

MARCIO JAMES GONÇALVES DE LIMA

**PRODUÇÃO DO ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* VAINIO (LÍQUEN)
POR IMOBILIZAÇÃO CELULAR, UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS**

**RECIFE
2004**

MARCIO JAMES GONÇALVES DE LIMA

**PRODUÇÃO DO ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* VAINIO (LÍQUEN)
POR IMOBILIZAÇÃO CELULAR, UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de mestre**

**Orientador: Prof. Dr. Nicácio Henrique
da Silva**

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

**RECIFE
2004**

FICHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora

Orientador:

Dr. Nicácio Henrique da Silva

Nicácio Henrique da Silva
(Universidade Federal de Pernambuco)

Examinadores:

1 Examinador:

Luiz Bezerra de Carvalho Junior

2 Examinador:

Maria da Paz Carvalho da Silva

Maria da Paz Carvalho da Silva

3 Examinador

Laise de Holanda Cavalcanti Andrade

Data de aprovação: 17 / 12 / 2004

SUMÁRIO

PÁGINAS

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Os líquens: suas substâncias e utilizações	12
1.2 Ácido úsnico	14
1.3 Histórico	15
1.4 Imobilização celular	19
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Geral	21
3.2 Específicos	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
5. TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	28
Produção do ácido úsnico de <i>Cladonia substellata</i> Vainio (Líquen) por imobilização celular, utilizando diferentes métodos.	29
6. CONCLUSÃO	53
7. ANEXOS	54
7.1. Trabalho enviado ao 55º Congresso Nacional de Botânica – Viçosa, Minas Gerais	55
7.2. Trabalho enviado a VIIa Reunião Regional da SBBq e 2nd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology – Recife-PE.	57
7.3. Normas para a publicação do artigo na Acta Botânica.	59

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Mônica Cristina Barroso Martins

Aos meus orientadores Profs. Drs. Nicácio Henrique da Silva e Eugênia Cristina Pereira

Aos meus companheiros do Laboratório de Produtos Naturais

Ao técnico do Laboratório de Produtos Naturais – João Virgínio.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

PÁGINAS

DISSERTAÇÃO

- Figura 01** Modelo estrutural plano do ácido úsnico com destaque para o carbono quiral 14
- Figura 02** Cristais de ácido úsnico extraídos e purificados da *Cladonia substellata* Vainio 15

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Figura 01.** Cristais de ácido úsnico extraídos e purificados de *Cladonia substellata* Vainio 39
- Figura 02** Sistema fixo de imobilização celular utilizando caulinita como matriz de enclausuramento e NaOAc como precursor biossintético de metabólitos liquênicos. 40
- Figura 03** Sistema de imobilização celular com movimento, utilizando caulinita como matriz de enclausuramento e NaOAc como precursor biossintético de metabólitos liquênicos 41
- Figura 04** Sistema de imobilização celular em fluxo contínuo de acetato de sódio, precursor metabólico de *Cladonia substellata*, utilizando caulinita como matriz de enclausuramento. 42
- Figura 05** Cromatogramas em camada delgada indicando a presença de metabólitos produzidos por sistema fixo de imobilização de células de *C. substellata* e seus respectivos Rfs. 43
- Figura 06** Cromatogramas de camada delgada indicando a presença de metabólitos produzidos por células de *C. substellata* imobilizadas em sistema de movimento e sob fluxo contínuo do precursor, com seus respectivos Rfs. 44
- Figura 07** Produção de fenóis por células imobilizadas de *C. substellata* em sistema fixo usando como precursor acetato de sódio (NaOAc) a 10,0mM (A), 1,0 mM (B) e 0,1mM (C). 45
- Figura 08** Produção de fenóis por células imobilizadas de *C. substellata* com sistema em movimento, usando como precursor acetato de sódio (NaOAc) a 10,0mM (A), 1,0 mM (B) e 0,1mM (C). 46

- Figura 09** Produção de fenóis por células imobilizadas de *C. substellata* em sistema com fluxo contínuo, usando como precursor acetato de sódio (NaOAc) a 10,0mM (A), 1,0 mM (B) e 0,1mM (C). 47
- Figura 10.** Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicando a presença de ácido úsnico nos extratos orgânicos etéreo (B), clorofórmico (C) e acetônico (D), obtidos de *C. substellata* e padrão Merck (A). 48
- Figura 11.** Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos eluatos do sistema fixo de imobilização em presença do precursor a 10,0; 1,0 e 0,1 mM de *C. substellata*. 49
- Figura 12.** Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos eluatos do sistema em movimento de imobilização em presença do precursor a 10,0; 1,0 e 0,1 mM *C.* 50
- Figura 13.** Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos eluatos do sistema sob fluxo contínuo em presença do precursor a 10,0; 1,0 e 0,1 mM de *C. substellata*. 51
- Figura 14.** Produção total de compostos fenólicos nos três sistemas de imobilização celular de *C. substellata*, em presença do precursor (NaOAc) nas três concentrações 0,1, 1,0 e 10,0mM. Obtida do somatório da produção na três concentrações do precursor em cada sistema. 52

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD – Cromatografia em camada delgada.

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência.

Ét – Solvente éter.

NaOAc – Acetato de sódio.

NTSI – Ácido nortístico.

STI – Ácido estítico.

Tr – Tempo de retenção.

USN – Ácido úsnico

USNR – Ácido úsnico reduzido.

UV – Espectrofotometria em ultravioleta.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo produzir os metabólitos de *Cladonia substellata* Vainio. através do uso de biorreatores com sistema em repouso (tradicional), com movimento e sob fluxo contínuo (inéditas). Os biorreatores foram montados utilizando caulinita como matriz de enclausuramento e acetato de sódio a 0,1; 1,0 e 10mM. No sistema em repouso observou-se a presença dos compostos fenólicos liquênicos nas três concentrações apresentando um pico máximo de produção nas primeiras 48h após a imobilização celular. Ao final de 720h (1mês) ocorreu sensível redução na produção fenólica e nenhuma após 1440 (2 meses). A concentração de 10mm foi a que mais se destacou. O sistema com movimento após 96h apresenta um pico de produção na concentração de 10mM, mantendo-se constante durante 600h (25 dias). A produção de 1,0mM mantêm-se apenas nos três primeiros dias. No sistema com fluxo contínuo, também foi observada produção máxima nas primeiras 96h, porém apenas 504h (21 dias). O mesmo resultado foi observado para concentração de 1,0 mM. As amostras resultantes foram analisadas por cromatografias em camada delgada (CCD), líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrofotometria (UV). Observou-se a presença do ácido úsnico, além de outros fenóis nas amostras dos três sistemas. Foi possível concluir que o aumento na concentração do precursor influenciou na produtividade das células liquênicas e, que o sistema com fluxo contínuo mostrou-se mais eficiente que os demais.

Palavras chave: ácido úsnico, *Cladonia substellata*, imobilização celular, substâncias liquênicas.

ABSTRACT

This study had as goal produce *Cladonia Metabólitos substellata* Vainio. Metabolites through bioreactores use with system in repose (traditional), with action and under continuous flux (unpublished). Bioreactores were mounted using kaolinite as sodium inclosure and acetate head office to 0,1; 1,0 and 10mM. In the system in repose the presence of the phenolics liquenics composts were observed in the three concentrations introducing a maximum spike of production in the first 48h after the cellular standstill. At the end of 720h (1mês) occurred sensitive reduction in the phenolic production and none after 1440 (2 months). The concentration of 10mm was to what it more stood out. The system with action after 96h introduces a production spike in the concentration of 10mM, keeping itself constant for 600h (25 days). The production of 1,0mM just they keep in the three first days. In the system with continuous flux, maxim production in the first 96h also was observed, however just 504h (21 days). the same result was observed for concentration of 1,0 mM. The resultant samples were analyzed by chromatographies in thin layer (CCD), high performance liquid (HPLC) and spectrofotometric (UV). The presence of the usnic acid was observed, besides other phenols in the samples of the three systems. It was possible to conclude that the increase in the concentration of the precursor influenced in the productivity of the liquênicos cells and, which the system with continuous flux it showed more efficient than the rest

Key-words: usnic acid, *Cladonia substellata*, cellular immobilization, lichenic substances

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos produzidos por líquens são exclusivos deste grupo de organismos, uma vez que não há registros destes em representantes do reino Plantae (CULBERSON *et al.*, 1977). Embora pouco se conheça a respeito das enzimas que sintetizam ou catabolizam tais substâncias, e menos ainda sobre sua regulação metabólica, as substâncias obtidas de líquens, vêm despertando o interesse da comunidade científica que atua na farmacologia e química de produtos naturais, devido aos seus efeitos terapêuticos.

Sabe-se hoje, de acordo com as referências disponíveis, que os primeiros estudos referentes à eficiência das substâncias liquênicas foram surgindo a partir da década de quarenta. Burkholder *et al.* (1944) e Burkholder & Evans (1945) iniciaram testes com a finalidade de descobrir compostos liquênicos 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, 1951).

Há séculos os líquens são empregados 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, foi investigada objetivando seu uso como carcinostático (KUMAR & MULLER, 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, sabendo-se que a elastase, assim como a tripsina, por exemplo, são fortemente inibidas por atranorina, um fenol de origem liquênica (PROKSA *et al.*, 1994).

A coleta de líquens para fins comerciais deve ser criteriosa, visto que, a extração e purificação de um composto com atividade biológica, ocasionam 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 (VICENTE *et al.*, 1995).

Atualmente, é possível realizar, por imobilizações celulares e enzimáticas, a síntese 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 ao nível de investigação e / ou industrial.

1.1 Os líquens: suas substâncias e utilizações

Os líquens são organismos resultantes de uma associação entre fungo e um simbiote fotossintético, o que resulta em uma estrutura complexa, porém com talos estáveis. O simbiote fotossintético é, geralmente, uma alga unicelular pertencente à divisão Chlorophycophyta ou Cyanophycophyta. Os micobiontes, ou seja, os fungos são, por sua vez, na maioria Ascomycota, podendo ocorrer em menor proporção Basidiomycota e Deuteromycota (NASH III, 1996; SILVA, 1980; PEREIRA, 2000; RAVEN *et al*, 2001). Esta simbiose exclusiva e característica dos líquens propiciam uma vida harmônica entre esses seres tão distintos: algas e fungos. O contato entre o fotobionte e o micobionte confere vantagens para ambos, como por exemplo, proteção mútua e transferência de substâncias vitais, tais como: nutrientes e produtos fotossintéticos (HALE-JR, 1983; HONDA & VILEGAS, 1999).

O produto do metabolismo primário dos líquens consiste na produção específica de um único carboidrato pela alga (e.g. eritritol, arabitól, ribitol, sacarose, trealose e glicose) a partir da fotossíntese, cuja transferência ao micobionte é rápida e em quantidade substancial, o que facilita sua transformação ou acúmulo, podendo ser sintetizados como produtos do metabolismo secundário. Nesta segunda via, são produzidas as substâncias ou ácidos liquênicos, únicos neste grupo (CULBERSON *et al.*, 1977). Cerca de 550 produtos naturais são descritos para os líquens, dos quais 350 são metabólitos secundários (HONDA & VILEGAS, 1999).

Os ácidos liquênicos são na maioria compostos fenólicos, como por exemplo, depsídeos, depsidonas, benzilésteres, dibenzofuranos, ácidos úsnicos, xantonas, antraquinonas e derivados do ácido pulvínico. Estes compostos, no interior do talo liquênico, tendem a tomar a forma cristalina e sendo extracelulares, encontram-se depositados sobre as hifas do micobionte, podendo sua concentração variar de 0,1 a 10% em relação ao peso do talo seco. É possível, em alguns casos, que essa concentração possa ser mais elevada. A maior parte desses metabólitos são oriundos das seguintes vias metabólicas: via do acetato-polimalonato (quinonas, depsídeos, depsidonas e ácidos graxos), via do ácido mevalônico (terpenóides e esteróis), via do ácido chiquímico (pigmentos amarelos) e via dos aminoácidos (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; HONDA & VILEGAS, 1999).

A formação cristais confere aos líquens grande capacidade de adaptação às adversidades, visto que os mesmos podem funcionar como fotorreceptores e/ou fotoindutores, selecionando o tipo de radiação que a eles seja conveniente (SEAWARD, 1977; NASH III, 1996). O ácido úsnico, que é um dos compostos liquênicos mais estudados, protege o fotobionte da radiação de baixo

comprimento de onda (RUNDEL, 1987), sendo também considerado como seguro energético em casos de estresse nutricional (VICENTE *et al*, 1980).

Sendo assim, a estratégia da liquenização permite ao líquen se espalhar em muitos habitats, ou seja, das regiões tropicais às polares, estando presentes nos mais variados substratos. Há espécies que crescem sobre o córtex de árvores, outras sobre folhas, rochas alcalinas ou ácidas, tomando assim as formas de um talo arbustivo, foliáceo ou crustáceo. O talo arbustivo (Usneaceae) é ramificado, o folhoso (Parmeliaceae) assemelha-se a uma folha e o crustoso (Lecanoraceae) caracteriza-se por ser circular e estar aderido ao material em que se encontra habitando (SILVA, 1980; HALE-JR, 1983; PEREIRA, 2000).

Os líquens são eficientes bioacumuladores e bioindicadores. Desprovidos de sistema radicular e com sua alimentação exclusivamente higroscópica, os líquens podem reter uma variedade de contaminantes, entre eles os metais pesados como chumbo, urânio, cobre, níquel, ferro, cobalto, mercúrio e dióxido de enxofre, resultantes da poluição industrial e os hidrocarbonetos provenientes principalmente da combustão dos veículos e aquecedores domésticos (PIÑATA *et al*, 2002; REIS *et al*, 2002; ADAMO *et al*, 2003; BACKOR *et al*, 2003; GUIDOTTI *et al*, 2003; LOPPI *et al*, 2003; WALKER *et al*, 2003).

Desde a antiguidade, os líquens também são utilizados amplamente na medicina popular cuja indicação era baseada na “doutrina de sinais”, estando portanto difundidos (e.g. *Usnea barbata*, filamentosa, era indicada para fortalecer os cabelos). Eles possuem a propriedade de produzir óleos essenciais e substâncias para perfumes, corante de tecidos, graxas e óleos. Eram utilizados na manufatura de cerveja, conhaque e álcool (LLANO, 1951; PEREIRA, 2000; HALE JR, 1983; NASH III, 1996). Seus metabólitos são ativos contra fungos e bactérias (VARTIA, 1949; INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1985; PEREIRA *et al*, 1991; PEREIRA *et al.*, 1996; ESIMONE & ADIKWU, 1999; PERRY *et al.*, 1999; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; FALCÃO *et al.*, 2002; PIOVANO *et al.*, 2002), tumores e células cancerígenas (LIMA *et al.*, 1990; PEREIRA *et al.*, 1994 a, b; PERRY *et al.*, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2002). São antivirais, analgésicos (PERRY *et al*, 1999; PIOVANO *et al*, 2002) e antiinflamatórios (VIJAYAKUMAR *et al*, 2000). Possuem ação alelopática (LAWREY, 1977; YANO, 1994) e são eficientes no controle biológico de alguns insetos (COSTA-FILHO *et al.*, 1991). Seus metabólitos secundários são considerados como bons filtros solares (RANCAN *et al.*, 2002), especialmente o ácido úsnico.

1.2. Ácido úsnico

O 2,6 diacetil – 7,9 diidroxi 8, 9b dimetil – 1,3 (2H, 9bH) – dibenzo furano, $C_{18}H_{16}O_7$ (ácido úsnico) é um pigmento cortical amarelo e ocorre em duas formas enantioméricas, dependendo da projeção angular do grupo metil do carbono quiral 9b (HUNECK *et al*, 1981). O ácido úsnico (+) de espécie *Usnea longissima* Ach., possui ponto de fusão 206°C, $M^+ 344$, $[\alpha]_D = + 490^\circ$ (Mallavadahani *et al*, 2004). Howell *et al* (2003), o descrevem como um esqueleto com três anéis ligados a uma estrutura aromática. Embora muitos autores o classifiquem como um grupo dibenzofurano, considera-se que seja formado pela ciclização do tipo floroglucinol e não do tipo orselínica, típica dos dibenzofuranos (CULBERSON, 1969; VICENTE, 1975).

O ácido úsnico é o metabólito líquênico mais extensivamente estudado, desde que foi isolado pela primeira vez por Pfaff, em 1826 de *Cetraria islandica* (L.) Ach. (L.) Ach. e, em 1843, por Rohleder e Heldt de *Usnea barbata* (BUSTINZA, 1951). Está amplamente distribuído em espécies de *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae), *Evernia* e *Parmelia* (Parmeliaceae) e *Alectoria* (Alectoriaceae), ricas em ácido úsnico e produzindo acima de 6% do peso seco do talo líquênico (PROKSA *et al.*, 1994). Sua estrutura consta de uma unidade aromática dihidroxilada de caráter fenólico (anel A), e a ela ligada uma função cetônica e um grupo metila. O anel B, cíclico de seis carbonos com insaturação, contém uma metila, dois grupos cetônicos e uma hidroxila. O caráter hidrofóbico da substância se dá por possuir três grupos cetônicos e um anel furano unindo os anéis A e B (Fig.1). Seus cristais de coloração amarela (Fig.2) variam de forma de acordo com o solvente utilizado na recristalização (ASAHINA & SHIBATA, 1954).

