

N ° 80
Tese de
Doutorado

EFEITOS DAS RADIAÇÕES GAMA E ULTRAVIOLETA
SOBRE *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. (LÍQUEN)
COLETADO EM DIFERENTES AMBIENTES DO
NORDESTE DO BRASIL

AUTORA: HELENA PAULA DE BARROS SILVA

RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL
DEZEMBRO – 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
ENERGÉTICAS E NUCLEARES (PROTEN)

HELENA PAULA DE BARROS SILVA

**EFEITOS DAS RADIAÇÕES GAMA E ULTRAVIOLETA SOBRE *Cladonia
verticillaris* (Raddi) Fr. (LÍQUEN) COLETADO EM DIFERENTES AMBIENTES
DO NORDESTE DO BRASIL**

**RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL
DEZEMBRO – 2011**

**EFEITOS DAS RADIAÇÕES GAMA E ULTRAVIOLETA SOBRE *Cladonia*
verticillaris (Raddi) Fr. (LÍQUEN) COLETADO EM DIFERENTES AMBIENTES
DO NORDESTE DO BRASIL**

HELENA PAULA DE BARROS SILVA

**EFEITOS DAS RADIAÇÕES GAMA E ULTRAVIOLETA SOBRE *Cladonia
verticillaris* (Raddi) Fr. (LÍQUEN) COLETADO EM DIFERENTES AMBIENTES
DO NORDESTE DO BRASIL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor. Área de Concentração: Aplicação de Radioisótopos no Meio Ambiente e Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Waldecir Colaço

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eugênia C. G. Pereira

**RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL
DEZEMBRO – 2011**

S586e **Silva, Helena Paula de Barros.**

Efeitos da radiação gama e ultravioleta sobre *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. (líquen) coletado em diferentes ambientes do Nordeste do Brasil. / Helena Paula de Barros Silva. - Recife: O Autor, 2011.

69 f. : il., gráf.

Orientador: Prof. Dr. Waldeciro Colaço.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2011.

Inclui Referências Bibliográficas.

1. Ácido fumarprotocetrárico. 2. Clorofila Total.
3. Alhandra-PE. 4. Saloá-PE. I. Colaço, Waldeciro.
(orientador). II. Título.

571.45 CDD (21. ed.)

UFPE/BDEN/2012-003

**EFEITOS DAS RADIAÇÕES GAMA E ULTRAVIOLETA SOBRE
Cladonia Verticillaris (Raddi) Fr. (Líquén) COLETADO EM
DIFERENTES AMBIENTES DO NORDESTE DO BRASIL**

Helena Paula de Barros Silva

APROVADA EM: 20.12.2011

ORIENTADOR: Prof. Dr. Waldecir Colaço

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Waldecir Colaço – DEN/UFPE

Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão – CAV/UFPE

Prof. Dr. Francisco Fernandes Amâncio – DBR/UFPE

Prof. Dr. Elmo Silvano de Araújo – DEN/UFPE

Prof. Dr. José Nildo Tabosa – IPA/PE

Visto e permitida a impressão

Coordenador do PROTEN/UFPE-CRCN-NE/CNEN

Aos meus pais,

Ao meu querido Léo,

Ao meu “Raio de Sol” Julia.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade de estudar em uma Universidade pública e de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, onde tive a oportunidade de cursar o Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos para a realização do curso.

Ao Departamento de Bioquímica, em Especial ao Laboratório de Produtos Naturais, da Universidade Federal de Pernambuco, onde desenvolvi parte da minha pesquisa e construí verdadeiros laços de amizade.

Ao Gammalab, do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, pela irradiação das amostras.

A Central Analítica do Departamento de Química Fundamental, em especial a Técnica Abene, pelas análises em Cromatografia Líquida (HPLC).

Aos professores do Departamento Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Elmo Araújo, chefe da Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares/DEN/UFPE, pelas orientações durante o curso.

Em especial, aos professores orientadores: Prof. Dr. Waldeciro Colaço, do Departamento de Energia Nuclear, que me recebeu novamente de braços abertos, colocando todas as dificuldades em segundo plano, e pela orientação indispensável para a realização da pesquisa; Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva, do Departamento de Bioquímica, por todos os ensinamentos transmitidos com carinho, paciência e atenção; Prof^ª. Dra. Eugênia C. Pereira, do Departamento de Ciências Geográficas, que além da orientação científica imensurável foi/é minha amiga, me incentivando a buscar sempre o melhor, estando presente em todos os momentos relacionados ou não com a pesquisa.

Aos Membros do meu Comitê de Acompanhamento, Prof. Dr. Francisco Amâncio, Prof^a. Dra Ana Mendonça e Prof. Dr. Emerson Peter, pelas sugestões que contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa.

A Magali, Nilvania, Seu Edvaldo, Antonio (Seu Tonho), Maria (Lia) e Maria José (Dona Zeza), funcionários do DEN/UFPE, pela amizade e carinho.

Ao técnico do laboratório de Microbiologia do solo do Departamento de Energia Nuclear, João Batista da Silva Neto, por toda sua ajuda e motivação. E ao técnico do laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica, João Virgínio, por toda sua ajuda e atenção.

Aos meus colegas do Departamento de Energia Nuclear/UFPE; do Departamento de Ciências Geográficas/UFPE e do Laboratório de Produtos Naturais/UFPE.

Aos meus queridos amigos conquistados no decorrer da minha vida acadêmica, em especial a Cinthia; Mônica; Rafaela; Lurdes; Herika; Eveline, Maria Claudia e Patryk.

A Girlan Silva, pela elaboração do Mapa de Alhandra e Saloá. E a Dario Primo do DEN, pela grande ajuda com as análises estatísticas.

Aos meus queridos alunos, que sempre se mostraram interessados pela minha pesquisa e área de estudo.

Aos meus queridos alunos de IC, principalmente Pedro Hildon e Iwelton Madson, que contribuíram de forma imensurável para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus sogros e cunhados que sempre me apoiaram e estiveram prontos a ajudar. E aos meus pais, irmãos e sobrinhos que sempre estiveram presentes na minha formação pessoal e profissional.

A Leonardo (Léo) por todo seu amor, paciência, compreensão, amizade, companheirismo, dedicação, incentivo e por estar sempre pronto a me ajudar em todos os momentos da minha vida.

A minha Pequena Julia, por ter chegado ao mundo.

A Deus por estar sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

“Não adianta ter idéias brilhantes se não estamos dispostos a pô-las em prática.”

Fábulas de Esopo

RESUMO

SILVA, H. P. B. **Efeitos das radiações gama e ultravioleta sobre *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR (líquen) coletado em diferentes ambientes do Nordeste do Brasil.** 2011. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2011.

Os líquens produzem substâncias que se cristalizam na superfície externa do seu microbionte, funcionando como fotoprotetor. Quando submetidos a diferentes doses e tipos de radiação, estes são estimulados a produzir suas substâncias em quantidades diferenciadas daquelas que produziram sem a intervenção da mesma. O objetivo desta pesquisa foi quantificar e comparar características químicas (bioprodução do ácido fumarprotocetrarico-FUM, seu principal composto), e fisiológicas (Clorofila Total) em amostras de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., coletadas em dois diferentes ambientes do Nordeste brasileiro, antes e após submissão à radiação gama e ultravioleta. Amostras líquênicas foram coletadas nos municípios de Saloá-PE e Alhandra-PB, locais que apresentam características fisionômicas semelhantes, porém com diferentes altitudes. Amostras de *C. verticillaris* (12 g) foram submetidas a irradiador gama [Co-60 – irradiador, Gammacell 220 Excel, com taxas de dose de 7,795 kGy/h (03/02/2009) para as amostras de Saloá, e 7,144 kGy/h (29/10/2009) para as de Alhandra] nas doses de 0, 10, 50, 100, 500, 1000, 5.000 e 10.000 Gy, e, separadamente, submetidas à irradiação ultravioleta (lâmpada Philips Ultraviolet B – 20 W), nas doses de 0, 1, 3, 6, 9, 12 e 15 J/cm². Após irradiação, foram coletadas amostras de 1,5g do material líquênico e acondicionadas separadamente, para posterior análise. Os resultados indicaram maior produtividade aos 90 dias de experimento, onde amostras de Saloá e Alhandra bioproduziram 1,41 e 2,7 vezes a amostra controle quando expostas a 5000 e 500 Gy, respectivamente. Nas irradiadas com UVB, a bioprodução foi de 2,99 e 3,52 vezes a amostra controle, quando expostas a 9 e 6 J/cm², respectivamente. A produção de Clorofila total, em todas as amostras expostas à radiação gama ou UVB, apresentou-se inferior as amostras não irradiadas. As amostras de *C. verticillaris* coletadas em Alhandra, irradiadas com raios gama ou UVB, apresentaram uma maior produtividade de FUM que as provenientes de Saloá. Essa Pesquisa foi realizada no Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco no período de 2007 a 2011.

Palavras-Chaves: Ácido fumarprotocetrárico; clorofila total; Saloá-PE; Alhandra-PB.

SILVA, H. P. B. **Effect of gamma and ultraviolet radiation on *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR (lichen) collected in different environments. 2011 Thesis (PhD).** Graduate Program in Nuclear and Energy Technologies. Federal University of Pernambuco. Recife, 2011.

ABSTRACT

Lichens produce substances that crystallize on the outer surface of its mycobionte, acting as a photoprotector. When subjected to different doses and types of radiation lichens, are encouraged to produce their substances in different quantities from those that would produce without the intervention of radiation. In this context, the objective of this research was to quantify and compare chemical and physiological characteristics in samples of *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR (bioproduction of fumarprocetraric acid - FUM, its main secondary component, and determination of total chlorophyll) collected from two different environments in northeast, Brazil (Saloá state of Pernambuco and Alhandra, state of Paraíba, Brazil) before and after submission of exposition gamma and ultraviolet radiation, can thus identify potential differences in these bioproduction substances. Lichen samples were collected in Saloá-PE and Alhandra-PB, places that have similar physiognomic characteristics, but with different altitudes. Samples of *C. verticillaris* (12 g) were submitted to gamma irradiator (Co-60 - Radiator, 220 Gammacell Excel, dose rates 7,795 kGy/h (03/02/2009) for samples of Saloá, and 7,144 kGy/h (29/10/2009) of Alhandra), receiving doses of 0, 10, 50, 100, 500, 1000, 5.000 e 10.000 Gy, and separately submitted to ultraviolet irradiation in Philips Ultraviolet B light bulb - 20 W, receiving doses of 0,1, 3, 6, 9, 12 and 15 J/cm². Were collected samples of 1.5 g of lichen material and stored separately for posterior analysis. The results indicated hyper producing FUM at 90 days in which samples collected in Saloá increased their bioproduction in 1,41 and the Alhandra 2,7 for the samples irradiated with 5000 e 500 Gy, respectively. And 2,99 and 3,52 for irradiated with 9 and 6 J/cm² of UVB, respectively. The production of total chlorophyll in all samples exposed to gamma or UVB radiation, presented lower non-irradiated samples. The samples of *C. verticillaris* collected in Alhandra, irradiated with gamma rays or UVB, had a higher productivity of the FUM from Saloá. The research was carried in UFPE (Federal University of Pernambuco) during the period of 2007-2011.

Key-words: fumarprocetraric acid, total chlorophyll, Saloá-PE, Alhandra-PB.

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1	Representação do Espectro eletromagnético.	4
Figura 2	Representação da penetração da radiação ultravioleta na atmosfera.	7
Figura 3	Modelo esquemático do talo liquênico heterômero (A) e homômero (B).	9
Figura 4	Tipo de hábitos de líquens, A: folhoso; B: crostoso; C: arbustivo.	10
Figura 5	Coleta de <i>Cladonia verticillaris</i> (RADDI) Fr. em ambiente natural	11
Figura 6	Estrutura química da substância 2-[29-Hidroxi-49-oxopentil]-3,5-dimetil-4,6-dihidroxi-7-acetilbenzofurano.	18
Figura 7	Mapa indicando os locais de coleta das amostras liquênicas, onde: (A) Alhandra - PB; (B) Fazenda Brejo, Saloá - PE.	20
Figura 8	Irradiador, Gammacell 220 Excel.	21
Figura 9	Irradiação UVB em lâmpada Philips Ultraviolet B – 20W.	22
Figura 10	Montagem dos experimentos.	23
Figura 11	Obtenção dos extratos liquênicos.	24
Figura 12	Cromatografia ascendente em Camada Delgada.	25
Figura 13	Cromatógrafo LC-MS-IT TOF. Shimadzu.	25
Figura 14	Espectrofotômetro BIOCHROM® modelo Libra S 22.	26
Figura 15	Cromatografia em Camada Delgada dos extratos de <i>C. verticillaris</i> submetida à radiação gama (0; 10; 50; 100; 500; 1K; 5K e 10K Gy) e seus grupos controle: (A): extrato <i>in natura</i> de <i>C. verticillaris</i> ; (B): ácido Fumarprotocetrárico e (C): ácido Protocetrárico.	29

Figura 16	Cromatografia em Camada Delgada dos extratos de <i>C. verticillaris</i> submetida à radiação ultravioleta (0; 1; 3; 6; 9; 12 e 15 J/cm ²) e seus grupos controle (A): extrato <i>in natura</i> de <i>C. verticillaris</i> ; (B): ácido Fumarprotocetrárico; (C): ácido Protocetrárico e (D): Atranorina.	30
Figura 17	Curva de Calibração do ácido Fumarprotocetrarico.	31
Figura 18	Concentrações do ácido fumarprotocetrárico extraído dos talos de <i>C. verticillaris</i> , coletado em Saloá-PE, irradiados e não irradiados com radiação gama, em diferentes épocas de coleta.	32
Figura 19	Concentrações do ácido fumarprotocetrárico extraído dos talos de <i>C. verticillaris</i> , coletado em Alhandra-PB, irradiados e não irradiados com radiação gama, em diferentes épocas de coleta.	32
Figura 20	Produção de Ácido Fumarprotocetrárico (mg.mL ⁻¹) em função da dose de radiação gama (Gy) em diferentes épocas de coleta.	34
Figura 21	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Onde A: Ácido Fumarprotocetrárico (FUM); B: Atranorina (ATR); C: Extratos de <i>C. verticillaris</i> , provenientes de Saloá; D: Extratos de <i>C. verticillaris</i> provenientes de Alhandra.	39
Figura 22	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos orgânicos de <i>C. verticillaris</i> submetida a diferentes doses de radiação gama (10, 1000 e 10.000 Gy) após 90 dias de experimento. Onde FUM: Ácido Fumarprotocetrárico; ATR: Atranorina.	40
Figura 23	Teores de clorofila total extraídos de <i>C. verticillaris</i> , coletada em Saloá-PE, após irradiação gama em diferentes épocas de coleta.	43
Figura 24	Teores de clorofila total extraídos de <i>C. verticillaris</i> , coletada em Alhandra-PB, após irradiação gama em diferentes épocas de coleta.	43
Figura 25	Concentrações do ácido fumarprotocetrarico extraído dos talos de <i>C. verticillaris</i> , coletado em Saloá-PE, submetidos ou não a diferentes doses de radiação UVB, em diferentes épocas de coleta.	45
Figura 26	Concentrações do ácido fumarprotocetrarico extraído dos talos de <i>C. verticillaris</i> , coletado em Alhandra-PE, submetidos ou não a diferentes doses de radiação UVB em diferentes épocas de coleta.	46

