento adequado, visto que só produzem determinado fenol em certo período do ano (Hale-Jr., 1983; Pereira, 1989).

Através de imobilizações celulares e enzimáticas é possível a obtenção contínua de compostos liquênicos a partir do talo *in natura*, impedindo a destruição de grande quantidade de biomassa. A continuidade destes estudos visa a produção de metabólitos em quantidades que justifiquem o processo, permitindo seu uso em investigação científica e/ou na indústria.

1.1 Líquens

Os líquens são organismos resultantes de uma associação entre um fungo e um simbiote fotossintético, resultando em talos complexos e estáveis. O componente fotossintético é constituído por algas unicelulares pertencentes às divisões **Chlorophycophyta** e **Cyanophycophyta**. Os fungos são, na maioria, **Ascomycota**, e em menor proporção, **Basídio** e **Deuteromicota**, formadores dos Asco, Basídio e Deuterolíquens (Nash, 1996). Conhecidos desde a antiguidade, quando se reporta ter sido encontrado em um vaso da 18ª dinastia egípcia (1700 a 1600 A. C), um fragmento de líquen identificado como *Evernia furfuracea*, espécie que não ocorre naquela região (Abraham & Florey, 1949). Os componentes do líquen estão posicionados em camadas sucessivas, onde o córtex superior, composto de hifas do fungo entrelaçadas, visa proteger a camada de algas (fotobiontes) que vêm logo abaixo. Outro feixe de hifas frouxas (medula), seguida de um outro de hifas mais entrelaçadas (córtex inferior) estão posicionados logo abaixo da camada algal (Nash, 1996).

Normalmente a reprodução dos líquens ocorre de forma vegetativa, por meio de fragmentação do talo, que por vezes apresenta visível protuberância, que contém as partes alga e fungo (Xavier-Filho & Rizzini, 1976). Essas estruturas são denominadas isídios, que ao se destacar do talo, são disseminadas para formação de novos líquens. Outra forma de reprodução é a liberação de massas de hifas envolvendo células de algas. Estas estruturas especializadas são liberadas pelas interrupções ou perfurações do talo, denominadas sorédios. Isídios e sorédios são geralmente disseminados por agentes dispersantes como água, vento e insetos (Seaward, 1977).

De acordo com a literatura, líquens são utilizados desde a antiguidade como plantas medicinais (Abraham & Florey, 1949). Possuem também a propriedade de produzir óleos essenciais e substâncias fixadoras de perfume, corantes de tecidos, graxas e óleos. Seus metabólitos são ativos contra fungos e bactérias (Pereira *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 1996;

Ingólfssdóttir *et al.*, 1998; Falcão *et al.*, 2002, Ribeiro *et al.*, 2002), tumores e células cancerígenas (Lima *et al.*, 1990; Pereira *et al.*, 1994), além de possuírem ação alelopática (Lawrey, 1977; Yano, 1994), e serem eficientes no controle biológico de insetos (Costa-Filho *et al.*, 1991).

Os líquens possuem grande capacidade adaptativa sendo encontrados dos trópicos aos pólos. Isto se deve à organização de sua estrutura, cuja associação entre córtex superior e as substâncias liquênicas cristalizadas sobre as hifas do fungo, fornece maior capacidade de resistência às adversidades do meio (Hale-Jr., 1983).

1.2 Substâncias liquênicas

As substâncias liquênicas, denominadas antigamente como “ácidos liquênicos”, são quase em sua totalidade de natureza fenólica, e responsáveis pela maioria da ação benéfica dos líquens (Xavier-Filho & Rizzini, 1976). São resultantes do metabolismo secundário do líquen, elaboradas a partir do processamento dos produtos do metabolismo primário (polióis) e são únicas neste grupo taxonômico (Culberson, 1970; Nash, 1996).

São conhecidas nos líquens cerca de 550 substâncias, das quais, 350 são metabólitos secundários.

As substâncias liquênicas são agrupadas em ácidos alifáticos, para e meta depsídeos, depsidonas, benzil ésteres, dibenzofuranos, ácidos úsnicos, xantonas, antraquinonas, terpenóides e derivados do ácido pulvínico. Estes compostos são elaborados no interior do talo, excretados e depositados sob forma de cristais na superfície das hifas do micobionte, conferindo ao líquen capacidade de adaptação às adversidades. As substâncias liquênicas são também as responsáveis pelas utilidades econômicas e benefícios curativos provenientes dos líquens (Culberson, 1970; Hale-Jr., 1983; Nash, 1996).

A produção de substâncias liquênicas ocorre através de três principais vias biossintéticas: a do acetato polimalonato, onde são formados os ácidos graxos, depsídeos, depsidonas e quinonas; a do ácido chiquímico, onde produzem-se os pigmentos amarelos; e a do ácido mevalônico, que forma os terpenóides e esteróis. São também relatadas as vias dos aminoácidos e dos carboidratos. No entanto, a origem biossintética da maioria dos metabólitos secundários decorre das vias do ácido chiquímico e do acetato polimalonato, que perfazem cerca de 10% do peso do talo seco (Hale-Jr., 1983; Xavier-Filho, 1989; Nash, 1996).

1.3 Utilização econômica

A eficiência das substâncias liquênicas foi estudada a partir da década de quarenta, quando surgiram os primeiros relatos sobre o assunto. Burkholder *et al.* (1944) e Burkholder & Evans (1945) deram início a testes antibacterianos. Bustinza, discípulo de Fleming, também foi um dos precursores neste tema de investigação, estudando a eficiência antimicrobiana do ácido

úsico, seus isômeros e derivados (Bustinza & Caballero, 1948; Bustinza, 1951). Este ácido é considerado um dos compostos liquênicos mais eficazes contra enfermidades e dos mais estudados. Demonstrou eficácia contra bacilos da tuberculose humana, bovina ou avium, além de regredir, por completo, casos de *Lupus vulgaris*, ou tuberculose de pele. Na Finlândia e Alemanha seu preparado hidrossolúvel é conhecido como Usno e Uniplant, respectivamente, indicados para casos de afecções dermatológicas e como balsâmico. Já na União Soviética é referido como Binan, indicado para uso antes de práticas cirúrgicas para prevenir formação de cicatrizes, como também, contra infecções urinárias (Vartia, 1950; Kortenkangas & Virtanen, 1956).

A ação farmacológica dos metabólitos dos líquens é também satisfatória, tanto para extratos brutos, como para substâncias purificadas. Na literatura é reportada ação antiespasmódica, espamolítica, histamínica, hipoglicemiante, neuromuscular, antiinflamatória e analgésica (Appa-Rao & Prabhakar, 1987; Silva *et al.*, 1997; Maia *et al.*, 2002).

Diante desta diversidade de utilizações dos metabólitos liquênicos na indústria farmacêutica, de cosméticos, têxtil e de alimentos, sua aplicação comercial deve ser criteriosa. Isto se deve ao fato da necessidade de destruição de grande quantidade de biomassa dificilmente renovável (Hale-Jr., 1983; Vicente *et al.*, 1995; Nash, 1996).

Além dos compostos hidrofóbicos, são também produzidas substâncias hidrossolúveis como polissacarídeos liquênicos, além de inúmeros outros produtos encontrados em outros organismos vivos, como animais e plantas superiores (Culberson, 1970).

1.4 Imobilização celular

Apesar de mostrarem-se promissoras, as técnicas de cultivo *in vitro*, bem como as de síntese do talo liquênico, não apresentaram até o momento resultados que as justifiquem. Ambas metodologias não chegaram à reprodução do líquen em sua forma natural. O micobionte *Lecanora chrysoleuca* unido, em laboratório, ao ficobionte *Pseudotreboxia*, desenvolveu um talo que produzia ácido úsico, mas não o ácido pseudoplacodiólico, apesar de ambos fenóis serem produzidos pelo talo *in natura* (Culberson & Ahmadjian, 1980). Por outro lado, as técnicas de cultura de tecidos mais elaboradas, as quais objetivam produção de fenóis liquênicos, não apresentam relação entre os fenóis produzidos pela cultura e aqueles que ocorrem no talo em estado natural (Yoshimura, 1993).

Uma alternativa para produção de substâncias liquênicas para fins industriais e científicos, sem a destruição da micota liquenizada, é o uso da imobilização celular. Neste recurso biotecnológico, as células encontram-se aprisionadas em espaço definido, tendo sua atividade total ou parcialmente mantida para uso continuado e repetido. É uma atraente alternativa ao uso de sistemas enzimáticos purificados, uma vez que a própria célula organiza e

fornece as condições ideais de funcionamento, além das vantagens de reutilização e economia de tempo (Yamamoto *et al.*, 1976; Svitel *et al.*, 1998).

Diferentes métodos, utilizando diversas matrizes, são conhecidos para imobilizar células, tais como: enclausuramento, adsorção ou ligação covalente (Skryabin & Koshcheenko, 1987). No que diz respeito à matriz, características como afinidade para ligação, ausência de efeitos tóxicos, resistência mecânica e à degradação, devem ser consideradas durante sua seleção (Gbewonyo *et al.*, 1987).

O primeiro trabalho de imobilização de uma enzima líquênica se deve a Mosbach & Mosbach (1966). Uma orselinato descarboxilase de *Umbilicaria pustulata* foi imobilizada em poliacrilamida a 5 e a 20%, posteriormente granulada, e posta em contato com ácido orselínico para estimular desprendimento de CO₂. A atividade da enzima imobilizada a 20% permanecia praticamente constante em 14 dias de armazenamento, o que não ocorria com a enzima imobilizada a 5%.

Por este procedimento foram imobilizadas células intactas do mesmo líquen, através do qual foi demonstrado que a atividade descarboxilante era mantida por dois meses de armazenamento a 20°C. A imobilização dessas células oferecia a possibilidade de estudar reações em cadeia. Assim, a atividade descarboxilase poderia ser detectada acrescentando ao reator os ácidos orselínico ou lecanórico como substrato. Neste caso, a orselinato depsídeo hidrolase contida nas células produzia duas moléculas de ácido orselínico, por cada molécula de ácido lecanórico hidrolisada (Mosbach, 1983).

A mesma enzima, por ser uma das mais estudadas do metabolismo dos fenóis, foi também utilizada em estudos de imobilização. Garcia-Junceda & Vicente (1986) descreveram um método de imobilização desvitalizante usando talos de *Pseudevernia furfuracea*, tendo poliacrilamida como matriz. Foi observada uma alta atividade enzimática nesta imobilização, já que 90% do ácido evérnico adicionado ao biorreator era eficientemente hidrolisado. Não foi detectada atividade orselinato descarboxilase, já que não aparecia orcinol nos eluatos.

Células de *Evernia prunastri* foram imobilizadas em alginato. Este processo apresentou a vantagem de não ser desvitalizante, como no caso da poliacrilamida, permitindo que as células mantivessem suas funções vitais por tempo indeterminado (Gonzalez *et al.*, 1984). Outra imobilização em alginato foi realizada por Vicente & Molina (1993), utilizando células de *Xanthoria parietina* para obtenção de produtos de degradação da parietina. Por meio de microscopia eletrônica de transmissão foi constatado que neste tipo de matriz, as células foram capazes de se dividirem ativamente.

Partindo do conhecimento de que, ao receberem a adição de substrato, enzimas presentes em células imobilizadas são capazes de iniciar processo de degradação e elaboração de produtos de reação enzimática. Esta constatação favoreceu a hipótese de que estas células,

quando imobilizadas e suplementadas com precursor enzimático, e não com substrato, produziram substâncias típicas de suas rotas metabólicas.

Com a finalidade de produzir açúcares alcoólicos de líquens, Pereira *et al.* (1995a) imobilizaram células de *Cladonia verticillaris* em alginato de cálcio, utilizando bicarbonato de sódio como precursor. As células aprisionadas foram mantidas sob constante iluminação por mais de 15 dias. Os polióis e açúcares liberados para o meio foram extraídos e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi comprovado que houve maior produção de ribitol e glicose quando as células eram incubadas em bicarbonato a 10,0 mM. Entretanto, o sal sódico utilizado provocou o enfraquecimento da estrutura endurecida, por retirada do cálcio. Esta concentração de bicarbonato diluiu as esferas em menos de cinco dias. Por outro lado, as mantidas em solução do mesmo precursor a 1,0 mM foram conservadas por período mais longo, com produção e excreção apenas do ribitol. Ainda que as células imobilizadas conservassem sua vitalidade, os fotobiontes apresentaram seus cloroplastos desorganizados. A falta de produção de manitol por parte do fungo, a partir do ribitol translocado da alga, indicou que o contato entre os simbiossios foi prejudicado durante a imobilização.

Diversos líquens presentes no nordeste brasileiro têm sido estudados no intuito de avaliar as espécies eficientes para esta metodologia de bioprodução de metabólitos. Neste caso optou-se pelo uso da caulinita. Trata-se de um silicato do grupo do caulim, produto da decomposição de feldspatos. É uma argila de estrutura cristalina constituída de partículas finíssimas de natureza coloidal, de composição química $\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8\text{A}_{14}$ (Leinz & Amaral, 1978). Este tipo alternativo de matriz de imobilização reduziu o custo final dos experimentos, sem perda da eficiência e da produtividade celular, com estabilidade mecânica diante das soluções de concentrações elevadas, e sem os inconvenientes da desvitalização celular. Assim, com o intuito de se testar nova matriz de imobilização, células de *Cladonia substellata* foram imobilizadas em caulinita, e produziram o ácido úsnico, composto liquênico de grande importância medicinal (Pereira *et al.*, 1995b). Outras espécies da família Cladoniaceae vêm sendo estudadas com este mesmo objetivo. *C. corallifera* precedente da Amazônia produziu os ácidos úsnico e didímico (Pereira *et al.*, 1999a), enquanto que *C. verticillaris* de tabuleiros arenosos da Paraíba produziu a atranorina, e não o ácido fumarprotocetrárico, seu componente principal (Pereira, 1998). O mesmo aconteceu com *C. clathrata*, que tem ácido fumarprotocetrárico como fenol majoritário. Neste caso, foi produzido o ácido hipoprotocetrárico e seu aldeído, notadamente à concentração de 1,0 mM do precursor utilizado, o acetato de sódio (Pereira *et al.*, 1999b).

Líquens da caatinga tiveram suas células imobilizadas. *Ramalina aspera*, ocorrente no município de Venturosa (PE), revelou uma produção contínua de metabólitos e a concentração do precursor mais satisfatória foi de 1,0 mM. Esta espécie produziu efetivamente o ácido úsnico, um potente bactericida, substância liquênica mais estudada no ponto de vista químico e

de bioatividade (Santos *et al.*, 2000). *Teloschistes flavicans* de Alagoinha (PE), apresentou comportamento semelhante, e é produtor de compostos antraquinóicos, como o falacinal, falacinal e a teloschistina. Todos eles foram detectados no talo *in natura* e nos eluatos das imobilizações celulares (dados não publicados).