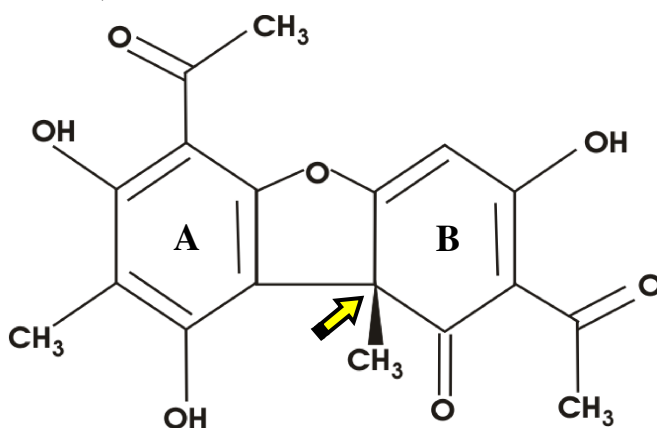


Figura 1- Modelo estrutural plano do ácido úsnico com destaque para o carbono quiral () Huneck & Yoshimura (1996)

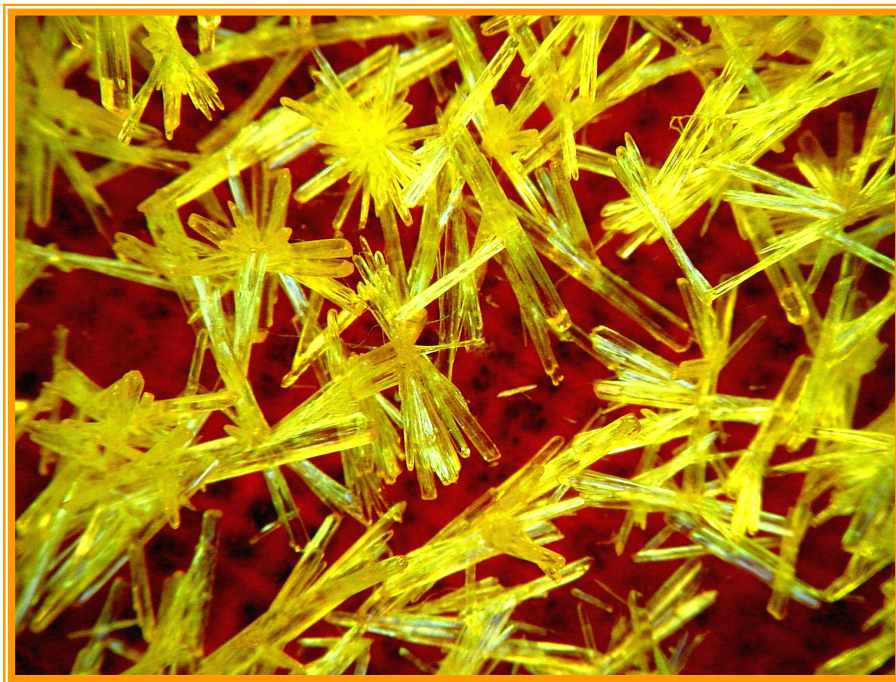


Figura 2. Cristais de ácido úsnico extraídos e purificados de *Cladonia substellata* Vainio foto do autor

1.3 Histórico

Burkholder *et al.* (1944), bem como Burkholder & Evans (1945) publicaram os primeiros estudos qualitativos a respeito das propriedades antibióticas dos líquens. Foram testadas 100 espécies, dentre elas algumas cujo ácido úsnico é o fenol principal, observando que os ácidos exercem preferencialmente sua atividade contra bactérias Gram-positivas.

Bargellini *et al.* (1946), Marshak (1947) e Shibata *et al.* (1948) observaram que o ácido úsnico isolado de *Ramalina reticulata* inibiu o crescimento de várias espécies de *Pneumococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Mycobacterium*, inclusive as patogênicas ao homem.

Stoll *et al.* (1947) trabalharam com as diferentes formas estruturais do ácido úsnico, como a α e a racêmica e verificaram uma notável inibição frente a *Mycobacteria*.

Shibata *et al.* (1948) estudaram os efeitos da substituição nos anéis A e B do ácido úsnico na ação antibiótica deste ácido e verificaram que esterificando as duas hiroxilas livres do primeiro anel

com ácido acético, a atividade do ácido úsnico se reduz em 50% sobre *Mycobacterium tuberculosis avium*. A hidrogenação da dupla ligação convertendo o ácido úsnico em dihidroúsnico, reduz em ¼ sua capacidade antibiótica. Essas observações indicam que as duas hidroxilas livres (C-8 e C-10) no primeiro anel, são fundamentais como suporte da atividade antibiótica do ácido úsnico.

Vartia (1949) estudou 149 espécies de líquens. Destas 75 foram ativas contra o crescimento de várias bactérias Gram-positivas, atribuindo a este fato a presença dos ácidos liqueterínico, pinástrico, pulvínico, girofórico, d-protoliqueterínico, d-liqueterínico, divaricático, fisódico e úsnico.

Pätälä (1949) e Vartia (1950) referem-se ao preparado hidrossolúvel, conhecido na Finlândia e Alemanha como usno e usniplant, respectivamente, indicados para casos de afecções dermatológicas e como balsâmico. Na Rússia, é conhecido como Binan indicado para uso antes das práticas cirúrgicas para evitar a formação de quelóides e contra infecção urinária. Esses autores também atribuem ao ácido úsnico grande eficácia contra enfermidades e demonstraram sua atividade contra bacilos da tuberculose humana, bovina e aviária, além de regredir por completo casos de *Lupus vulgaris*, ou tuberculose de pele.

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

Virtanen & Kilpio (1957) testaram *in vivo* a atividade de um novo preparado solúvel em água, fabricado com o ácido úsnico, sob o nome comercial de USNO (usnato de amônia), contra o fungo *Trichophyton gallinae*. Após 9 -12 dias de tratamento, as colônias do fungo desapareceram completamente.

Benzinger *et al.* (1960) consideraram o ácido úsnico como um dos agentes liquênicos mais importante junto à estreptomicina, tendo ação eficaz contra cepas resistentes à penicilina.

Capriotti (1961) testou o ácido úsnico contra leveduras presentes em secreções endobrônquicas de pacientes portadores de tuberculose pulmonar, sendo ativo contra espécies de *Candida* e *Saccaromyces*.

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

Experimentos de Campos & Lopez (1972) indicam que o ácido úsnico inibe a taxa de respiração e a atividade da amilase, protease, fosfatase e incorporação da ^{14}C - α -Leucina dentro da proteína nos vegetais.

Vicente *et al.* (1973; 1978), estudando germinação de sementes, demonstraram que o uso do ácido úsnico pode inativar algumas enzimas, como por exemplo, glutamato desidrogenase e a urease.

Huovinen & Ahti (1986) trabalharam com amostras de *Cladonia substellata* provenientes da Serra de Caldas, no Estado de Minas Gerais e, comentam o alto conteúdo de ácido úsnico desta espécie, cerca de 98,1%.

Lima *et al.* (1990) atribuíram ao ácido úsnico presente em *C. substellata*, os resultados satisfatórios obtidos contra células tumorais, cujos extratos apresentaram maior citotoxicidade, em relação às outras espécies testadas, com uma CI_{50} em torno de $12\mu\text{g/mL}$.

Hamada (1991) demonstrou o efeito dos fatores ambientais sobre o teor do ácido úsnico usando o micobionte cultivado de *Ramalina siliquosa*. O autor observou que não houve correlação entre a intensidade luminosa e a produção dos ácidos úsnico e 4-O-dimetilbarbático. A quantidade do composto variou apenas com a temperatura, sendo entre 5°C e 12°C a faixa ótima, onde ocorreu seu aumento.

Pereira *et al.* (1991; 1997) observaram que extratos brutos e frações purificadas de *C. substellata* e *C. crispatula* procedentes de Santa Rita e Alhandra, do Nordeste do Brasil, mostraram-se ativos contra diversos microrganismos (fungos e bactérias). Segundo os autores para ambas as espécies, a atividade encontrada deveu-se à presença do ácido úsnico.

Pereira *et al.* (1995b) relatam que o ácido úsnico possui mecanismos de ação semelhante ao ácido fosfórico, utilizado para descalcificar o esmalte dentário e facilitar a adesão da resina restauradora e comentam, ainda, que o usnato de potássio reage sobre o dente agindo como um verniz selador.

Kortepeter (1996) comparou duas espécies de *Cladonia*, *C. incrassata* e *C. cristatella*, quanto ao teor de seus ácidos liquênicos e encontrou que *C. cristatella* contém 1% do percentual de seu peso seco de ácido úsnico e, *C. incrassata* 2%.

Ingólfssdóttir *et al.* (1998) realizaram um *screenig* da atividade biológica de vários metabólitos de líquens, “*in vitro*”, entre eles o ácido úsnico contra *M. aurum* que é um organismo não patogênico, mas possui sensibilidade semelhante a *M. tuberculosis*. O valor da CMI para o

ácido úsnico ficou em 32µg/mL o que se considerou um bom resultado quando comparado aos outros ácidos liquênicos, como atranorina cuja CMI ficou em 250µg/mL.

Esimone & Adikwu (1999) verificaram a ação do ácido úsnico dissolvido em etanol, clorofórmio, hexano e água contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Trichophyton rubrum* com bons resultados.

Perry *et al.* (1999) referem que *Cladia retipora*, *Pseudocyphellaria glabra* e *P. homeophylla* têm como composto principal o ácido úsnico que é ativo contra microorganismos e vírus. Neste estudo, eles observaram que os líquens produziram uma maior proporção de compostos bioativos que as coleções de briófitas e plantas vasculares, isoladas de ilhas subantárticas. Os níveis de atividade antimicrobiana dos extratos foram mais altos se comparados às plantas superiores.

Vijayakumar *et al.* (2000) avaliaram a atividade antiinflamatória do ácido úsnico comparando-o com ibuprofen (droga padrão), administrado em ratos de ambos os sexos, de peso entre 100g – 120g, por via oral. O ácido úsnico reduziu significativamente a atividade antiinflamatória em ratos em doses de 100mg/Kg de peso corpóreo.

Caviglia *et al.* (2001) verificaram que as substâncias liquênicas têm um importante papel de proteção do talo contra a ação de radicais livres, que são tóxicos e podem ser oriundos de altos níveis de luminosidade no hábitat. Poluentes como SO₂ ou herbicidas transferem elétrons na cadeia transportadora de elétrons produzindo radicais superóxidos. Em *Parmelia sooredians* ocorreu um aumento no teor do ácido úsnico quando o líquen foi exposto a agentes oxidantes.

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

Ingólfssdóttir (2002) realizou testes antimicrobianos contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, anaeróbicas, micobactérias e fungos que confirmaram os resultados anteriores, em que se observou atividade satisfatória do ácido úsnico contra os microorganismos testados.

No Brasil, líquens nordestinos e amazônicos vêm sendo avaliados quanto à presença de compostos antineoplásicos e à produção sazonal de compostos bioativos. Lima *et al.* (1990), comprovaram a eficiência de diferentes extratos obtidos de Cladoniaceae contra tumores sólidos do tipo sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich, com inibição acima de 80%. Substâncias produzidas por

líquens de distintas procedências como Chapada Diamantina (BA), Antártica, caatinga e tabuleiros arenosos da Paraíba, demonstraram eficiência contra a proliferação de células cancerígenas, apresentando CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular) de $4\mu\text{g/mL}$ a $7\mu\text{g/mL}$, resultados considerados altamente satisfatórios para testes com extratos brutos, onde a concentração dos princípios ativos é muito baixa (SILVA *et al.*, 1994).

1.4. Imobilização celular

Diante da diversidade de utilização dos metabólitos liquênicos na indústria farmacêutica de cosméticos, têxtil e de alimentos, sua aplicação a nível comercial deve ser criteriosa. Isto se deve ao fato da necessidade de destruição de uma grande quantidade de biomassa, para a obtenção de um composto bioativo (VICENTE *et al.*, 1995).

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; SILVA *et al.*, 1997; PEREIRA, 1998).

Com a finalidade de produzir açúcares alcoólicos de líquens, Pereira *et al.* (1995^a) imobilizaram células de *Cladonia verticillaris* em alginato de cálcio, utilizando bicarbonato de sódio como precursor.

Com o intuito de testar nova matriz de imobilização, células de *Cladonia substellata* foram imobilizadas em caulinita como matriz de enclausuramento. 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 $\text{S}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8\text{Al}_{14}$ (PEREIRA, 1998) e produziram o ácido úsnico, composto liquênico de grande importância medicinal (PEREIRA *et al.*, 1995b).

Nas duas últimas décadas diversos líquens presentes no nordeste brasileiro têm sido estudados no intuito de avaliar as espécies eficientes para esta metodologia de bioprodução de metabólitos. Nestes estudos optou-se pelo uso da caulinita. Outras espécies da família Cladoniaceae vêm sendo estudadas com este mesmo objetivo. *C. corallifera* procedente da Amazônia, produziu os ácidos úsnico e didímico (PEREIRA *et al.*, 1999), enquanto que *C. verticillaris* oriunda 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 mas produziu o ácido hipoprotocetrárico e seu aldeído, notadamente na concentração de 1,0 Mm do precursor utilizado, o acetato de sódio (PEREIRA *et al.*, 1999).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Os compostos fenólicos produzidos por líquens são exclusivos deste grupo de organismos, 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.

Há séculos os líquens são empregados 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 & MULLER, 1999).

A coleta de líquens para fins comerciais deve ser criteriosa, visto que a extração e purificação de um composto com atividade biológica, tornam necessária a destruição de grande quantidade de biomassa dificilmente renovável, no caso dos líquens. Por isso, surgem problemas imediatos quanto ao uso industrial dos metabólitos liquênicos, o qual requer grandes quantidades de matéria prima (VICENTE *et al.*, 1995).

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 (PEREIRA, 1989). Dessa forma, se torna relevante o desenvolvimento de métodos e sistemas que possam utilizar as células liquênicas, desenvolvendo seu potencial de maneira a aproveitar a maior quantidade possível de metabólitos, sem afetar a fisiologia celular.

Ninguém pode negligenciar a necessidade de investigação da imensa flora do Brasil e do resto do mundo, visando a busca de novas drogas, que trariam benefícios para todos (MONTE, 1998). Portanto, é de grande relevância o estudo do potencial que os líquens podem oferecer, como

também, a viabilidade da bioprodução de seus compostos, o que evitaria a destruição da micota liquenizada.

Em relação à *Cladonia substellata*, esta espécie apresenta relevante atividade biológica e alto teor de ácido úsnico (PEREIRA *et al*, 1991; LIMA *et al*, 1990; AHTI *et al*, 1993). Pereira *et al*. (1995 b) imobilizaram células desta espécie, obtendo ácido úsnico em quantidades crescentes, em função do aumento da concentração do precursor (acetato de sódio). No entanto, neste caso, quantidades deste ácido na forma reduzida também eram detectadas.

Por isso, justifica-se um estudo que vislumbre novas metodologias, ou proporcione aperfeiçoamento da técnica empregada por Pereira *et al*. (1995 b), para se tornar mais eficaz a bioprodução de uma substância com tamanha relevância como o ácido úsnico.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar de forma qualitativa e quantitativa os metabólitos produzidos por células de *Cladonia substellata* Vainio. Imobilizadas em caulinita, utilizando como precursor o acetato de sódio, em sistemas fixo, com movimento e de fluxo contínuo, comparando-os com material isolado e purificado do talo *in natura*.