Figura 27	Produção de Ácido Fumarprotocetrárico (mg.mL^{-1}) em função da dose de radiação ultravioleta (UVB) em diferentes épocas de coleta.	48
Figura 28	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos orgânicos de <i>C. verticillaris</i> submetida a diferentes doses de radiação UVB (1, 9 e 15 J/cm^2) após 90 dias de experimento. Onde FUM: Ácido Fumarprotocetrárico; ATR: Atranorina..	53
Figura 29	Teores de Clorofila Total extraídos de <i>C. verticillaris</i> , coletada em Saloá-PE, após irradiação UVB em diferentes épocas de coleta.	53
Figura 30	Teores de Clorofila Total extraídos de <i>C. verticillaris</i> , coletada em Alhandra-PE, após irradiação UVB em diferentes épocas de coleta.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UVA	Radiação Ultravioleta do tipo A (320 - 400nm)
UVB	Radiação Ultravioleta do tipo B (280 - 320nm)
UVC	Radiação Ultravioleta do tipo C (200 - 280nm)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
FUM	Ácido Fumaprotocetrário
TR	Tempo de Retenção
PRO	Ácido Protocetrário
ATR	Atranorina
PE	Pernambuco
PB	Paraíba
As'	Clima quente e úmido com chuvas de outono-inverno
BShs'	Clima quente e seco com vegetação de caatinga com chuvas de outono-inverno
Cs'a	Clima mesotérmico úmido com chuvas de outono-inverno e verões quentes

	SUMÁRIO	PÁGINA
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	Radiações	4
2.1.1	Radiações ionizantes	5
2.1.1.1	Estágios da interação da radiação ionizante com os sistemas biológicos	5
2.1.2	Radiações não- ionizantes	6
2.1.2.1	Efeito biológico da radiação ultravioleta	7
2.2	Radiações e líquens	8
2.3	Os líquens	8
2.3.1	Características gerais	8
2.3.2	A espécie <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fries	10
2.3.2.1	Áreas de coleta do líquen <i>Cladonia verticillaris</i>	11
2.3.3	Substâncias liquênicas	12
2.3.4	Característica fisiológica estudada	13
2.4	Efeitos das radiações nos líquens	14
2.4.1	Radiação gama	14
2.4.2	Radiação Ultravioleta	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Coleta e acondicionamento do material liquênico	20
3.2	Irradiação do material liquênico	21
3.2.1	Exposição gama em fonte de Co ⁶⁰	21
3.2.2	Exposição Ultravioleta B	22

3.3	Montagem dos experimentos	22
3.4	Coleta do material liquênico	23
3.5	Análises fisiológica e química dos líquens	23
3.5.1	Análise de fenóis liquênicos	24
3.5.1.1	Obtenção de extratos orgânicos	24
3.5.1.2	Cromatografia em Camada Delgada para detecção de fenóis	24
3.5.1.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para detecção de fenóis	25
3.5.1.4	Ensaio Espectrofotométrico	26
3.5.2	Análise de pigmentos	26
3.6	Isolamento e purificação de substâncias liquênicas	26
3.7	Análises estatísticas	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5	CONCLUSÕES	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7	APÊNDICE 1 - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	65
8	APÊNDICE 2 - CO -ORIENTAÇÕES DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	68
9	APÊNDICE 3 - PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS RELACIONADOS A PESQUISA DE TESE	69

1 INTRODUÇÃO

Após o acidente nuclear de Chernobyl em Abril de 1986, quando uma grande quantidade de elementos radioativos foi lançada ao meio ambiente, contaminando solo, vegetação, água, entre outros, surge à necessidade de monitorar essas áreas contaminadas.

O biomonitoramento, ou monitoramento biológico, utilizando diferentes espécies de musgos, líquens e bromeliáceas foi amplamente empregado. A utilização de líquens como biomonitores de radionuclídeos foi cada vez mais estudada, principalmente devido a sua grande capacidade de absorver elementos dispersos no ar atmosférico (BOARETTO et al., 1990; HOFMANN et al., 1993; MONNA et al., 2006; GÓMEZ-GUZMÁN et al., 2011). Porém, estudos que demonstrem os efeitos das radiações ionizantes sobre os líquens ainda são bastante escassos.

Líquens são organismos formados pela simbiose entre um fungo e uma alga (ou cianobactéria), ou seja, entre um micobionte e um fotobionte. Dessa “união” são produzidas as substâncias liquênicas (CULBERSON; CULBERSON, 1970; NASH III, 1996). Essas substâncias são responsáveis pela maioria dos benefícios advindos dos líquens, entre eles: aplicações na indústria farmacêutica, têxtil, de perfumes e de cosméticos, sendo também referidos como de uso agrícola (HUNECK, 1973; LEGAZ et al., 2006).

Radiações eletromagnéticas ionizantes são aquelas capazes de ejetar os elétrons orbitais dos átomos (KELLER, 1981), provocando danos diretos ou indiretos a uma biomolécula (ROCHA, 1976; OKUNO et al., 1982; OKUNO, 1988; MURRAY, 2008).

Estas radiações podem ser de origem natural ou artificial. As de origem natural podem vir de fontes externas (as radiações cósmicas) ou de elementos radioativos existentes na crosta terrestre (AZEVEDO, 2010). Entre as fontes artificiais destaca-se a produção e utilização de artefatos, dos quais a contribuição mais importante provém dos raios X usados para fins de diagnósticos (OKUNO, 1988).

Dentre as radiações eletromagnéticas ionizantes, os raios gama se incluem entre os mais penetrantes na matéria. O efeito desses raios em sistemas biológicos vem sendo amplamente estudado em diversos campos: conservação de alimentos e insumos

agrícolas; melhoramento genético de plantas e controle ou eliminação de fungos e bactérias (OKUNO et al., 1982, CARDOSO, 2006).

As radiações eletromagnéticas não-ionizantes são as que não produzem ionizações, mas podem provocar danos às biomoléculas dependendo da dose e do tempo de exposição à radiação (OKUNO, VILELA, 2005).

Dentre as radiações não-ionizantes, os efeitos da radiação ultravioleta têm grande destaque na literatura, principalmente devido a sua influencia na formação de radicais livres, além de danos ao DNA, lipídios e proteínas (HALL, 2002).

A radiação ultravioleta corresponde à cerca de 7% do total de radiação emitida pelo sol e está subdividida em UVA, UVB e UVC (LIOU, 1980). A UVC é totalmente absorvida pelo oxigênio e ozônio presentes na atmosfera; a UVA é pouco absorvida pelos gases presentes na atmosfera e atinge a superfície terrestre em maiores quantidades; a UVB é fortemente absorvida pelo ozônio, e atinge a superfície terrestre em quantidades muito tênues (DIFFEY, 1991).

O ozônio é o único gás na atmosfera que efetivamente absorve parte da radiação UVB. Portanto, uma diminuição na concentração de ozônio nas camadas superiores da atmosfera leva a um aumento na radiação UVB na superfície da Terra (HALL, 2002).

O estudo do efeito da radiação ultravioleta UVB, especificamente, sobre líquens, é bastante divulgado, principalmente devido às propriedades antioxidantes e fotoprotetoras das substâncias liquênicas (RUNDEL, 1978; LAWREY, 1986; KRANNER, 2005).

As substâncias dos líquens são cristalizadas e depositadas na superfície do micobionte, favorecendo a capacidade de adaptação desses organismos aos agentes extrínsecos do ambiente (NASH III, 1996).

No nordeste brasileiro líquens da família Cladoniacea ocorrem, via de regra, sobre solos arenosos em áreas com fisionomia denominada de Tabuleiro, com vegetação do tipo Cerrado (PEREIRA, 1989; PEREIRA, 1998).

O líquen *Cladonia verticillaris* é endêmica do Leste do Brasil, encontrada da Paraíba ao Paraná, e seu funcionamento e produção de substâncias protetoras são diferenciados (LEGAZ et al, 1986; BURIL, 2011).

Buscando quantificar e comparar características químicas (bioprodução do ácido fumarprotocetrárico) e fisiológicas (teor de Clorofila Total) em amostras de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. nos propusermos a desenvolver esta pesquisa, coletando em dois diferentes ambientes do nordeste brasileiro, antes e após submissão à radiação ionizante (gama) e não-ionizante (ultravioleta-B). Tentando identificar possíveis diferenças na bioprodução dessas substâncias, consequentes ao uso controlado dessas energias.

A escolha dos ambientes foi devido ao fato de algumas espécies de líquens produzirem suas substâncias em quantidades diferentes em função da altitude (CULBERSON, et al. 1977; RUBIO et al., 2002, HALL et al., 2002) ou microclimas (LEGAZ et al., 1986).

Os locais de coleta das amostras de *C. verticillaris* foram Saloá-PE e Alhandra-PB. Locais que apresentam características fisionômicas semelhantes (solos arenosos e vegetação de cerrado), porém com diferentes altitudes.

Com isso, pretende-se responder ao questionamento se uma mesma espécie ocorrente em áreas com fitofisionomias idênticas, mas com tipologias climáticas distintas, responderia de forma similar ou distinta a fatores adversos ao ambiente, neste caso a radiação. Sabe-se que as áreas de ocorrência de *C. verticillaris* além do clima, têm diferentes altitudes e exposição à luminosidade/radiação.

É de grande valia ressaltar a importância dessa pesquisa na área da liquenologia aplicada, contribuindo para diminuir a carência de informações nesse segmento e criando novas perspectivas de pesquisa nas relações entre os líquens, suas substâncias e a radiações. Desde que os líquens produzam substâncias fotoprotetoras, pesquisas com este direcionamento, se revestem de valor sócio-econômico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Radiações

Radiações são formas de energia, emitida por uma fonte, que se propaga de um ponto para outro sob forma de partículas com ou sem carga elétrica, ou ainda sob a forma de ondas eletromagnéticas (OKUNO, 1988; PERES, 2008; ANDREUCCI, 2010). Podendo ser divididas em dois grandes grupos: corpusculares e eletromagnéticas.

As radiações corpusculares são feixes de partículas atômicas, que transferem sua energia para todo corpo com o qual colidem. Entre estas estão as partículas alfa e beta (OKUNO et al., 1982; OKUNO, 1988).

As radiações eletromagnéticas representadas na figura 1 são constituídas de campos elétricos e magnéticos oscilantes e se propagam, no vácuo, com velocidade constante igual à velocidade da luz. São exemplos: as ondas de rádio, as luminosas (luz), os raios infravermelhos, raios ultravioleta, raios X e raios gama. Diferenciam-se por sua frequência e pelo seu comprimento de onda (OKUNO, 1988; MURRAY, 2009). Estas se dividem em radiações ionizantes e não-ionizantes.

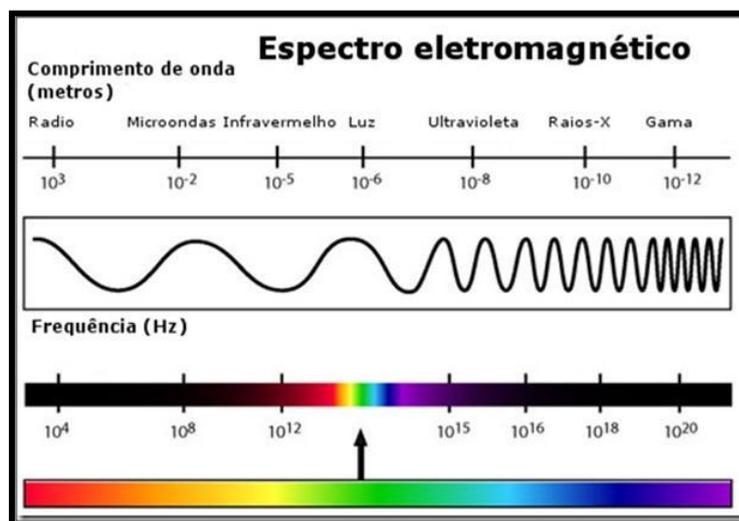


Figura 1 - Representação do Espectro eletromagnético. Fonte: [HTTP://kajkrause.com/2009/06/o-espectro-eletromagnetico](http://kajkrause.com/2009/06/o-espectro-eletromagnetico). Acesso em 10/12/ 2010.

2.1.1 Radiações ionizantes

Radiações ionizantes são aquelas capazes de ejetar elétrons dos átomos. A quantidade de energia depositada por uma radiação ionizante ao atravessar um material depende da natureza química do material e de sua massa específica (KELLER, 1981; MURRAY, 2008; PERES, 2008). Os raios X e gama são exemplo de radiação ionizante.

Os raios gama são emitidos dos núcleos dos átomos dos elementos radioativos naturais e artificiais; é uma radiação eletromagnética com um comprimento de onda curto (menor que 1 \AA ou 10^{-10} m) por isso, possui uma grande capacidade de penetração na matéria. Eles surgem na desaceleração das partículas carregadas, na aniquilação de um par de antipartículas (pósitron, néutrinos) na fissão espontânea ou artificial dos núcleos dos átomos de urânio e plutônio e em algumas outras reações nucleares (KELLER, 1981).

Os raios gama das fontes radioativas naturais e artificiais têm ampla aplicação: na indústria, são utilizados para examinar o interior dos materiais e conjuntos lacrados, destacando-se aí as radiografias e gamagrafias. Também, são utilizados como medidores de espessura ou nível de materiais, e na detecção de vazamentos, na esterilização de materiais cirúrgicos, na conservação de alimentos, atuando por meio da ionização de alguns átomos e alteração da estrutura de moléculas vitais de bactérias e microrganismos, provocando a sua morte (OKUNO et al., 1982).

2.1.1.1 Estágios da interação da radiação ionizante com os sistemas biológicos

Após um sistema biológico ser irradiado, ele passará por três fases: a primeira é conhecida como física, e acontece em um espaço de tempo muito curto, onde a energia veiculada pela radiação é transferida para a matéria viva, conduzindo a excitações moleculares e ionizações. A segunda é a físico-química, que também ocorre rapidamente (menos de 1 segundo), caracterizada pela reação dos produtos surgidos na fase anterior, entre si ou com moléculas vizinhas, o que conduz à formação de produtos secundários. A terceira fase é conhecida como estágio biológico, que pode durar de segundos até anos. Neste último ocorrem as alterações bioquímicas e fisiológicas, produzindo alterações morfológicas e/ou funcionais (GOMES, 1976; OKUNO, 1988; BOLUS, 2001).

Existem dois mecanismos de ação da radiação ionizante interagir, biologicamente, com uma molécula: o direto e o indireto.

No primeiro, o direto, a radiação age diretamente sobre as biomoléculas, danificando-as. No segundo, o indireto, a radiação ocasiona alterações estruturais em algumas moléculas do meio e estas conseqüentemente dão origem a uma série de espécies químicas bastante reativas, denominadas radicais livres, que por sua vez produzem danos biológicos as biomoléculas da célula (ROCHA, 1976; OKUNO et al., 1982; OKUNO, 1988; MURRAY, 2008). Dessa forma, os efeitos biológicos da radiação ionizante derivam dos danos celulares causados a estrutura química da célula (GONZALEZ, 1994).

Uma série de pesquisas foi desenvolvida nos diferentes campos da biologia sobre as transformações ocasionadas nas moléculas pela radiação ionizante, seja de forma direta ou indireta. Entre elas citam-se a criação de novas variedades de plantas com características melhoradas; aumento e melhoramento na produção de alimentos por intermédio do metabolismo vegetal, e controle ou eliminação de insetos, fungos e/ou bactérias (OKUNO et al., 1982; CARDOSO, 2006).

2.1.2 Radiações não- ionizantes

A radiação ultravioleta (R-UV), representada pela faixa do espectro eletromagnético entre os comprimentos de onda de 100 e 400 nm (1 nm equivale a 10^{-9} m), corresponde a cerca de 7% do total de radiação emitida pelo sol (LIOU, 1980). Quando atinge a superfície, a radiação ultravioleta exerce diversos tipos de efeitos sobre os seres vivos e materiais inorgânicos. Esses efeitos são geralmente causados pelo excesso e continuidade de exposição ao sol, a depender dos mecanismos de reparo.

A radiação ultravioleta é subdividida em três partes: UVA: entre 315 e 400nm; UVB: entre 280 e 315nm; e UVC: entre 100 e 280nm, conforme representado na figura 2.