Pseudocyphellaria aurata, espécie típica de brejos, produziu eficientemente metabólitos, a partir de imobilização de suas células, com biossíntese das mesmas substâncias produzidas pelo talo *in natura*. Foram detectados o ácido pulvínico e seus derivados, como a dilactona pulvínica e a calycina, não havendo interferência das concentrações utilizadas do precursor, acetato de sódio, nos ensaios de bioprodução (Albuquerque *et al.*, 2000).

Células imobilizadas de *Heterodermia leucomela*, coletada em área de caatinga, também produziram os compostos majoritários desta espécie, que são a atranorina, o ácido salazínico e a zeorina, além de outras substâncias não identificadas (Rocha, 1999).

O estado de fertilidade também é um dos fatores que influencia a produtividade de compostos fenólicos através de células imobilizadas. Isto foi constatado quando Pereira *et al.* (2002) imobilizaram células de *Cladia aggregata* nos estados fértil e estéril. Esta espécie apresentou maior produtividade quando estéril, em relação às amostras férteis. Em ambos os casos foram produzidos o compostos majoritário da espécie, ácido barbático.

Até o momento foi constatado que, de forma geral, algumas espécies têm produção de compostos semelhantes aos obtidos do talo *in natura*, por suas células imobilizadas; outras sintetizam produtos intermediários de suas rotas metabólicas, ou seus fenóis na forma reduzida (Pereira *et al.*, 1999b). Fontaniella *et al.* (2000) comprovaram que tal fato ocorre em algumas espécies pela perda total de contato entre os simbiontes, o que dificulta a troca de co-fatores entre eles. Por outro lado, não haver produção dos mesmos compostos produzidos pelo talo *in natura* não significa resultado desfavorável. Produtos intermediários podem ser mais eficazes e/ou menos tóxicos, o que torna-se uma vantagem nos testes de bioatividade.

2. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE ESTUDADA

Parmotrema andinum (Müll. Arg.) Hale, líquen pertencente à família Parmeliaceae, foi por muito tempo denominado como *Parmelia andina* Müll. Arg.

Diversos sinônimos já foram atribuídos a essa espécie, como por exemplo, *Parmelia hiporysalia*, coletada em Formosa, no Japão (Asahina, 1952) e na Índia (Aghoramurthy *et al.*, 1954). Também já foi encontrada no Congo Belga (Ramaut, 1961), como *P. africana*. No Paraguai, esta mesma espécie foi referida por Hale-Jr., em 1958 como *P. paraguayense*. No entanto, o próprio Hale-Jr. em 1965 estudou *Parmelia andina* proveniente da Ásia, África central e centro-sul, além da América do Sul tropical e constatou tratar-se da mesma espécie. *P. andinum* tem hábito folhoso, podendo ser destacada de seu substrato com facilidade (Figura 1).

Todas espécies liquênicas possuem uma composição química definida, com variações em substâncias em menores teores; é o que se denomina de raça química. Esse fato se atribui aos fatores ambientais/microclimáticos, aos quais os líquens tendem a se adaptar (Hale-Jr., 1983; Reyes *et al.*, 1994; Nash, 1996). *P. andinum* possui em sua composição o ácido lecanórico (Figura 2) e a atranorina (Figura 3) como principais componentes (Culberson *et al.*, 1977). Ambos os compostos são depsídeos, ou seja, compostos fenólicos cujas unidades estão unidas por uma ligação éster, geralmente nas posições 1 e 4'. Winnem (1975) detectou nesta espécie, as mesmas substâncias, por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), com ocorrência em Angola, Etiópia, Equador, Socotra e Uganda.



Figura 1 – *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale

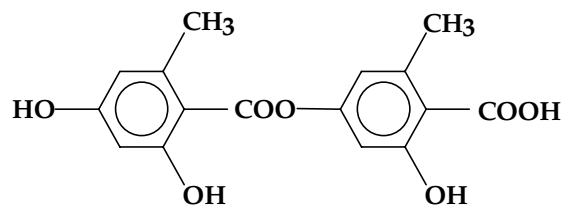


Figura 2 – Fórmula estrutural do ácido lecanórico

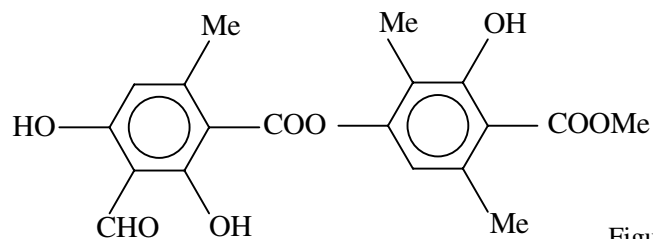


Figura 3 – Fórmula estrutural da atranorina

3. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA

O material liquênico foi coletado no município de Saloá (Figura 4), localizado na Mesorregião do Agreste de Pernambuco, Microrregião de Garanhuns. Com uma área de 297 km² e a 266 km de distância do Recife, tem por limite o município de Paratama, ao norte; os municípios de Bom Conselho e Terezinha, ao sul; o município de Garanhuns, ao leste; e o município de Iati, a oeste. A sede municipal está a 745 m de altitude.

O clima no município é do tipo semi-árido quente, com temperatura média anual de 25°C, variando entre mínima de 12° C e a máxima de 32° C. Este clima de Agreste apresenta similaridade ora com a Zona da Mata (clima úmido), ora com o Sertão (clima seco), por ser uma região intermediária (Dougan-Neto, 2001).



Figura 4 – Mapa de Pernambuco com indicativo da localização do município de Saloá, PE. Fonte: Almanaque Abril, 2000 (CD Rom)

4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Os compostos fenólicos produzidos por líquens são exclusivos deste taxon, uma vez que não há registros destes em representantes do Reino Plantae (Culberson *et al.*, 1977). Pouco se conhece a respeito das enzimas que sintetizam ou catabolizam tais substâncias, e menos ainda sobre sua regulação metabólica.

Além disso, os metabólitos liquênicos possuem aplicações das mais diversas, e potencialmente interessantes. Há séculos são utilizados como fixadores em perfumaria, e por muito tempo utilizados como potentes antibióticos de uso tópico (Vartia, 1973). Sua alta atividade citotóxica, um inconveniente para seu uso terapêutico, está sendo atualmente investigada objetivando seu uso como carcinostático (Kumar & Müller, 1999).

Em cosmética terapêutica, vários compostos fenólicos de líquens são utilizados para evitar o envelhecimento da pele devido à idade, ou a prolongadas exposições ao sol. A elastase, assim como a tripsina, são fortemente inibidas por atranorina, um fenol de origem liquênica (Proksa *et al.*, 1994).

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

Estudar de forma qualitativa e quantitativa os compostos fenólicos produzidos por células imobilizadas de *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale, utilizando como precursor o acetato de sódio, comparando com a produção realizada pelo seu talo *in natura*, com verificação de atividade antimicrobiana.

5.2 Específicos

- Imobilizar células de *P. andinum* em caulinita para a produção de compostos fenólicos.
- Determinar a concentração do precursor, acetato de sódio, que proporciona maior produtividade.
- Determinar o período de vitalidade das células nas diferentes concentrações do precursor.
- Correlacionar a produção de metabólitos na natureza com a de células imobilizadas.
- Verificar atividade antimicrobiana dos extratos brutos, substâncias purificadas e eluatos obtidos por meio de imobilização celular do líquen em estudo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahan, E. P.; Florey, H. W. Antimicrobial substances from lichens and algae. In: **Antibiotic**, v. 1, cap.13, 1949, p. 566-575.

Aghoramurthy, K.; Neelakantan, S.; Seshadri, T. R. Chemical investigation of Indian lichens: Part XVII – Chemical components of some *Parmelia* lichens. **J. Sci. Ind. Res.** v. 13B, p. 326-328, 1954.

Albuquerque, U. P.; Atanázio, V.; Silva, N. H.; Pereira, E. C. Produção de metabólitos por *Pseudocyphellaria aurata* a partir de imobilização celular. In: **51º Congresso Nacional de Botânica**, Brasília, DF, p. 21, 2000.

Appa-Rao, A. V. N.; Prabhakar, M. C. Pharmacological actions of leprapinic acid, a lichen metabolite. **Fitoterapia**, v. 58, n. 4, p. 221-228, 1987.

Asahina, Y. Lichens of Japan. Vol. II. Genus *Parmelia*. Research Institute for Natural Resources, Tokyo, 1952.

Burkholder, P. R.; Evans, A. W.; Macveigh, I.; Thornton, H. R. Antibiotic activity of lichens. **Proc. Nat. Acad. Sci. Was.**, v. 30, n. 9, p. 250-255, 1944.

Burkholder, P. R.; Evans, A. W. Further studies on the antibiotic activity of lichens. **Bull. Torrey Bot. Club.**, v. 72, n. 2, p. 157-164, 1945.

Bustinza, F. Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas y antifúngicas del ácido úsnico y algunos de sus derivados. **Ann. Inst. Bot. A. J. Cavanilles**, v. 10. p. 157-175, 1951.

Bustinza, F.; Caballero, A. Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquenes. **Ann. Inst. Bot. Madrid**, v. 7, p. 511-548, 1948,

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

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 of Lichen Products**. St. Louis, The American Bryological and Lichenological Society, 1977. 400p.

Culberson, C. F.; Ahmadjian, V. Artificial reestablishment of lichens II. Secondary products of resynthesized *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*. **Mycologia**, v. 72, p. 90-109, 1980.

Dougan-Neto, R. M. **Potenciais Geoturísticos dos municípios de São Benedito do Sul e Saloá em Pernambuco**. Recife, 2001. 51p. (Monografia-Graduação-Curso de Geografia-UFPE).

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

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

Gbewonyo, K.; Meier, J.; Wang, D. I. C. Immobilization of mycelial cells on celite. **Methods in enzymology**, New York, v. 135, p. 318-333, 1987.

Garcia-Junceda, E.; Vicente, C. The use of immobilized cells to stabilize orsellinate depside hydrolase of *Pseudevernia furfuracea*. **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 155-157, 1986.

Gonzalez, A.; Vicente, C.; Legaz, M. E. A simple assay demonstrating the effect of rehydration on the orsellinate depside hidrolase activity of *Evernia prunastri*. **J. Plant Physiol.**, v. 116, p. 219-224, 1984.

Hale-Jr., M. E. Chemical components of type specimens in *Parmelia* I. **Brittonia**, v. 10, p. 177-180, 1958.

Hale-Jr., M. E. A Monography of *Parmelia* subgenus *Amphigymnia*. **Contrib. U. S. Natl. Herb.** v. 36, p. 193-358, 1965.

Hale-Jr., M. E. **The Biology of Lichens**. 3 ed. London: Edward Arnold Pub., 1983, 90p.

Ingólfssdóttir, K.; Chung, G. A. C.; Skúlason, V. G.; Gissurarson, S. R.; Vilhelmsdóttir, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 141-144, 1998.

Korten kangas, A. E.; Virtanen, O. E. The antibiotic activity of some amino compound derivatives of usnic acid. **Soumen Kemistilehti**, v. 19, p. 2-4, 1956.

Kumar, S. Müller, K. Lichens metabolites, 2, Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractaic acids on human ketatinocyte growth. **J. Nat. Products**, v. 62, p. 821-823, 1999.

Lawrey, J. D. Inhibition of moss spore germination by acetone extracts of terricolous *Cladonia* species. **Bull. Torrey Bot. Club.**, v. 104, n. 1, p. 49-52, 1977.

Leinz, V.; Amaral, S. E. **Geologia Geral**. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1978. 400p.

Lima, R. M. C.; Nascimento, S. C.; Pereira, E. C.; Campos-Takaki, G. M. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. **Bol. Soc. Brot.**, v. 63, n. 24, p. 339-348, 1990.

Maia, M. B. S.; Silva, N. H. Silva, E. F.; Catanho, M. T. Schuler, A. R. P.; Pereira, E. C. Antinoceptive activity of crude extract and atranorin obtained from the lichen *Cladina dendroides* (des Abb.) Ahti. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 259-264, 2002.

Mosbach, K.; Mosbach, R. Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic cross-linked polymers and their application in column techniques. **Acta Chem. Scand.**, v. 20, p. 2807-2810, 1966.

Mosbach, K. The potencial in biotechnology of immobilized multistep enzyme-coenzyme systems. **Phil. Trans. R. Soc. London**, v. 330, p. 355-367, 1983.

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

Pätiälä, R. Application of usnic acid to a case of *Lupus vulgaris*. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, v. 27, n. 2, p. 151-1531, 1949.

Pereira, E. C. **Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de *Cladonia* e *Cladina* (líquen)**. Recife, 1989. 193p. (Dissertação-Mestrado em Criptógamos-Departamento de Micologia-Departamento de Botânica-UFPE).

Pereira, E. C.; Campos-Takaki, G. M.; Xavier-Filho, L.; Silva, N. H.; Vicente, C.; Legaz, M. E. Fracionation of *Cladonia substellata* crude extracts and deteccon of antimicrobial activity. **Bol. Soc. Brot.**, v. 64, p. 173-186, 1991.

Pereira, E. C.; Nascimento, S. C.; Lima, R. M. C.; Silva, N. H.; Oliveira, A. F. M.; Boitard, M.; Berial, H.; Vicente, C. Legaz, M. E. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tokay J. of Exp. and Clin. Medicine**, v. 19, n. 12, p. 47-52, 1994.

Pereira, E. C.; Molina, M. C.; Pedrosa, M. M.; Solas, M. T. Vicente, C; Legaz, M. E. Production of ribitol by alginate-immobilized cells of the lichen *Cladonia verticillaris*. **Anales de Química**, Madrid, v. 91, n.3/4, p. 253-259, 1995a.

Pereira, E. C.; Pereyra, 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**, Warszawa, v. 64, n. 2, p. 171-174, 1995b.

Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Brito, E. S. A.; Cruz, J.; Silva, M. I. L. Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos. **Revista da Universidade do Amazonas**, Série Ciências Biológicas, v. 1, n. 1, p. 65-77, 1996.

Pereira, E. C. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae a partir de imobilização celular**. Recife, 1998. 240p. (Tese- Doutorado em Botânica-UFRPE).

Pereira, E. C.; Silva, E. F.; Silva, N. H.; Vicente, C.; Vital, M. J. S.; Silva, M. I. L.; Andrade, L. H. C. et al. Produção de metabólitos de *Cladina corallifera* (Kunze) Nyl. Por imobilização celular. **Revista da Universidade do Amazonas**, Série de Ciências Biológicas, v. 2, n. ½, 1999a.

Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Andrade, L. C.; Vicente, C. Legaz, M. E. Production of lichen metabolites by immobilized cells of *Cladonia clathrata*, **Phyton (Austria)**, v. 39, p. 79-89, 1999b.