3.2. Específicos

- Imobilizar células de *C. substellata* e mantê-las vivas para produção de metabólitos.
- Testar a eficiência do sistema imobilizado, sob a ação de movimento e de fluxo contínuo.
- Determinar a concentração do precursor que proporciona maior produtividade nos sistemas estudados
- Verificar a influência da concentração do precursor sobre a vitalidade das células em ambos biorreatores, movimento e fluxo contínuo
- Correlacionar a produção de metabólitos na natureza com a de células imobilizadas em laboratório.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMO, P.; GIORDANO, S.; VINGIANI, S.; COBIANCHI CASTALDO, R.; VIOLANTE, P. Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy). **Environmental Pollution**. v. 122.p. 91-103, 2003.
- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER-FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Byology** . v.7. p. 55-70, 1993.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of Lichen Substances**. Tokio: Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. 240p.
- BACKOR, M.; PAULIKOVA, K.; GERALSKA.; DAVIDSON, R. Monitoring of air pollution in kosice (eastern Slovakia) using lichens. **Polish – Journal of Environmental – Studies**. v. 12. p. 141-150, 2003.
- BANDONI, R. J.; TOWERS, G. H. N. Degradation of usnic acid by microorganisms. **Canadian Journal of Biochemistry**. V. 45. p. 1197-1201, 1967.
- BARGELLINI, E.; DEL PIANTO, E.; MARINI-BETOLO, E. B. Sull Attività antibatterica di due acidi vulpinico. **Ati della Accademia Nazionale dei Lincei**. v. 1 (12). p. 1252-1255, 1946.
- BENZINGER, F.; TOMÁSIC, P. Zaverserk Usninsäure aus jugoslawischen flechten und ihre antibiotische wirksmreit. **Qualeitäts Plantarum Water-Veg**.v. 7 (4).p. 371-83, 1960.
- BURKHOLDER, P. R.; EVANS, A. W.; MAC VEIGH, I.; THORNTON, H. R. Antibiotic activity of lichens. **Proc. Natural. Academic. Science**. v. 30. p. 250-255, 1944.
- BURKHOLDER, P. R.; EVANS, A. W. Futher studies on the antibiotic of lichens. **Bull. Torrey Botanic Club.**, v. 72. n. 2. p. 157-164, 1945.
- BUSTINZA, F. Contribución al studio de las propiedades antibacterianas y antifungicas del ácido úsnico y algunos de sus derivados. **Ann. Inst. Bot. A. J. Cavanilles**. v. 10. p. 157-175, 1951.
- CAVIGLIA, A. M.; NICORA, P.; GIORDANI.; BRUNIALTI, G.; MODENESI, P. Oxidative stress and usnic content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (lichenes). **IL Farmaco**. v. 56. p. 379-382, 2001.
- CAMPANELLA, L.; DELFINI, M.; ERCOLE, P.; IACOANGELI, A.; RISULEO, G. Molecular chracterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polioma virus in vitro and whose main target is RNA transcription **Biochimie**. v. 84. p. 329-334, 2002.
- CAMPOS, G.; LÓPEZ, V. Physiological and biochemical investigations on the phytotoxicity of usnic acid. **Oyton**. v. 29. p 63-72, 1972.

CAPRIOTTI, A. The effect of Usno on yeast isolated from the excretion of tuberculosis patients. **Antibiotic Chemotherapy** v. 11(6).p. 409-410, 1961.

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. P. 36, 1991.

CULBERSON, C. F. **Chemical and botanical guide to lichen products**. The University of North Carolina Press: Chapel Hill. 1969. 628p.

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

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

FALCÃO, E. P. DA. S.; 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 Farma Bonaerense**. v. 21(n.1). p. 43-9, 2002.

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

INGÓLFSDÓTTIR, K.; BLOOMFIELD, S.; HYLANDS, P. J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 289-292, 1985.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G. A. C.; SKÚLASON, V. G.; GISSURARSON, S. R.; VILHELMSDÓTTIR, M. Antimicrobial activity of lichen metabolites in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Science**. v. 6. p. 141-144, 1998

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

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

HAMADA, N. Environmental factors affecting the content of usnic acid in the lichen mycobiont of *Ramalina siliquosa*. **The Bryologist**. v. 94 (n.1). p. 57-59, 1991.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química de líquens. **Química Nova**. v. 22 (1). p. 25-55, 1999.

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

HUOVINEN, K.; AHTI, T. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia*, section *Unciales*. **Annals Botannici Fennici**. v. 23. p. 173-188, 1986.

HUNECK, S.; AKNNIYI, J. A.; CAMERON, A. F.; CNNOLLY, J. D.; MULHOLLAND, A. G. The absolute configurations of (+) – usnic and (+) – isousnic acid. X-ray of the (-) – α -phenylethylamine derivative of (+) – usnic acid and of (-) pseudoplacodiolic acid, a new dibenzofuran, from the lichen *Rhizoplaca chrysoleuca*. **Tetrahedron**. v. 22. p. 351-352, 1981.

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

KORTEPETER, S. A. Lichen speciation in the section Cocciferae: *Cladonia* *ãs ens ie* and *Cladonia cristatella*. **Journal Undergrad. Sci.** v. 3. p. 71-73, 1996.

KUMAR, S.; MULLER, K. Lichens metabolites, 2, Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acids on human keratinocyte growth. **Journal Nature Products**. v. 62. p. 821-823, 1999.

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

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. p. 339-348, 1990.

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

LOPPI, S.; RICCOBONA, F.; ZHANGB, Z. H.; SAVICC, S.; IVANOVD, D.; PIRINTSOSE, S. A. Lichens as biomonitors of uranium in the Balkan area. **Environmental Pollution**. V. 125 (2). P. 277-280, 2003.

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

MARSHAK, A. A. Cristaline antibacterial substance from de lichen *Ramalina reticulata*. **Public Health**. v. 62 (n.1).p. 3-19, 1947.

MONTE, F. J. Q. Produtos naturais: vale investigar. **Jornal da Ciência**, Rio de Janeiro. v. 387. p. 4-5, 1998.

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

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

PIGNATA, M. L.; GUDIÑO, G. L.; WANNAZ, E. D. PLÁ, R. R.; GONZÁLEZ, C. M.; CARRERAS, H. A.; ORELLANA, L. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. **Environmental pollution**. v. 120. p-59-68, 2002.

PEREIRA, E. C. **Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de *Cladonia* e *Cladia* (líquen)**. 1989. 193f. Dissertação (Mestrado em Criptógamos) – Departamento de Micologia, Departamento de Botânica. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 1989.

PEREIRA, E. C. G.; CAMPOS-TAKAKI, G.; SILVA, N. H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E.;XAVIER-FILHO, L. Fractionation of *C. substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. **Bol. Soc. Brot. Portugal**. v. 64, 1991.

PEREIRA, E. C. NASCIMENTO, S. C.; LIMA, R. M. C.; SIVA, N. H.; OLIVEIRA, A. F. M.; BOITARD, M.; BERIEL, H. VICENT, C.; LEGAZ, M. E. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. Tokai. **J. of Exp. And Clin. Medicine**. v. 19 (12). p. 47-52, 1994 a.

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; ALCÂNTARA, S. R.; LIMA, R. C. Atividade citotóxica e antitumoral de *Himantormia lugubris* e *Ramalina sp* (líquens). In: **RESUMOS DO XIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 1994b, Fortaleza. p. 168.

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(n.2): 171-174, 1995b.

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

PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; XAVIER –FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Antimicrobial activity of biologically active compounds from the lichen *Cladonia crispatula*. **Bol. Ecot. Ecot. Ecos. Trop**. v. 31, p. 172, 1997.

PEREIRA, E. C. **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae (líquen), a partir de imobilização celular**. 1998. 240f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, 1998.

PEREIRA, E. C.; SILVA, E. F.; SILVA, M. I. L.; VITAL, M. I. 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, no1/2, jan/dez: 25-41, 1999.

PEREIRA, E. C. **Biologia de líquens**. Depto. de Ciências Gergráficas. Centro de Filosofia e Ciências Humanas. Universidade Federal de Pernambuco. 2000. 22 p.

PERRY, N. B.; BENN. M. H.; BRENNAN, N. J.; BURGESS. E. J.; ELLISS, G.; GALLOWAY, D. J.; LORIMER, S. D.; TANGNEY, R. S. Antimicrobial, antiviral and citotóxica activity of New Zeland lichen. **Lichenologist**. v. 31 (6). v. 627-636, 1999.

PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; GIANNINI, F. A.; CORRECHE, E, R.; FERESIN, G.; TAPIA, A.; ZACCHINO, S.; ENRIZ, R. D. Evaluations of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichen. **Boletin de la Sociedad Chilena de Química**. v. 47. p. 235-240, 2002.

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

RANCAN, F.; ROSAN, S.; BOEHM, K.; FERNÁNDEZ, E.; HIDALGO, M. E.; QUIHOT, W.; RUBIO, C.; BOEHM, F.; PIAZENA, H.; OLTMANNS, U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 68. p. 133-139, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan. p. 323-329, 2001.

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

RIBEIRO, S.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; FALCÃO, E. P.; GUSMÃO, N. B.; HONDA, N.; QUILHOT, W. Detection of antibacterial activity of lichen substances through microdilution tests. *Mitt. Inst. Bot. Hamburg*. V. 30 (32). p. 187-194, 2002.

RUNDEL, P. W. The ecological role of secondary lichen metabolites. **Biological System Ecology**. v.6. p. 157-170, 1987.

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

SHIBATA, S.; UKITA, T.; TAMURA, T.; MIURA, Y. Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and derivatives. **Japanese Medecine Journal**. v. 1. p. 152-155, 1948.

SILVA, O. E. **Estudo químico de líquens constituintes do *Teloschistes flavicans***. 1980. 100f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 1980.

SILVA, N. H.; SANTOS, N. P.; LIMA, R. C.; PEREIRA, E. C. Atividade citotóxica de extratos líquênicos. In: RESUMOS DA XVIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 1994, Areia. PB, Universidade da Paraíba.,1994. p. 174..

SILVA, E. F.; CATANHO, M. T. J.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. N. H. Efeito analgésico de extratos brutos de *Cladina dendroides*. In: RESUMOS DO TERCEIRO ENCONTRO DO GRUPO LATINO-AMERICANO DE LIQUENÓLOGOS (GLAL-3), 1997, Campos do Jordão, SP., 1997. p.36.

STOLL, A.; RENZ, J.; BRACK, A. DE antibakterielle wirkung der Usninsäure aut Mycobakterien und andere Mikroorganismen. **Experimentia**. v. 2 (15).p. 115-117, 1947.

VARTIA, K. O. Antibiotics in lichens I. **Annals Medicine Experimental Biologic Fennici** v. 27 (1). P. 46-54. 1949.

VARTIA, K. O. Antibiotics in lichens II. **Annals Medicine Experimental Biologic Fennici** v. 28 (1). P. 7-19, 1950.

VARTIA, K.O.; TERVILÄ, A. L. D. Effect *in vivo* on pigmented mice with inoculation tuberculosis. **Anales Medicinale Experimentals et Biologiae Feinniae**. v. 30 (n.1). p. 76-78, 1952.

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

VICENTE, C. **Fisiologia de las sustancias líquénicas**. Alhambra, Madrid. 1975.

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

VICENTE, C.; RUIZ, J. L.; ESTÉVEZ, M. P. Mobilization of usnic acid in *Evernia prunastri* under critical conditions of nutrient availability. **Phyton**. v. 39. p. 15-20, 1980.

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. **Flechten Follmann. Contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann**. The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Germany. p. 97-110, 1995.

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

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

WALKER, T. R.; CRITTENDEN, P. D.; YOUNG, S. D. Regional variation in the chemical composition of winter snow pack and terricolous lichens in relation to sources of acid emissions in the USA river basin northeast European Russia. **Environmental Pollution**. V. 125 (3).p. 401-412, 2003.

YAMAMOTO, K.; TOSA, T.; TAMASHITA, K.; SHIBATA, I. Continuous production of L-malic acid by immobilizes *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***. 1994. 126f. Dissertação (Mestrado em Criptógamos) - Departamento de Micologia, Departamento de Botânica – UFPE. 1994.

5. TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Produção do ácido úsnico de *Cladonia substellata* Vainio (Líquen) por imobilização celular, utilizando diferentes métodos.

Marcio.J. G de Lima¹; Mônica, C. B. Martins¹.; Eugênia, C. Pereira²; Nicácio, H. da Silva³

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, ² Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Acadêmico Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária. Cep: 50.740-530, Recife-PE, Brasil. Email: mjgl3@hotmail.com.

RESUMO – (Produção do ácido úsnico de *Cladonia substellata* Vainio (Líquen) por imobilização celular, utilizando diferentes métodos). A produção de fenóis liquênicos, obtidos de células *Cladonia substellata*, utilizando acetato de sódio a 0,1; 1,0 e 10mM como precursor biossintético foi avaliada. 3g do talo liquênico misturados a caulinita e água deionizada foram mantidos durante 2 meses em biorreatores com sistema em repouso, com movimento e sob fluxo contínuo do precursor. No sistema em repouso os compostos fenólicos foram produzidos nas três concentrações, com o pico máximo de produção nas primeiras 48h e reduzindo-se gradativamente até o final de 720h. a produção com 10mM mostrou-se a mais eficiente. O sistema com movimento produziu fenóis apenas nas concentrações de 1,0 e 10mM do precursor, com pico máximo de produção após 96h. no sistema com fluxo contínuo observou-se resultado similar ao anterior para concentração de 10mM. A concentração de 1,0mM manteve-se ativa apenas por 21 dias. Este estudo demonstrou a viabilidade das metodologias apresentadas para produção de compostos fenólicos de *C. substellata* e que aumento na concentração do precursor influencia na produtividade das células.

PALAVRAS-CHAVE: acetato de sódio, ácidos liquênicos, Cladoniaceae.

ABSTRACT – (Methods Optimization of Usnic Acid of *Cladonia substellata* Vainio (Lichen) Through Cell Immobilization). The lichenic phenols production, obtained from cells *Cladonia substellata*, using sodium acetate to 0,1; 1,0 and 10mM as precursory biossintetic was evaluated. 3g of lichenic stem mixed for caulinita and dilutes deionizada were kept for 2 months in bioreactors with system in repose, with action and under continuous flow of the precursor. In the system in repose the phenolics composed were produced in the three concentrations, with the maximum peak of production in the first 48h and reducing itself gradually until the end of 720h. The production with 10mM it showed in excess efficient. The system with action produced phenols just in the concentrations of 1,0 and 10mM of the precursor, with maximum peak of production after 96h. in the system with continuous flow similar result was observed to previous for concentration of 10mM. The concentration of 1,0mM it kept active just for 21 days. This study demonstrated the viability of the methodologies introduced for production phenolic composed *C. substellata* and that increase in the concentration of the precursor influences in the productivity of the cells.

KEY WORDS: lichenic acids, sodium acetate, Cladoniaceae.

Introdução

Há séculos os líquens são explorados comercialmente, seja como fixadores em perfumaria, seja como potentes antibióticos de uso tópico (Maia *et al.*, 2002; Piovano *et al.*, 2002; Vijayakumar *et al.*, 2002). Sua alta atividade citotóxica, um inconveniente para seu uso terapêutico, está sendo atualmente investigada objetivando seu uso como carcinostático (Lima *et al.*, 1990; Santos *et al.*, 2003).

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 pela atranorina, um fenol de origem liquênica (Proksa *et al.*, 1994; Rancan *et al.*, 2002).

A coleta de líquens para fins comerciais deve ser criteriosa, visto que a extração e purificação de um composto com atividade biológica torna necessária a destruição de grande quantidade de biomassa, que é, no caso dos líquens dificilmente renovável. Por isso, surgem problemas imediatos quanto ao uso industrial dos metabólitos liquênicos, o qual requer grandes quantidades de matéria prima (Vicente *et al.*, 1995).

Por outro lado, as técnicas para isolamento dos compostos orgânicos 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 (Pereira *et al.*, 1995b). Dessa forma, se torna relevante o desenvolvimento de métodos e sistemas que possam utilizar as células liquênicas, desenvolvendo seu potencial de maneira a aproveitar a maior quantidade possível de metabólitos, sem afetar a fisiologia celular.

Ninguém pode negligenciar a necessidade de investigação da imensa flora do Brasil e do resto do mundo, visando a busca de novas drogas, que podem trazer benefícios para todos (Monte, 1998). Portanto, é de grande relevância o estudo do potencial que os líquens podem oferecer, como também a viabilidade da bioprodução de seus compostos, o que evitaria a destruição da micota liquenizada.

Uma alternativa para produção de substâncias liquênicas para fins industriais e científicos 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; Pereira *et al.*, 1999).

Diversos líquens presentes no nordeste brasileiro têm sido estudados no intuito de avaliar as espécies eficientes para este método de produção de metabólitos. Neste caso optou-se pelo uso da caulinita, como matriz de aprisionamento. 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 $S_4O_{10}(OH)_8Al_{14}$ (Pereira *et al.*, 1995b).

Este trabalho teve como objetivo estudar, de forma qualitativa e quantitativa, a produção de metabólitos liberados por células de *Cladonia substellata* Vainio, imobilizadas em caulinita, utilizando como precursor o acetato de sódio, em sistemas fixo, com movimento e de fluxo contínuo, comparando aos metabólitos obtidos com material isolado e purificados do talo *in natura*.

Materiais e métodos

Material líquênico – *Cladonia substellata* Vainio, foi coletada no município de Mamanguape (Paraíba, Brasil) e identificada por E. C. Pereira. Sua exsicata está depositada no Herbário UFP, da Universidade Federal de Pernambuco, sob a inscrição nº 34402. As amostras foram identificadas através de características químicas e morfológicas do talo.