A ultravioleta do tipo C é totalmente absorvida pelo oxigênio e ozônio presentes nas camadas superiores da atmosfera. Apesar de não atingir a superfície, a UVC, gerada artificialmente através de lâmpadas, é utilizada para esterilizar a água e equipamentos cirúrgicos. A UVB é fortemente absorvida pelo ozônio presente principalmente na estratosfera e atinge a superfície terrestre em quantidades muito tênues. Por fim, tem-se a UVA que é pouco absorvida pelos gases presentes na atmosfera e atinge a superfície terrestre em maiores quantidades (DIFFEY, 1991; OKUNO, VILELA, 2005).

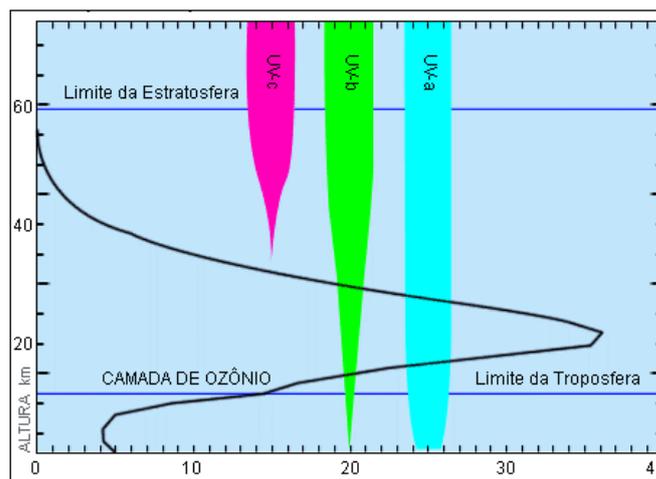


Figura 2 - Representação da penetração da radiação ultravioleta na atmosfera. Disponível em <http://aquaticos.blogspot.com/2010/08/radiacao-ultravioleta-gerada-pela.html>, acesso em 29/6/2011.

Alguns fatores influenciam o índice de radiação ultravioleta na superfície da Terra, entre eles: hora do dia, estações do ano, latitude, altitude e ozônio (RIKKINEN, 1995; OKUNO, VILELA, 2005). Em geral, cada aumento de 1 km de altitude aumenta o fluxo ultravioleta por cerca de 6% (DIFFEY, 1991).

2.1.2.1 Efeito biológico da radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta induz efeitos diretos e indiretos (HALL, 2002). Muitas macromoléculas são alvos em potencial dos efeitos da radiação UVB, particularmente o DNA e as proteínas (JANSEN et al., 1998). O DNA, devido à sua estrutura molecular, absorve radiações na faixa do UV, o máximo de absorção se dá em torno de comprimentos de onda da ordem de 260 nm (UVC), diminuindo para comprimentos de onda maiores (UVB e UVA) (RICKLEFS, 2001).

A energia dos raios ultravioleta transferidas ao meio em que uma molécula esteja inserida pode ocasionar formação de radicais livres que, posteriormente, reagem quimicamente, podendo provocar danos às moléculas inseridas neste meio (HOBBIE, ROTH; 2007).

Quando atinge a superfície, a R-UV exerce diversos tipos de efeitos sobre os seres vivos. Liou (1980); Bornman (1989) e Strid et al. (1990) sugerem que, dentre esses efeitos, geralmente causados pelo excesso e longo prazo de exposição, podem ser

destacados: a atenuação do crescimento de lavouras e frutos, a diminuição da produção de fitoplâncton, os cânceres e mutações genéticas em peixes e anfíbios, dentre outros. Sobre os seres humanos a radiação UV também exerce uma série de efeitos nocivos, tais como: queimaduras, envelhecimento precoce, depleção do sistema imunológico, catarata e diversos tipos de cânceres de pele (Diffey, 1991). Por outro lado, a exposição à radiação UV também é necessária por proporcionar efeitos benéficos e mesmo essencial à sobrevivência, tais como a síntese da provitamina D3, fundamental para as funções osteoblástica e paratireóide, e a prevenção de distúrbios no metabolismo do cálcio e fósforo (HOBBIE, ROTH; 2007).

2.2 Radiações e líquens

Após o acidente de Chernobyl a utilização de líquens como bioindicadores e biomonitores de poluição radioativa foi amplamente empregada (STEINNER; NJASTAD, 1993; NIFONTOVA, 1995; BELIVERMIS; ÇOTUK, 2010), uma vez que os líquens acumulam alto teor de metais pesados e radionuclídios se comparados às plantas vasculares (BRETTEEN et al, 1992; CONTI; CECHETTI, 2001). Por outro lado, muito pouco se tem estudado sobre o efeito das radiações ionizantes no metabolismo líquênico (NIFONTOVA, 1995). Em contrapartida, o efeito da radiação ultravioleta sobre líquens vem sendo amplamente estudado, sobretudo devido a capacidade fotoprotetora de algumas substâncias líquênicas (FAHSELT, 1993; RACAN et al., 2002; HALL, 2002).

2.3 Os líquens

Os líquens são definidos como organismos simbiotes compostos de fungo, o micobionte, e uma ou mais espécies de fotossintetizantes, o fotobionte, que pode ser alga verde ou cianobactéria (NASH III, 1996; RAVEN et al, 2001, LAWREY, 2009). Esta simbiose pode variar desde o parasitismo até o mutualismo estrito, dependendo dos grupos taxonômicos de fungos e algas (ou cianobactérias) que estejam envolvidos (AHMADJIAN, 1993).

2.3.1 Características gerais

Margulis; Schwartz (2001) posicionam os seres em um sistema baseado na evolução celular classificando os líquens no reino Fungi, praticamente isolados e

filogeneticamente situados acima dos fungos superiores Zygo, Asco e Basidiomycota, sendo classificados como MYCOPHYCOPHYTA (*MYCO*=fungo, *PHYCO*=alga e *PHYTA*=planta).

A partir de 1950 o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CINB), passou a declarar que o nome atribuído a um líquen deve ser entendido como aplicado ao fungo, tendo o fotobionte taxonomia particular dentro de seu próprio grupo (MARCELLI, 2006).

A simbiose característica dos líquens permite que dois seres bastante distintos, o fotobionte (a alga pertencente às divisões Chlorophyta ou Cyanophyta, conhecidas como Cianobactérias) e o micobionte (o fungo, pertencente ao Reino Fungi), vivam harmoniosamente, fornecendo mútua proteção e substâncias vitais. O contato alga/fungo facilita a transferência de nutrientes e produtos da fotossíntese do fotobionte para o micobionte (HALE, 1983; NASH III, 1996).

Conforme Marcelli (2006) o fotobionte e o micobionte se posicionam de forma peculiar dentro do talo liquênico, podendo apresentar-se em camadas sucessivas, denominados heterômeros (figura 3A) onde possuem dois estratos internos, a camada das algas e a dos fungos, e talos homômeros (figura 3B) que não possuem diferenciação de camadas.

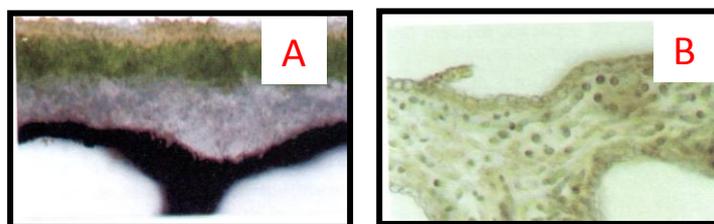


Figura 3 - Modelo esquemático do talo liquênico heterômero (A) e homômero (B).
Fonte: Marcelli (2006).

O talo do líquen pode se apresentar de cores e formas variadas (figura 4), a depender da espécie e das substâncias que ele contém. Alguns produzem substâncias coloridas, que funcionam como defesa contra o excesso de exposição à energia luminosa dos ambientes em que vivem (RIKKINEN, 1995). Apresenta seu talo com diferentes aspectos: o talo foliáceo ou folhoso é semelhante a uma folha sobre o substrato, e dele

se destaca com facilidade. O talo crostoso são formas mais aderidas ao substrato. O talo arbustivo ou fruticoloso apresenta-se como sugere o nome, como um arbusto e pode ser ereto, ou decumbente, semelhante a uma planta epífita (PEREIRA, 2002).

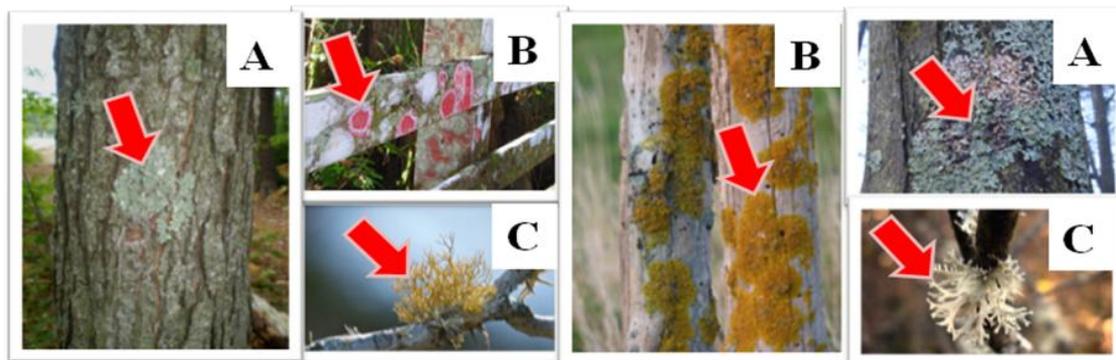


Figura 4 - Tipo de hábitos de líquens, A: folhoso; B: crostoso; C: arbustivo. Fonte: <http://www.flickr.com/photos>, acessado em 21/09/2011.

2.3.2 A espécie *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fries

No gênero *Cladonia*, o micobionte está sempre em associação com clorofíceas do gênero *Trebouxia*, ordem Chlorococcales, e em menor proporção com *Pseudotrebouxia*, da ordem Chlorosarcinales. A associação é considerada tão específica que nenhuma outra alga realiza a liquenização, mesmo em condições laboratoriais (AHMADJIAN; JACOBS, 1981). O talo primário, de maneira geral, varia entre esquamuloso e folhoso.

C. verticillaris (figura 5) é endêmica do Leste do Brasil, encontrada da Paraíba ao Paraná, podendo formar colônias extensas sobre a areia nas florestas de restinga em altitudes de até 1200 m (ATHI; MARCELLI, 1995). A espécie apresenta o ácido fumarprotocetrarico, como seu principal metabólito secundário, e como substâncias acessórias o ácido protocetrarico e a atranorina (HUOVINEN et al., 1990; ATHI et al., 1993).

A grande maioria das substâncias liquênicas é depositada, como cristais ou substâncias amorfas, na superfície exterior das hifas dos fungos, seja na medula ou no córtex (RUNDEL, 1978). Conforme Huovinen et al. (1990) o ácido fumarprotocetrarico está localizado na medula de talos liquênicos.

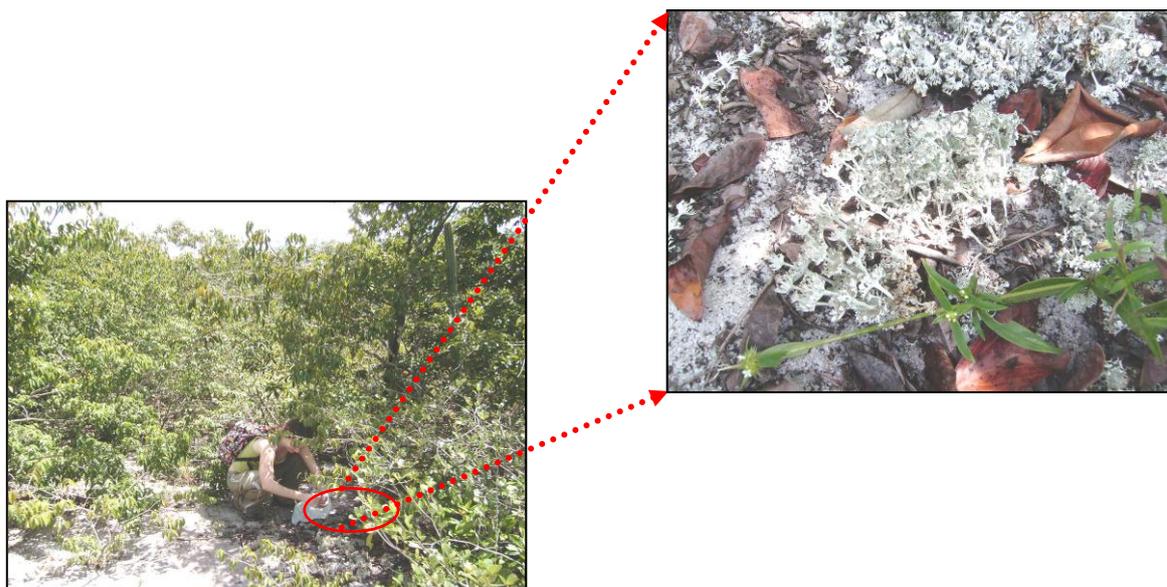


Figura 5 - Coleta de *Cladonia verticillaris* (RADDI) FR. em ambiente natural. Foto: Melo, 2008.

2.3.2.1 Áreas de coleta do líquen *Cladonia verticillaris*

As amostras líquênicas foram coletados nos municípios de Saloá-PE e Alhandra-PB.

O Município de Saloá-PE está inserido na Mesorregião do Agreste Pernambucano e Microrregião de Garanhuns. As amostras líquênicas foram coletadas em uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) da Fazenda Brejo, denominada Reserva Ambiental Brejo, mais especificamente na Serra do Prata. O local de coleta das amostras apresenta como substrato solos arenosos, denominados de Neossolos quartzarênicos, com clima segundo a classificação de Koppen do tipo Cs'a (Mesotérmico úmido com chuvas de outono-inverno e verões quentes) com amplitude térmica anual de até 25°C (IBGE, 2011; EMBRAPA Solos/UEP Nordeste, 2011). Vale salientar que o clima Cs'a é encontrado apenas na Serra do Prata, no município de Saloá-PE predomina o clima do tipo BShs' (Clima quente e seco com vegetação de caatinga e chuvas de outono-inverno).

O município de Alhandra-PB, localiza-se na Mesorregião da Mata Paraibana, Microrregião do Litoral Sul. As amostras líquênicas foram coletadas em solos arenosos do tipo Neossolos quartzarênicos, com clima segundo a classificação de Koppen do tipo

As' (Clima quente e úmido com chuvas de outono-inverno), apresentando amplitude térmica anual de até 10°C (IBGE, 2011; EMBRAPA Solos/UEP Nordeste, 2011).

Ambas as áreas constituem tabuleiros arenosos, com fitofisionomia de Cerrado, sendo, no entanto, distintas entre si, pela primeira ocorrer em domínio semi-árido, recebendo influência dos efeitos da continentalidade (maiores amplitudes térmicas, menor umidade, etc) e a segunda em ambiente costeiro, implicando, dessa forma, em diferenças climáticas (BURIL, 2011), além da diferença de altitude.

2.3.3 Substâncias liquênicas

O metabolismo primário nos líquens consiste na produção específica de um único carboidrato pela alga, a partir da fotossíntese, cuja transferência ao micobionte é rápida e em quantidade substancial para transformação e acúmulo (PEREIRA, 1998). Os produtos do metabolismo primário são processados e, pelo metabolismo secundário, são produzidas as substâncias liquênicas, únicas neste táxon (CULBERSON; CULBERSON, 1970; NASH III, 1996). Essas substâncias liquênicas, antigamente designadas como “ácidos liquênicos”, são quase na sua totalidade fenóis, responsáveis pela maioria dos benefícios advindos dos líquens (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976). Dentre esses benefícios destacam-se a ação farmacológica, bactericida e a utilização na indústria têxtil, farmacêutica, de perfumes e de cosméticos, também são referidos como úteis na fermentação para a produção de álcool, na alimentação, entre outros (HUNECK, 1973; LEGAZ et. al., 2006).