Pereira, E. C.; Andrade, L. C.; Silva, N. H.; Vicente, C. Production of metabolites by immobilized cells of *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. At different status of fertility. In: **Lichenology in Latin America II**. S. Calvelo & T. Feurere (Eds.). Hamburg, Alemanha, 2002, v. 1, p. 157-169.

Proksa, B.; Adamcova, J.; Sturdikova, M.; Fуска, J. Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* and their inhibition potencial of proteolytic enzymes. **Pharmazie**, v. 49, p. 282-283, 1994.

Ramaut, J. L. Contribution à l'étude chromatographique de quelques *Parmelia* de la section *Amphigymnia*, sous-section *Subglaucescentes* Vain. **Rev. Bryol. Lichénol.** v. 30, p. 131-134, 1961.

Reyes, A.; Molina, M. C.; Vicente, C.; Pereira, E. C. Influência da variação ambiental na composição fenólica de diferentes espécies de líquens. **Resumos do II Congresso de Ecologia do Brasil** Londrina-PR, v. 1, p. 22, 1994.

Ribeiro, S. M.; Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Falcão, E. P.; Gusmão, N. B.; Honda, N. K.; Quilhot, W. Detection of antibacterial activity of lichen substances through microdilution tests. In: **Lichenology in Latin America II**. S. Calvelo & T. Feurere (Eds.). Hamburg, Alemanha, 2002, p. 187-194.

Rocha, J. A. M. R. Análise de metabólitos de *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt produzidos pelo talo *in natura* e por células imobilizadas. Recife, 1999. 54p. (Dissertação- Mestrado-Bioquímica-UFPE).

Santos, R. A.; Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Gomes, A. C.; Monteiro, V. C. S. Bioprodução de metabólitos de *Ramalina aspera* (Líquén) a partir de imobilização celular. In: **VIII Congresso de Iniciação Científica da UFPE-CONIC**, Recife-PE, p. 67, 2000.

Seaward, M. R. D. **Lichen Ecology**. London: Academic Press, 1977, 550p.

Silva, E. F.; Catanho, M. T. J.; Pereira, E. C.; Silva, N. H. Efeito analgésico de extratos brutos de *Cladina dendroides*. **Resumos do Terceiro encontro do Grupo Latino-Americano de liquenólogos (GLAL-3)**. Campos do Jordão-SP, p. 36, 1997.

Skryabin, G. K.; Koshcheehko, K. A. Immobilization of living microbial cells in polyacrilamide gel. **Methods in Enzimology**, New York, v. 135, p. 198-216, 1987.

Svitel, J.; Curilla, O.; Tkac, J. Microbial cell-based biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose. **Biothecnology Applied Biochemistry**, London, v. 27, p. 153-158, 1998.

- Vartia, K. O. Antibiotics in lichens II. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, v. 28, p. 7-19, 1950.
- Vartia, K. O. Antibiotics in lichens. In: **The Lichens** (Ahmadjian, V., Hale, M. E., eds.), Academic Press, New York, p. 547-561, 1973.
- Vicente, C.; Molina, M. C. Enzymatic degradation of physodic acid and parietin by stored thalli of *Pseudevernia furfuracea* and *Xanthoria parietina* or by immobilized enzymes and cells. **Bibl. Lichenol.**, v. 53, p. 267-276, 1993.
- Vicente, C.; Solas, M. T.; Pereyra, M. T.; Pereira, E. C.; Pedrosa, M. M. Immobilization of 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**. J. A. Daniels; M. Schultz; J. Peine (Eds.). The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Germany, 1995. p. 97-110.
- Winnen, B. *Parmelia* subgenus *Amphigymania* in Etiopia. **Norwegian Jour. Bot.** v.. 22, p. 139-166, 1975.
- Xavier-Filho, L. **Inibição Fotooxidativa de β caroteno por cloroatranorina de *Parmelia tinctorum* Nyl.** João Pessoa, 1989. 91p. (Tese para Professor Titular-Laboratório de Tecnologia Farmacêutica-UFPB).
- Xavier-Filho, L.; Rizzini, C. T. **Manual de Liquenologia Brasileiro**. Recife: UFPE, 1976, 431p.
- Yamamoto, K.; Tosa, T.; Tamashita, K.; Shibata, I. Continuous production of L-malic acid by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells. **European Journal Applied Microbiology**, New York, v. 3, p. 169-183, 1976.
- Yano, A. M. **Atividade biológica de *Cladonia verticillaris* e *Cladonia substellata* sobre a germinação e desenvolvimento da plântula de *Allium cepa***. Recife, 1994. 126p. (Dissertação-Mestrado em Criptógamos-Departamento de Micologia-Departamento de Botânica-UFPE).
- Yoshimura, I.; Kurokawa, T.; Yamamoto, Y.; Kinoshita, Y. Development of lichen thalli *in vitro*. **Bryologist**, v. 96, p. 412-421, 1993.

7. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

**Produção de Compostos Fenólicos a Partir de
Células Imobilizadas do Líquen *Parmotrema
andinum* (Müll. Arg.) Hale e Avaliação de
Ação Antimicrobiana**

Nadejda de A. Nóbrega; Sheyla M. Ribeiro; Eugênia C. Pereira; Nicácio H. da Silva

Produção de Compostos Fenólicos a Partir de Células Imobilizadas do Líquen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale e Avaliação de Ação Antimicrobiana

Nadejda de A. NÓBREGA¹, Sheyla M. RIBEIRO², Eugênia C. PEREIRA³, Nicácio H. da SILVA^{1,4}

¹Curso de Mestrado em Bioquímica, ²Doutorado em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, ³Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, ⁴Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n, Cidade Universitária, 50.740-530, Recife-PE, Brasil.

RESUMO. Este trabalho demonstra a produção de compostos fenólicos, a partir de células imobilizadas de *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale, utilizando acetato de sódio como precursor. Ensaio de atividade antimicrobiana com extratos orgânicos do talo *in natura*, eluatos celulares e substâncias purificadas de *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale, procedente do agreste do Estado de Pernambuco, revelaram ação contra bactérias Gram-Positivas. Através de ensaio de biocromatografia, foi possível indicar o ácido lecanórico e um composto não identificado como princípios ativos da espécie. Substâncias produzidas a partir de imobilização celular, não exibiram inibição frente aos microrganismos testados.

SUMMARY. "Production of phenolic substances from immobilized cells of the lichen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale and evaluation of antimicrobial action". This paper shows a phenolic production by immobilized cells of *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale, occurred in semi arid region of Pernambuco State (Brasil), using sodium acetate as precursor. Antimicrobial assays using organic extracts of *in natura* thallus, cell washes and purified substances of this species showed inhibition against Gram positive bacteria. Through biochromatography assays, there were indicated the lecanoric acid and a non-identified compound, as active principles of the species. Substances produced from cell immobilization did not exhibit inhibition against the tested microorganisms.

PALAVRAS-CHAVE: *Parmotrema andinum*, imobilização celular, atranorina, ácido lecanórico, atividade antimicrobiana.

KEY WORDS: *Parmotrema andinum*, cell immobilization, atranorin, lecanoric acid, antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

Líquens são conhecidos desde a antiguidade, e seus produtos eficientes contra diversas enfermidades e, também usados em medicamentos em alguns países da Europa¹.

São encontrados no Nordeste do Brasil diversas espécies, cujos metabólitos possuem comprovada ação farmacológica². No estudo de ação antimicrobiana de espécies encontradas em solos arenosos de tabuleiros costeiros (vegetação tipo cerrado) do estado da Paraíba (Nordeste do Brasil), Pereira *et al.*^{3,4} detectaram ação antimicrobiana em extratos brutos de *Cladonia substellata* e *C. crispatula*, atribuindo ao ácido úsnico o princípio ativo das espécies. Tais preparados impediram o desenvolvimento de fungos e bactérias. Em relação a estas últimas, foram mais eficientes contra as Gram positivas.

Além da indústria farmacêutica, substâncias liquênicas são largamente utilizadas na manufatura de cosméticos, têxtil e de alimentos. Diante desta diversidade de usos, sua aplicação

comercial deve ser criteriosa, devido ao fato da necessidade de destruição de uma grande quantidade de biomassa dificilmente renovável^{5,6}. Portanto, uma alternativa para produção de substâncias liquênicas para fins industriais e científicos, sem a destruição da micota liquenizada, é o uso da imobilização celular.

Neste trabalho foram produzidos compostos fenólicos do líquen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale por imobilização celular, e avaliada a ação antibacteriana do material obtido, bem como dos extratos brutos do talo *in natura* e substâncias purificadas da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material liquênico

Parmotrema andinum (Müll. Arg.) Hale, foi coletado no município de Saloá, Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. As amostras foram identificadas através de análise dos caracteres químicos e morfológicos do talo, pelo Dr. Marcelo Marcelli do Instituto de Botânica de São Paulo, sendo mantidas em caixas de papel até o momento dos experimentos.

Preparo dos extratos orgânicos do talo *in natura*

O material liquênico foi seco à temperatura ambiente e extratos foram obtidos com os solventes éter, clorofórmio e acetona, utilizando 5g do talo liquênico para 20 mL de cada solvente. Os extratos obtidos tiveram seus respectivos solventes evaporados até peso constante.

Isolamento e purificação de fenóis de *Parmotrema andinum*

Atranorina e ácido lecanórico foram obtidos por meio de cristalizações sucessivas de acordo com Asahina & Shibata⁷, com modificações. O ácido lecanórico foi obtido do extrato etéreo de *P. andinum* utilizando bicarbonato de sódio a 5%, e, em seguida, precipitado com ácido clorídrico de mesma concentração. A purificação foi realizada através de cristalização em benzeno/etanol (1:1). Para purificar a atranorina, o extrato etéreo também foi utilizado, o qual foi evaporado, dissolvido em clorofórmio, e por fim, o etanol gelado promoveu a precipitação da atranorina. Sua purificação foi realizada por meio de cristalizações em clorofórmio.

Ensaio de imobilização celular

Foram utilizados 2 g de *P. andinum* para cada ensaio de imobilização, de acordo com Pereira *et al.*⁸. As suspensões celulares foram obtidas através de suave maceração do material liquênico em almofariz com água destilada, seguida por filtração em gaze. Em seguida, as células em suspensão foram imobilizadas em 90g de caulinita previamente hidratada por duas horas em água destilada. O material imobilizado foi transferido para colunas de vidro (30 cm x 7 cm), e a cada uma foram adicionados 50 mL de acetato de sódio nas seguintes concentrações: 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 e 20,0 mM. Os recipientes foram mantidos sob luz branca ($125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante todo o experimento.

Obtenção e processamento dos eluatos celulares

Na primeira semana foram coletadas alíquotas diárias de 25 mL de cada coluna, com imediata reposição do mesmo volume de acetato de sódio, na respectiva concentração. Alíquotas semanais foram coletadas, a partir da segunda semana de imobilização, até 31 dias. Para a extração dos fenóis foram utilizados 25 mL do sistema éter/acetato de etila (65:35, v/v) com agitação, seguido por uma segunda extração com o mesmo volume de clorofórmio/acetonitrila (60/40, v/v). Os dois extratos orgânicos obtidos foram submetidos à leitura em espectrofotômetro a 254 nm e 366 nm, postos em mesmo recipiente e, em seguida, evaporados para análise posterior⁸.

Análise dos extratos liquênicos

A análise dos extratos orgânicos foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para os ensaios em CCD os extratos orgânicos do talo *in natura* e eluatos celulares foram diluídos na concentração de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, para em seguida serem aplicados em cromatoplaças de

sílica Gel F₂₅₄₊₃₆₆ Merk (20 x 20 cm; 0,25 mm de espessura). A fase móvel foi tolueno:dioxano:ácido acético (180:45:5, v/v), de acordo com a metodologia de Culberson⁹. As bandas foram observadas sob luz UV de comprimento de onda curta e longa, e reveladas com ácido sulfúrico a 10% com aquecimento a 100°C, por 10 minutos, sendo identificadas através de reações de coloração e valores de Rf comparados aos padrões de atranorina e ácido lecanórico.

Para a análise em CLAE, os extratos orgânicos foram injetados em duas concentrações (0,5mg.mL⁻¹ e 1,0mg.mL⁻¹), os eluatos celulares a 1,0mg.mL⁻¹ e os padrões a 0,1mg.mL⁻¹, em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado a um detector de UV da marca CG. As condições de cromatografia obedeceram à metodologia de Legaz & Vicente¹², a citar: coluna de fase reversa MicroPack MHC-18 (300 mm x 4 mm I.D.); volume de injeção 20 µL; fase móvel metanol: água: ácido acético (80:19,5:0,5 v/v) em sistema isocrático; pressão 88 atm; temperatura ambiente (28°C ± 3° C); detector de UV a 254 nm. Como padrões foram utilizados atranorina e ácido lecanórico.

Atividade antimicrobiana

Os ensaios foram realizados através do teste de difusão em meio sólido¹¹. Placas de Petri (140mm) contendo 25mL de meio Agar Müller-Hilton foram inoculadas com 100 µL de suspensão dos microrganismos teste a 10⁷ UFC.mL⁻¹, segundo Bauer *et. al.*¹². Discos de papel (6,0 mm) foram impregnados com 50 µL das soluções de cada extrato, ou substâncias purificadas, nas concentrações respectivas de 1,0 mg.mL⁻¹ e 2,0 mg.mL⁻¹ e, em seguida, depositados sobre o meio previamente inoculado. As placas foram incubadas a 37° C, para bactérias, e 30° C para a levedura por 24 horas. Como controle de uma possível interferência dos solventes ao processo de inibição, foram utilizados discos impregnados com os respectivos solventes utilizados para extração. Como referência, foram utilizados discos impregnados com 50 µL de ácido úsnico na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ e 2,0 mg.mL⁻¹, já que este fenol liquênico possui comprovada atividade antimicrobiana. Os resultados foram obtidos através de mensuração das zonas de inibição formadas ao redor dos discos, e expressos em milímetros (mm).