Obtenção de extratos orgânicos a partir do talo *in natura* – A partir de 45g do talo seco à temperatura ambiente ($28^\circ C \pm 3^\circ C$), foram obtidos extratos orgânicos de *C. substellata* utilizando éter dietílico, clorofórmio e acetona por sistema de esgotamento a frio, obedecendo a série eluotrópica.

Isolamento e purificação do ácido úsnico do talo *in natura* – O principal composto do líquen estudado, ácido úsnico, foi isolado e purificado a partir do extrato etéreo, por meio de cristalizações sucessivas de acordo com Asahina & Shibata (1954) (Fig. 1).

Imobilização em sistema fixo – Foram utilizadas 3g de *C. substellata* para cada ensaio de imobilização celular de acordo com Pereira *et al.* (1995b). As suspensões celulares foram obtidas através de suave maceração do material líquênico em almofariz com água deionizada, seguida por filtração em gaze. As células em suspensão foram imobilizadas em 90g de caulinita previamente hidratada por duas horas em água deionizada. O material imobilizado foi empacotado em colunas e, a cada uma, foram adicionados 30 mL de acetato de sódio (NaOAc) nas seguintes concentrações: 0,1; 1,0 e 10,0 mM. As colunas foram conservadas fixas sob luz branca ($125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante 2

meses. Foram coletadas periodicamente 30 mL de eluatos celulares de cada coluna e o mesmo volume de solução de acetato reposta na respectiva concentração (Fig.3).

Imobilização em sistema com movimento – O sistema foi preparado da mesma forma que a imobilização para o sistema fixo, sendo que o material imobilizado foi acondicionado em tubos de ensaio e, a cada um, foram adicionados 30 mL de acetato de sódio nas mesmas concentrações anteriormente descritas. Os tubos de ensaio foram fixados a uma roldana acoplada a um motor que a mantinha em movimento a uma velocidade constante, durante todo o experimento. Alíquotas de 30mL foram coletadas periodicamente, repetindo-se o procedimento usado para o sistema fixo (Fig.4).

Imobilização em sistema de fluxo contínuo Células imobilizadas em caulinita foram acondicionadas em funil de fundo poroso. Ao sistema foram adicionados 30 mL do precursor NaOAc nas concentrações referidas para os outros métodos, no entanto as soluções foram adicionadas por sistema de gotejamento contínuo. Com coletas contínuas de 30mL durante todo o experimento e reposição do precursor NaOAc, para cada concentração (Fig.5).

Obtenção e tratamento das frações – Na primeira semana, em todos os sistemas, foram coletadas alíquotas diárias. Posteriormente, a 15, 30 e 60 dias. As alíquotas coletadas por cada método foram mantidas sob congelamento até o momento do processamento. Para o isolamento dos extratos contendo os compostos fenólicos produzidos foram utilizados 30 mL do sistema éter/acetato de etila (65:35, v/v), seguido de três agitações e repouso. Após separação das fases, foi adicionado à fase aquosa o mesmo volume de clorofórmio/ acetonitrila (60/40, v/v), procedendo da mesma forma que a extração anterior. Os dois extratos obtidos foram submetidos à leitura em espectrofotômetro a 254 nm e 366 nm. Em seguida, foram concentrados para análise posterior (Culberson, 1972).

Cromatografia em camada delgada (CCD) – Esta técnica foi empregada para detecção qualitativa de compostos fenólicos predominantes no líquen estudado, nos extratos orgânicos do talo *in natura* e nos eluatos celulares obtidos nos três experimentos de imobilização. Amostras diluídas foram aplicadas em placas de sílica Gel 60 F₂₅₄+ 366 Merk de 20cm x 20 cm, e desenvolvida de forma ascendente no sistema de solventes A (tolueno/ dioxano/ ácido acético (180:45: 5, v/v)). Após evaporação dos solventes, as bandas foram visualizadas sob luz UV curta (254 nm) e longa (366 nm). Posteriormente as placas foram borrifadas com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 100° C por 40 min., para que fossem evidenciadas as bandas por reação de coloração, segundo Culberson

(1972). Os resultados foram avaliados mediante cálculo dos valores de Rf, que foram comparados ao padrão utilizado (ácido úsnico purificado).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – nestes ensaios foram usados os extratos orgânicos e as frações resultantes das imobilizações, do talo *in natura* e o ácido úsnico purificado. Os extratos foram diluídos a 1mg/mL e o padrão a 0,1mg/mL e injetados em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado a detector UV a 254nm, tendo como fase móvel metanol/água/ácido acético (80: 19,5: 0,5 v/v), fase fixa em coluna C₁₈ em fluxo de 1,0 mL. min⁻¹ (Legaz & Vicente, 1983). Os resultados foram analisados pelo tempo de retenção (TR) da substância na coluna, comparado com os padrões.

Resultados e discussão

As substâncias liquênicas são formadas por unidades fenólicas que têm origem a partir de ácidos carboxílicos policetônicos, derivados do ácido acético, que o sistema enzimático liquênico utiliza na forma de acetato. Por isso, utilizou-se acetato de sódio (NaAOc) como precursor para a síntese dos compostos fenólicos. Os resultados revelam a produção desses compostos em *C. substellata*.

A produção do principal composto fenólico de *Cladonia substellata*, o ácido úsnico, purificado (Fig.1), que está presente em dois dos três sistemas de imobilização (movimento e fluxo contínuo) como demonstrado nos cromatogramas em camada delgada (Fig. 7). Por outro lado, apesar dos ensaios em CCD (Fig.6) demonstrarem bandas compatíveis ao ácido úsnico reduzido, este não foi detectado por CLAE (Fig. 12).

A Fig.7 indica que os compostos fenólicos, no sistema fixo, estão sendo produzidos nas três concentrações do precursor (10,0; 1,0 e 0,1 mM de NaAOc), apresentando um pico máximo de produção nas primeiras 48h após imobilização celular. Após esse período, observa-se sensível redução na produção fenólica até o final de 1 mês (720h) e, nenhuma produção ao final de 2 meses (1440h). A maior produção de compostos fenólicos foi observada na concentração de 10,0 mM do precursor (Fig. 7A), seguida pelas concentrações de 1,0mM (Fig.7B) e 0,1mM (Fig.7C) . Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Pereira *et al.* (1995), quando estes introduziram o uso da caulinita como matriz de enclausuramento, em lugar do alginato, produzindo notadamente ácido úsnico de *C. substellata* na concentração de 10mM.

Líquens da caatinga, tais como *Ramalina aspera*, *Teloschistes flavicans* e *Heterodermia leucomela* cujas células foram também imobilizadas em caulinita usando-se o NaOAc como

precursor, produziram ácido úsnico, antraquinonas, atranorina e ácido salazínico, respectivamente. A concentração de 1,0mM do precursor mostrou-se a mais satisfatória para a produção dos compostos fenólicos nas espécies estudadas. Todas essas substâncias têm ação medicinal, destacando-se a atranorina, cujo efeito antiinflamatório é superior ao do AAS, além de não possuir toxicidade alguma (Maia *et al.*, 2002).

Quando analisados os resultados obtidos da imobilização no sistema em movimento Fig.8, verifica-se que estão sendo sintetizados produtos em duas concentrações do precursor (10,0 e 1,0mM de NaOAc). Observa-se, na concentração de 10,0mM de NaOAc, um pico máximo de produção nas primeiras 96h após imobilização celular, mantendo-se constante durante 25 dias (600h), com acentuada queda ao final de 30 dias (720h) e, nenhuma produção ao final de 2 meses (1440h) (Fig.8A). Quando usado precursor a 1,0mM, observa-se um pico máximo de produção nos primeiros três dias (72h), com brusca queda na produção chegando imediatamente a zero e aí permanecendo durante o restante do experimento (Fig.8B). Quando usado precursor a 0,1mM não foi observada produção significativa (Fig.8C).

No sistema de fluxo contínuo Fig.9, a produção foi melhor a 10,0mM e 1,0 mM de NaOAc, observado um pico máximo de produção nas primeiras 96h de imobilização, na concentração de 10,0mM, mantendo-se constante durante 21 dias (504h), seguida de suave queda na produção até 30 dias (720h) e, nenhuma produção ao final de 2 meses (1440h) (Fig.9A). No sistema com precursor a 1,0mM, observa-se um pico máximo de produção nos primeiros 3 dias (72h), com brusca queda na produção chegando imediatamente a zero e aí permanecendo durante o restante do experimento (Fig.9B). Quanto à coluna com precursor à 0,1mM não foi observada produção significativa. (Fig.9C).

Os cromatogramas obtidos por CLAE, tendo ácido úsnico Merck como padrão, apresentaram picos correspondentes a ácido úsnico nos extratos orgânicos etéreo, clorofórmico e acetônico (Fig. 10), observados seus tempos de retenção em relação ao padrão USN Merck (Fig.10A). Por outro lado os eluatos no sistema de imobilização fixo, analisados por CLAE, registraram picos de substâncias liquênicas outras, cujos tempos de retenção estão entre 3 e 4 minutos com significativos percentuais de concentração (Figura 11). Os eluatos dos sistemas de imobilização, em movimento e sob fluxo contínuo, nas concentrações de 10,0 e 1,0 mM (Fig. 12 e 13 A e B) analisados por CLAE, apresentam picos para o ácido úsnico e úsnico reduzido além de substâncias outras cujos tempos de retenção estão de acordo com aqueles do sistema de imobilização em repouso sendo considerados

talvez como o ácido estético e ácido nortístico. Ahti *et al.* (1993) reportam tais substâncias como acessórias para a espécie, além de terem sido detectadas nos ensaios de CCD (Fig. 5 e 6).

Outras metodologias de imobilização, além das três aqui estudadas, utilizando outras substâncias como matriz de enclausuramento, ou como precursor metabólico, também são usadas para o estudo do comportamento celular nos talos líquênicos. É o caso de células do fotobionte de *Xanthoria parietina*, *Caloplaca citrina* e *Ramalina pollinaria* que foram imobilizadas em colunas de superfície sólida de agarose em placas microtituladas de PVC, através de adsorção eletrostática ou ligação covalente, fornecendo um método alternativo de imobilização de células de algas (Bubrick *et al.*, 1985).

Células de *Xanthoria parietina* também foram imobilizadas em matriz de polissacarídeo em tampão fosfato pH 4.0, cuja imobilização ocorre através de troca iônica. Depois de armazenadas no escuro e à temperatura ambiente, as células imobilizadas, ainda, retém considerável atividade de fotorredutores e pouca habilidade de produzir clorofila. Porém, não foi observada divisão celular após 12 dias de imobilização (Molina *et al.*, 1994).

Em um período de 23 dias, células de *Pseudevernia furfuracea*, que foram imobilizadas em esferas de polihidroxiuretano ($\leq 3\text{mm}$) em coluna de 20x3cm, suplementada com 50mL de acetato de sódio a 1.0mM, produziram atranorina e ácido fisódico, dois fenóis característicos da espécie (Blanch *et al.*, 2001).

Em culturas separadas, os micobiontes de *Teloschites exilis* e *Caloplaca erythrantha* são capazes de produzir seus compostos fenólicos, como antraquinonas, sem depender da presença do fotobionte em meio de cultura de ágar (Rossob *et al.*, 2003). Os resultados do autor levam a supor que células isoladas do micobionte podem também produzir substâncias típicas do fungo, quando se fornecem as substâncias que suprem suas necessidades de nutrição.

Quando a produção dos compostos fenólicos é comparada nos três sistemas de imobilização das células líquênicas, observa-se sua presença em todos eles nas concentrações utilizadas do precursor. Contudo, o melhor desempenho é conseguido no sistema sob fluxo contínuo do precursor, na concentração de 10,0mM de NaOAc. Esses resultados estão sumarizados na Fig. 10. É possível que o acúmulo de substâncias bioproduzidas no meio contendo NaOAc leve as células a utilizarem de alguma maneira, estes compostos em seu metabolismo. O sistema de fluxo contínuo faz com que haja menor tempo de permanência dessas substâncias em contato com as células, não saturando o sistema e não permitindo reutilização pelas células imobilizadas. Isto explica uma maior

produtividade deste sistema. Por outro lado esperar-se-ia uma menor produção do ácido úsnico reduzido neste sistema, o que não ocorreu.

Os experimentos demonstram que as três metodologias aqui apresentadas para produção de metabólitos de *Cladonia substellata* são viáveis. Dentre elas a do sistema sob fluxo contínuo e de movimento nas concentrações de 10,0 e 1,0mM de NaOAc são as mais produtivas. No entanto, as células não permanecem viáveis por muito tempo, quando comparadas às células do sistema fixo de imobilização, sob a mesma concentração do precursor.

A produção muito baixa observada no sistema em movimento e sob fluxo contínuo na concentração de 0,1mM de NaOAc, indica que houve perda da atividade celular logo após os três primeiros dias de imobilização. Esse fenômeno também foi observado no sistema sob fluxo contínuo na concentração de 0,1mM de NaOAc. É possível que o movimento danifique as células, ou como afirmam Pereira *et al.* (1999), houve prejuízo de contato entre os simbiontes, dificultando a transferência de enzimas e/ ou cofatores importantes para a biossíntese destes metabólitos.

Analizando a produção total nos diferentes sistemas de imobilização implementados, observou-se que em todos um aumento de concentração do precursor influenciou no incremento da produtividade das células e, que o sistema de fluxo contínuo mostrou-se mais eficiente dentre os testados (Fig. 14).

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Pernambuco, ao Departamento de Bioquímica e ao Laboratório de Produtos Naturais do Depto. De Bioquímica pela disponibilização de suas instalações equipamentos e orientação para a realização deste trabalho.

Referências bibliográficas

- Asahina, Y.; Shibata, S. 1954. **Chemistry of Lichen Substances**. Tokio: Japanese Society for the Promotion of Science.
- Blanch, M.; Blanco, Y.; Fontaniella, B.; Legaz, M. E.; Vicente, C. 2001. Production of phenolics by immobilized cells of the lichen *Pseudevernia furfuracea*. The role of epiphytic bacteria. **Intituto Microbiologia 2**: 89-92.
- Bubrick, P.; Goldstein, L.; Frensdoff, A. 1985. Immobilized whole algal cells for solid-phase binding assays. **Journal of Immunological Methods**. **86**: 171-177.

- Culberson, C. F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer chromatographic method. **Journal of Chromatography. Amsterdam** **72**: 113-125.
- Legaz, M. E.; Vicente, C. 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant physiology, Lancaster** **71**: 300-301.
- Lima, R. M. C.; Nascimento, S. C.; Pereira, E. C.; Campos-Takaki, G. M. 1990. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos líquênicos. **Boletim Sociedade Brototeriana** **63**: 339-348.
- Maia, M. B. S. ; Silva, N. H.; Silva, E. F.; Catanho, M. T. J.; Schuler, A. R. P.; Pereira, E. C. 2002. Anticonceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from lichen *Cladina dendroides* (des. Abb) Ahti. **Acta Farma. Bonaerense** **21**: 259-264.
- Molina, M. C.; Segovia, M.; Solas, M. T.; Vicente, C. 1994. Immobilization of phycobionts cells on bioskin, a natural product of microbial origin. **Journal of Biotechnology** **37**: 209-215.
- Monte, F. J. Q. 1998. Produtos naturais: vale investigar. **Jornal da Ciência** **387**: 4-5.
- Piovano, M.; Garbarino, J. A.; Giannini, F. A.; Correche, E. R.; Feresin, G.; Tapia, A.; Zacchino, S.; Enriz, R. D. 2002. Evaluations of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichen. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química** **47**: 235-240.
- Pereira, E. C.; Pereyra, M. T.; Matos, S. C.; Silva, N. H.; Andrade, L.; Vicente, C. 1995. Bioproduction of usnic acid from acetate by kaolinite immobilized cells of *Cladonia substellata* Vainio. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae (Polônia)** **64** (2): 171-174.
- Pereira, E. C.; Silva, E. F.; Silva, M. I. L.; Vital, M. I. S.; Silva, N. H.; Vicente, C.; Andrade, L. H. C. 1999. Produção de metabólitos de *Cladonia corallifera* (Kunze) Nyl. -por imobilização celular. **Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas** **2**: 25-41.
- Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Andrade, L. H. C.; Vicente, C.; Legaz, M. E. 1999. Production of Lichen Metabolites by Immobilized Cells of *Cladonia clathrata* Athi & Xavier – filho. **Phyton Austria. Austria** **39** (1): 79 – 89.
- Proksa, B.; Adamcova, J.; Sturdikova, M.; Fuska, J. 1994. Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* and their inhibition potencial of proteolytic enzymes. **Pharmazie** **49**: 282-283.
- Rancan, F.; Rosan, S.; Boehm, K.; Fernández, E.; Hidalgo, M. E.; Quihot, W.; Rubio, C.; Boehm, F.; Piazena, H.; Oltmanns, U. 2002. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** **68**: 133-139.
- Rossob, M. L.; Bertonid, M. D.; Adlerd, M. T.; Maier, M. S. 2003. Anthraquinones from the cultured lichen mycobionts of *Teloschistes exilis* and *Caloplaca erythrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology** **31** (10): 1197-1200.
- Santos, N. P.; Wanderley, M. S. O.; Pereira, E. C .G.; Silva, N. H.; Nascimento, S. C.; Honda, N. K.; Santos-Magalhães, N. S. 2003. In vitro and in vivo antitumoral activity of nanocapsules containing usnic acid. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** **39** (2): 328.