Os compostos fenólicos (entre eles os ácidos alifáticos, para e meta depsídeos, depsidonas, benzil ésteres, dibenzofuranos, ácidos úsnicos, xantonas, antraquinonas, terpenóides, e derivados do ácido pulvínico) não estão distribuídos de maneira uniforme no interior do talo liquênico, podendo acumular sobre partes expostas ou vulneráveis do talo: tecidos corticais acima da camada das algas, medula, ou ainda nas estruturas de reprodução (HUNECK, 1973; NASH III, 1996, HUOVINEN et al., 1990, RIKKINEN, 1995; LAWREY, 2009). Estes compostos tomam forma cristalina fornecendo ao líquen grande capacidade de adaptação às adversidades, visto que esses cristais funcionam como fotoprotetores da radiação solar (FERNANDEZ et al., 1998; RANCAN et al., 2002; LAWREY, 2009).

Vale a pena salientar que alguns compostos liquênicos podem atuar como fluoróforos, captando e absorvendo a radiação e emitindo essa energia em forma de luz, e ainda interferir no ritmo de crescimento e reprodução (RIKKINEN, 1995).

Em geral, em um espécime pode ocorrer de um a vários compostos resultantes do metabolismo secundário. A concentração de metabólitos secundários pode variar de 0,1% a 10% do peso seco do talo liquênico, embora, em alguns casos essa concentração possa ser mais alta, como em *Pentagenella fragilima*, que tem 30% do seu peso seco em ácido psorômico (HALE, 1983).

2.3.4 Característica fisiológica estudada

Clorofila

Clorofila é um pigmento fotossintético, responsável por captar energia necessária para a realização da fotossíntese (RAVEN et al., 2001; TAIZ, ZEIGER, 2004).

Existem diferentes tipos de clorofila, o tipo “a” que apresenta cor verde azulada e aparece em todas as células fotossintetizantes que liberam oxigênio, e tipo “b” com cor verde amarelada, sendo encontrada nas plantas superiores e nas algas verdes (MODESTO, SIQUEIRA, 1981). A clorofila do tipo “b” é um pigmento acessório, ou seja, um pigmento que serve para ampliar a faixa de luz que pode ser usada na fotossíntese (RAVEN et al., 2001). Existem, ainda, as clorofilas “c” e “d” (encontradas em alguns protistas e cianobactérias) e a *bacterioclorófica* e a *clorofila chlorobium* (existentes nas bactérias fotossintetizantes) (RAVEN et al., 2001; TAIZ, ZEIGER, 2004).

A quantidade dos teores de clorofila está estreitamente relacionada com os percentuais de células mortas, uma vez que na associação alga e fungo, as algas é que são responsáveis pela síntese de substâncias orgânicas, assim, a morte de células verdes (algas) deve apresentar uma correlação clara com a queda da clorofila, taxa fotossintética e, conseqüentemente, morte do líquen (MAZZITELLI et al., 2006).

2.4 Efeitos das radiações nos líquens

2.4.1 Radiação gama

Pollum; Erbisch (1972) estudaram o efeito da radiação gama no líquen *Cladonia verticillata* e constataram que durante o período de exposição, o líquen apresentou um escurecimento com tendência a entrar em colapso na dose de 10.000 Gy.

Gannutz (1972), observou que talos liquênicos irradiados com doses de até 2.500 Gy de radiação gama, proveniente de uma fonte de Co^{60} , são mais radiosensíveis do que qualquer um dos componentes, algas ou fungos, em cultura. possivelmente devido ao *stress* já existente na associação entre alga e fungo no talo liquênico. Acrescenta, ainda, que “algas liquênicas” são mais radiosensíveis que os “fungos liquênicos”, mesmo entre os componentes da mesma espécie de líquen. Estes dados podem ser corroborados por Nifontova et al., (1989) que afirmam que culturas do fotobionte liquênico *Trebouxia erici* foi mais sensível a radiação gama que o micobionte de *Parmelia caperata*.

Erbisch; Kalosis (1973) analisando possíveis danos causados a *Cladonia sylvatica* (L.) Hoffm pela radiação gama, observaram por meio de consumo de oxigênio e danos ao fotobionte, que os líquens foram capazes de sobreviver a dose de 10.000 Gy após seis semanas de incubação. Foi observado que nas amostras irradiadas o consumo de oxigênio não foi alterado. Danos ao fotobionte foram verificados duas semanas após doses de 1.000 Gy, e imediatamente após as doses de 10.000 e 20.000 Gy. No entanto, menos de 10% das células de algas mostraram danos após o período de experimentação de seis semanas.

Com relação ao crescimento de líquens, Jones; Platt (1969) afirmam que a radiação gama inibe o crescimento de *Parmelia conspersa* (Ach.). Synder; Platt (1973) usaram diferentes doses de radiação gama entre 0,115 e 1,259 Gy em *Trapelia ornata* e concluíram que seu crescimento foi inversamente proporcional a dose de radiação utilizada.

Erbisch (1974) observou que o líquen *Cladonia sylvatica* sob radiação gama, não sofreu danos em sua estrutura; em 1977 o mesmo autor estudou o efeito da radiação gama de uma fonte de Cs^{137} sobre o líquen folhoso *Parmelia sulcata* Tayl, observando que apenas os líquens que foram irradiados com dose de 1.000 Gy apresentaram danos como estímulos e quebra de lóbulos, formação de pigmentos escuros, distorção do cloroplasto da alga, modificação no crescimento normal do talo e, eventualmente,

morte. Constatando que, após ter recebido uma grande dose de radiação gama, o líquen não pode realizar suas funções normais de crescimento e deteriora-se.

Barstow; Erbisch (1977) observaram que *Cladonia mitis* Sandst. submetida a doses de até 10.000 Gy de raios gama reduz sua taxa de fotossíntese e apresenta danos e morte aos podécios.

Nifontova et al (1995) verificaram danos a membrana plasmática de *Cladonia arbuscula*; *Cetraria islandica*, *Peltigera aphthosa* e *Hypogymnia physodes* após receberem doses de 100 Gy. As atividades de respiração, fotossíntese e peroxidase sofreram influência a partir de doses de 50 Gy. E, ainda, doses de até 50.000 Gy não modificaram a concentração de Nitrogênio total nas amostras liquênicas irradiadas.

No Brasil, líquens da região Nordeste começam a ser estudados com objetivo de verificar a influência da radiação gama na produção de metabólitos secundários. Silva et. al., (2010) demonstraram o efeito da radiação gama na produção de metabólitos de *Cladonia substellata* e observaram que a produção de ácido úsnico obedece a uma tendência de aumento, indicando a existência de um limite de produção deste ácido, que ocorre em torno da dose de 10 Gy, a partir da qual os teores do ácido úsnico tendem a diminuir.

Melo (2011) verificou que amostras de *Cladonia salzmannii* após serem irradiadas com radiação gama e acondicionadas sobre solo argiloso, aumenta a produção de ácido barbático-BAR na dose de 5 Gy, e que essa produção tende a diminuir até a dose de 100 Gy. Acrescenta, ainda, que a quantidade de BAR lixiviado para o solo foi diretamente proporcional à quantidade desta substância produzida pelo talo liquênico, havendo assim um aumento nos valores de pH, teores de C total e N total.

2.4.2 Radiação Ultravioleta

Radicais livres, produzidos pela interação da radiação ultravioleta com a molécula da água, podem vir a causar uma série de danos às células dos líquens, atacando proteínas e ácidos nucleicos, bem como ácidos graxos insaturados nas membranas celulares (MOLNÁR; FARKAS, 2010). Metabólitos secundários dos líquens possuem capacidade de agir contra esses radicais livres (ação antioxidante) gerados pela radiação (HIDALGO et al., 1994; MARANTE et al., 2003; ODABASOGLU et al., 2006).

A radiação ultravioleta induz a síntese dos compostos fotoprotetores dos líquens, cujas taxas de acumulação se correlacionam com os níveis de radiação (RUNDEL, 1978; QUILHOT; RUBIO, 2006). Os compostos liquênicos possuem importante papel na proteção dos líquens contra o excesso de radiação (RIKKINEN, 1995), protegendo hifas do micobionte e as células das algas dos efeitos destrutivos da radiação ultravioleta (LAWREY, 2009).

Fernandez et al. (1998) demonstraram que as substâncias liquênicas panarina, cloropanarina e atranorina, extraídas de *Psoroma* spp, *Erioderma leyandii* e *Umbilicaria antarctica*, respectivamente, possuem elevada capacidade fotoprotetora e antioxidante. Os autores ao irradiar misturas contendo a substâncias 8-MOP (metoxsalen) - utilizada no tratamento de psoríase e vitiligo, com as substâncias liquênicas referidas a 0,329 J/cm² de UVB, verificaram que as substâncias liquênicas elevaram a capacidade fotoprotetora do 8-MOP em 40,4%; 31,7% e 20,1%, respectivamente.

Racan et al. (2002) compararam as substâncias liquênicas: ácido úsnico-USN, cloropanarina, calicina e ácido epiforelico com o protetor Nívea sun Spray FPS 5 e com as substâncias: metoxinamato de octila (OMC) - utilizada em bloqueadores de UVB, e 4-*terc*-butil-4'-metoxidibenzol metano (BM-DBM) - utilizada em fórmula para proteção UVA, expostas as doses de 5, 10 e 15 j/cm². Os resultados demonstraram que o ácido úsnico foi melhor filtro de raios UVB que o OMC e semelhante ao protetor Nívea Sun Spray FPS 5 sugerindo que o USN pode vir a ser usada no preparo de bloqueadores solares. Nos experimentos com radiação UVA a calicina apresentou menor capacidade de fotoproteção quando comparada a substancia BM-DBM.

Hall et al. (2002) em experimentos de laboratório com o líquen *Cladonia arbuscula* submetido à radiação ultravioleta (UVB) com dose de 13 kJ/m² observaram um aumento de 28% a 218% na produção de ácido úsnico, principal composto produzido pela espécie. Os autores, ainda, mediram a atenuação dos raios ultravioleta dentro do talo liquênico com fibra ótica e observaram que os líquens que cresceram sobre a influência da radiação UV, apresentaram redução na penetração de UVB. Os autores constataram, ainda, que *C. arbuscula* acumula ácido úsnico sobre a medula do micobionte.

Rubio et al. (2002) estudaram amostras do líquen *Acarospora schleicheri*, coletadas nas latitudes 18°S, 19°S, e 33°S em zonas alpinas do Chile, nas quais as concentrações

do ácido rizócarpico foram determinadas e comparadas. Os resultados obtidos sugerem que a síntese do ácido rizócarpico é induzida pela radiação UVB e que este composto representa uma adaptação química aos níveis elevados da radiação UVB em habitats do líquen.

Rozema et al. (2002), estudando o papel da radiação ultravioleta em ecossistemas terrestres e aquáticos, verificaram que os líquens *Cladina foliácea*, *C. portentosa* e *Cladonia arbusculosa*, estudados, não tiveram redução significativa de seu crescimento sob radiação ultravioleta. Já o musgo *Tortula ruralis* teve seu crescimento reduzido com o aumento dessa radiação. As plantas aquáticas estudadas não tiveram seu crescimento afetado com o aumento dessa radiação e algumas plantas terrestres, de maior porte, tiveram seu crescimento afetado. Os autores verificaram, também, que *Cladonia arbusculosa* apresenta aumento na incidência de dímeros de piridimina (CPDs) indicando, assim, danos ao DNA.

De La Torre Noetzel et al. (2004) testaram a resistência do líquen *Rhizocarpon geographicum*, coletado em altitude elevada no centro da Espanha, com o seu córtex e com esta parte removida. Os resultados obtidos indicaram uma alta redução na atividade fotossintética em amostra do líquen que teve seu córtex removido, em relação às do líquen com córtex.

Kranner et al. (2005) estudaram o efeito da atividade antioxidante e fotoprotetora em *Cladonia vulcani* e em seus simbiontes isolados. Os resultados indicaram que sozinhos, alga e fungo, sofrem oxidação durante a dissecação, e que alga perde metade da concentração de clorofila durante este período. E, ainda, que alga isolada tolera pouca luz e que o seu sistema de fotoproteção é parcialmente efetivado; e que o sistema antioxidante de fungos isolados é ineficiente. Indicando, dessa forma, que *C. Vulcani* apresenta mecanismos antioxidantes e fotoprotetores mais eficazes que seus simbiontes isolados.

Bjerke et al. (2005) irradiaram os líquens *Flavocetraria nivalis* e *Nefroma antarctica* a radiação UVB, correspondente a 25% de depreciação da camada de ozônio. O aumento da radiação UVB não afetou as concentrações de ácido úsnico e dos depsídeos fenaretina e nefroaretina; demonstrando, também, que a atividade de fotossíntese, em ambas as espécies, foi menor nas amostras irradiadas.

Fernandez et al. (2006) avaliaram as taxas de acúmulo de ácido úsnico em *Xanthoparmelia microspora* expostos a doses de 7.5 mW/cm² de radiação UVA e 1.46 mJ/cm² de UVB e constataram um aumento de 326,31% para os talos irradiados com UVA e 228% para doses de UVB. Observaram, também, em soluções de ácido úsnico irradiadas a produção de fotoprodutos, identificando e isolando a substância: 2-[29-Hidroxi-49-oxopentil]-3,5-dimetil-4,6-dihidroxi-7-acetilbenzofurano (figura 06). Verificaram, ainda, a existencia de um aumento nas concentrações desse fotoproduto associado a uma diminuição na concentração do USN, indicando, dessa forma, a possibilidade processos fotólícos secundários.

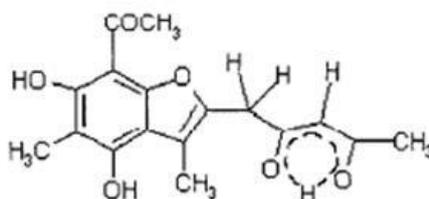


Figura 06 - Estrutura química da substância 2-[29-Hidroxi-49-oxopentil]-3,5-dimetil-4,6-dihidroxi-7-acetilbenzofurano. Fonte: Fernandez et al. (2006).

Fernández, et al. (2009) analisaram os coeficientes de absorção UVB em 13 diferentes substâncias liquênicas extraídas de líquens da zona alpina do Chile. Os resultados indicaram o FUM como a substância de menor absorção UVB.

Lasson et al. (2009) verificaram que *Lobaria pulmonaria* e *Xanthoria aureola* sintetizam melanina e parietina em maior quantidade quando expostas à radiação UVB.

Kohlhardt-Floehr et al. (2010) investigaram o potencial antioxidante e pró-oxidante do ácido úsnico extraído de *Xanthoparmelia farinosa* (Vainio) usando células de linfócitos humano (Jurkat-cell) sob diferentes doses de radiação UV-B. Os resultados indicaram que com baixas concentrações de USN e baixas doses de UVB (0,1 J/cm²) existe um elevada taxa de sobrevivência das células.

Diferenças existentes entre pigmentos fotossintetizantes em líquens podem ser observados em Unal et al. (2009) que observaram após irradiar amostras de *Physcia semipinnata* com doses de 20 J.m⁻² de radiação UVA, uma diminuição na concentração de Clorofila “a”, diretamente proporcional ao tempo de experimento. Os resultados indicaram que após um período de 24, 48 e 72h, a concentração de clorofila “a” foi de

23.98, 8.89 e 6.65 mg/g, respectivamente. Nas amostras controle a concentração encontrada foi de 38,9 mg/g.

Picotto; Tretiach (2010) observaram diferenças no teor de Clorofila “a” entre doze populações de espécies de líquens folículas coletados na sombra ou expostos ao sol. Os resultados demonstraram que a atividade de fotossíntese é dependente do regime de luz sobre o talo.