Microrganismos teste

Foram selecionados para os ensaios antimicrobianos *Staphylococcus aureus* (DAUFPE-01), *Bacillus subtilis* (DAUFPE-16), como representantes de bactérias Gram-positivas; *Escherichia coli* (DAUFPE-224), como representante de bactérias Gram-negativas e a levedura *Candida albicans*, isolada de caso clínico pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Biocromatografia

O teste biocromatográfico foi desenvolvido de acordo com Homans e Fuchs¹³, modificado por Costa-Filho¹⁴. O extrato considerado mais ativo nos ensaios antibacterianos, foi aplicado em placas de sílica Gel F₂₅₄₊₃₆₆ Merk, na concentração de 3,0 mg.mL⁻¹, e desenvolvido no sistema A de solventes¹¹. Como referência foram aplicadas as substâncias atranorina, ácido lecanórico e ácido úsnico. A cromatoplaça foi armazenada por 24 h, em condições assépticas, até a completa evaporação do eluente. Em seguida foi depositada em placa de Petri (180 mm), recebendo uma camada de meio Agar Muller-Hilton (25mL). Sobre ele foram inoculadas 100 µL de uma suspensão do microrganismo mais sensível nos testes em disco, na concentração de 10⁷UFC.mL⁻¹. As substâncias cromatograficamente separadas que exibiram atividade antimicrobiana foram reconhecidas nos cromatogramas por meio de formação de zonas de inibição (halo) ao redor de suas bandas

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante todo o experimento de imobilização celular foi observada produção de compostos por *P. andinum* (Figuras 1-5), cujas células imobilizadas em caulinita mantiveram sua vitalidade por 31 dias, em todas as concentrações de acetato de sódio utilizadas. Foi observado que, para esta espécie, a concentração do precursor adicionado praticamente não influenciou na produtividade das células imobilizadas (Figura 6). Fato semelhante ocorre com *Cladonia corallifera*, uma vez que a produção de compostos fenólicos é praticamente igual, mesmo variando a concentração do

precursor¹⁷. Por outro lado, algumas espécies apresentam produtividade crescente proporcionalmente à concentração do precursor, como foi o caso da *Cladonia verticillaris* e *Cladonia salzmannii*¹⁶.

Um outro fator que influencia a produtividade de compostos fenólicos, através de células imobilizadas, é o estado de fertilidade do líquen. Isto foi constatado quando Pereira *et al.*¹⁷ imobilizaram células de *Cladia aggregata* nos estados fértil e estéril. Esta espécie apresentou maior produtividade quando estéril, em relação às amostras férteis.

Através de CCD foi observada a presença do ácido lecanórico nos extratos etéreo e acetônico do talo natural. Já no extrato clorofórmico foi observada a presença de atranorina, além de um outro composto não identificado. Os extratos dos eluatos celulares produziram uma substância cujo Rf é próximo ao do ácido lecanórico (Figura 7). A presença de um composto a mais no extrato clorofórmico não é fato surpreendente, visto que a região geográfica, *versus* influência microclimática, influi sobremaneira no teor e natureza de substâncias produzidas por líquens^{17,19}.

Foram realizadas cromatografias líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando os extratos orgânicos do talo, dos cinco eluatos celulares e as substâncias purificadas de *P. andinum*, atranorina e ácido lecanórico. Foram utilizados éter e metanol para solubilizar as amostras, e foi observado que o metanol permite uma melhor definição dos picos, o que não ocorre com o éter. Porém, o uso do éter é justificado, por este solubilizar atranorina, ao contrário do metanol.

Através de CLAE, foi constatada a presença de atranorina (TR 27,77 min) nos extratos etéreo, acetônico e clorofórmico, cujos teores foram de 2,135%; 2,690% e 8,991%, respectivamente (Figura 8). Já o ácido lecanórico (TR 5,95 min) foi detectado nos três extratos, sendo que o acetônico apresenta o maior teor desta substância (85,304%), dentre os extratos brutos analisados, ratificando os dados obtidos por CCD (Figura 9).

A presença de outras substâncias líquênicas, além das referidas na literatura foi verificada em todos os extratos brutos, o que sugere estudos posteriores detalhados da química de *P. andinum*. Este fato é observado principalmente no clorofórmico, no qual foi constatada, através de CLAE, a presença de substâncias não identificadas, cujos teores são de 76,662% e 6,227%, e tempo de retenção de 17,08 min e 3,71 min, respectivamente (Figura 9).

A análise de CLAE dos eluatos celulares confirma que não houve produção das duas substâncias referidas na literatura. Foi registrada a produção de compostos não identificados, de TR bastante próximos (Figura 10). Tais substâncias podem ser consideradas intermediárias das vias metabólicas de compostos principais da espécie, e serem úteis em algum setor econômico.

Fato semelhante ocorreu com células imobilizadas de *Cladonia verticillaris*, que produziram atranorina, mas não o ácido fumarprotocetrárico, composto majoritário da espécie¹⁶. Uma outra espécie que não produziu os mesmos compostos do talo *in natura* foi a *Cladonia clathrata*. Neste caso, não foi verificada a produção do ácido fumarprotocetrárico, um dos compostos principais desta espécie. No entanto, derivados deste ácido, como o ácido hipoprotocetrárico e seu aldeído foram produzidos pelas células imobilizadas, e material *in natura*²⁰. A não produção dos principais compostos de um líquen por meio de células imobilizadas é atribuída à separação da alga/fungo, durante a extração de células, dependendo da forma de contato entre os simbiontes.

Em outros casos, como foi observado em *Cladonia salzmannii*, células imobilizadas produziram os mesmos compostos do talo *in natura*, que são os ácidos barbático e taminólico¹⁶. A síntese de outras substâncias pelas células imobilizadas, que diferem das sintetizadas pelo talo *in natura*, não significa insucesso da técnica. A produção de compostos intermediários, que permitam seu uso comercial, ou a síntese de outra substância, já é uma resposta positiva à técnica empregada, sobretudo se for considerada a hipótese da bioconservação da espécie, e maior conhecimento da sua fisiologia o que possibilita a produção de uma substância em especial. Técnicas de ressíntese de líquens, além de dispendiosas, levam meses para o desenvolvimento de talos rudimentares, e a produção esbarra nos mesmos problemas²¹. Por outro lado, a adição de co-fatores funciona de forma eficiente para contornar o prejuízo de contato entre os simbiontes^{22,23}.

Não foi observada atividade antimicrobiana nos eluatos celulares de *P. andinum*. Possivelmente as substâncias bioproduzidas podem ser intermediárias das rotas metabólicas, que podem até mesmo serem semelhantes estruturalmente, mas diferenças no sítio ativo acarreta perda de atividade biológica. Quanto aos extratos brutos, o mais ativo foi o clorofórmico, seguido pelo etéreo. Os dois extratos à concentração de 2mg/mL inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Considerando os extratos a 1mg/mL, apenas o clorofórmico foi ativo em

relação a estas duas bactérias Gram-positivas. Todos os extratos foram inativos para *Escherichia coli* e *Candida albicans* nas duas concentrações testadas (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com os de vários pesquisadores, os quais referem uma maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas diante de substâncias liquênicas^{24,25,26}. Já Hale²⁷ reporta a ineficácia dos ácidos úsnico e protoliqueterínico contra bactérias Gram-negativas.

O ensaio biocromatográfico foi realizado para indicar de forma mais precisa os princípios ativos de *P. andinum*, utilizando o extrato de maior atividade (clorofórmico) e o microrganismo mais sensível (*Bacillus subtilis*). Neste teste (Figura 11) foram observados halos de inibição em torno das bandas correspondentes ao ácido lecanórico (15 mm), e da substância não identificada presente no extrato clorofórmico (40mm).

Maia *et al.*²⁸ referem atividade antiinflamatória para a atranorina, no entanto, em relação ao ácido lecanórico, não foram encontradas referências sobre sua ação antimicrobiana, ou de outra natureza. A primeira substância foi também testada por Falcão *et al.*²⁹, que faz parte do líquen *Heterodermia leucomela*, apresentando forte inibição contra bactérias Gram positivas e fungos.

CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos foi possível concluir que a espécie responde satisfatoriamente ao processo de imobilização, não sofrendo influência da concentração do precursor. No entanto, as substâncias bioproduzidas não correspondem às do talo natural. *P. andinum* possui ação antibacteriana contra microrganismos Gram-positivos. Esta ação está relacionada, principalmente a um composto não identificado presente no extrato clorofórmico desta espécie e, em menor proporção, ao ácido lecanórico. Já os metabólitos produzidos por suas células imobilizadas não exibiram inibição alguma. A detecção de substâncias adicionais às referidas na literatura merece um estudo químico detalhado da espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dr^a Maria do Carmo Barros Pimentel, por ter permitido o uso de seu laboratório, e ao técnico João Virgínio do Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

Um dos autores (E. C. Pereira) é bolsista de Produtividade em Pesquisa/CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Llano, G.A. (1944) *Bot. Rev.* **10**: 1-37.
2. Pereira, E.C. (1998) "Lichens from Brazilian Northeast (NE) – studies and applications", in: "*Lichenology in Latin America*" (Marcelli, M. P. & Seaward, M. R. D., eds), Grupo Latino-Americano e Liquenólogos (GLAL). International Association for lichenology (IAL)/CNPq/CETESB. Brasil, págs. 65-70.
3. Pereira, E.C., G.M. Campos-Takaki, N.H. Silva & C. Vicente (1991) *Bol. Soc. Brot. Portugal* **64**: 173-86.
4. Pereira, E.C., N.H. Silva, G.M. Campos Takaki, L. Xavier-Filho, M.E. Legaz & C. Vicente (1997) *Bol. Ecot. Ecos. Tropi.* **31**: 9-19.
5. Vicente, C., M. T. Solas, M. T. Pereyra, E. C. Pereira & M. M. Pedrosa (1995) "Immobilization of 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*" (J. A. Daniels, M. Schulz & J. Peine, eds.). The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Germany. Págs. 97-110.
6. Nash, T. H. (1996) "Lichen Biology" 1^a ed., Cambridge University Press, Cambridge, USA, págs 1-303.
7. Asahina, Y. & S. Shibata. (1954) "Chemistry of Lichen Substances", Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, págs. 1-240.
8. Pereira, E.C., T. Pereyra, S.C. Matos, N.H. Silva, L. Andade & C. Vicente (1995) *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **64**(2): 171-4.

9. Culberson, C.F. (1972) *J. Chromatog.* **72**: 113-25.
10. Legaz, M.E. & C. Vicente, (1983) *Plant Physiol.* **71**: 300-2.
11. Groove, D.C. & W.A. Randal (1955) "Assay Methods, Antibiotic activity: a laboratory manual." Medical Enciclopedia, New York, p. 1-238.
12. Bauer, A.W. W.M.M. Kirby, J.C. Sherris & M. Truck (1966) *Amer. J. Clin. Pathol.* **45**: 493-6.
13. Homans, A.L. & A. Fuchs (1970) *J. Chromatog.* **51**: 327-9.
14. Costa-Filho, L. (1991) "Atividade antimicrobiana de substâncias liquênicas". Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE (Brasil), págs. 1-61.
15. Pereira, E. C., E. F. Silva, N. H. Silva, C. Vicente, M. J. S. Vital, M. I. L. Silva, & L. Andrade (1999) *Revista da Universidade do Amazonas* **2**: 25-41.
16. 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, págs. 1-240.
17. Pereira, E. C., L. C. Andrade, N. H. Silva & C. Vicente (2002) "Production of metabolites by immobilized cells of *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. at different status of fertility" in: "*Lichenology in Latin America II*" (S. Calvelo & T. Feuerer, eds.), Hamburg, Alemanha. Vol. 1, págs. 157-69.
18. Legaz, M. E., C. Gallo, & L. Xavier-Filho (1987) *Lichen Physiology and Biochemistry* **2**: 13-21.
19. Pereira, E. C. (1989) "Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de *Cladonia* e *Cladina* (líquen)" Dissertação de Mestrado, Mestrado em Criptógamos, Departamento de Micologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, pág. 1-193.
20. Pereira, E. C., N. H. Silva, L.C. Andrade, C. Vicente & M. E. Legaz (1999) *Phyton (Áustria)* **39**:79-89.
21. Blanco, Y., M. Blanch, B. Fontaniella, M. E. Legaz, A. M. Millanis, E. C. Pereira & C. Vicente (2002) Bioproduction of lichen phenolics by immobilized lichen cells with emphasis on the role of epiphytic bacteria. *Journal Hattori Botany Laboratory* **92**: 245-60.
22. Fontaniella, B., M. E. Legaz, E. C. Pereira, B. Sebastian, & C. Vicente (2000) *Biotechnol. Lett.* **22**: 813-7.
23. Sebastian, B., B. Fontaniella, E. C. Pereira & C. Vicente (2000) *Tropical Bryology* **19**: 73-80.
24. Hawksworth, D.L. & D.J. Hill (1984) "The Lichen Forming Fungi." Chapman & Hall, New York, pág. 1-158.
25. Fahselt, D. (1994) *Simbiosis* **16**: 117-65.
26. Ribeiro, S. M., E. C. Pereira., N. H. Silva, E. P. Falcão., N. B. Gusmão, N. K. Honda, & W. Quilhot (2002) "Detecção de antibacteriana activity of lichen substances through microdilution tests.", in: "*Lichenology in Latin America II*" (S. Calvelo & T. Feuerer, eds.), Hamburg, págs. 187-94.
27. Hale, M.E. (1983) "The Biology of Lichens." Edward Arnold Pub., London, págs. 1-190.
28. Maia, M. B. S., N. H. Silva, E. F. Silva, M. T. Catanho, A. R. P. Schuler & E. C. Pereira (2002) *Acta Farm. Bonaerense* **21**(4): 259-64.
29. Falcão, E. P., N. H. Silva, N. B. Gusmão, S. M. A. Ribeiro, N. K. Honda & E. C. Pereira (2002) *Acta Farm. Bonaerense* **21**(1): 43-49.