Vicente, C.; Solas, M. T.; Pereyra, M. T.; Pereira, E. C.; Pedrosa, M. M. 1995. Immobilization of lichen cells and enzymes for bioproduction of lichen metabolites: technical requirements and optimization of product recovering. **Flechten Follmann. Contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann 22**: 97-110.

Vijayakumar, C. S.; Viswanathan, S.; Reddy Kannappa, M.; Parvathavarthiwi, S.; Kundu, A. B.; Sukumar, E. 2000. Anti-inflammatory activity of (+) – usnic acid. **Fitoterapia 71**: 564-566.

Yamamoto, K.; Tosa, T.; Tamashita, K.; Shibata, I. 1976. Continuous production of L-malic acid by immobilizes *Brevibacterium ammoniagenes* cells. **European Journal Applied Microbiology 3**: 169-183.

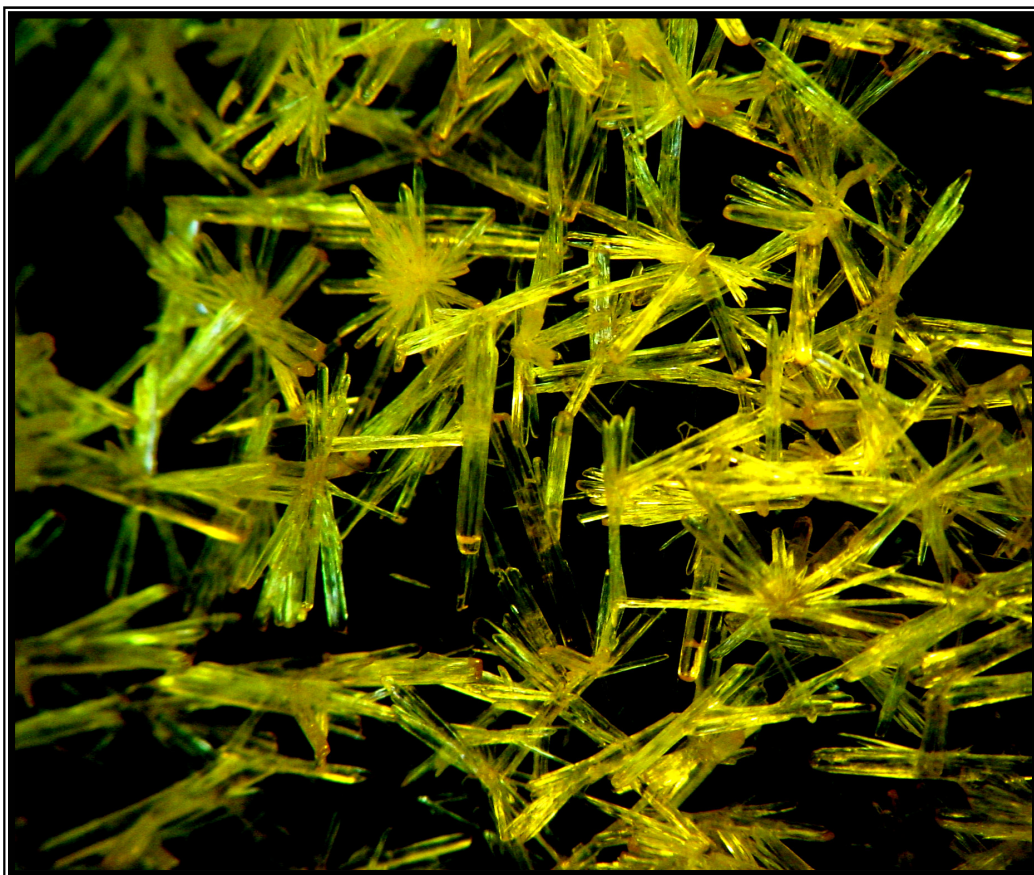


Figura 1. Cristais de ácido úsnico extraídos e purificados de *Cladonia substellata* Vainio
foto do autor

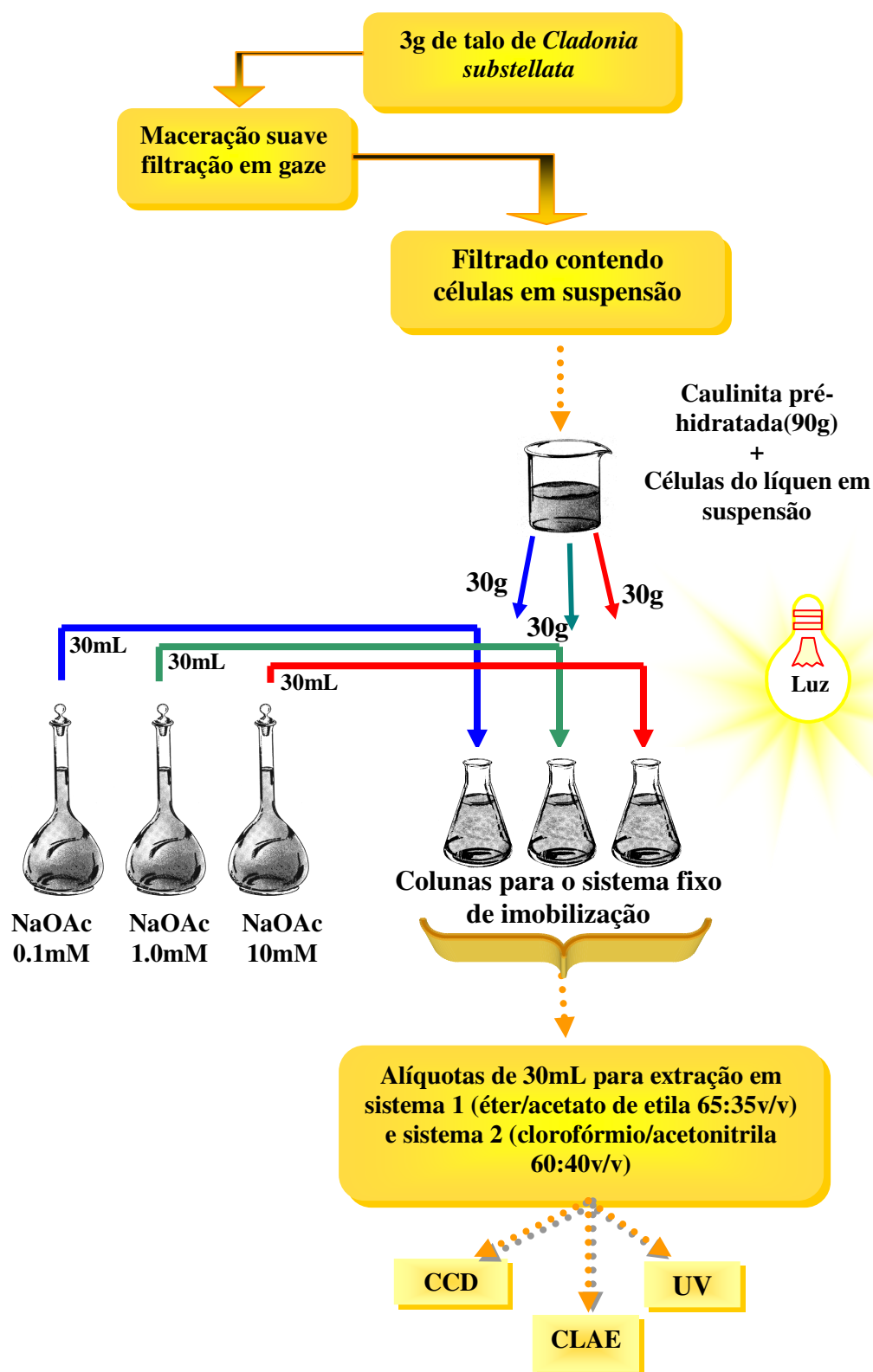


Figura 2. Sistema fixo de imobilização celular utilizando caulinita como matriz de enclausuramento e NaOAc como precursor biossintético de metabólitos líquênicos. NaOAc (acetato de sódio); CCD (cromatografia em camada delgada); CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência); UV (espectrofotometria em ultravioleta).

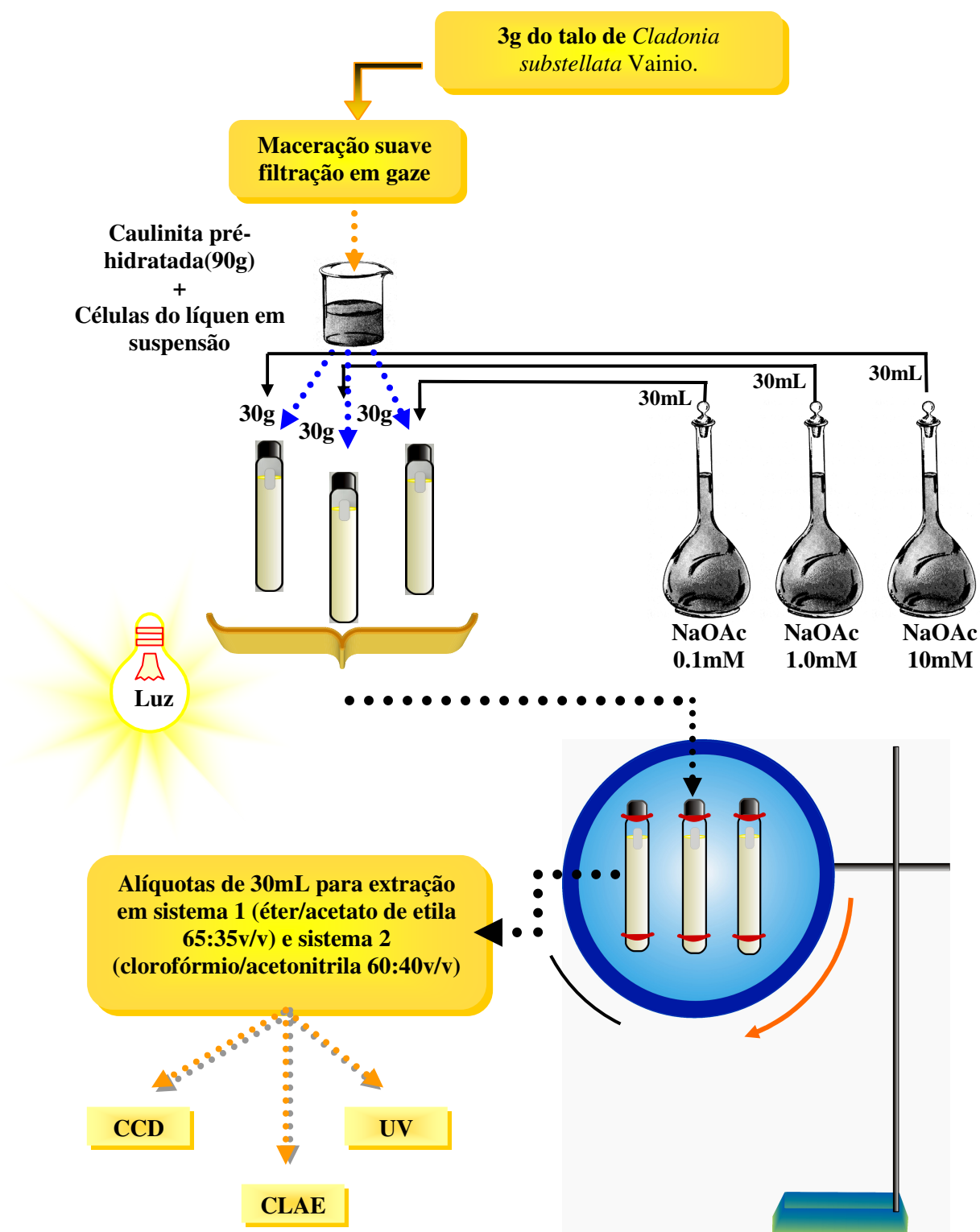


Figura 3. Sistema de imobilização celular com movimento, utilizando caulinita como matriz de enclausuramento e NaOAc como precursor biossintético de metabólitos líquênicos. NaOAc (acetato de sódio); CCD (cromatografia em camada delgada); CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência); UV (espectrofotometria em ultravioleta).

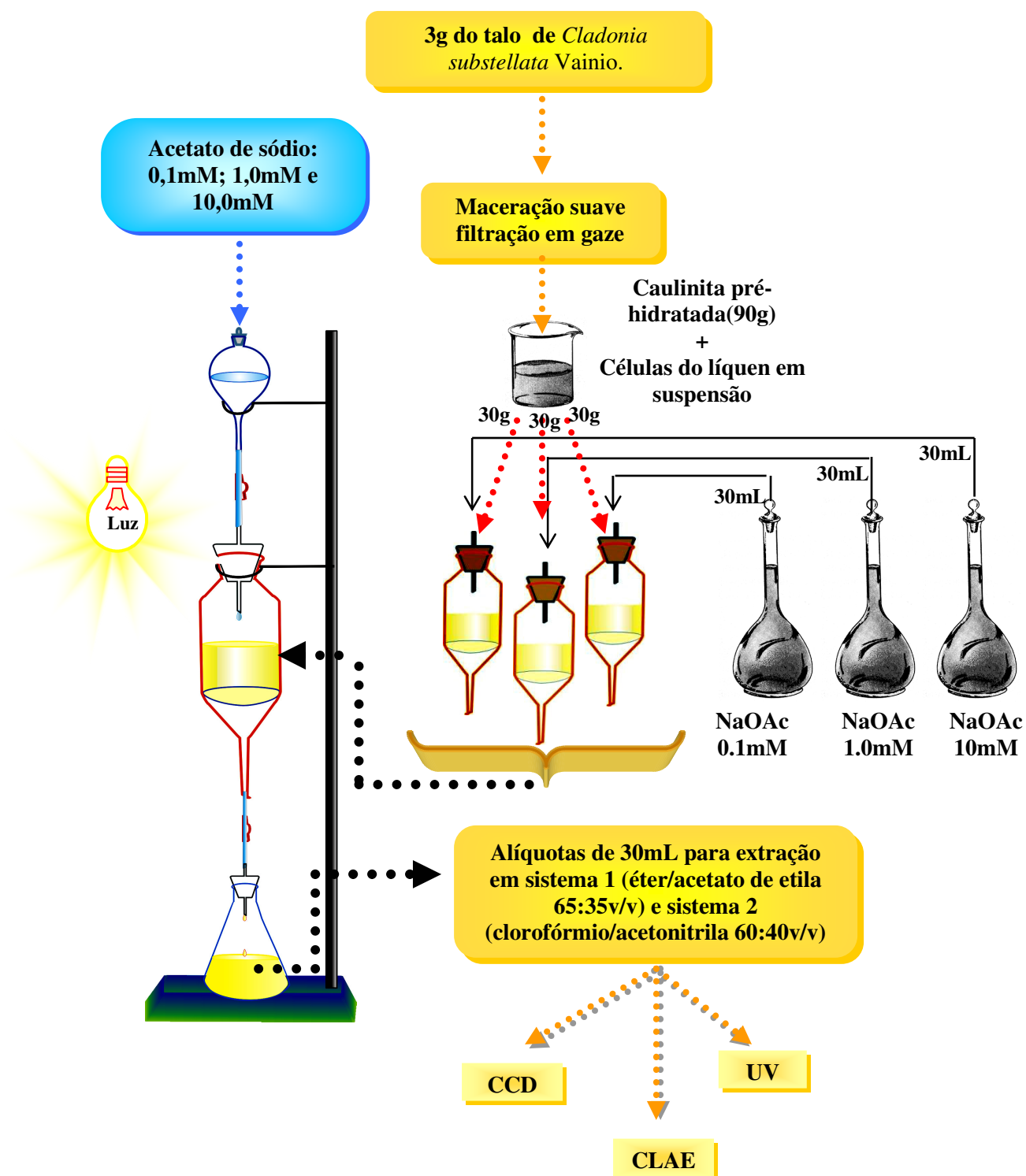


Figura 4. Sistema de imobilização celular em fluxo contínuo de acetato de sódio, precursor metabólico de *Cladonia substellata*, utilizando caulinite como matriz de enclausuramento. NaOAc (acetato de sódio); CCD (cromatografia em camada delgada); CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência); UV (espectrofotometria em ultravioleta).