Unal; Uyanikgil (2011), examinaram a influencia da radiação UVB nas doses de 5,9; 47,9 e 95,9 J/cm² em talos do líquen *Physcia semipinnata* em termos de viabilidade celular e mutações. Os resultados sugeriram que a UVB induz a morte celular do fotobionte e do micobionte de maneira diretamente proporcional as doses aplicadas, apresentando na dose de 95,9 J/cm² morte de 100% das células do fotobionte a 45% das células do micobionte. Os autores sugerem, ainda, que o acúmulo de células mortas na superfície do talo pode ser uma forma de proteção contra os raios UVB.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e acondicionamento do material liquênico

Tufos de *Cladonia verticillaris* (500 g) foram coletados em solos arenosos dos municípios de Saloá-PE (altitude de 1086 m, Lat. 9° 25' S, Long. 36° 79' W) e Alhandra-PB (altitude: 107 m, Lat. 7° 27' S, Long. 34° 57' W) representados na figura 7, em sacos de papel, e levados para o laboratório de microbiologia do solo/DEN/UFPE.

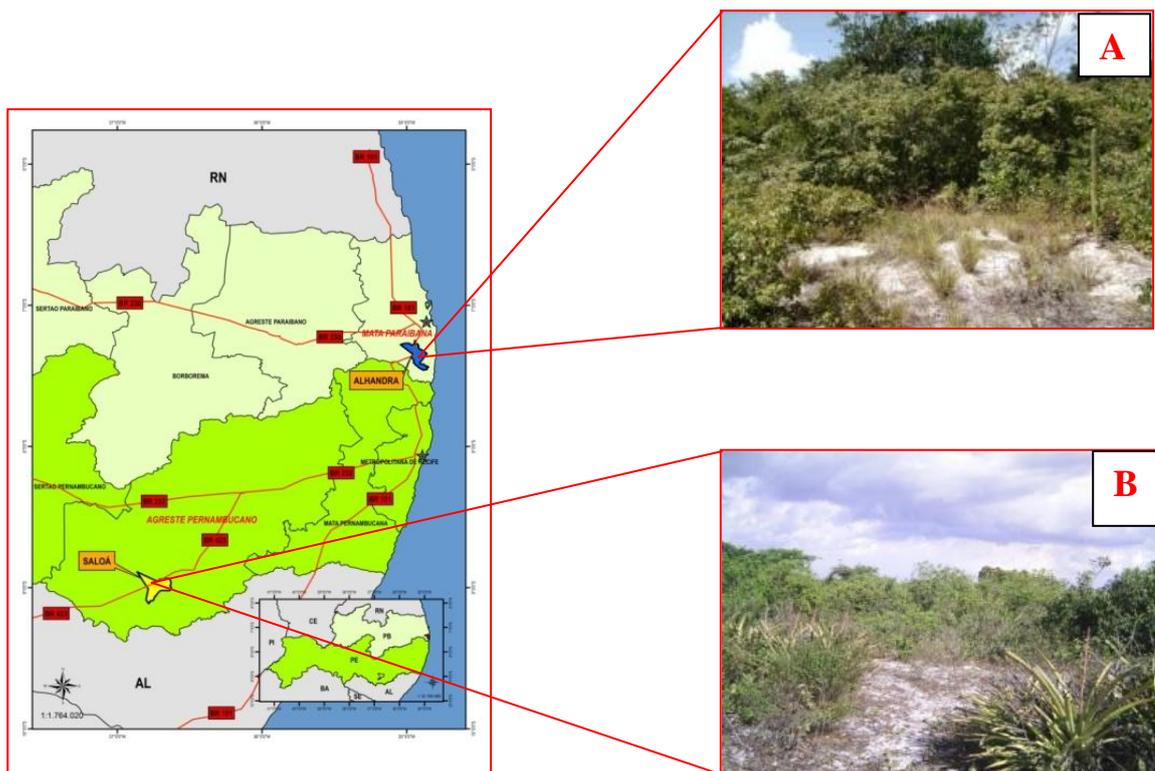


Figura 7 - Mapa indicando os locais de coleta das amostras liquênicas, onde: (A) Alhandra -PB; (B) Fazenda Brejo, Saloá-PE. Mapa: Girlan Silva. Fotos: Helena Silva, 2008.

O material foi limpo, acondicionado em caixas de papelão e mantido à temperatura ambiente ($28^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$). Parte foi identificada por características taxonômicas e químicas do talo e, depositada no herbário UFP, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, exsicata n° 63.704 para os líquens coletados em Saloá, e exsicata n° 63.705 para os coletados em Alhandra.

3.2 Irradiação do material liquênico

3.2.1 Exposição gama em fonte de Co^{60}

Para exposição gama amostras de *C. verticillaris* foram acondicionadas em envelopes de papel. Foram separados 40 envelopes com 12g cada de *C. verticillaris* coletada em Saloá e a mesma quantidade para as amostras coletadas em Alhandra.

Os 40 envelopes, de cada localidade, foram subdivididos em 5 grupos de 8 envelopes cada, obtendo, dessa forma, 8 unidades amostrais (7 irradiadas e 1 controle) com 5 repetições.

Cada envelope foi submetido, uma única vez, a uma das oito doses utilizadas de radiação gama. As doses utilizadas foram: 0, 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000 Gy de Co^{60} , no irradiador Gammacell 220 Excel (figura 8), seguindo metodologia de Ninfotova et al. (1995). As taxas de dose foram 7,795 kGy/h (03/02/2009) para as amostras de Saloá, e 7,144 kGy/h (29/10/2009) para as de Alhandra. A irradiação das amostras foi realizada no Gammalab. do Departamento de Energia Nuclear/UFPE.



Figura 8 - Irradiador, Gammacell 220 Excel. Fotos: Helena Silva (2008).

3.2.2 Exposição Ultravioleta B

Para exposição à radiação UVB foram separadas 35 recipientes plásticos revestidos com papel alumínio contendo, cada um, 12g de *C. verticillaris* para as amostras de Saloá e a mesma quantidade para as amostras de Alhandra.

Os 35 recipientes plásticos, de cada localidade, foram subdivididos em 5 grupos de 7 recipientes. Obtendo, dessa forma, 5 repetições para os 7 tratamentos (6 tratados e 1 controle).

As amostras liquênicas foram expostas, uma única vez, a uma das 7 doses utilizadas. As doses utilizadas foram 0, 1, 3, 6, 9, 12 e 15 J/cm² de UVB em lâmpada Philips Ultraviolet B – 20 W (figura 9), seguindo metodologia de Rancan et al. (2002). As radiações foram realizadas no laboratório de Microbiologia do Solo, Departamento de Energia Nuclear/UFPE.



Figura 9 - Irradiação UVB em lâmpada Philips Ultraviolet B – 20W. Foto: Helena Silva (2009).

3.3 Montagem dos experimentos

O trabalho foi realizado em quatro etapas:

- Etapa 1: *C. verticillaris* de Saloá submetida a radiação gama;
- Etapa 2: *C. verticillaris* de Alhandra submetida a radiação gama;
- Etapa 3: *C. verticillaris* de Saloá submetida a radiação UVB;
- Etapa 4: *C. verticillaris* de Alhandra submetida a radiação UVB.

Em cada etapa, as amostras liquênicas (12 g) irradiadas e não irradiadas foram acondicionadas, separadamente, em recipientes plásticos, revestidos de papel alumínio com tampa (figura 10). Todos os tratamentos foram borrifados com 2,5ml de água deionizada, três vezes por semana, durante todo o experimento. O delineamento experimental para todos os experimentos foi inteiramente casualizado.



Figura 10 - Montagem dos experimentos. Foto: Helena Silva (2008)

3.4 Coleta do material liquênico

Após montagem dos experimentos, foram realizadas coletas de 1,5g do material liquênico, de cada tratamento, nos seguintes intervalos: 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. As amostras foram acondicionadas separadamente, para posterior análise: 1 g para extração de fenóis e 0,5 g para análise de Clorofila Total.

3.5 Análise química e fisiológica dos líquens

Amostras dos líquens irradiados e não irradiados foram avaliadas química e fisiologicamente, por meio de quantificação de fenóis e análise de pigmentos (Clorofila Total), respectivamente.

3.5.1 Análise de fenóis liquênicos

3.5.1.1 Obtenção de extratos orgânicos

Após a coleta, os líquens irradiados e não irradiados, foram submetidos à extração de seus fenóis pelo sistema de esgotamento à temperatura ambiente. Este processo consiste na adição, separadamente, de 10 mL de cada solvente: éter, clorofórmio e acetona, conforme Silva et al. (2010).

Os extratos obtidos (figura 11) foram evaporados à temperatura ambiente e analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Ensaio Espectrofotométrico.



Figura 11 - Obtenção dos extratos liquênicos. Foto: Helena Silva (2009).

3.5.1.2 Cromatografia em Camada Delgada para detecção de fenóis

Os extratos liquênicos foram submetidos a cromatografia ascendente em camada delgada (CULBERSON, 1972) (figura 12), utilizando-se placas de sílica Gel F₂₅₄₊₃₆₆ Merck desenvolvidas no sistema B de solventes (hexano/éter dietílico/ácido fórmico, 130:80:20, v/v/v.). Após evaporação dos solventes, as placas foram reveladas sob luz ultravioleta curta e longa, posteriormente pulverizadas com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 100°C por 1h. Os resultados foram avaliados mediante RF (quociente entre a altura em cm das substâncias separadas (bandas) e a linha de parada do solvente) e cor das substâncias separadas, e comparadas com padrões das substâncias utilizadas: ácidos fumaprotocetrárico (FUM), protocetrárico (PRO) e atranorina (ATR).

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica/CCB/UFPE.



Figura 12 - Cromatografia ascendente em Camada Delgada. Foto: Helena Silva (2010).

3.5.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para detecção de fenóis

Os extratos e padrões liquênicos foram injetados em cromatógrafo LC-MS-IT TOF. Shimadzu (figura 13) nas concentrações de 1 mg.mL^{-1} e de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente.

Como parâmetros de análise, foram utilizadas coluna de fase reversa C18, fase móvel metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5, v/v/v), sob fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, com coluna ODS 15 cm e 2,5 D.I, pressão 84atm, atenuação 6, temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$), conforme Legaz; Vicente (1983).

Os resultados foram avaliados de acordo com o tempo de retenção (TR) das substâncias na coluna e a área dos picos dos cromatogramas obtidos.

Esta análise foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental/CTG/UFPE.



Figura 13 - Cromatógrafo LC-MS-IT TOF. Shimadzu. Foto: Helena Silva (2011)

3.5.1.4 Ensaio Espectrofotométrico

Os extratos (0,01 mg/mL) foram analisados em espectrofotômetro BIOCHROM[®] modelo Libra S 22 (figura 14) nos comprimentos de onda de 210, 254 e 366 nm, selecionados conforme o pico de absorção máxima do FUM em ultravioleta, proposto por Huneck; Yoshimura (1996).

Foi elaborada uma curva de calibração, a partir da solução estoque de FUM padrão a 0,1 mg/mL, com diluições sucessivas até 0,00001 mg/mL, possibilitando cálculo dos teores desta substância nas amostras.



Figura 14 - Espectrofotômetro BIOCHROM[®] modelo Libra S 22. Foto: Helena Silva (2010).

3.5.2 Análise de pigmentos

O pigmento analisado foi clorofila total (“a” + “b”). Este foi extraído a partir de 500mg de talo liquênico infusos em 10 ml de acetona a 80%, mantidos no escuro por 48 horas, em seguida cada extrato foi filtrado. Os teores de pigmentos foram quantificados em espectrofotômetro BIOCHROM[®] modelo Libra S 22 (figura 14) a 663nm e 645nm. Os resultados das leituras foram aplicados em fórmulas para o cálculo dos teores de clorofila total (HILL, 1963).

3.6 Isolamento e purificação de substâncias liquênicas

O isolamento e a purificação do ácido fumarprotocetrárico (FUM) foram realizados em amostras não irradiadas e recém coletadas para utilização como amostra padrão.

A extração, o isolamento e a purificação do FUM foram realizados segundo o método de Asahina; Shibata (1954), modificado por Pereira (1998), a partir de 10g de *C. verticillaris*, extraídos com éter dietílico, cuja infusão foi mantida a -13° C por 48h. Após filtração e concentração do solvente, o material foi precipitado com acetona, e mantido em repouso por 72h a 13°C. Os cristais foram recristalizados em acetona.

Padrões de PRO e ATR foram fornecidos pelo Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica/CCB/UFPE.

3.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância sob o delineamento experimental inteiramente casualizado e, em seguida, efetuadas as análises de regressão para se estimar a produção/acúmulo do ácido fumarprotocetrárico de amostras de *C. verticillaris* irradiadas e seus grupos controle. Os resultados se ajustaram de forma mais eficiente ao modelo quadrático por meio do uso do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada, em cada coleta, a avaliação qualitativa da composição química de talos liquênicos submetidos à radiação gama, e não irradiados, após um período de incubação de seis meses. Análises em Cromatografia em Camada Delgada revelaram a presença do ácido fumarprotocetrárico (FUM), seu principal composto (Rf 0,99) e suas substâncias secundárias como o ácido protocetrárico (PRO) (Rf 0,53) e atranorina (ATR) (Rf 0,95), em todas as amostras (figura 15) avaliadas. Estas substâncias já foram identificadas em líquens em condições naturais segundo Huneck; Yoshimura (1996), Ahti et al. (1993) e Athi; Marcelli (1995).

Em adição, observa-se ainda, na figura 15, a presença do composto com Rf semelhante ao ácido metil-protocetrárico (Rf 0,82) (HUNECK; YOSHIMURA, 1996), nas amostras de *C. verticillaris* provenientes de Alhandra, coletada aos 15 dias e, nas amostras provenientes em Saloá após 180 dias de tratamento.

Nos cromatogramas referentes às amostras irradiadas com ultravioleta (figura 16), além das substâncias principais e acessórias, observa-se também a presença de metabólitos intermediários os quais podem ser referentes, segundo Fontaniella et al. (2000) ao ácido hipoprotocetrárico (Rf 0,75) e metil-protocetrárico (Rf 0,82). Athi; Marcelli, (1995) sugerem a presença do confumarprotocetrárico (Rf 0,55) e, ainda, Xavier-Filho et al. (1984) e Athi et al. (1993) referem-se ao orcinol e ao β -metil orcinol carboxilato. Observa-se ainda a atranorina na forma reduzida ou oxidada (Rf 0,95).

O surgimento dessas bandas intermediárias nesses cromatogramas dá-se, provavelmente, pela influência do aumento dos níveis de radiação ultravioleta. Legaz et al. (1986) informam que talos de *Cladonia verticillaris* promoviam uma maior síntese do ácido fumarprotocetrárico (1 a 2,5 vezes), seu principal composto, quando diretamente expostos ao sol, em ambiente natural. O mesmo líquen, quando protegido pela sombra de um dossel de *Anacardium occidentale* priorizava o acúmulo de clorofilas e outros pigmentos fotossintetizantes.

Na figura 16 observa-se, nas cromatoplas referentes aos extratos de *C. verticillaris* coletada em Alhandra, bandas com Rf's inferiores ao do PRO (Rf 0,53) não evidenciadas nas cromatoplas referentes aos líquens coletados em Saloá: Rf 0,19 e Rf 0,25. Estes dados provavelmente são referentes aos diferentes resultados apresentados por *C. verticillaris* quando coletada em diferentes ambientes e, exposta ao excesso de radiação UVB.