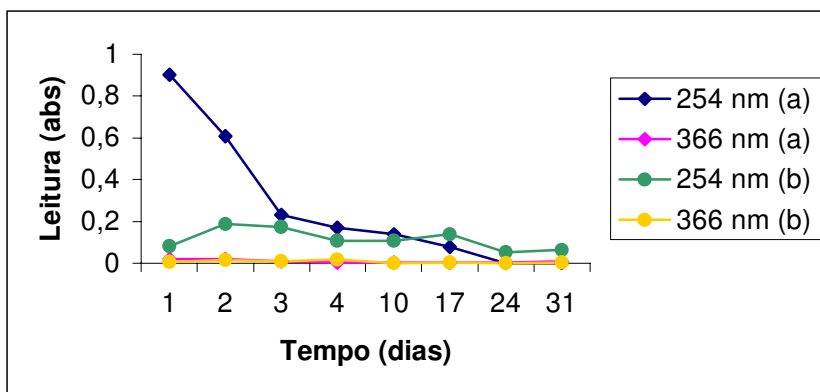


Figura 1. Produção de metabólitos por células de *Parmotrema andinum* immobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio 0,01 mM. (a) extrato éter/acetato de etila; (b) extrato clorofórmio/acetoneitrila

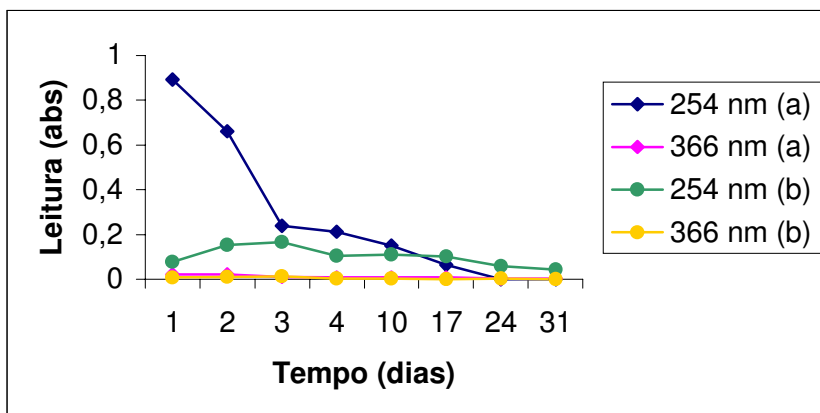


Figura 2. Produção de metabólitos por células de *Parmotrema andinum* immobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio 0,1 mM. (a) extrato éter/acetato de etila; (b) extrato clorofórmio/acetoneitrila

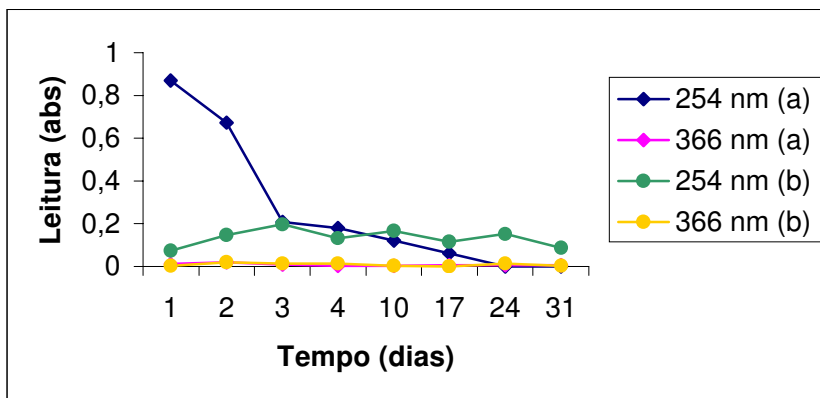


Figura 3. Produção de metabólitos por células de *Parmotrema andinum* immobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio 1,0 mM. (a) extrato éter/acetato de etila; (b) extrato clorofórmio/acetoneitrila

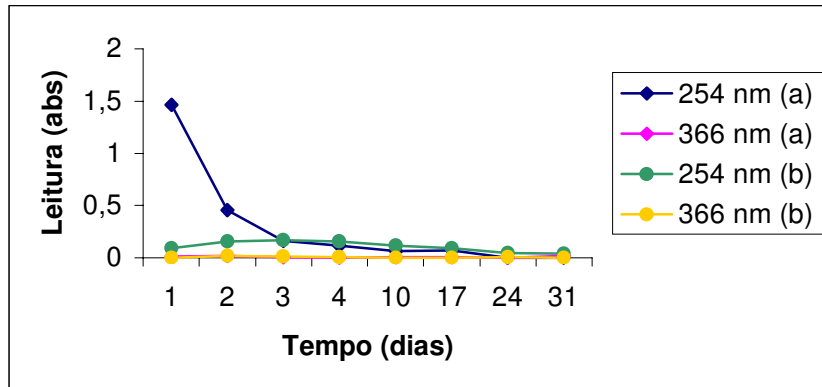


Figura 4. Produção de metabólitos por células de *Parmotrema andinum* imobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio 10,0 mM. (a) extrato éter/acetato de etila; (b) extrato clorofórmio/acetonitrila

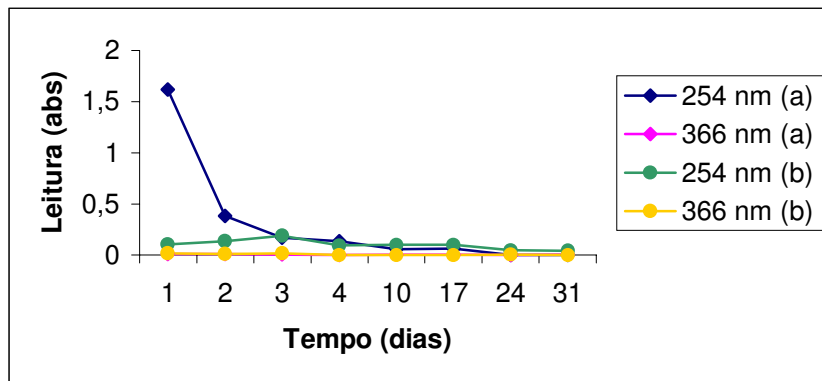


Figura 5. Produção de metabólitos por células de *Parmotrema andinum* imobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio 20,0 mM. (a) extrato éter/acetato de etila; (b) extrato clorofórmio/acetonitrila

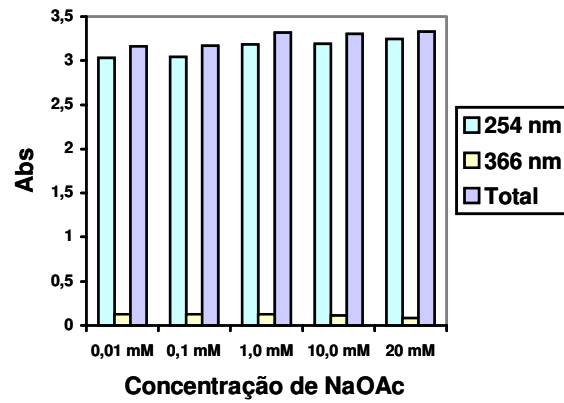


Figura 6. Produção total de substâncias fenólicas por células de *P. andinum*, immobilizadas em caulinita, utilizando acetato de sódio em diferentes concentrações

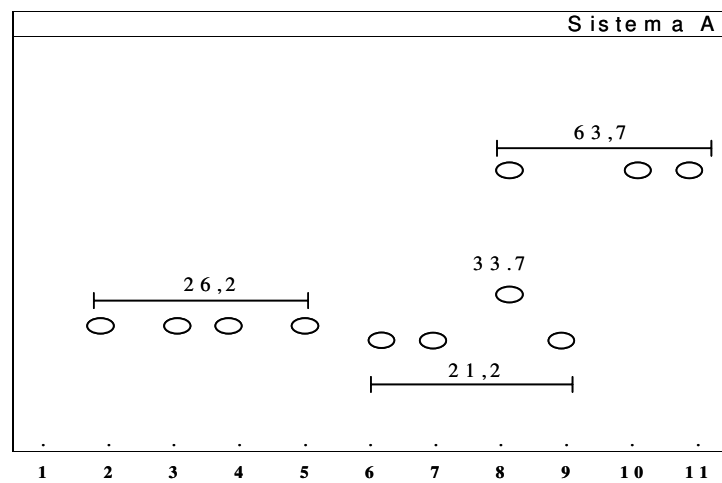


Figura 7. Cromatograma em camada delgada dos eluatos celulares de *P. andinum* a 0,01 mM(1); 0,1 mM (2); 1,0 mM (3); 10,0 mM (4); 20,0 mM (5). Extratos etéreo (6), acetônico (7) e clorofórmico (8). Ácido lecanórico isolado de *P. andinum* (9) e atranorina isolada de *P. andinum* (10). Atranorina padrão (11).

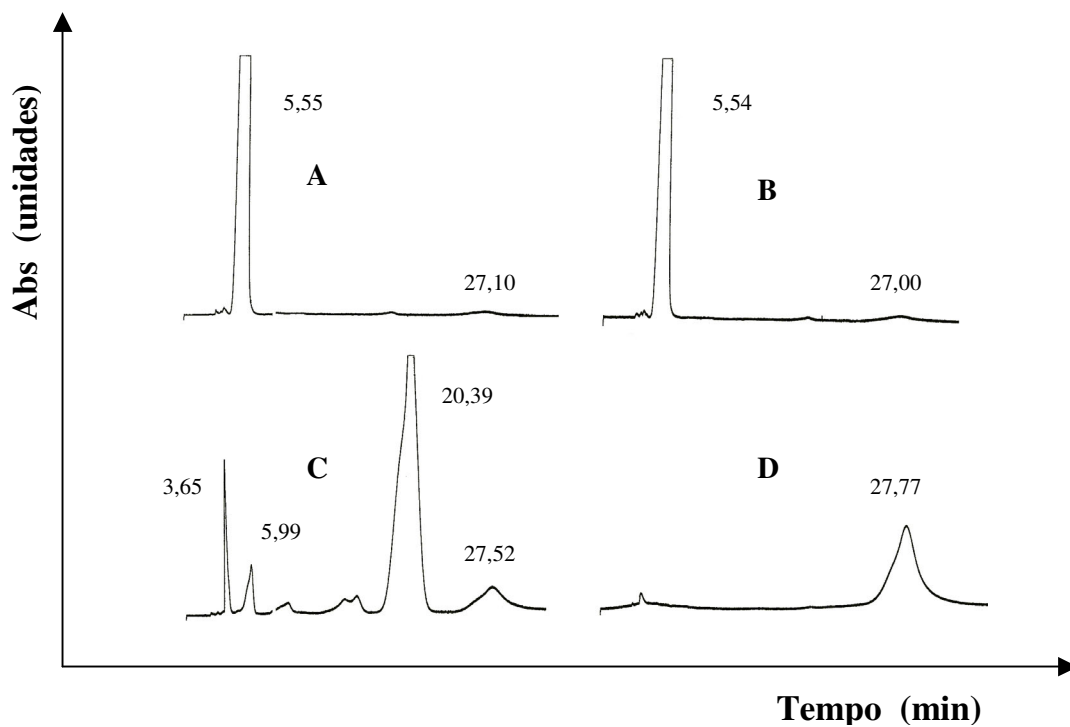


Figura 8. Cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando amostras diluídas em éter etílico. A – extrato etéreo; B – extrato acetônico; C – extrato clorofórmico; D - atranorina

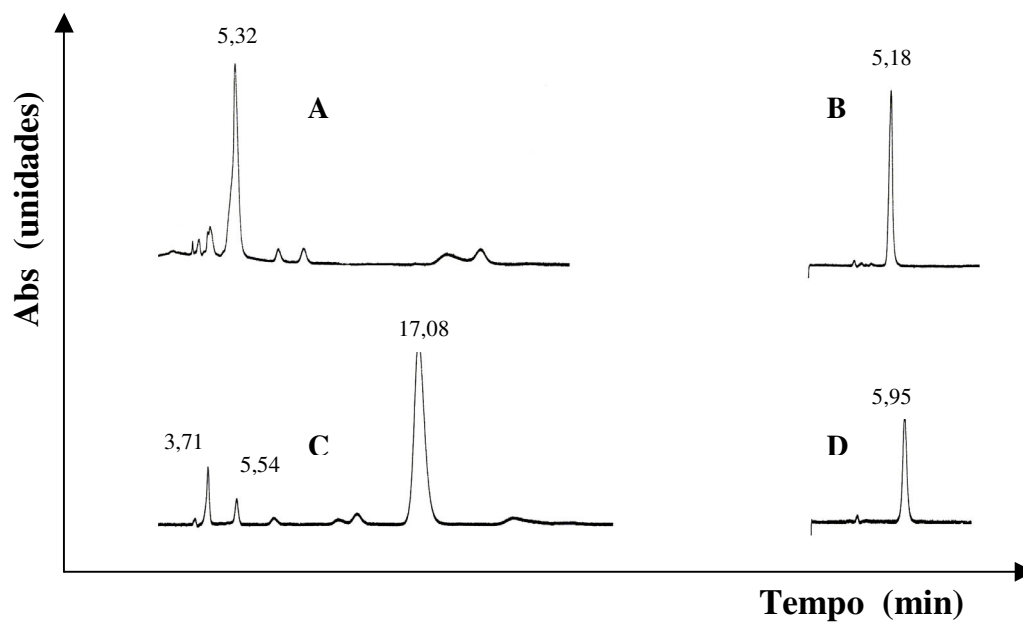


Figura 9. Cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando as amostras diluídas em metanol. A – extrato etéreo; B – extrato acetônico; C – extrato clorofórmico; D – ácido lecanórico

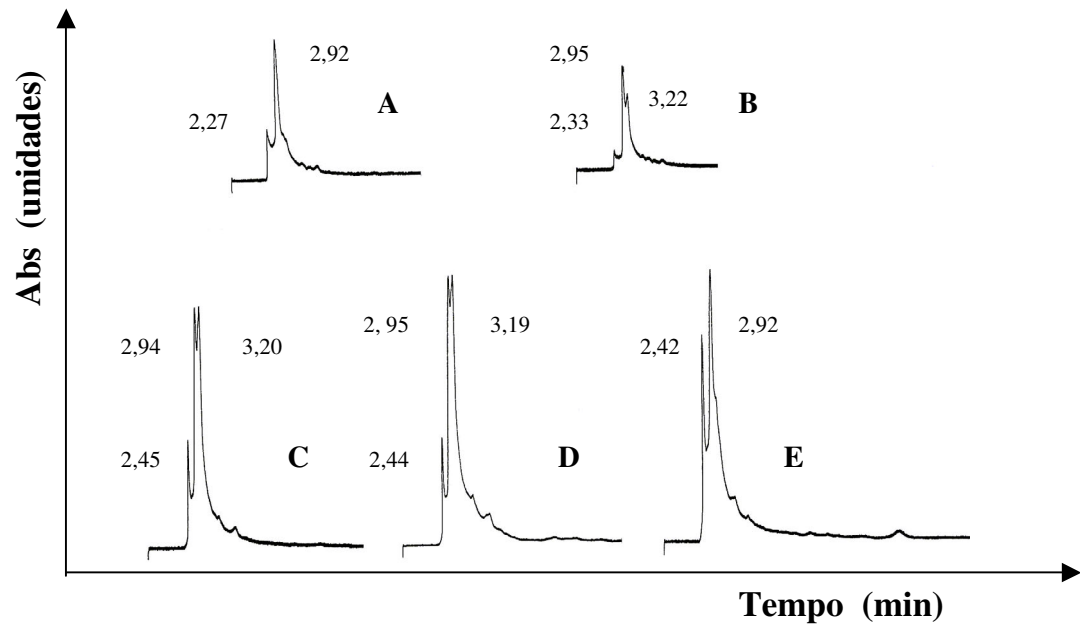


Figura 10. Cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando eluatos celulares diluídos em metanol. A – 0,01 mM; B – 0,1 mM; C – 1,0 mM; D – 10,0 mM; E – 20,0 mM

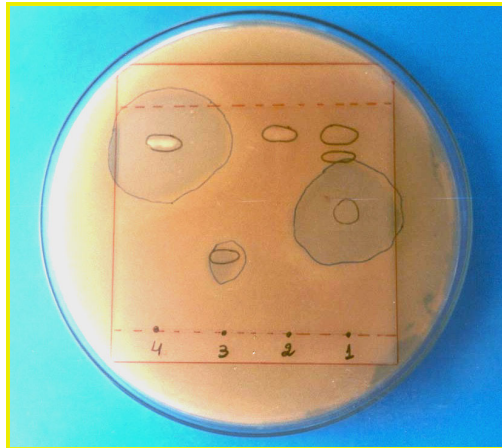


Figura 11. Biocromatograma utilizando extrato clorofórmico de *P. andinum* (1), padrões de atranorina (2), ácido lecanórico (3) e ácido úsnico (4), contra *Bacillus subtilis*.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de extratos de *P. andinum* após 24 horas (mm)

Extratos/Substâncias	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Microrganismos	
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Extrato etéreo	1	não inibiu	não inibiu
	2	8	10
Extrato clorofórmico	1	20	9
	2	18	13
Extrato acetônico	1	não inibiu	não inibiu
	2	não inibiu	não inibiu
Atranorina	1	não inibiu	não inibiu
	2	não inibiu	12
Ácido lecanórico	1	19	15
	2	21	18
Ácido úsnico	1	25	13
	2	20	13

6. CONCLUSÕES

Foi possível concluir que:

- As células de *Parmotrema andinum*, quando imobilizadas em caulinita, produzem metabólitos distintos dos sintetizados pelo talo *in natura* e mantém sua vitalidade durante 31 dias.
- A concentração do precursor não influi na bioprodutividade.
- Os compostos bioproduzidos podem ser considerados intermediários das vias metabólicas de compostos principais da espécie.
- Substâncias adicionais às referidas na literatura foram detectadas no talo natural da espécie estudada, o que sugere estudos posteriores detalhados da química de *P. andinum*, que possui ação antibacteriana contra microrganismos Gram-positivos. Esta ação está relacionada, principalmente a um composto não identificado presente no extrato clorofórmico desta espécie, e em menor proporção, ao ácido lecanórico. Já os metabólitos produzidos pela espécie não exibiram inibição alguma.