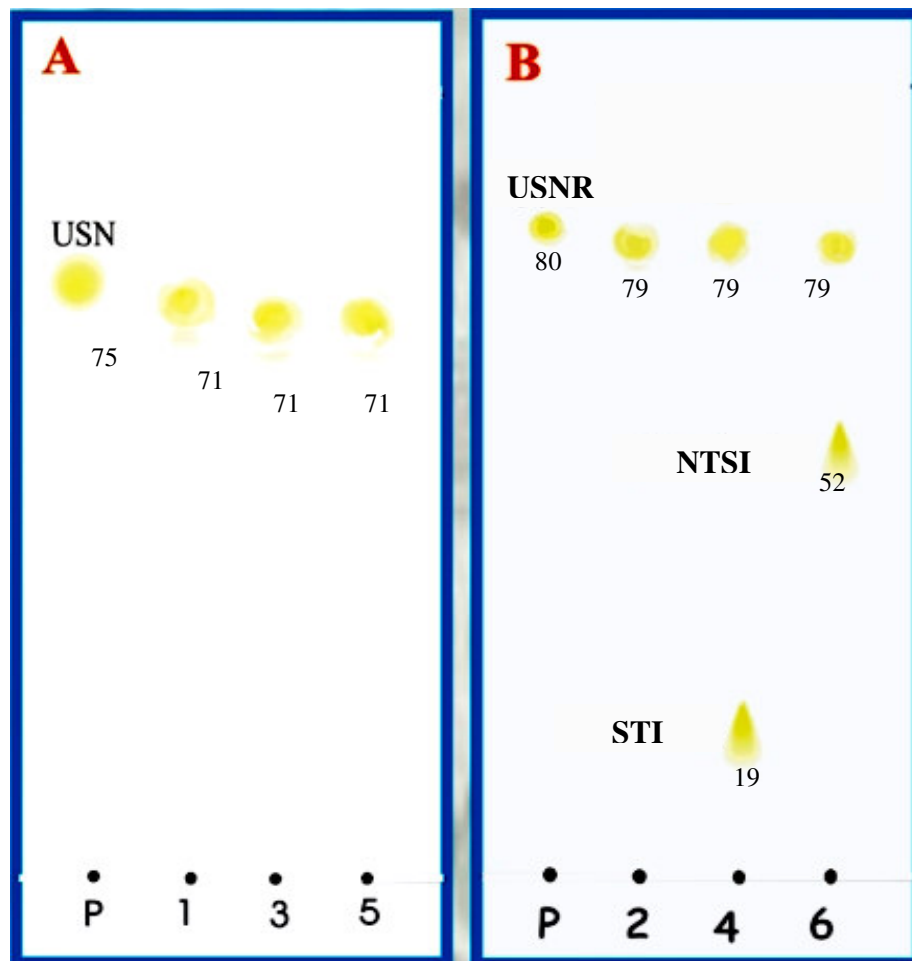


Figura 5. Cromatogramas em camada delgada indicando a presença de metabólitos produzidos por sistema fixo de imobilização de células de *C. substellata* e seus respectivos Rfs.

A – cromatograma indicando compostos extraídos em éter/acetato de etila 65:35 v/v, com precursor (acetato de sódio) a 10,0; 1,0 e 0,1 mM.

USN – ácido úsnico, USNR – ácido úsnico reduzido, NTSI – ácido nortístico, STI – ácido estítico.

P – padrão ácido úsnico purificado.

1 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 10,0mM de NaOAc.

3 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 1,0mM de NaOAc.

5 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 0,1mM de NaOAc.

B – cromatograma indicando compostos extraídos em clorofórmio/acetoneitrila de etila 60:40 v/v, com precursor (acetato de sódio) a 0,1; 10,0 e 1,0mM.

P – padrão ácido úsnico (USN)

2 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 0,1mM de NaOAc.

4 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 10,0mM de NaOAc.

6 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 1,0mM de NaOAc.

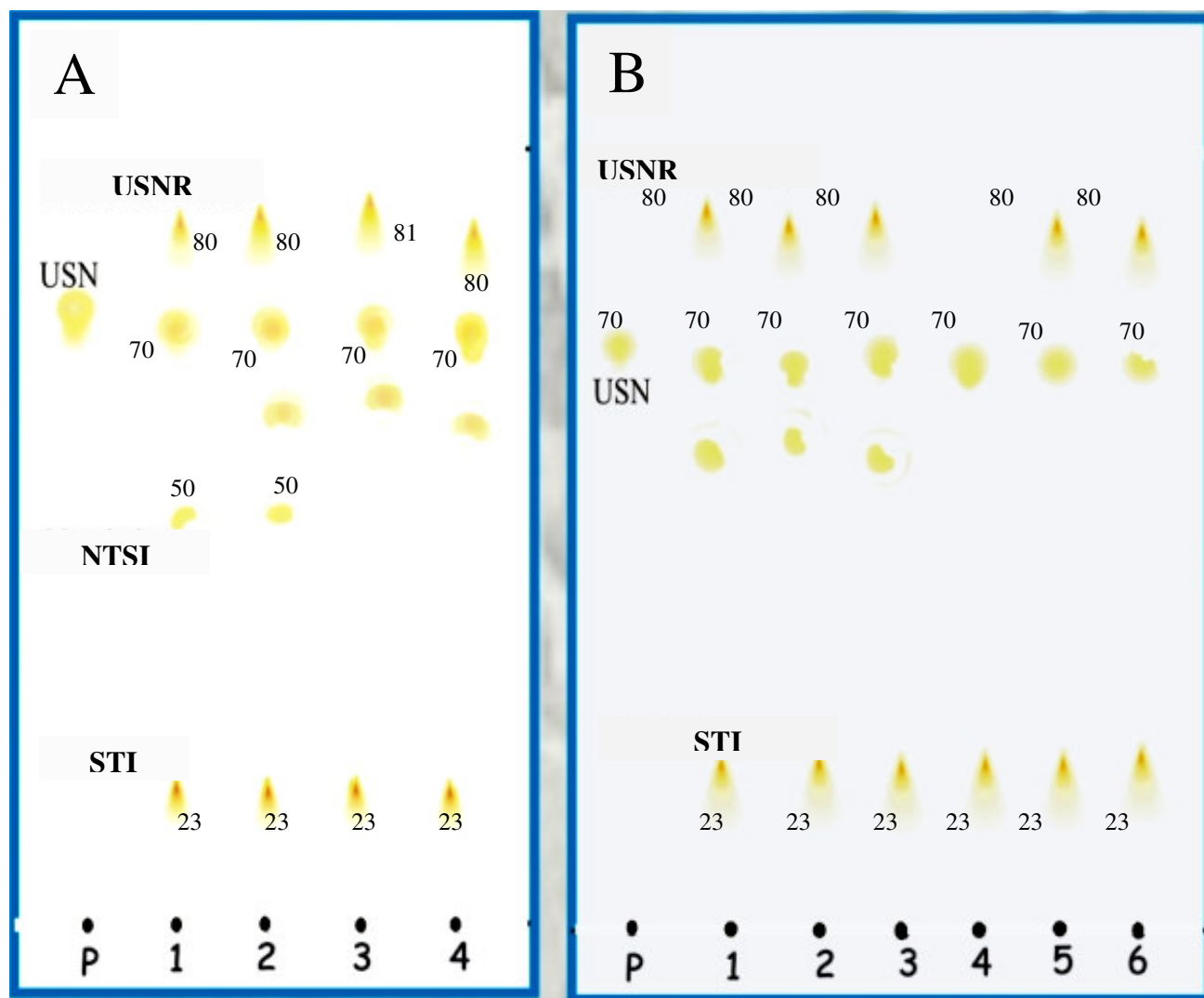


Figura 6. Cromatogramas de camada delgada indicando a presença de metabólitos produzidos por células de *C. substellata* imobilizadas em sistema de movimento e sob fluxo contínuo do precursor, e seus respectivos Rfs.

A– cromatograma indicando compostos extraídos em éter/acetato de etila 65:35 v/v (1C e 2C) e clorofórmio/acetonitrila 60:40v/v (3C e 4C) com precursor (acetato de sódio), a 1,0 e 10,0mM no sistema de movimento.

USN – ácido úsnico, USNR – ácido úsnico reduzido, NTSI – ácido nortístico, STI – ácido estítico.

P– padrão ácido úsnico purificado

- 1– Extrato dos eluatos celulares mantidos a 1,0mM de NaOAc.
- 2– Extrato dos eluatos celulares mantidos a 10,0mM de NaOAc.
- 3– Extrato dos eluatos celulares mantidos a 1,0mM de NaOAc.
- 4– Extrato dos eluatos celulares mantidos a 10,0mM de NaOAc.

B– cromatograma indicando compostos extraídos em éter/acetato de etila 65:35 v/v (1D, 2D e 3D) e clorofórmio/acetonitrila 60:40v/v (4D, 5D e 6D) com precursor (acetato de sódio) a 1,0; 0,1 e 10,0mM no sistema sob fluxo contínuo.

P – padrão ácido úsnico purificado

- 1 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 10,0mM de NaOAc.
- 2 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 1,0mM de NaOAc.
- 3 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 0,1mM de NaOAc.
- 4 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 0,1mM de NaOAc.
- 5 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 1,0mM de NaOAc.
- 6 – Extrato dos eluatos celulares mantidos a 10,0mM de NaOAc.

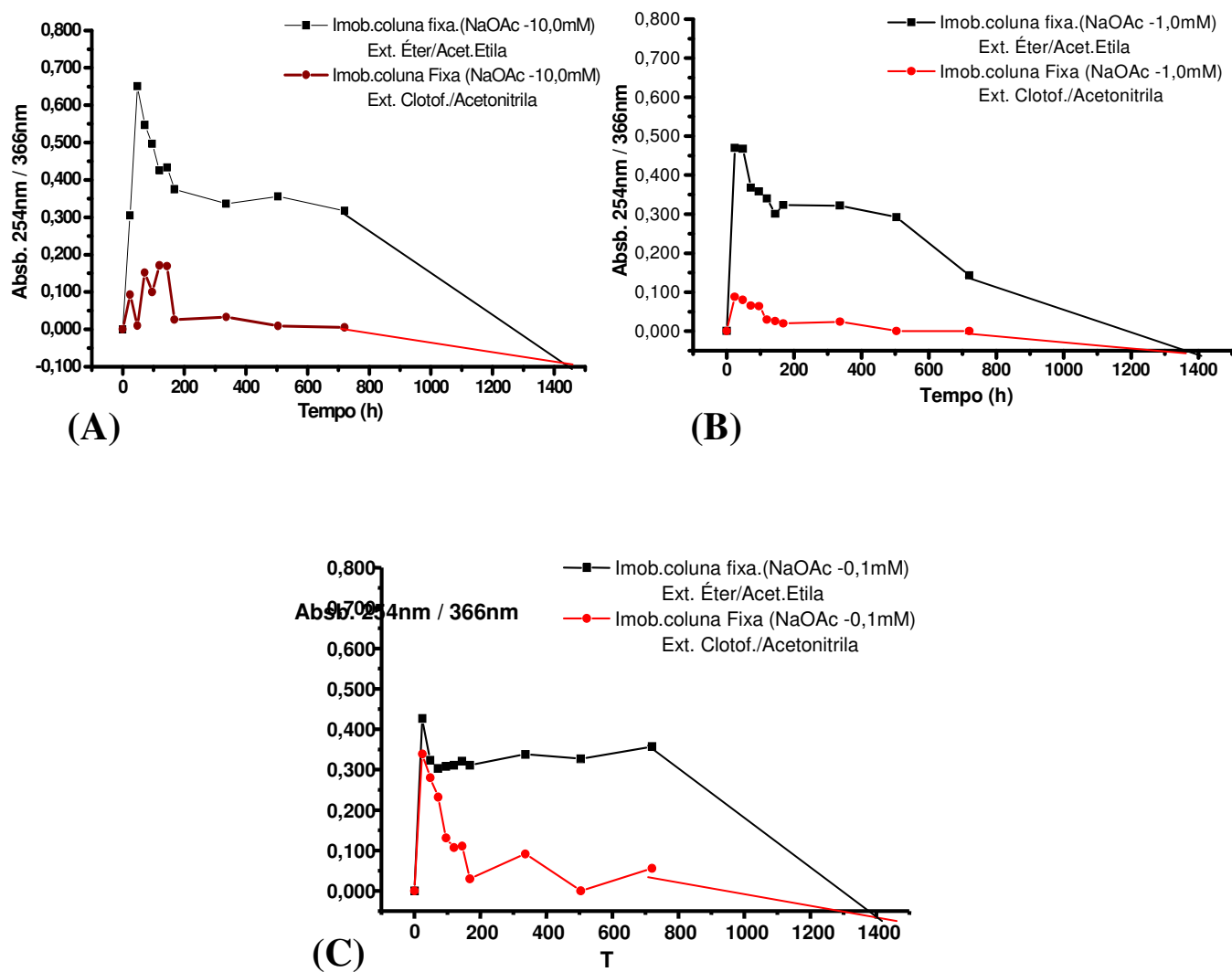


Figura 7. Produção de fenóis por células imobilizadas de *C. stellata* em sistema fixo usando como precursor acetato de sódio (NaOAc) a 10,0mM (A), 1,0 mM (B) e 0,1mM (C).

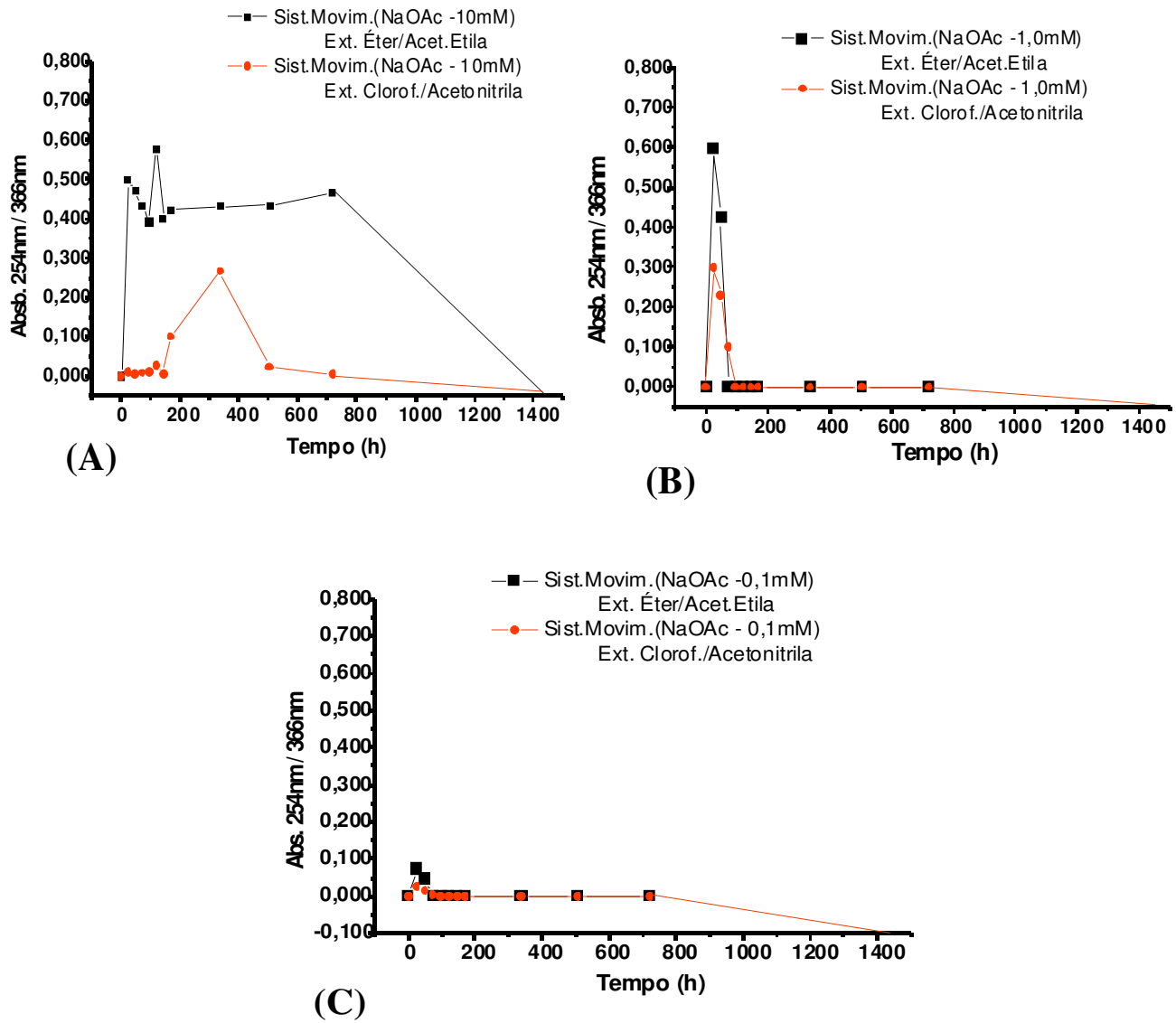


Figura 8. Produção de fenóis por células imobilizadas de *C. substellata* com sistema em movimento, usando como precursor acetato de sódio (NaOAc) a 10,0mM (A), 1,0 mM (B) e 0,1mM (C).