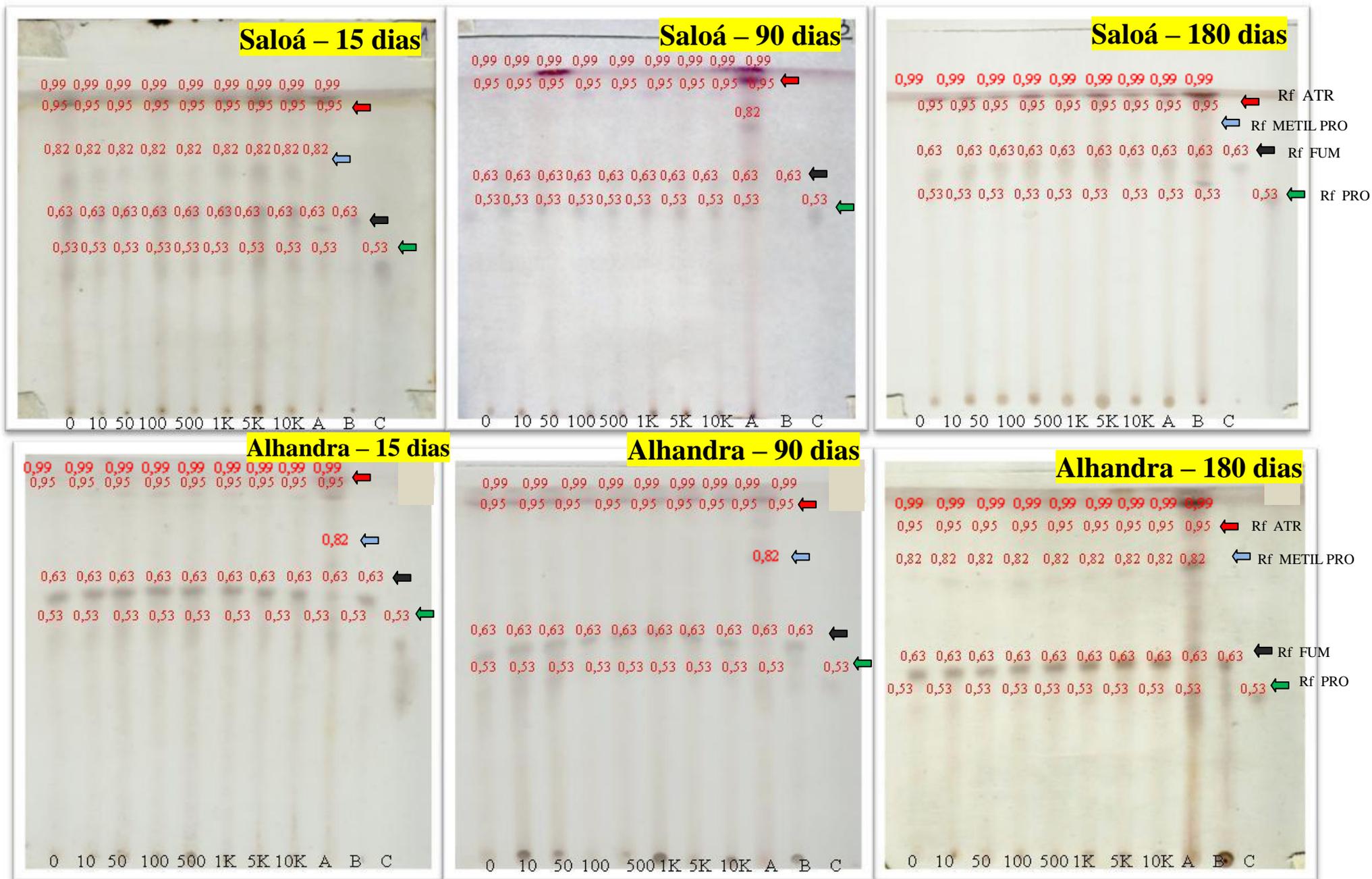


Figura 15 - Cromatografia em Camada Delgada dos extratos de *C. verticillaris* submetida à radiação gama (0; 10; 50; 100; 500; 1K; 5K e 10K Gy) e seus grupos controle: (A): extrato *in natura* de *C. verticillaris*; (B): ácido Fumarprotocetrárico e (C): ácido Protocetrárico.

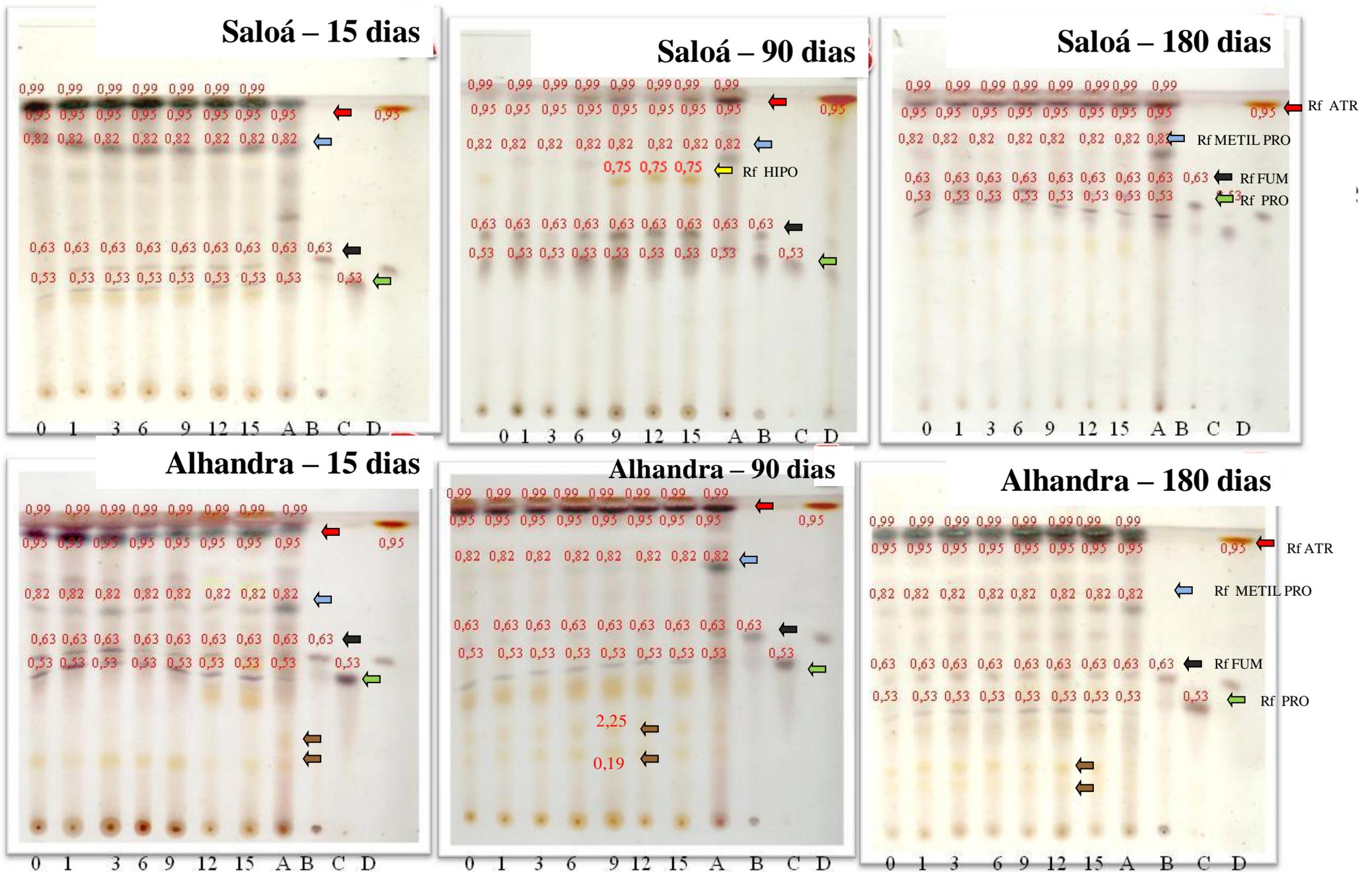


Figura 16 - Cromatografia em Camada Delgada dos extratos de *C. verticillaris* submetida à radiação ultravioleta (0; 1; 3; 6; 9; 12 e 15 J/cm²) e seus grupos controle (A): extrato *in natura* de *C. verticillaris*; (B): ácido Fumarprotocetrárico; (C): ácido Protocetrárico e (D): Atranorina.

Pereira et al. (1999) afirmam que a síntese do FUM é precedida pela produção da ATR, que em etapas subsequentes, dá origem aos ácidos hipoprotocetrárico e metilprotocetrárico, e forma o ácido protocetrárico (PRO). Este, ao acoplar-se a uma porção de fumarato, origina o FUM. Portanto, o acúmulo de produtos intermediários e ATR na síntese do FUM pode ocorrer por algum bloqueio nas etapas metabólicas causadas pela radiação, ou como mecanismo de proteção do líquen contra a agressão externa.

Em adição, Culberson et al. (1983) verificaram um aumento na concentração de depsídeos em amostras de *Cladonia cristatella* quando exposta a elevados níveis de intensidades de luz. E, ainda, Fernandez et al. (2006) observaram que soluções de ácido úsnico irradiadas com doses crescentes de UVB originavam fotoprodutos.

Observa-se, nos cromatogramas, a presença de bandas acentuadas referentes ao Rf da atranorina (Rf 0,95), principalmente nas amostras irradiadas com ultravioleta. Sabe-se que em *C. verticillaris* a produção do FUM é precedida pela síntese da ATR (PEREIRA et al., 1999; FONTANIELLA et. al., 2000), nesse contexto, uma possível concentração mais acentuada de ATR indica que os radicais livres, provavelmente, produzidos pela influência da radiação UVB, bloqueiam, de alguma forma, as reações para a produção do FUM, resultando na concentração das substâncias mencionadas.

Em adição, Fernández et al. (2009) afirmam que a ATR apresenta maior espectro de absorção UVB que o FUM e o PRO.

A quantificação da concentração do FUM nos extratos das amostras irradiadas e controle foi realizada com base em uma curva de calibração do FUM purificado (figura 17), a qual produziu uma linha de tendência linear com correlação R^2 igual a 0,989.

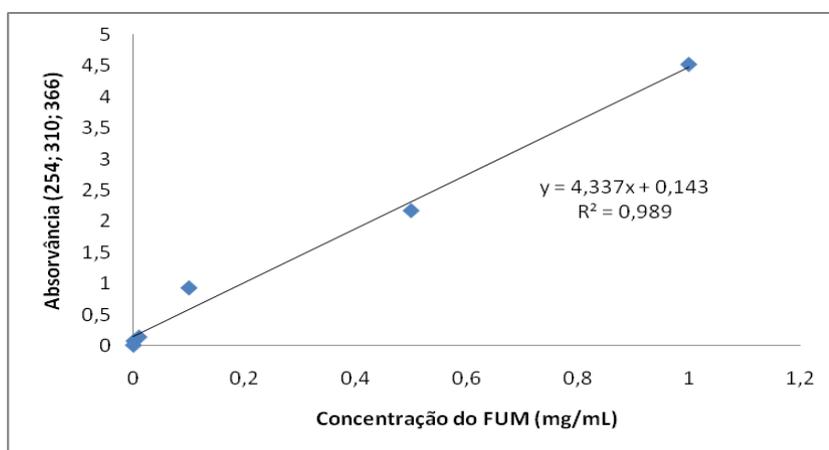


Figura 17- Curva de Calibração do ácido Fumarprotocetrárico.

Os resultados obtidos possibilitaram calcular os teores do FUM nos diferentes tratamentos e tempos do experimento para cada tipo de radiação.

A produção de FUM, após irradiação gama e seu grupo controle, pode ser observada na figura 18, para amostras coletadas em Saloá e na figura 19, para as coletadas em Alhandra.

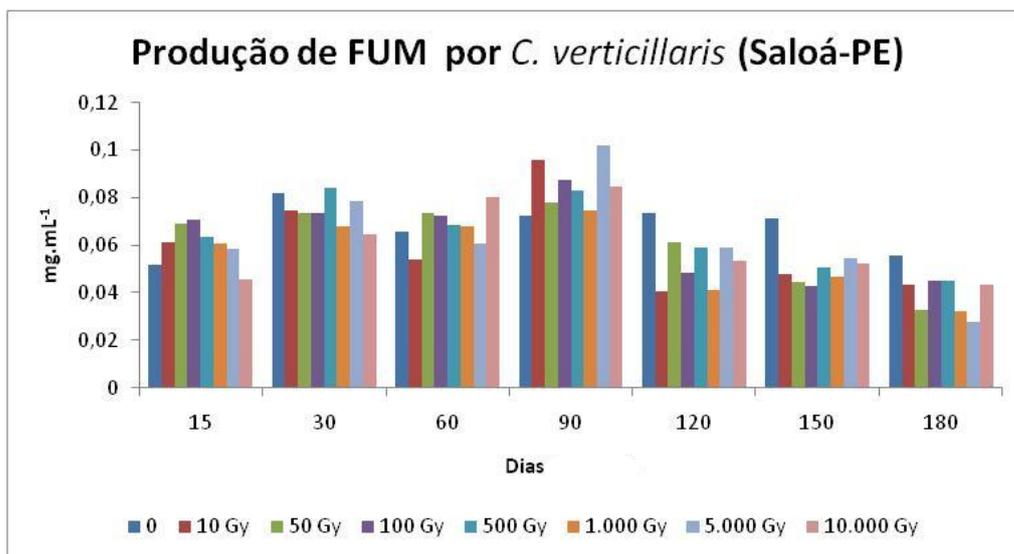


Figura 18 - Concentrações do ácido fumarprotocetrárico extraído dos talos de *C. verticillaris*, coletado em Saloá-PE, irradiados e não irradiados com radiação gama, em diferentes épocas de coleta.

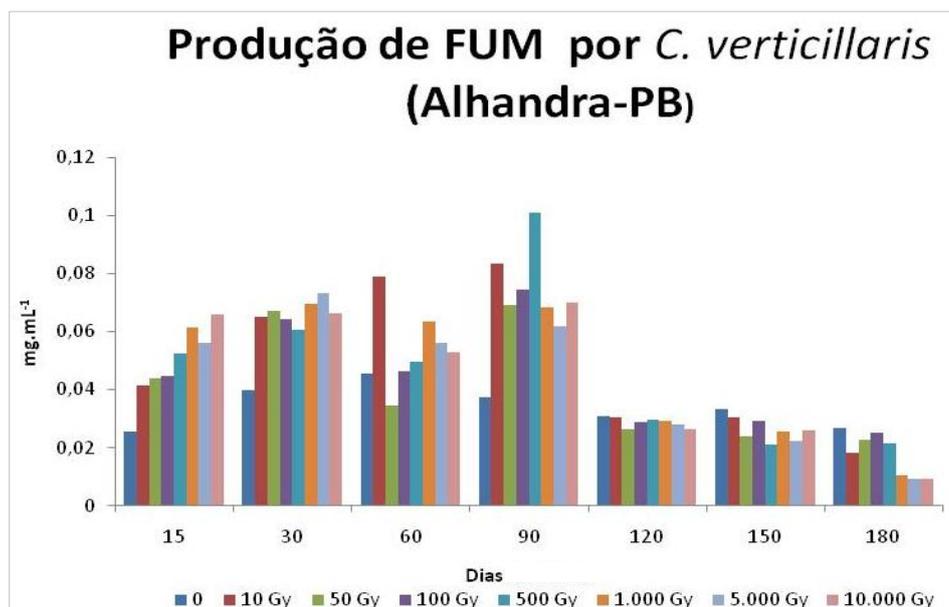


Figura 19 - Concentrações do ácido fumarprotocetrárico extraído dos talos de *C. verticillaris*, coletado em Alhandra-PB, irradiados e não irradiados com radiação gama, em diferentes épocas de coleta.

Pode ser observada, nas figuras 18 e 19, uma tendência de diminuição na produção de FUM nas amostras coletadas em Saloá e em Alhandra, a partir de 120 dias de experimento. Dados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2010) que observam uma diminuição nos teores de ácido úsnico em amostras de *Cladonia substellata*, três meses após serem submetidas à exposição gama em fonte de ^{60}Co nas doses de 60 e 80 Gy, e Melo (2011) que observou diminuição do ácido barbático em *C. salzmannii*, quatro meses após ser irradiada com doses de 20, 40, 60, 80 e 100 Gy de radiação gama em fonte de ^{60}Co .