7. ANEXOS

7.1 Trabalho completo publicado em anais de congresso

Pereira, E. C.; Santos, R. A. S.; Cruz, A.; Monteiro, V. C.; **Nóbrega, N. A.**; Silva, N. H.. Bioconservação e utilização econômica de líquens. II Encontro Nordestino de Biogeografia. Maceió – AL, p. 21-33, 2001.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE GEOGRAFIA E MEIO AMBIENTE
LABORATÓRIO DE FITOGEOGRAFIA APLICADA

ANAIS



Biodiversidade e Sustentabilidade: desafios do novo milênio

&

**1º FÓRUM DE DEBATES PARA O SIMPÓSIO INTERNACIONAL
“JARDIN PLANETAIRE” 03 – MACEIÓ**

**De 10 a 13 de outubro de 2001
Campus A C. Simões – UFAL
Maceió - Alagoas**

BIOCONSERVAÇÃO E UTILIZAÇÃO ECONÔMICA DE LIQUENS

Eugênia C. Pereira¹; Renata Almeida Santos²; Andrea Cruz²; Vandessa Cristina Monteiro²;
Nadejda de Azevedo Nóbrega³. Nicácio H. da Silva⁴.

Depto. de Ciências Geográficas¹, CFCH; Estudantes de Graduação em Farmácia²/Bolsistas de IC/CNPq; Mestranda em Bioquímica³; Depto. de Bioquímica⁴/CCB, Universidade Federal de Pernambuco.
fmf@elogica.com.br; arruda@hotmail.com.br

1. INTRODUÇÃO

Os líquens são pouco estudados, e na maioria dos casos são conhecidos por sua capacidade de habitar substratos rochosos, e iniciar o processo de pedogênese. No entanto, este grupo biológico tem um sem-número de utilidades econômicas, algumas delas medicinais, além de uma interação notável com os elementos do ambiente.

Esses seres são resultantes de uma associação simbiótica entre alga e fungo, cujas naturezas distintas resultam em um talo de estrutura estável, onde o fungo é o exo-habitante. A simbiose entre componentes tão distintos, como a alga, que é clorofilada, e portanto fotossintética, e o fungo, aclorofilado e heterótrofo, confere ao líquen um funcionamento ímpar, não comparado a outros grupos taxonômicos (Nash, 1996).

A fotossíntese da alga líquênica, ou fotobionte, proporciona os hidratos de carbono necessários para o início da nutrição, e todas as reações metabólicas do líquen. Estes açúcares são repassados ao fungo, que não têm capacidade de sintetizá-los, pois não são seres fotossintéticos. A partir desse transporte massivo de carboidratos, são sintetizadas as substâncias líquênicas, produtos finais do processo, únicas desses seres, e responsáveis pelos benefícios advindos dos líquens (Culbertson et al., 1977; MacFarlane & Kershaw, 1984).

As substâncias líquênicas ao serem sintetizadas no interior da hifa do fungo, são excretadas e depositadas na sua superfície sob forma de cristais. Estes, de acordo com a forma, cor, transparência ou opacidade, captam a radiação solar, fazendo uma seleção do que lhes é útil, e refletindo o que não lhes serve, ou aumentando a temperatura do talo, no caso de temperaturas subzero. Em situações de climas secos, ou semi-áridos, estes cristais funcionam como impermeabilizantes, não permitindo a perda de umidade, já que não possuem estômatos, como no caso das plantas. Daí ser possível afirmar que as substâncias líquênicas têm função acessória na fotossíntese, e são responsáveis pelos mecanismos de co-adaptação dos líquens aos ambientes mais adversos (Seaward, 1977; Nash, 1996; Pereira, 1998a).

Além da capacidade de sobrevivência às intempéries, os líquens captam todos os elementos dispersos no ar atmosférico. Por isso não necessitam de nutrientes de seu substrato, e são considerados poiquilohídricos, ou seja, nutrem-se de forma higroscópica. Daí, se o ar estiver contaminado, esses poluentes fatalmente serão absorvidos, e a depender do tipo, teor, ou da resistência da espécie líquênica, isso concorrerá para seu desaparecimento. Essas características conferem ao líquen a função de biomonitor da qualidade do ar, técnica já empregada em diversos países da Europa, Japão, Canadá, dentre outros, bem como no Nordeste do Brasil (Seaward, 1977; Nash, 1996; Pereira, 1998a).

1.1 Utilização econômica das substâncias líquênicas

Os líquens são conhecidos desde o antigo Egito, e também eram de larga utilização em distintas partes da Europa e Oriente, por produzirem substâncias oloríferas (óleos essenciais), ou produtos de degradação que geram perfumes muito apreciados. Estes, nas indústrias de cosméticos, são usados desde o século XVI no fabrico de talcos, sachês e perfumes. Na manufatura destes últimos e de cremes, os óleos essenciais dos líquens são importantes não apenas pelo aroma agradável, mas também como fonte de glicerol (Abrahan & Florey, 1949; Llano, 1951; Seu-Salerno & Blakeway, 1987).

No século XVII o pó de *Cyprus*, uma combinação de diversas espécies de líquens, era utilizado em conjunto com o âmbar cinzento, almíscar, óleo de rosas, jasmim ou flor de laranjeira,

como pó de *toilete*, e também para alvejar e limpar os cabelos. Por outro lado, *Ramalina calicaris* era usada para clarear as cabeleiras postiças (Llano, 1951; Seu-Salerno & Blakeway, 1987).

Substâncias liquênicas como a atranorina são utilizadas como fixadores de perfumes, notadamente na França (Llano, 1951). O emprego de líquens na perfumaria é atualmente uma das formas mais importantes de sua utilização econômica. A França, Marrocos, e a antiga Jugoslávia consomem de 8.000 ton. a 10.000 ton. anuais de espécies produtoras de óleos essenciais, produtos de degradação odoríferos, e fixadores de aroma (Nash, 1996).

Os líquens são empregados como corantes de tecidos desde a antiguidade grega. *Rocella montagnei* produz substâncias de cor púrpura ou vermelha, obtidas por fermentação ou por extração química com amônia, utilizadas em regiões do Mediterrâneo (Nash, 1996).

No século XIX, suas substâncias coloridas eram empregadas na indústria têxtil, notadamente na Inglaterra, onde os tecidos tingidos com produtos liquênicos nunca eram atacados por traças. Na Escandinávia também eram utilizados na indústria artesanal, principalmente para roupas de lã (Llano, 1951; Seu-Salerno & Blakeway, 1987).

Os líquens eram também utilizados como corantes para vinhos, licores, óleos, graxas, além de tintas para mármore e papel. Por sua capacidade de indicar pH, eram empregados no fabrico do papel tornassol (Llano, 1951).

A existência de líquens comestíveis é largamente conhecida. Seu valor nutritivo deve-se à presença de altos teores de carboidratos. Por isso, servem de alimento para homens e animais. Tais açúcares são facilmente hidrolisados para a glicose, conseqüentemente úteis nos processos fermentativos como na produção de álcool, conhaque, etc. Na Suécia foram encontrados projetos de fabricação desta bebida, detalhados com figuras e planos para uma destilaria. Esta fábrica, após algum tempo de funcionamento foi fechada, devido à exploração não racional da matéria prima ter esgotado o fornecimento dos líquens (Llano, 1951).

Além da ampla referência do uso dos líquens na medicina popular, atualmente são encontrados medicamentos em farmácias da Europa, sobretudo na Alemanha, obtidos a partir de seus princípios ativos, como o Granobil - tônico estimulante (Figura 1), e a Isla-Moss, pastilhas para inflamação da garganta (Figura 2).



Figura 1: Forma comercial do ácido úsnico (GRANOBIL), fabricado na Alemanha.



Figura 2: Forma comercial do ácido fumarprotocetrárico (ISLA-MOSS), fabricado na Alemanha.

Tomando como base a interação dos líquens com as rochas, como agentes intempéricos quelantes, comprovou-se que o ácido úsnico possui mecanismo de ação semelhante ao do ácido

fosfórico, utilizado para descalcificar o esmalte dentário, e facilitar a adesão da resina restauradora. Por outro lado, o preparado hidrossolúvel deste composto, na forma de sal potássico, o usnato de potássio, reagiu sobre o dente como um verniz selador (Pereira et al., 1995). Testes posteriores poderão atestar a eficácia das substâncias de líquens na terapia odontológica.

1.2 O líquen na terapêutica popular e na pesquisa medicinal

A referência da utilização do líquen na terapêutica popular remonta há milênios. Fragmentos de *Pseudevernia furfuracea* foram encontrados em vasos da XVII dinastia egípcia, cerca de 1700 a.C. Sabe-se que esta espécie possui compostos eficazes contra microrganismos patogênicos, notadamente as bactérias Gram positivas. Além disso, *P. furfuracea* era também empregada no embalsamamento de cadáveres (mumificação). (Abrahan & Florey, 1949; Llano, 1951; Seu-Salerno & Blakeway, 1987).

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” (Abrahan & Florey, 1949). Entretanto, nem todos os líquens eram dessa forma utilizados; apesar de *Lobaria pulmonaria* ser indicada para problemas pulmonares, visto sua superfície reticulada ter semelhança com pulmões, espécies de *Usnea*, líquen com aspecto filamentosos, geralmente decumbente, eram de ampla utilização como antissépticos, dentre outras utilidades, sem apresentar sinal algum de semelhança com sua forma de emprego.

A partir da década de quarenta foram surgindo os primeiros estudos referentes à eficiência das substâncias líquênicas. Burkholder et al. (1944) e Burkholder & Evans (1945) iniciaram testes elaborando um trabalho ao nível de detecção de compostos líquênicos antibacterianos. 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 (Bustinza & Caballero, 1948; Bustinza, 1951).

O ácido úsnico, um dos compostos líquênicos mais eficazes contra enfermidades e de amplo estudo, demonstrou eficácia contra bacilos da tuberculose humana, bovina ou avium, além de regredir por completo casos de lupus vulgaris, ou tuberculose de pele. Seu preparado hidrossolúvel é conhecido na Finlândia e Alemanha como Usno e Usniplant, respectivamente, indicado para casos de infecções dermatológicas e como balsâmico. Na União Soviética é referido como Binan e indicado para uso antes de práticas cirúrgicas, para evitar a formação de quelóides e contra infecções urinárias (Pätiälä, 1949; Vartia, 1950; Kortenkangas & Virtanen, 1956).

A Evosina, mescla dos ácidos úsnico e evêrnico, é eficaz contra furunculoses, impetigo e mastite bovina (Marshak, 1947).

Por outro lado, a forma de sal sódico do ácido úsnico, e sua associação a antibióticos comerciais, como a penicilina e estreptomicina, conferiram ao composto resultante uma maior eficácia contra microrganismos resistentes, inclusive as bactérias Gram negativas (Vartia, 1950; Bustinza, 1951).

A ação farmacológica é também satisfatória, tanto para extratos brutos, como para substâncias purificadas. Na literatura é reportada ação antiespasmódica, espasmolítica, histamínica, hipotensiva, hipoglicemiante, neuromuscular e analgésica, tanto periférica como central (Appa-Rao & Prabhakar, 1987; 1996a; Silva et al., 1997).

A capacidade antiblástica das substâncias líquênicas é fato. Os primeiros trabalhos sobre o assunto foram publicados no final da década de 50, onde foi demonstrada a eficiência do ácido polipórico de *Sticta coronata* contra leucemia linfocítica (Cain, 1960).

Testes com extratos brutos e frações polissacarídicas contra tumores sólidos do tipo sarcoma-180 e adenocarcinoma de mama demonstraram resultados significativos (Takeda et al., 1972).

Alguns produtos líquênicos 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 sólido. Já heteroglicanos obtidos de distintas espécies foram moderadamente ativos (Takahashi et al., 1981).

Os compostos liquênicos de natureza fenólica são também eficazes contra neoplasias. O ácido úsnico apresentou alta atividade contra o carcinoma de Lewis (Kupchan & Koppermann, 1975) e baixa para leucemia linfocítica P388 (Takai et al., 1979). Este ácido foi, ainda, o responsável pela ação antitumoral e citotóxica de extratos de *Usnea fasciata*, que possui altos teores do referido composto (Pereira et al., 1994). A atranorina, bem como os ácidos protoliqueterínico e nefrosferínico, exibiram forte inibição contra o carcinoma de Ehrlich sólido (Hirayama et al., 1980; Santos, 1996).

No Brasil, líquens nordestinos e amazônicos vêm sendo avaliados quanto à presença de compostos antineoplásicos e à produção sazonal de compostos bioativos. Em 1990, Lima et al. comprovaram a eficiência de diferentes extratos obtidos de Cladoniaceae contra tumores sólidos do tipo sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich, com inibição de até 80%, bem como contra células KB (carcinoma nasofaríngeo) com CI50 (concentração que inibe 50% do crescimento celular) de 12 µg/ml. Esses mesmos extratos foram altamente eficazes quando testados frente a mais quatro diferentes linhas celulares (*in vitro*), notadamente os que continham maiores teores de atranorina e dos ácidos úsnico e estético (Nascimento et al., 1994). Líquens de distintas procedências como da Chapada Diamantina (BA), Antártica e tabuleiros arenosos da Paraíba, demonstraram CI50 de 4 µg/ml e 7 µg/ml, resultados considerados altamente satisfatórios para testes com extratos brutos, onde a concentração dos princípios ativos é muito baixa (Silva et al., 1994).