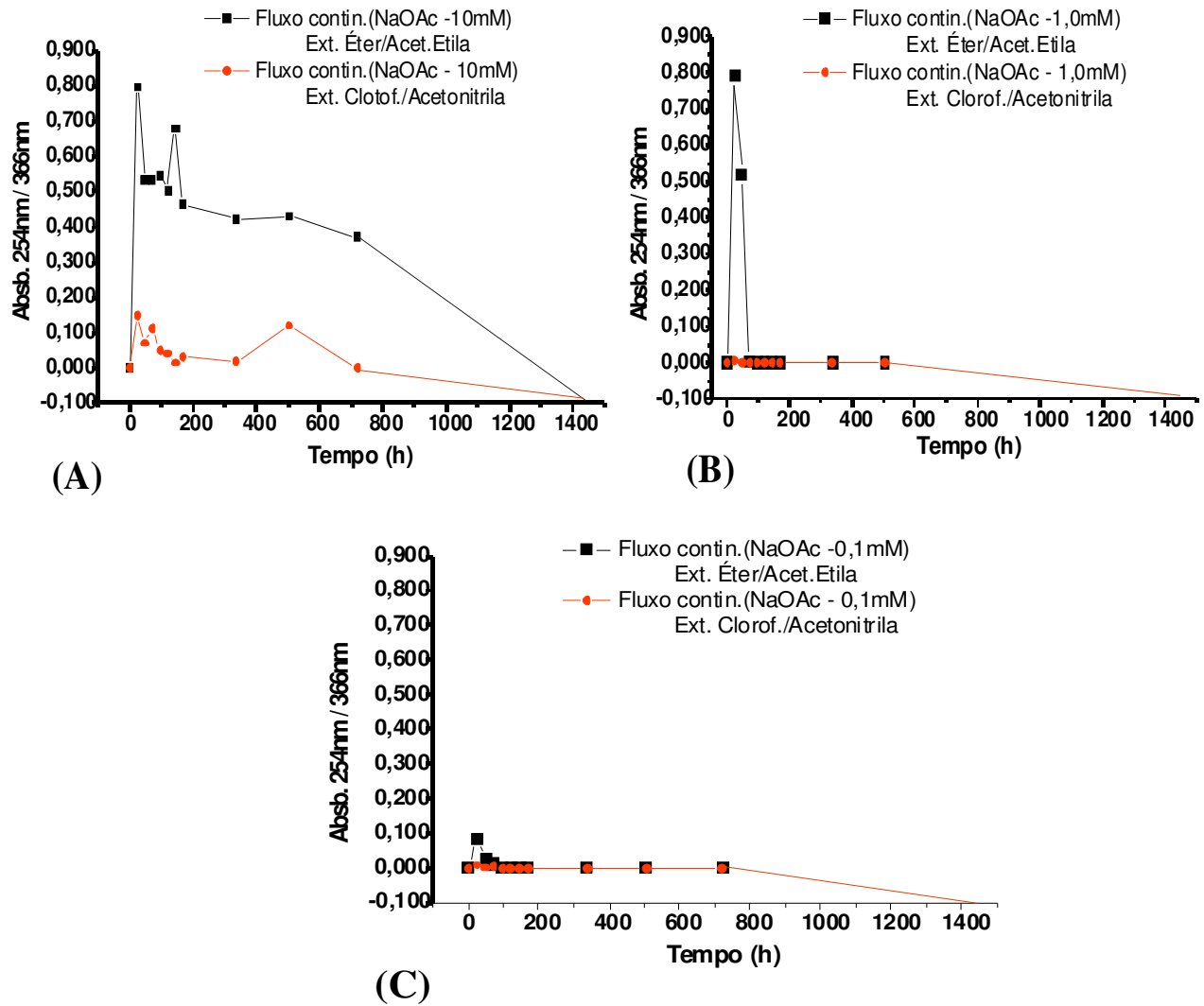


Figura 9. Produção de fenóis por células imobilizadas de *C. substellata* em sistema com fluxo contínuo, usando como precursor acetato de sódio (NaOAc) a 10,0mM (A), 1,0 mM (B) e 0,1mM (C).

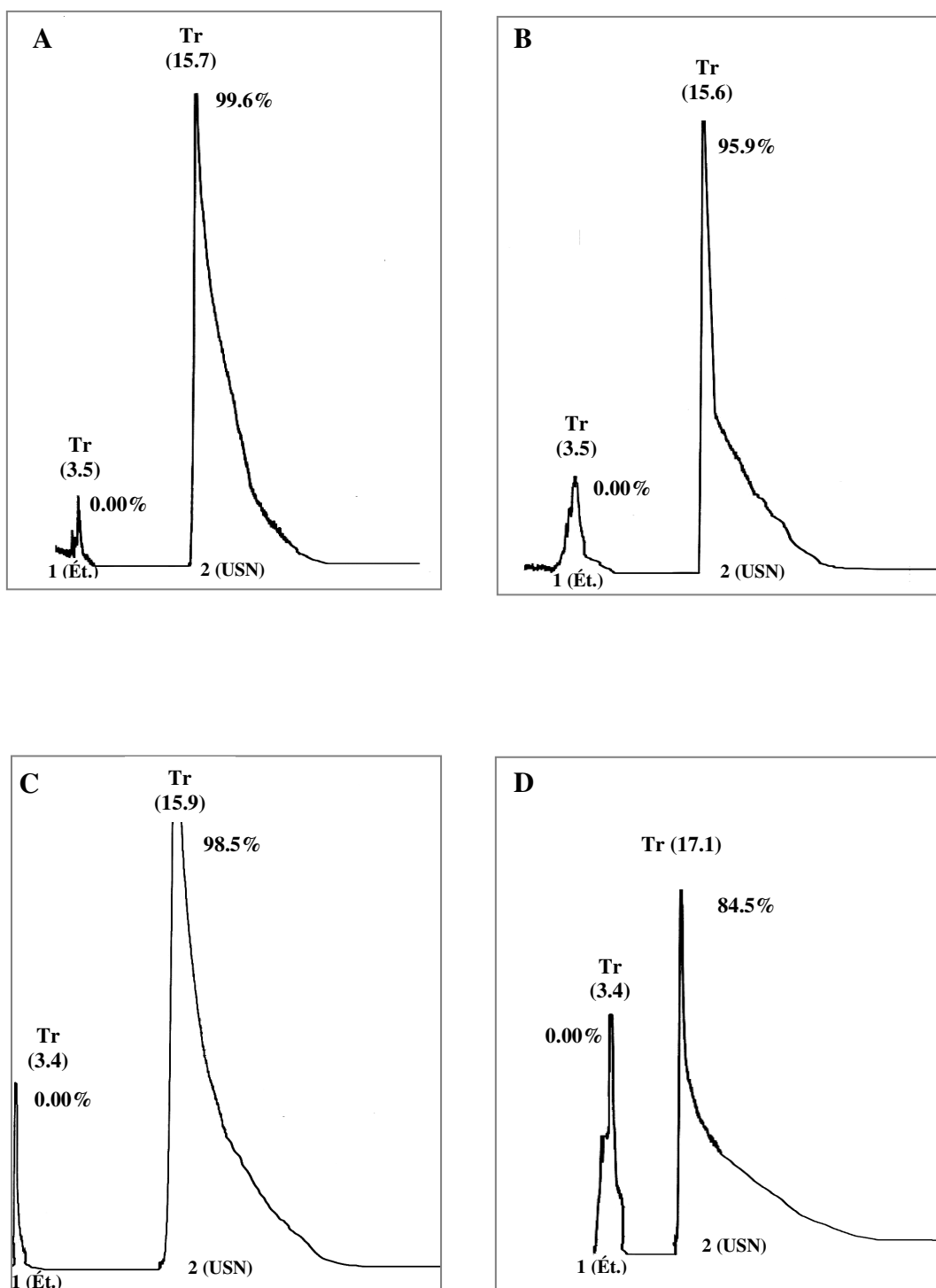


Figura 10. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicando a presença de ácido úsnico nos extratos orgânicos etéreo (B), clorofórmico (C) e acetônico (D), obtidos de *C. substellata* e padrão Merck (A). USN (ácido úsnico); Tr (tempo de retenção); Ét.(solvente éter).

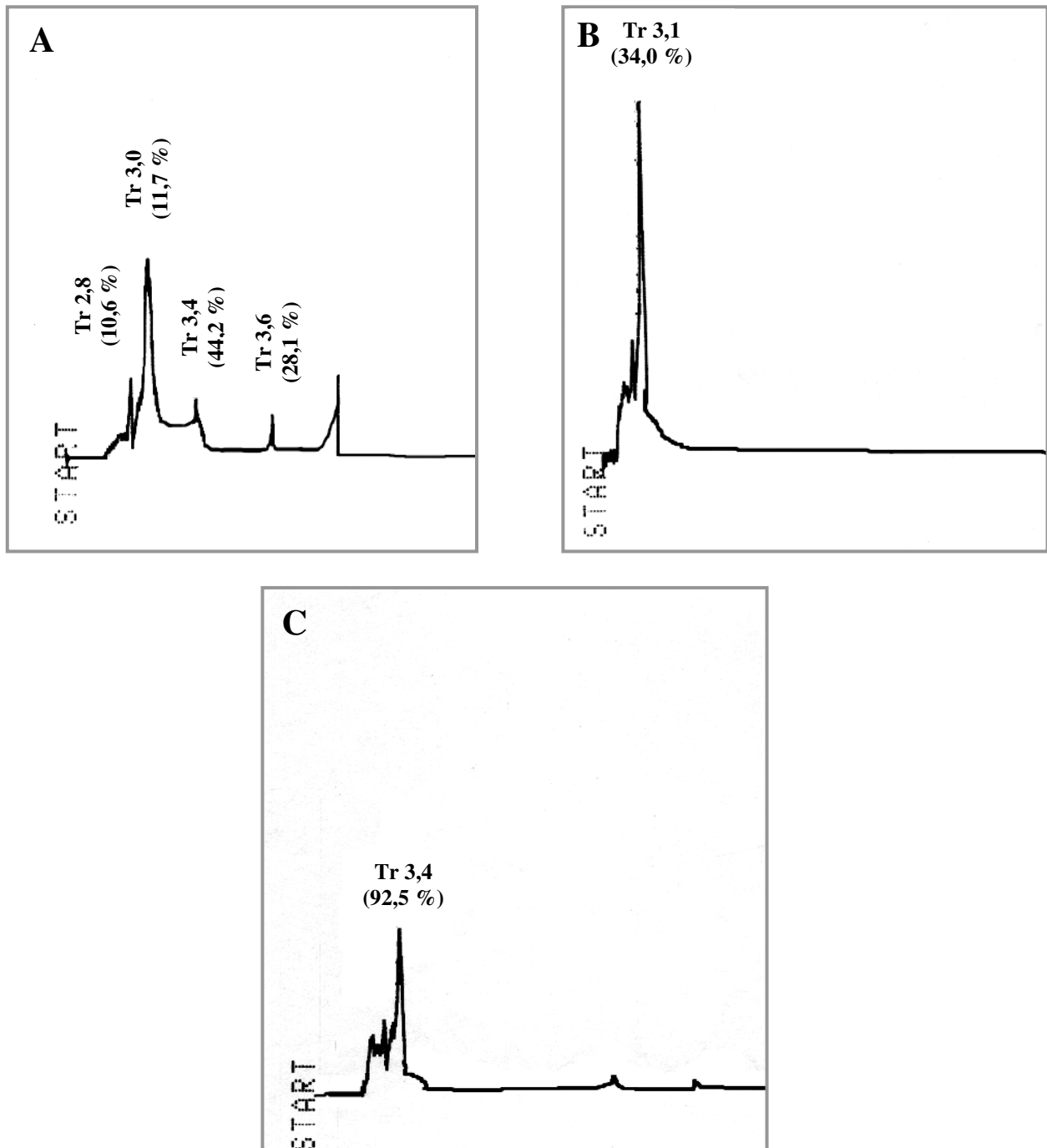


Figura 11. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos eluatos do sistema fixo de imobilização em presença do precursor a 10,0; 1,0 e 0,1 mM de *C. substellata*.

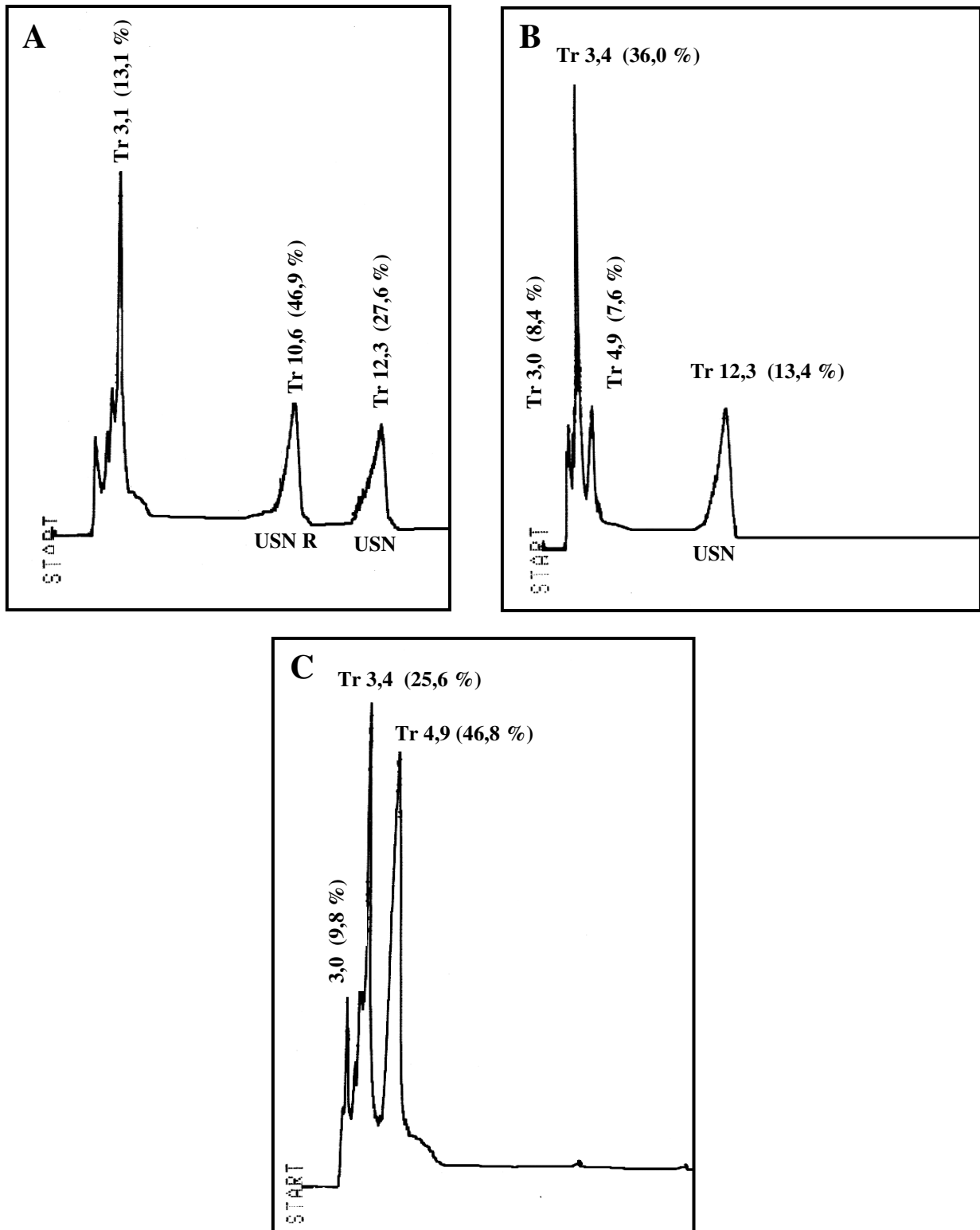


Figura 12. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos eluatos do sistema em movimento de imobilização em presença do precursor a 10,0; 1,0 e 0,1 mM. de *C. substellata*.