Foi possível observar uma hiper produção do FUM nas amostras irradiadas e coletadas aos 90 dias de experimento em ambos os locais de coleta. A partir de 120 dias o teor de FUM parece diminuir cada vez mais, até 180 dias. Isto ocorre, provavelmente, como mecanismo de defesa dos líquens, devido à influência de um agente externo, nesse caso a radiação gama, conforme sugerido por Woodwell; Gannutz (1968).

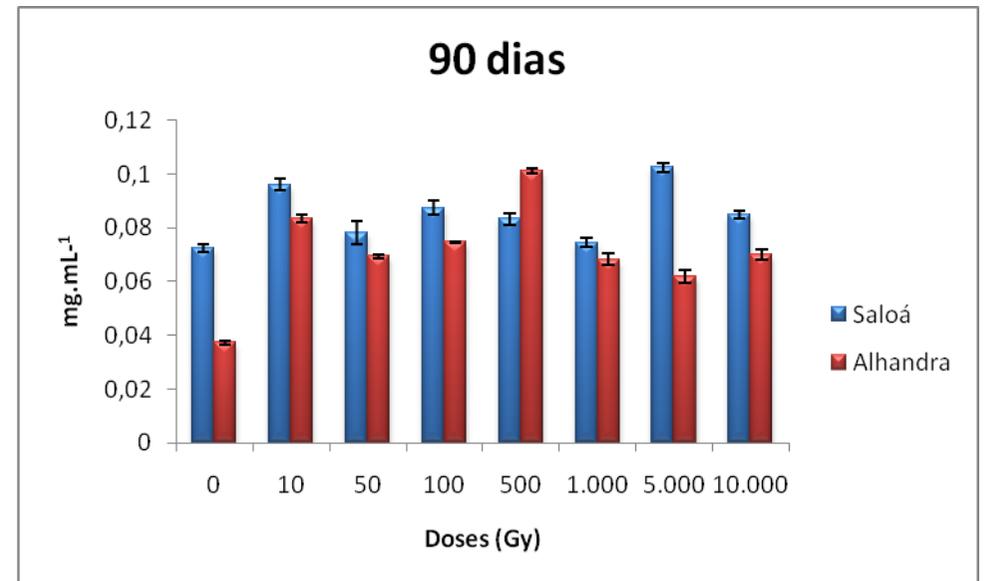
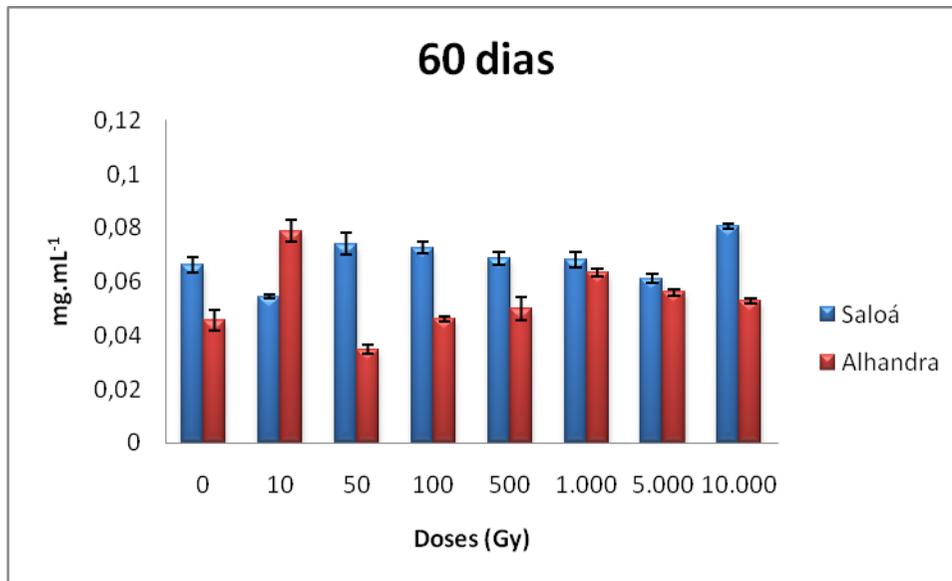
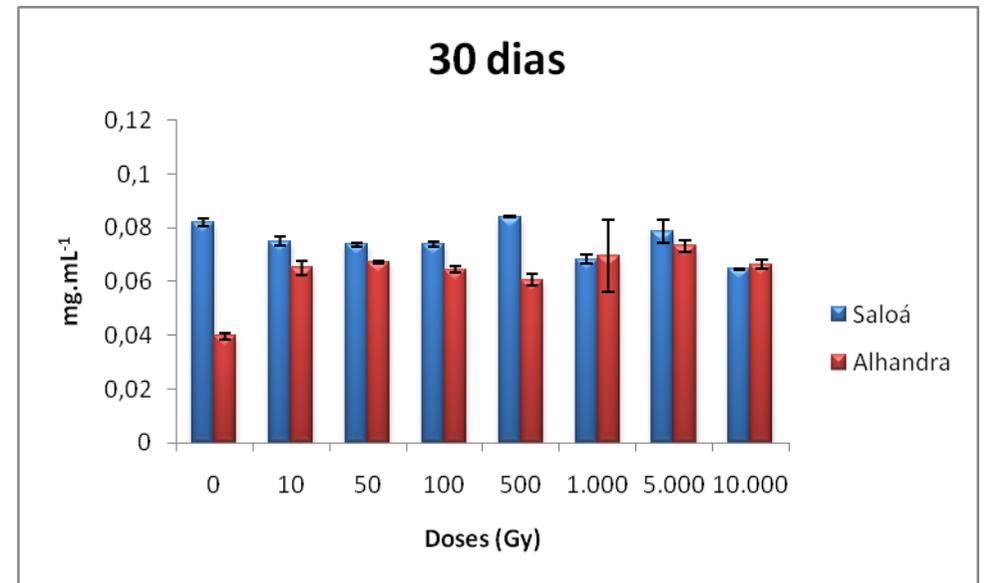
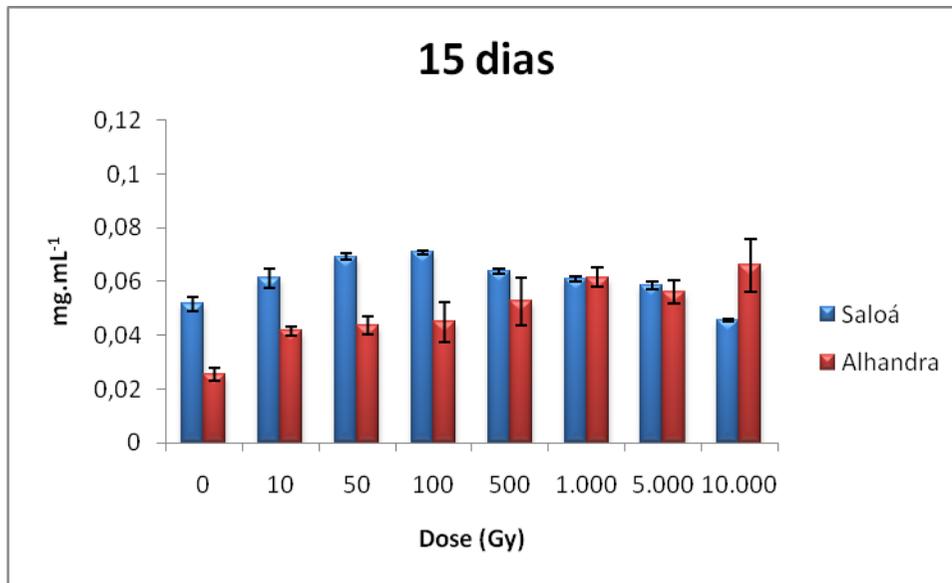
É possível que após 120 dias de experimento a dose absorvida nos tecidos do líquen possa ter impedido a síntese do FUM, como fator de adaptação a tal situação.

Os resultados podem, ainda, ser ratificados em função dos postulados de Jones; Platt (1969); Synder; Platt (1973); Erbisch (1974) e Pollum; Erbisch (1972) que afirmam a existência de efeitos tardios sobre *Cladonia sylvatica* e *C. verticillata* submetida a doses agudas ou crônicas de radiação gama.

Estes dados estão de acordo com Pawlik-Skowronska; Backor (2011) que observaram um aumento nas concentrações de FUM em *Cladonia furcata* e dos ácidos estítico e constítico, da atranorina e zeorina em *Lepraria lobata*, como forma de defesa dos líquens à ação de poluentes radioativos, neste caso o chumbo (Pb^{210}). Estes dados podem, ainda, ser corroborados por Mota-Filho et al. (2007) que observaram alterações na produção de metabólitos secundários em *C. verticillaris* sob influência de acetato de chumbo.

Com base nos dados obtidos, foi possível elaborar um gráfico comparativo da produção do FUM por *C. verticillaris* coletada em Saloá e em Alhandra nos diferentes tempos de experimento (figura 20).

Figura 20



Continua na próxima página

Continuação da figura 20

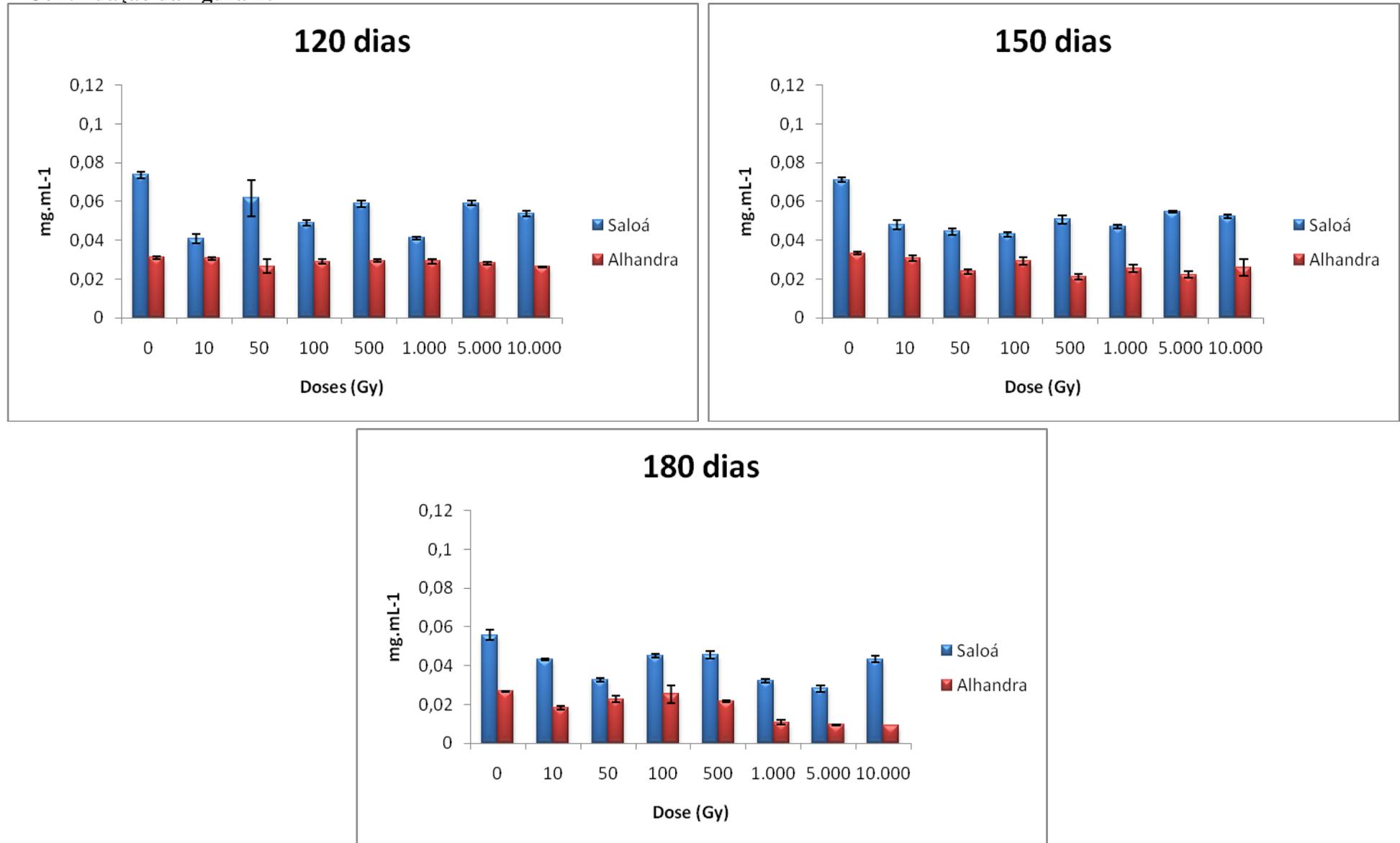


Figura 20 - Produção de Ácido Fumarprotocetrárico (mg.mL⁻¹) em função da dose de radiação gama (Gy) em diferentes épocas de coleta.

⊥: Desvio padrão negativo; ⊤: Desvio padrão positivo.

Na mesma figura pode-se observar que as amostras de *C. verticillaris* coletadas em Saloá e em Alhandra, aos 15 dias de experimento apresentaram, em todas as amostras analisadas, uma produção/acúmulo de FUM maior que a amostra controle, com exceção para as amostras de Saloá irradiadas com 10.000 Gy que tiveram uma redução de 12% em relação à amostra controle.

Nesta coleta as amostras de Alhandra produziram/acumularam FUM de maneira diretamente proporcional ao aumento da dose utilizada. Dessa forma, a dose de 10.000 Gy foi a que estimulou uma maior produção de FUM, apresentando 2,58 vezes a mais que a amostra controle. Este fato, também, ocorreu nas amostras de Saloá até a dose de 100 Gy, com produção de 1,36 vezes a amostra controle. A partir daí as concentrações diminuíram com o aumento da dose de radiação.

Apesar do aumento da produção de FUM, nas amostras de Saloá, na coleta de 30 dias, apenas a dose de 500 Gy revelou uma produção maior que a amostra Controle, apresentando apenas 1,02 vezes. Nas amostras de Alhandra todas as doses tratadas revelaram uma produção maior que a da amostra Controle, com destaque para a dose de 5.000 Gy com produção de 1,83 vezes.

Na coleta aos 60 dias, amostras de Saloá apresentaram uma bioprodução de FUM inferior às produzidas na coleta anterior, com exceção para as amostras irradiadas com 10.000 Gy. Fato semelhante ocorreu nas amostras coletadas em Alhandra, porém a exceção foi para as irradiadas com dose de 10 Gy.

Aos 90 dias, existiu um pico de produtividade na produção do FUM, nas amostras de *C. verticillaris* de ambos os locais de coleta. Destacam-se a produção de 1,41 vezes, na dose de 5.000 Gy para amostras de Saloá, e 500 Gy para as amostras de Alhandra com produção de 2,70 vezes a amostra controle. Vale salientar que, nesta coleta, as amostras de Alhandra, em todos os tratamentos, produziram FUM em quantidades superiores a 2 vezes a amostra controle.

Aos 120, 150 e 180 dias observa-se, de maneira geral, nas amostras coletadas em Saloá e em Alhandra, uma diminuição na produção do FUM, onde em todos os tratamentos essa concentração foi inferior as apresentadas nas amostras controle.

Os menores percentuais de produção do FUM, nas amostras de *C. verticillaris*, foram encontrados nas coletadas aos 180 dias. Nas amostras provenientes de Saloá, a produção de

FUM teve uma redução em 50% em relação à amostra controle na dose de 5.000 Gy; nas de Alhandra, esta redução foi de 75% nas amostras que receberam dose de 10.000 Gy.