Quanto à produção em função da época do ano, foi verificado que em exemplares de *Cladonia verticillaris* ocorrentes em tabuleiros arenosos da Paraíba havia maior produtividade de compostos ativos durante o período seco do ano (verão). Aí foram detectados maiores teores de atranorina e ácido fumarprotocatrático, princípios ativos de natureza fenólica, assim como a liquenina, polissacarídeo liquênico também ativo contra tumores sólidos experimentais testados *in vivo* (Santos, 1996; Santos et al., 1997).

A isoliquenina, açúcar comum a diversas espécies liquênicas, exibe atividade moderada frente ao sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich. Todavia, a rafinose isolada de *Usnea fasciata* inibe em mais de 90% a proliferação celular de ambas as linhas de tumores (Pereira et al., 1994).

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 com inibição de até 85,8% contra o carcinoma de Ehrlich, e CI50 de 7,5 µg/ml contra células KB; *Ramalina complanata*, ocorrente em brejo de altitude (PB), foi eficaz contra tumores (80%) e apresentou CI50 de 8 µg/ml contra as mesmas células acima mencionadas (Pereira, 1998a).

1.3 Forma de obtenção: vantagens e desvantagens

Os evidentes efeitos terapêuticos das substâncias obtidas de líquens vêm aumentando o interesse sobre o assunto na comunidade científica que atua na farmacologia e química dos produtos naturais.

A coleta de líquens para fins comerciais deve ser sumamente criteriosa, visto que, a extração e purificação de um composto com atividade biológica, torna necessária a destruição de grande quantidade de biomassa dificilmente renovável. Por isso, surgem problemas imediatos quanto ao uso industrial dos metabólitos liquênicos, o qual requer grandes quantidades de matéria prima (Hale-Jr., 1983; Vicente et al., 1995; Nash, 1996).

Além da necessidade de grande volume de material, as técnicas para isolamento de compostos fenólicos proporcionam baixo rendimento, pois dependem do procedimento utilizado e dos solventes empregados. Algumas espécies de líquens requerem que a coleta seja efetuada em momento adequado, visto que só produzem determinado fenol em certo período do ano (Hale-Jr., 1983; Pereira, 1989).

Atualmente, é possível realizar, por imobilizações celulares e enzimáticas, a síntese contínua de metabólitos de difícil aquisição, a partir de líquens *in natura*. As investigações estão direcionadas no sentido de se produzir esses compostos em quantidades que justifiquem o processo, e permitam seu uso a nível de investigação e/ou industrial.

Na proposição da bioprodução de metabólitos liquênicos para fins industriais e científicos, sem destruição da liquenoflora, observou-se que são ainda incipientes as técnicas de re-síntese do

talo liquênico, ou mesmo sua cultura *in vitro*, apesar de atualmente estas técnicas virem ocupando espaço, e terem demonstrado ser bastante promissoras. Estas metodologias não chegaram à reprodução do líquen segundo sua forma original. Ahmadjian (1980) atribui tal fato à intensidade luminosa empregada para desenvolver a cultura sintética. Por outro lado, fatores como composição e concentração dos elementos do meio de cultivo, temperatura, entre outros devem também ser levados em consideração. Por exemplo, o talo re-sintetizado de *Cladonia cristatella* com seu próprio ficobionte, *Trebouxia ereci*, produziu fenóis característicos da espécie, exceto o ácido úsnico (Ahmadjian & Jacobs, 1981).

Muitos fenóis liquênicos são produzidos utilizando-se a técnica de cultura de tecidos, a partir de porções do talo liquênico (Yamamoto, 1991). Kinoshita et al. (1993) referem a necessidade de, por vezes, se realizar processos de dessecação para uma síntese mais eficiente. 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 natural (Yoshimura et al., 1993).

De uma forma geral, as imobilizações enzimáticas servem para síntese de compostos resultantes da ação de uma enzima específica. Trata-se, normalmente, da separação da enzima das misturas de reação, e diminuindo a inativação enzimática (Mozhaev et al., 1987).

Os líquens produzem compostos fenólicos que são únicos deste taxon, e não registrados em representantes do reino Plantae (Culbertson et al., 1977). Existem poucas informações sobre enzimas que sintetizam ou catabolizam estes compostos, e menos ainda se conhece sobre sua regulação metabólica.

A pesquisa sobre a biossíntese de fenóis liquênicos é muito dificultada, por estes seres crescerem muito lentamente (Seaward, 1977; Hill, 1984).

Face à probabilidade de larga utilização econômica de produtos liquênicos, o interesse em sua bioprodução vem aumentando com o passar dos anos.

Para bioprodução de substâncias liquênicas, foi inicialmente biossintetizado o ribitol, um açúcar alcoólico. Neste grupo os mais utilizados são o sorbitol e o manitol. Entram, via de regra na composição de alimentos dietéticos, como produtos para diabéticos e odontológicos. Possuem sabor adocicado e baixa velocidade de transformação. Por isso, são considerados substitutivos não calóricos do açúcar de cana ou de beterraba, já que o catabolismo dos polióis é muito lento em relação à glicose. Neste caso, células do líquen *Cladonia verticillaris* foram imobilizadas em esfera de alginato (produtos de algas), e induzidas a produzir o ribitol já mencionado (Pereira et al., 1995a).

As células produziram ribitol em quantidades significativas, entretanto as maiores concentrações do precursor (bicarbonato de sódio) levava à dissolução das esferas de alginato, que eram endurecidas com cloreto de cálcio.

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, Pereira et al. (1995b) imobilizaram células de *C. substellata* e introduziram o uso de caulinita como matriz de enclausuramento. A técnica foi considerada satisfatória visto que o ácido úsnico, principal substância da espécie, foi produzido, notadamente na concentração de 10mM, além da possibilidade de aumento da concentração do precursor sem danificar a estrutura da matriz de aprisionamento. Esta, por sua vez, de custo bem inferior ao do alginato demonstrou resultados satisfatórios quando submetida aos referidos ensaios.

Continuando com a bioprodução de metabólitos liquênicos, Pereira et al. (1999a) e Pereira et al. (1999b) imobilizaram, respectivamente, células de *Cladonia corallifera* ocorrente na região amazônica e *Cladonia clathrata* de cerrados nordestinos. A primeira espécie produziu, sem problemas, os ácidos úsnico e didímico biossintetizados pelo talo *in natura*. Por outro lado, *C. clathrata*, produz em condições naturais, o ácido fumarprotocetrárico. Este não foi produzido por suas células imobilizadas por uma provável dificuldade de contato entre os simbiossintetizadores, o que tornaria mais difícil a passagem de enzimas e cofatores entre eles. O mesmo ocorreu com células de *C. verticillaris* (Pereira, 1998b) que, quando submetidas ao mesmo tipo de experimento, produziram a atranorina. Por outro lado, Fontaniella et al. (2000) comprova tais hipóteses quando adiciona aos biorreatores FMN e succinil CoA, e consegue que a porção fumarato seja introduzida à atranorina, biossintetizada em etapa anterior ao ácido fumarprotocetrárico. Em relação à atranorina, sabe-se que este para depsídeo da série do β orcinol é produzido por diversas espécies

do gênero *Cladonia*. Sebastián et al. (2000) conseguiram aumentar a produção desta substância pela adição de NAD⁺ ou FMN ao meio de incubação.

Espécies de Cladoniaceae de distintas procedências respondem de forma distinta à ação dos precursores. Esta reação pode ser a bioprodução diretamente, ou inversamente proporcional, à concentração do precursor acetato de sódio, ou na produção seletiva de um determinado metabólito (Pereira, 1998b).

Líquens da caatinga vêm também sendo estudados neste contexto, como *Ramalina aspera*, *Teloschistes flavicans* e *Heterodermia leucomela*.

A imobilização dessas espécies revelou que há uma bioprodução contínua de metabólitos, e que a concentração de 1,0mM do precursor acetato de sódio é a mais satisfatória. Para *R. aspera* foi bioproduzido o ácido úsnico, células de *T. flavicans* produziram derivados da antraquinona, e *H. leucomela* a atranorina e o ácido salazínico. Todas estas substâncias têm ação medicinal, e destaque deve ser dado à atranorina, que possui ação antiinflamatória superior à do AAS, e retarda o envelhecimento da pele, o que a torna útil na cosmetologia.

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

Tabela 1: Substâncias produzidas por células imobilizadas de líquens com utilização econômica

SUBSTÂNCIA	ESPÉCIE/PROCEDÊNCIA	USO
Atranorina	<i>Cladonia verticillaris/ cerrado (PB)</i> <i>Cladina dendroides/ cerrado (PB)</i> <i>Heterodermia leucomela /caatinga (PE)</i> <i>Parmotrema andinum/cerrado (PE)</i>	Antiinflamatório Anticancerígeno Antialérgico Fixador de perfume Retarda o envelhecimento da pele
Ácido barbático	<i>Cladonia salzmannii/ cerrado (PB)</i> <i>Cladonia salmonea/campo rupestre (MG)</i> <i>Cladia aggregata/campo rupestre (MG)</i>	Antibacteriano
Ácido taminólico	<i>Cladonia salzmannii/ cerrado (PB)</i> <i>Cladonia salmonea/campo rupestre (MG)</i>	Antibacteriano
Ácido úsnico	<i>Cladonia substellata/ cerrado (PB)</i> <i>Cladonia corallifera/cerrado (AM)</i> <i>Cladia aggregata/campo rupestre (MG)</i> <i>Ramalina aspera/caatinga (PE)</i>	Antibacteriano Anticancerígeno
Ácido didímico	<i>Cladonia corallifera/cerrado (AM)</i>	Antibacteriano
Ácido rodocladônico	<i>Cladonia corallifera/cerrado (AM)</i> <i>Cladonia salmonea/ campo rupestre (MG)</i>	Antibacteriano
Telosquistina/ Falacinol	<i>Teloschistes flavicans/caatinga (PE)</i>	Anticancerígeno Antiinflamatório
Ácido pulvínico	<i>Pseudocyphellaria aurata /caatinga (PE)</i>	Antibacteriano
Ácido lecanórico	<i>Parmotrema andinum/cerrado (PE)</i>	Antibacteriano

A partir dos dados expostos, se for considerado que para cada sistema imobilizado utilizam-se 2,0g de líquen por biorreator, e este produz ininterruptamente por período que varia de 15 a 65 dias, faz-se uma estimativa de que em um experimento sejam produzidas, em média, 0,1g de substância por dia (pereira et al., 1995b). Caso este teor de substância tivesse que ser isolado e purificado diretamente do talo liquênico, seriam necessários de 50 a 100g de material biológico, dependendo da espécie de líquen.

1.4 Como funciona um biorreator?

A bioprodução de substâncias liquênicas, a partir da imobilização celular, obedece às seguintes etapas:

- coleta do material liquênico em ecossistemas diversos como cerrado, caatinga, campos rupestres, etc.;
- isolamento das células do líquen;
- imobilização em matriz inerte, que pode ser o alginato de algas, ou caulinita, ou outras matrizes poliméricas como o sephadex;
- montagem dos biorreatores, e adição de um precursor enzimático (bicarbonato ou acetato de sódio), que vai induzir às células a sintetizarem a substância de interesse, conforme esquemas abaixo (figuras 3 e 4).

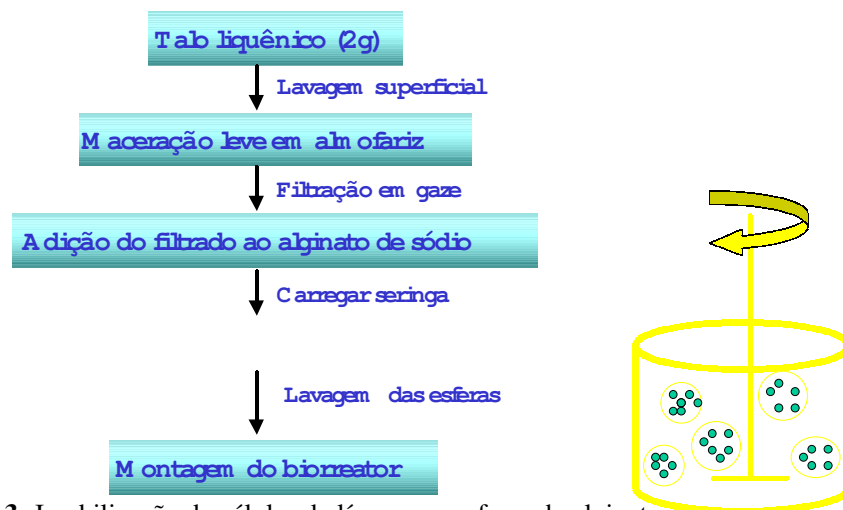


Figura 3: Imobilização de células de líquen em esferas de alginato.

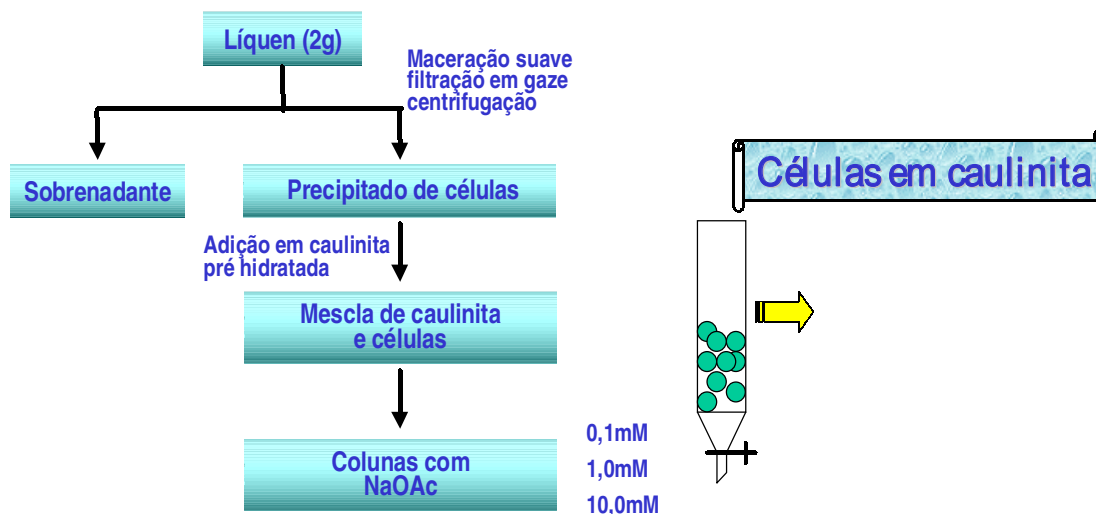


Figura 4: Imobilização de células de líquen em caulinita

Em períodos pré-determinados, alíquotas do meio de contendo precursor é retirado (o líquido), onde estão as substâncias produzidas pelas células imobilizadas, e nova solução é adicionada para que as células continuem a produzir.