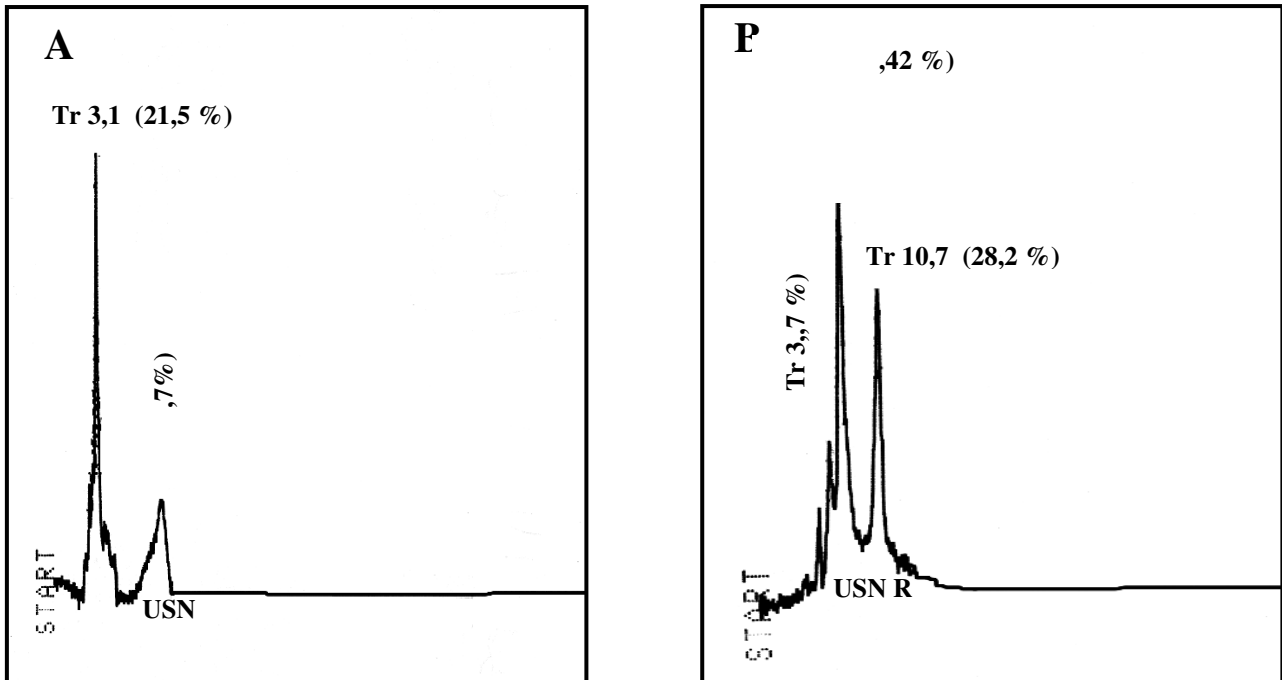


Figura 13. Cromatogramas em coluna líquida de alta eficiência (CLAE) dos eluatos do sistema sob fluxo contínuo em presença do precursor a 10,0; 1,0 e 0,1 mM de *C. substellata*.

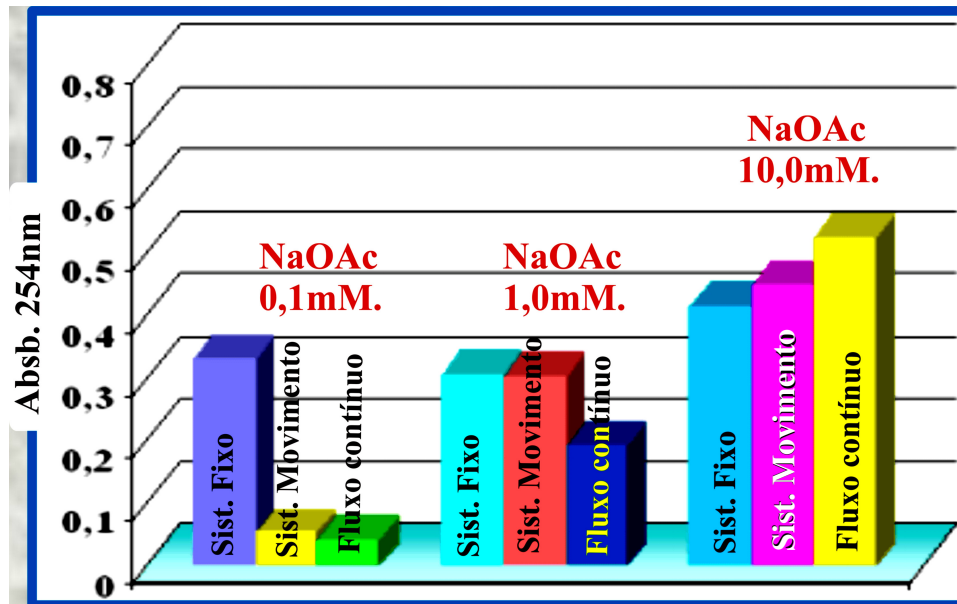


Fig.14. Produção total de compostos fenólicos nos três sistemas de imobilização celular de *C. substellata*, em presença do precursor (NaOAc) nas três concentrações 0,1, 1,0 e 10,0mM. Obtida do somatório da produção na três concentrações do precursor em cada sistema.

6. CONCLUSÃO

1. Os experimentos demonstram que os três métodos de imobilização celular para produção do ácido úsnico de *Cladonia substellata* são viáveis.
2. Destacam-se os sistemas em movimento e sob fluxo contínuo nas concentrações de 10,0 e 1,0mM de NaOAc, sendo que o sistema sob fluxo contínuo do precursor (NaOAc), na concentração de 10,0mM, apresentou um melhor desempenho para a produção do referido composto fenólico.
3. As células liquênicas imobilizadas nos sistemas em movimento e sob fluxo contínuo, na concentração de 1,0mM de NaOAc, aparentemente não permanecem viáveis por muito tempo, quando comparadas às células do sistema fixo de imobilização sob a mesma concentração do precursor.
4. A produção muito baixa observada no sistema em movimento e sob fluxo contínuo na concentração de 0,1mM de NaOAc, provavelmente indica que houve perda da atividade celular logo após os primeiros 3 dias de imobilização celular. Esse fenômeno também foi observado no sistema sob fluxo contínuo na concentração de 1,0mM de NaOAc.

7. ANEXOS

**7.1 Trabalho enviado ao 55^o Congresso Nacional de Botânica
Viçosa, Minas Gerais.**

OPTIMIZATION OF BIOPRODUCTION OF LICHEN METABOLITES METHODS; USNIC ACID FROM *Cladonia substellata* VAINIO

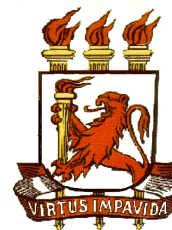
LIMA, Marcio James Gonçalves de²⁻⁴; MARTINS, Mônica Cristina Barroso²⁻⁴; SERAFIM, Alba Tatiana do Nascimento¹⁻⁴; PEREIRA, Eugênia Cristina³⁻⁵; SILVA, Nicácio Henrique da³⁻⁴. 1 Graduando; 2 Pós-Graduando; 3 Docente; 4 Departamento de Bioquímica; 5 Departamento de Ciências Geográficas/ CFCH. Universidade Federal de Pernambuco. PE. (mjgl3@hotmail.com.br).

Since centuries ago lichens have been used as perfum fixative and antibiotics, among other utilities. Due to its application in a large scale, huge amounts of lichen are destroyed, and its reposition is very slow. This way the collect should be very criterious for do not extinguish the lichenized micota. For this reason, studies concerning the production of lichen metabolites without use of large quantities of thalli are the solution. In this paper, there are demonstrated different techniques of producing usnic acid, a bioactive lichen compound synthesized by *Cladonia substellata*, in a more effective way than the traditional method of bioproduction. This method was compared with an immobilized system kept in movement and other one in a continuous flow by dropping, using kaolinite as entrapment and sodium acetate as precursor. Aliquots were subtracted and extract with organic solvents and analysis UV spectrophotometer (254nm). It was observed that the immobilized cells in movement system and continuous flow produce a highest content of substances and for a more long time in relation to the fix (or traditional) system. Chromatographic assays indicated the usnic acid production in all evaluated systems.

**7.2 Trabalho enviado a VIIª Reunião Regional da SBBq e 2nd Internacional
Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology
Recife - Pernambuco.**



OPTIMIZATION OF BIOPRODUCTION OF LICHEN METABOLITES METHODS; USNIC ACID FROM *Cladonia substellata* VAINIO



Marcio J. G. de Lima^{2,4}; Mônica C. B. Martins^{2,4}; Alba T. N. Serafim^{1,4}; Eugênia C. Pereira^{3,5}; Nicácio H. da Silva^{3,4}. 1 Graduando; 2 Pós-Graduando; 3 Docente; 4 Departamento de Bioquímica; 5 Departamento de Ciências Geográficas/ CFCH. Universidade Federal de Pernambuco. PE.

Universidade Federal de Pernambuco – Email: mjgl3@hotmail.com – Rua da Amizade 156, 33B – Graças, Recife – PE, CEP – 52011-260

Since centuries ago lichens have been used as perfum fixative and antibiotics, among other utilities. Due to its application in a large scale, huge amounts of lichen are destroyed, and its reposition is very slow. This way the collect should be very criterious for do not extinguish the lichenized micota. For this reason, studies concerning the production of lichen metabolites without use of large quantities of thalli are the solution. In this paper, there are demonstrated different techniques of producing usnic acid, a bioactive lichen compound synthesized by *Cladonia substellata*, in a more effective way than the traditional method of bioproduction. This method was compared with an immobilized system kept in movement and other one in a continuous flow by dropping, using kaolinite as entrapment and sodium acetate as precursor. Aliquots were subtracted and extract with organic solvents and analysis UV spectrophotometer (254nm). It was observed that the immobilized cells in movement system and continuous flow produce a highest content of substances and for a more long time in relation to the fix (or traditional) system. Chromatographic assays indicated the usnic acid production in all evaluated systems.

7.3 Normas para publicação do artigo na Acta Botânica.



ISSN 0102-3306 printed version
ISSN 1677-941X online version **INSTRUCTIONS TO AUTHORS**

- [Scope](#)
- [Preparation of manuscripts](#)

Scope

The **Acta Botânica Brasileira**, publishes in Portuguese, Spanish and English, original papers, short communication and abstracts of dissertations and thesis in Botany.

Preparation of manuscripts

The articles should be concise with at the most 30 typed pages (equivalent to 15 printed pages) including illustrations and tables. Four copies of the paper should also be included with the 3.5" diskette, for revision by the [Editorial board](#). Their format must be in Times New Roman, size 12, 1.5 spacing between lines on letter sized paper, with all margins 1.5 cm, using the Wordprocessing package Microsoft Word for Windows, version 6 or above. All pages should be numbered consecutively. Longer papers might be accepted but the extra-cost should be sponsored by the authors.

Latin or Greek words in the title or text, such as *in vivo*, *in vitro*, *in loco*, *et al.*, should be in italics.

The title should be written in capital letters and centralized.

The names of the authors should have the first letter only capitalized, below the title, and justified to the right. References to footnotes should be in Arabic numerals, after the authors names, indicating the complete address and data and information about the work (part of a thesis, congress presentation, etc.), where necessary, after the title. The footnote should be separated from the main text by a horizontal line.

The manuscript format should contain:

- **RESUMO and ABSTRACT** (Use capitalized letters and bold for these subtitles): It should occupy a single paragraph with about 200 words, followed by up to five keywords. It should be a concise summary in Portuguese, of the objectives, material and methods, results and conclusions. One should not cite bibliographic references, or information not found in the manuscript. A short title should come before the summary. The same rules apply to the abstract, written in English and followed by the keywords. The English abstract is obligatory and should follow the same rules.

- **Introduction**: It should have the first letter only capitalized, in bold, justified to the left and give a clear and concise view of: a) revision of studies relevant to the objective of the work; b) issues that lead the author to conduct the research; c) objectives.

- **Material and Methods:** It should have the first letter only capitalized, in bold, justified to the left and should contain brief descriptions of the work, enough to permit the research to be repeated, and any techniques published should be cited and not described.

- **Results and discussion:** It should have the first letter only capitalized, in bold, justified to the left and could contain tables and figures (charts, photographs, drawings, maps and illustrations) only when essentially needed to understand the text. Depending on the work, results and discussion can be joined or presented separately.

Tables and Figures should be numbered in independent series, in Arabic numerals placed at the bottom right and should be presented on separate sheets at the end of the text (original plus three copies). The Figures should be no more than twice the size that in press. The area available for them, including the legend is 15 cm wide and 21 cm high. They could be drawn in Indian ink or from a Windows program, with a scale placed at the left side of the figure. Botanical illustrations should be drawn in Indian ink on tracing paper or cardboard.

Numbers and letters should be sufficiently large to be easily legible when reduced. Letters should be placed below and to the right of the drawing.

Photographs should be on glossy black and white paper. **Color photos can be accepted by the Editorial Board but the authors should sponsor the costs.**

Tables and Figures must be referred to in the text in abbreviated form (singular) with the initial letter in capitals (Fig., Tab.).

Abbreviations and symbols, when used for the first time, should be preceded by their meaning in full. eg: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Measures should be abbreviated. eg: 11 cm; 2,4 µm.

Only numbers from one to ten should be written in full unless it is a unit of measure or is in combination with other numbers. eg.: four trees; 2,0 mm; 1-4µm; 125 vouchers.

For taxonomic and flora work only the botanical vouchers examined which are representative of the taxon in question should be cited in the following order:

COUNTRY (capitalized and bold), state (bold), municipality, date (the month in roman numerals), phenology (where possible), collectors name and number (italics), and the herbarium code. Eg: **BRASIL, São Paulo:** Santo André, 03/XI/1997, fl. fr., Milanez 435 (SP).

In the case of more than 3 collectors cite the first followed by *et al.* Ex: *Silva et al.*

Character keys should be indented and the author names of the taxa should not appear. The taxa in the keys when cited in the text, should be numbered in alphabetic order. Example:

- 1. Terrestrial plants
- 2. Folhas orbiculares, mais de 10cm diâm **4. *S. orbicularis***
- 2. Folhas sagitadas, menos de 8cm compr. **6. *S. sagittalis***
- 1. Aquatic plants
- 3. Nervuras paralelas
- 4. Flores brancas **1. *S. albicans***
- 4. Flores roxas **5. *S. purpurea***
- 3. Nervuras furcadas
- 5. Frutos oblongos **2. *S. furcata***
- 5. Frutos esféricos **3. *S. nanuzae***

The taxonomic treatment should use italics and bold together only for valid names. Basonyms and synonymes should be in italics only. Authors of the scientific names should be abbreviated, according to the current taxonomic list of the group (eg. Brummit & Powell, 1992, for plant names).

- 1. ***Sepulveda albicans*** L., Sp. pl. 2: 25. 1753.
- 2. *Pertencia albicans* Sw., Fl. bras. 4: 37, t. 23, f. 5. 1870.
- 3. *Cabralia zeleyensis* Anisio, Hoehnea 33(2): 65. 1995.

Fig. 1-12.

Subtitles within Materials and Methods and Results should be written with the initial letter in capitals, followed by a dash and the text in the same line. Eg. Study area - localized....

Results and discussion should include the conclusions.

- **Acknowledgements** (with the initial letter in capitals, bold, and left justified): should be succinct.

- **Bibliographic references**

- Within the text: first author, then date. eg. Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva *et al.* (1997) or Silva (1993;1995), Santos (1995;1997) or Silva 1975;Santos 1996; Oliveira 1997).

- At the end of the article: the initial letter in capitals, and left justified; in alphabetical and chronological order of the authors; the names of the journals and book titles should be written in bold and in full. Examples:

Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva *et al.* (1997) ou Silva (1993; 1995), Santos (1995; 1997) ou (Silva 1975; Santos 1996; Oliveira 1997).

- ao final do artigo: em caixa alta e baixa, deslocado para a esquerda; seguir ordem alfabética e cronológica de autor(es); nomes dos periódicos e títulos de livros devem ser grafados por extenso e em negrito. Exemplos:

Santos, J. 1995. Estudos anatômicos em Juncaceae. Pp. 5-22. In: **Anais do XXVIII Congresso Nacional de Botânica**. Aracaju 1992. HUCITEC Ed. V. I. São Paulo.

Santos, J.; Silva, A. & Oliveira, B. 1995. Notas palinológicas. Amaranthaceae. **Hoehnea** 33(2): 38-45.

Silva, A. 1996. **A família Urticaceae no Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Paraná, Londrina.

Silva, A. 1997. O gênero *Pipoca* L. no Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 2(1): 25-43.

Silva, A. & Santos, J. 1997. Rubiaceae. Pp. 27-55. In: F. C. Hoehne (Ed.). **Flora Brasilica**. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, São Paulo.

Congress summaries will not be accepted as bibliographic references. Citations of dissertations and theses should be avoided where possible.

For more details consult the [most recent volumes](#) of the journal or the internet link www.botanica.org.br.

© 2002-2004 Sociedade Botânica do Brasil

Caixa Postal 4005
01061-970 São Paulo SP Brasil
Tel.: +55 61 347-5349
Fax: +55 61 307-2786



sbb@botanica.org.br