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eficiência da técnica com utilização reduzida de biomassa propicia a preservação dos ecossistemas, com manutenção da biodiversidade. Isto contribui para que não haja interrupção na sucessão ecológica e processos pedogenéticos, bem como um maior conhecimento do potencial dos recursos naturais, sobretudo a nível regional, para seu uso sustentado.

Além da bioconservação dos líquens de ecossistemas diversos, a técnica da bioprodução é também viável para outros grupos biológicos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAN, E. P.; FLOREY, H. W. Antimicrobial substances from lichens and algae. In: **Antibiotic**. v. 1, cap. 13, 1949. p. 566-575.

AHMADJIAN, V. Separation and artificial synthesis of lichens. In: Cook, C. B.; Papas, P.W.; Rudolph, E. D. (Eds.) **Cellular interactions in symbiosis and parasitism**. Ohio State University Press, 1980. p. 3-29.

AHMADJIAN, V.; JACOBS, J. B. Artificial reestablishment of lichens. VI. Comparison between natural and synthetic thalli of *Usnea strigosa*. **Lichenologist**, v. 17, p. 149-166, 1981.

, A. V. N.; PRABHAKAR, M. C. Pharmacological actions of leprapinic acid, a lichen metabolite. **Fitoterapia**, v. 58, n. 4, p. 221-228, 1987.

BURKHOLDER, P. R.; EVANS, A. W.; MACVEIGH, I.; THORNTON, H. R. Antibiotic activity of lichens. **Proc. Nat. Acad. Sci. Was.**, v. 30, n. 9, p. 250-255, 1944.

BURKHOLDER, P. R.; EVANS, A. W. Further studies on the antibiotic activity of lichens. **Bull. Torrey Bot. Club.**, v.72, n. 2, p. 157-164, 1945.

BUSTINZA, F. Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas y antifúngicas del ácido úsnico y algunos de sus derivados. **Ann. Inst. Bot. A. J. Cavanilles**, v. 10, p. 157-175, 1951.

BUSTINZA, F.; CABALLERO, A. Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquenes. **Ann. Inst. Bot. Madrid**, v.7, p. 511-548, 1948.

CAIN, B. F. Potential anti-tumor agents. Part I. Poliporic acid series. **J. Chem. Soc.**, p 936-940, 1960.

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L.; JOHNSON, A. **Second Supplement to Chemical and Botanical Guide of Lichen Products**. St. Louis, The American Bryological and Lichenological Society, Inc., 1977. 400p.

FONTANIELLA, B.; LEGAZ, M. E.; PEREIRA, E. C.; SEBASTIÁN, B.; Vicente, C. Requirements to produce fumarprotocetraric acid using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*. **Biotechnology Letters** (Inglaterra). 22:813-817, 2000.

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

HILL, D. J. Studies on the growth of lichens. I. Lobe formation and maintenance of circularity in crustose species. **Lichenologist**, v. 16, p. 273-278, 1984.

HIRAYAMA, T.; FUJIKAWA, F.; KASSAHARA, T.; OTSUKA, M.; NISHIDA, N.; MIZUNO, D. Anti-tumor activities of some lichen products and their degradation products. **Yakugaku Zasshi**, v. 100, n. 7, p. 755-759, 1980.

- KINOSHITA, K.; YAMAMOTO, Y.; YOSHIMURA, Y.; KUROKAWA, T.; YAMADA, Y. Production of usnic acid in cultured *Usnea hirta*. **Bibl. Lichenol.**, v. 53, p. 137-146, 1993.
- KORTENKANGAS, A. E.; VIRTANEN, O. E. The antibiotic activity of some amino compound derivatives of usnic acid. **Soumen Kemistilehti**, v. 19, p. 2-4, 1956.
- KUPCHAN, S. M.; KOPPERMANN, H. L. L-usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. **Experientia**, v. 31, n. 6, p. 625, 1975.
- LLANO, G.A. Economic uses of lichens. **Smithsonian Institution Publ.**, vol. 4040, p. 385 – 422, 1951.
- LIMA, R.M.C.; NASCIMENTO, S.C.; PEREIRA, E.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos líquênicos. **Bol. Soc. Brot.**, v. 63, n. 24, p. 339 – 348, 1990.
- MACFARLANE, J. D.; KERSHAW, K. A. Some aspects of carbohydrate metabolism in lichens. IN: **Lichen Physiology and Cell Biology**. Ed. D. H. Brown. Plenum Presss. N. York, p. 1-8. 1984
- MARSHAK, A. A cristaline antibacterial substance from the lichen *Ramalina reticulata*. **Publ. Health. Rep.**, v. 62, n. 1, p. 3-19, 1947.
- MOZHAEV, V. V.; BEREZIN, I. V.; MARTINEK, K. Reactivation of immobilized enzymes. In: **Methods in Enzymology** (Mosbach, K. ed.), 44. Academic Press, N. York. p. 53-65, 1987.
- NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; OLIVEIRA, A. F. M.; SILVA, N. H.; BOITARD, M.; BÈRIEL, H. Screening de atividade citotóxica em extratos líquênicos: Cladoniaceae. **Acta Bot. Bras.**, v. 8, n. 1, p. 97-108, 1994.
- NASH III, T. H. **Lichen Biology.**, Cambridge, USA, Cambridge University Press 1ed., 1996, 303p.
- PÄTIÄLÄ, R. Application of usnic acid to a case of Lupus Vulgaris. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, v. 27, n. 2, p. 151-1531, 1949.
- PEREIRA, E. C. **Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de *Cladonia* e *Cladina* (líquen)**. 193 f. Dissertação. (Curso de Mestrado em Criptógamos). Departamento de Micologia, Departamento de Botânica. Universidade Federal de Pernambuco, 1989.
- 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. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tokai J. of Exp. and Clin. Medicine**, v. 19 n. 12, p. 47 – 52, 1994.
- PEREIRA, G. G.; PEREIRA, E. C.; LIRA, K. D. L.; SILVA, N. H. Estudo comparativo da ação dos ácidos úsnico e fosfórico e usnato de potássio sobre a estrutura dentária (dados preliminares). **Resumos da XIX Reunião Nordestina de Botânica**, Universidade Federal de Pernambuco, Sociedade Botânica do Brasil, Recife, PE, p. 146-147, 1995.
- PEREIRA, E. C.; MOLINA, M. C.; PEDROSA, M. M.; SOLAS, M. T.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Production of ribitol by alginate - immobilized cells of the lichen *Cladonia verticillaris*. **Anales de Química (Espanha)**, 91 (3-4):253-259, 1995a.
- 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 (Polônia)**, 64(2): 171-174, 1995b.
- PEREIRA, E. C. Lichens from Brazilian Northeast (NE) - studies and applications. In: **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., pp. 65 - 70
- PEREIRA, E. C. Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae (líquen), a partir de imobilização celular.** Tese de doutorado. Uuniversidade Federal Rural de Pernambuco. 1998b. 240p.

- PEREIRA, E. C.; SILVA, E. F.; SILVA, M. I. L.; VITAL, M. J. S.; SILVA, N. H.; VICENTE, C.; ANDRADE, L. H. C. Produção de metabólitos de *Cladonia corallifera* (Kunze) Nyl. – por imobilização celular. *Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas*, vol. 2/3, nº 1/2, jan/dez: 25-41, 1999a.
- PEREIRA, E. C.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E.; SILVA, N. H.; SILVA, E. F.; ANDRADE, L. H. C. Production of lichen metabolites through cell immobilization by *Cladonia clathrata* Ahti & Xavier-Filho. *Phyton (Áustria)*, 39(1):79-89, 1999b.
- SANTOS, N. P. **Estudo comparativo da ação antitumoral dos extratos e frações purificadas de *Cladonia verticillaris* (líquen) contra diferentes tumores sólidos experimentais.** 112 f. Dissertação. (Curso de Mestrado em Bioquímica) Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 1996.
- SANTOS, N. P.; PEREIRA, E. C.; LIMA, R. M. C.; HONDA, N. K.; SILVA, M. P. C.; SILVA, N. H. Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *Cladonia verticillaris* (líquen). **Rev. U.A., Série Ciências Biológicas**, v. 2, n. 2. 1997.
- SEAWARD, M. R. D. **Lichen Ecology**, London, Academic Press, 1977. 550p.
- SEBASTIAN, B.; FONTANIELLA, B.; PEREIRA, E. C.; VICENTE, C. Oxidation reaction are required to produce aranzonin from acetate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*. **Tropical Bryology**, 19:73 – 80, 2000.
- SEU-SALERNO, M.; BLAKEWAY, J. El perfume. **Investigación y Ciencia**, v. 132, p. 38 481, 987.
- SILVA, N. H.; SANTOS, N. P.; LIMA, R. C.; PEREIRA, E. C. Atividade citotóxica de extratos líquênicos. **Resumos da XVIII Reunião Nordestina de Botânica**, Areia, PB, Universidade Federal da Paraíba, p. 174, 1994.
- SILVA, E.F.; CATANHO, M. T. J.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H. Efeito analgésico de extratos brutos de *Cladonia dendroides*. **Resumos do Terceiro Encontro do Grupo Latino-Americano de Liquenólogos (GLAL-3)**. Campos do Jordão, SP, p. 36, 1997.
- TAKAHASHI, K.; KON, T.; YOKOTO, I.; SHIBATA, S. Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of stereocaulaceous lichens. **Carbohydrate Research**, v. 89, p. 166-173, 1981.
- TAKAI, M.; UEHARA, Y.; BEISLER, J. A. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. **J. Med. Chem.**, v. 22, n. 11, p. 1380-1384, 1979.
- TAKEDA, T.; FUNATSU, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. () Polysaccharides of lichens and fungi. V) Antitumor active polysaccharides of *Evernia*, *Acroscyphus* and *Alectoria spp.* **Chem. Pharm. Bull.**, v. 20, n. 11, p. 2445-2449, 1972.
- VARTIA, K. O. Antibiotics in lichens II. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, v. 28, p. 7-19, 1950.
- 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: **Flechten Follmann. contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann.** J. A. Daniels; M. Schulz; J. Peine (Eds.). The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Germany, 1995. p. 97-110.
- YAMAMOTO, Y. Production of lichen substances. In: **Plant Cell Culture in Japan.** Komamine, A. (Ed.), Tóquio, CMC Co. Ltd., 1991. p. 58-71.
- YOSHIMURA, I.; KUROKAWA, T.; YAMAMOTO, Y.; KINOSHITA, Y. Development of lichen thalli *in vitro*. **Bryologist**, v. 96, p. 412-421, 1993.

7.2 Normas do periódico Acta Farmacéutica Bonaerense

ACTA FARMACÉUTICA BONAERENSE

Acta Farmacéutica Bonaerense considerará a publicação de contribuições vinculadas direta ou indiretamente às Ciências Farmacêuticas, na forma de trabalhos originais, comunicações curtas, atualizações, revisões, notas ao Editor, etc. Os trabalhos deverão ser enviados ao *Editor, Acta Farmacéutica Bonaerense, Calle 5 N° 966, 1900 La Plata, Argentina*, em duas vias e escritos em espaço duplo. Juntamente com as duas cópias do manuscrito, os autores deverão enviar uma versão em disquete de 3 ½ " contendo os arquivos correspondentes em Word ou Word Perfect for Windows. **Serão aceitos manuscritos em espanhol, português e inglês.**

A apresentação deverá seguir as seguintes **regras gerais**:

- a) Na margem superior direita deverá constar a numeração da página e o nome do autor a quem a correspondência deverá ser enviada.
- b) O *Título* deverá fornecer, da forma a mais concisa possível, informações claras sobre conteúdo do trabalho. Se o trabalho estiver escrito em espanhol ou português, deverá incluir uma tradução do título em inglês. Se o trabalho estiver escrito em inglês, o título deverá ser acompanhado de uma tradução em espanhol.
- c) Abaixo do título deverá constar o primeiro nome completo e sobrenome de cada um dos autores, com identificação (*) do autor para o qual a correspondência deverá ser enviada. Nas próximas linhas serão declarados os endereços postais dos autores.
- d) A seguir será incluído um *Resumo* de aproximadamente 100 palavras. Se os trabalhos estiverem escritos em espanhol ou português, deverá ser incluído uma tradução do resumo em inglês (*Summary*). Se o trabalho está escrito em inglês o *Summary* deverá ser acompanhado de um resumo em espanhol.
- e) Após o resumo deverão ser listadas ao menos três *Palavras chaves* em ordem alfabética, em espanhol ou português e em inglês (*Key Words*).
- f) Na medida do possível, o trabalho deverá ser dividido em capítulos, sugerindo-se os seguintes títulos: *Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e/ou Conclusões*. Em continuação poderão ser incluídos os *Agradecimentos*.
- g) As referências bibliográficas serão numeradas conforme a ordem em que são citadas no texto. A bibliografia deverá ser listada ao final do trabalho e ordenada numericamente abaixo do título *Referências bibliográficas*. As citação de periódicos¹, monografias², e livros³ deverão **seguir exatamente os seguintes exemplos**:
 - (1) Pazos, A., K.H. Wiederhold & J.M. Palacios (1986) *Eur. J. Pharmacol.* **125**: 123-9
 - (2) Boelcke, O. (1992) "*Plantas vasculares de la Argentina, nativas y exóticas*", Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, págs. 209-10
 - (3) Askhenazi, A. & G.E. Peralta (1994) "Muscarinic acetylcholine receptors", en "*Handbook of receptors and channels*" (S.J. Peroutka, ed.), CRC Press, Boca Raton, Fda., Vol. 1, págs. 1-27
- h) As tabelas e figuras serão numeradas, utilizando números árabicos, na ordem em que aparecem citadas no texto. *O tamanho das letras e símbolos incluídos nas figuras devem ser estabelecidos em dimensão adequada, considerando que esses são habitualmente reduzidos ao tamanho de meia coluna (6.5 cm)*. Os títulos e texto de figuras e tabelas devem ser incluídos após as referências bibliográficas.

Os trabalhos recebidos serão remetidos aos consultores correspondentes, que avaliarão criticamente os manuscritos, cuja opinião será comunicada imediatamente aos autores. Se os consultores sugerirem correções, os autores deverão enviar a nova versão em duplicata, acompanhada de outro disquete contendo os arquivos correspondentes. Os trabalhos serão corrigidos em caso de conter erros sintáticos ou ortográficos. *Acta Farmacéutica Bonaerense* enviará, sem encargo aos autores, cinquenta separatas de cada trabalho publicado.