Sanita di Toppi et al. (2005) e Backor; Fahselt (2008) sugerem que modificações fisiológicas e morfológicas nos simbioses liquênicos, devido aos agentes agressores do ambiente, provocam alterações na produção das substâncias liquênicas. Conforme sugerido por Grodzinsky (1989) essas alterações irão ocorrer, provavelmente, devido à destruição de suas rotas metabólicas. Portanto, sugere-se que a radiação também pode ter interferido da mesma forma.

Nifontova et al. (1995) verificaram danos à membrana plasmática, analisando perda de eletrólitos e compostos orgânicos e o fluxo de potássio, ao irradiar *Peltigera aphthosa*, *Cladonia arbuscula*, *Cetraria islandica* e *Hypogymnia physodes* com doses crescentes de radiação gama. Os autores observaram que as maiores modificações ocorreram em amostras de *H. physodes* ao serem irradiadas com 50.000 Gy, apresentando alterações de até 400% na perda de eletrólitos, 543,85% na perda de compostos orgânicos e, 217,28% na perda de potássio. Em adição, Erbisch; Kalosis (1973) observaram o surgimento de manchas marrons na membrana plasmática e presença de muitos vacúolos no citoplasma do fotobionte de *Cladonia sylvatica* na dose de 1000 Gy.

Sabe-se que a membrana plasmática da célula vegetal tem várias funções, entre elas manter estável a composição química do meio intracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1987; RAVEN, 1996; PANNO, 2004). Dessa forma, danos a ela induzidos pela radiação gama provavelmente podem influenciar na produção de metabólitos secundários.

Com referência aos efeitos biológicos diretos e indiretos da radiação ionizante, Nifontova et al. (1995) concluíram que talos liquênicos secos são mais resistentes à radiação ionizante que os úmidos, ao observarem que a dose de 1000 Gy foi suficiente para inibir em 54% a respiração de talos úmidos de *Hypogymnia physodes* e em talos secos, esta mesma dose estimulou um aumento de cerca de 200%. Erbisch; Kalosis (1973), também observaram um aumento de cerca de 170% no consumo de oxigênio em talos secos de *Cladonia sylvatica*, na dose de 1000 Gy. Com isso, pode-se constatar que ao irradiar amostras secas de *C. verticillaris*, provavelmente, o efeito direto das radiações ionizantes pode ter contribuído para um aumento na produção de FUM, até os 90 dias de experimento.

Devido ao pico de produtividade aos 90 dias de experimento, foi realizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE nas amostras tratadas e controle com o objetivo de visualizar a produção dos metabólitos secundários produzidos pela espécie após receber diferentes doses de radiação gama.

Na figura 21, observam-se os padrões de ácido fumarprotocetrárico (FUM) purificado (Figura 21-A) apresentando tempo de retenção (TR) de 17,2 minutos, e de atranorina (ATR) purificada (Figura 21-B) com TR de 27,6 minutos, e o comportamento do extrato de *C. verticillaris*, provenientes de Saloá (Figura 21-C) e de Alhandra (figura 21-D).

Foram detectados teores de FUM e ATR nas amostras controle de Saloá e Alhandra, ratificado pelos cromatogramas do FUM purificado de *C. verticillaris*. Os dados estão em conformidade com Ahti et al. (1993) e Pereira et al. (1995).

A figura 22 mostra a CLAE dos extratos de amostras de *C. verticillaris* de Saloá e Alhandra submetidas às doses de 10, 1.000 e 10.000 Gy de radiação gama, após um período de noventa dias.

Nos cromatogramas referentes às amostras de Saloá irradiadas com 10; 1.000 e 10.000 Gy o TR para o pico referente ao FUM foi de, aproximadamente, 18 minutos. Nestas amostras a produção de FUM foi de 0,26; 0,08 e 0,09 mg.mL⁻¹, respectivamente. Esses dados apresentaram-se em conformidade com os obtidos por espectrofotometria.

Nas análises em CLAE das amostras referentes aos extratos irradiados de *C. verticillaris* de Alhandra, foi observado que o pico correspondente ao FUM surgiu com TR de 17 minutos nos extratos irradiados com 10 e 1.000 Gy, apresentando produção de 0,41 e 0,014 mg.mL⁻¹, respectivamente. Os extratos de *C. verticillaris* irradiada com 10.000 Gy apresentaram produção de 0,31 mg.mL⁻¹ para a substância com TR de 16,26 minutos, a qual pode ser referente ao FUM modificado. Essa modificação, provavelmente, é devido a alterações na composição química da substância referida por algum bloqueio nas etapas metabólicas causado pela radiação (SILVA et al., 2010).

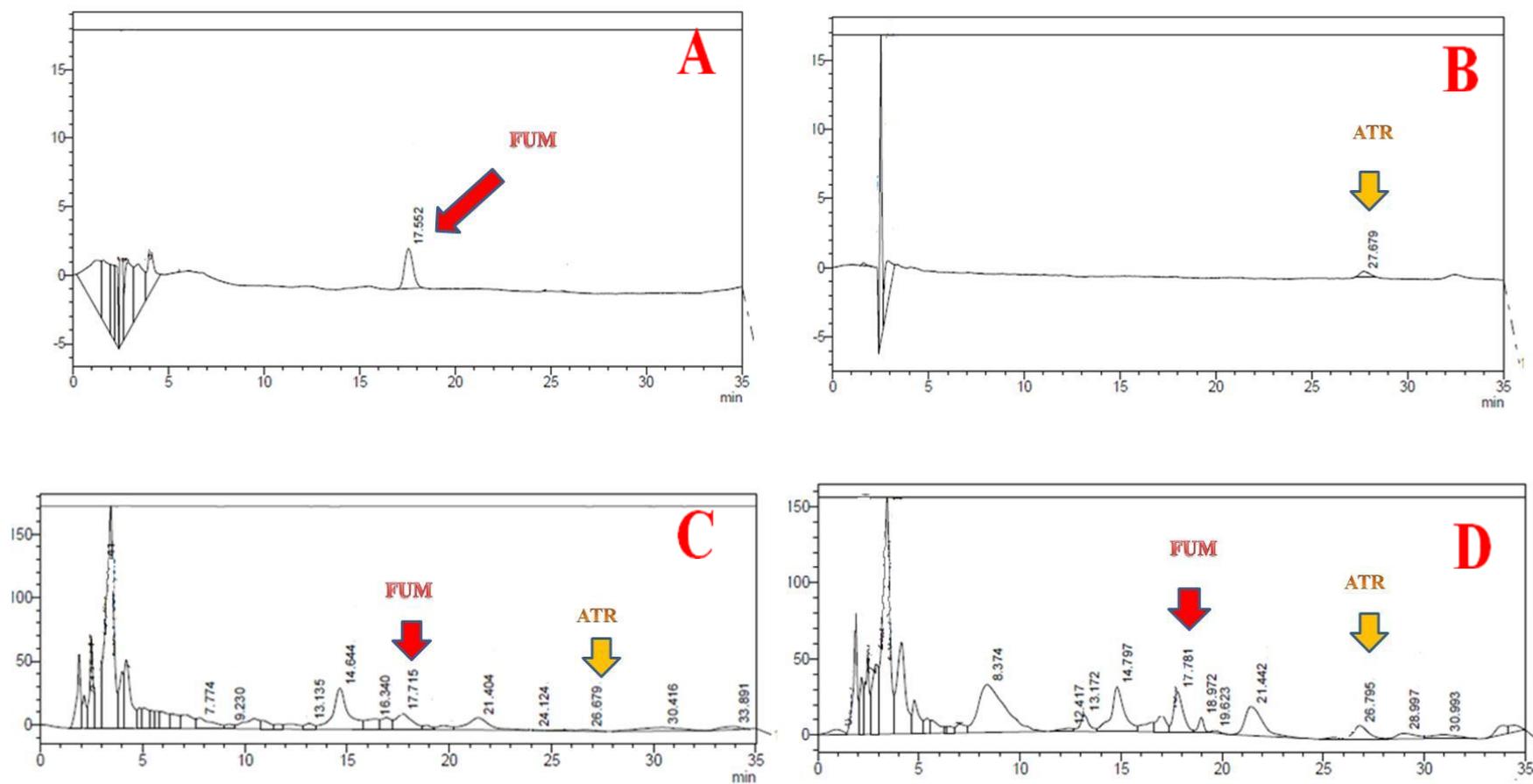


Figura 21 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Onde A: Ácido Fumarprotocetrárico (FUM); B: Atranorina (ATR); C: Extratos de *C. verticillaris*, provenientes de Saloá; D: Extratos de *C. verticillaris* provenientes de Alhandra.

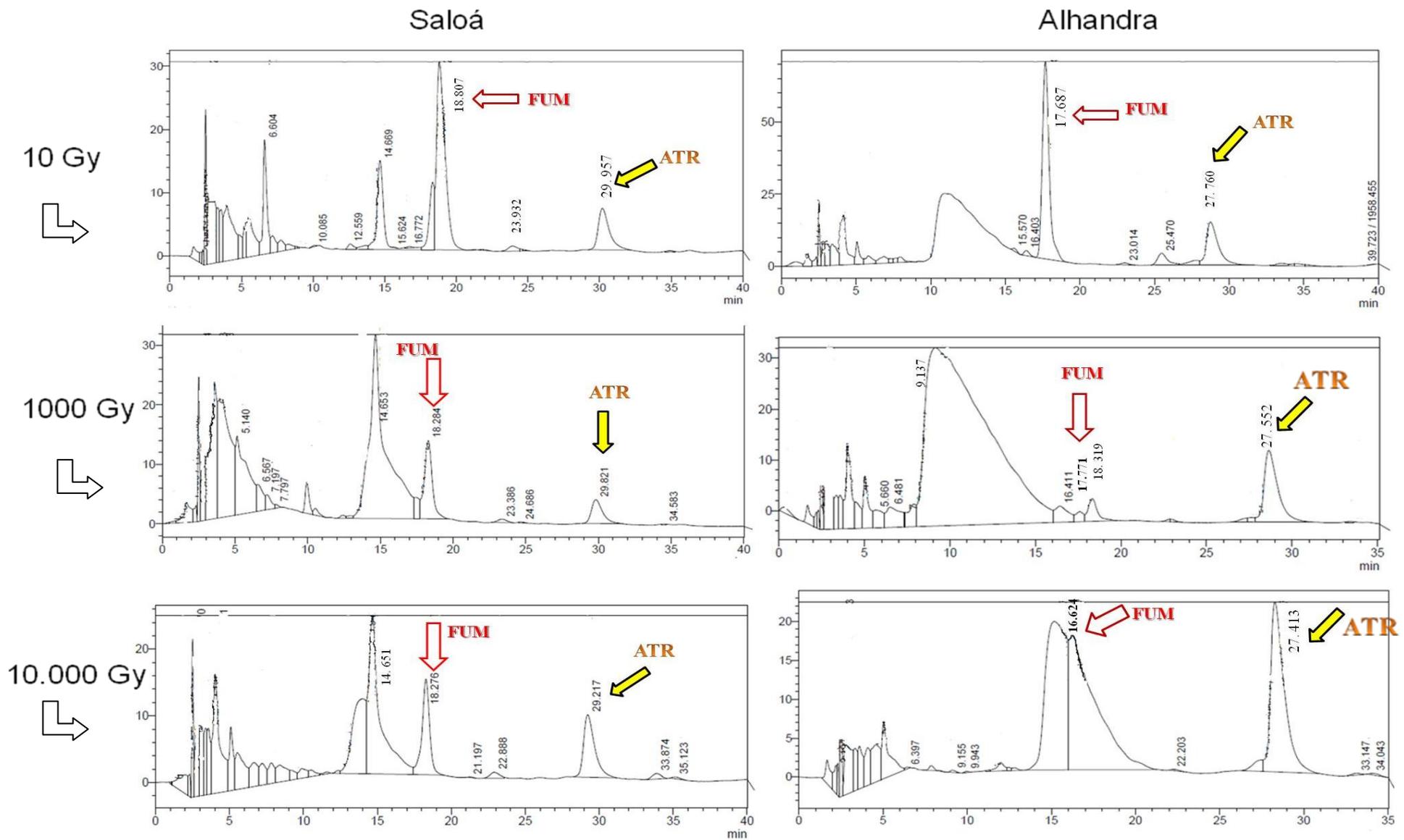


Figura 22 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos orgânicos (etério + clorofórmico + acetônico) de *C. verticillaris* submetida a diferentes doses de radiação gama (10 , 1000 e 10.000 Gy) após 90 dias de experimento. Onde: FUM: Ácido Fumarprotocetrárico; ATR: Atranorina.

Outra substância analisada em CLAE dos extratos irradiados de *C. verticillaris* foi a atranorina. Observa-se, nos extratos das amostras provenientes de Saloá, que o pico correspondente a ATR, foi registrado com o tempo de retenção de, aproximadamente, 29 minutos, apresentando produção para as amostras irradiadas com 10; 1000 e 10.000 Gy de: 0,07; 0,03 e 0,08 mg.mL⁻¹, respectivamente. Dessa forma, verifica-se a maior produção para as amostras irradiadas com 10.000 Gy. Vale salientar que a produção de ATR nas amostras de *C. verticillaris* provenientes de Saloá foi de 0,008 mg.mL⁻¹, demonstrando, novamente, alterações na produção das substâncias liquênicas pela influência da radiação gama.

A produção de ATR por *C. verticillaris* proveniente de Alhandra não exposta a radiação gama foi de 0,024 mg.mL⁻¹. Após exposição gama o TR da referida substância foi de, aproximadamente, 27 minutos. A produção para amostras irradiadas com 10; 1.000 e 10.000 Gy foi de 0,15; 0,06 e 0,20 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Nas amostras não irradiadas de *C. verticillaris* de Saloá, observa-se que a produção do FUM (0,039 mg.mL⁻¹) apresentou-se inferior à produção da substância não identificada com TR de 14,7 minutos (0,094 mg.mL⁻¹). Após exposição à dose de 10 Gy, a produção de FUM foi de 0,26 mg.mL⁻¹ e a da substância referida foi de 0,10 mg.mL⁻¹, demonstrando, dessa forma, alterações qualitativas e quantitativas na produção das substâncias liquênicas após exposição à radiação gama, possivelmente por alterações em suas vias metabólicas.

Observa-se, de maneira geral, uma diferença significativa entre os teores de substâncias sintetizadas pelas amostras coletadas em Saloá e em Alhandra (FUM e ATR e outras substâncias não identificadas), bem como na variação do seu TR na coluna. Alguns picos não-identificados observados na CLAE apresentam TR próximo ao FUM e ATR podem ser metabólitos intermediários da via biossintética ou produtos de degradação (BURIL, 2011).

Fernandez et al. (2006) ao irradiar soluções de ácido úsnico com doses de 7,5 mJ/cm² de radiação UVA e 1,46 mJ/cm² de UVB constataram a formação de fotoprodutos. Os mesmos autores verificaram, ainda, um aumento na concentração desse fotoproduto associado a uma diminuição na concentração do USN à medida que aumentava o tempo de experimento. Neste trabalho, o aumento na produção de metabólitos intermediários foi acompanhado de uma diminuição na concentração da substância principal produzida pela espécie com o aumento da dose de radiação gama.

A radiosensibilidade nos líquens não ocorre na mesma proporção para os organismos simbióticos. Gannutz (1972) observou que as células das algas apresentam-se mais radiosensíveis que as do fungo. Após irradiar algas e fungos líquênicos, verificou que a dose para 50% de sobrevivência de suas células (LD₅₀) é de 100 Gy para a alga e de 400 Gy para o fungo.

Sobre a radioresistência dos fungos Chou et al. (1971) verificaram que o fungo *Penicillium expansum*, após receber a dose de 1.000 Gy não apresentou danos ao DNA e RNA. Thompson (1990) não observou danos ao fungo *Fusarium graminearum* após receber dose de 5.000 Gy. O fato pode, ainda, ser corroborado por Nifontova et al. (1989) que afirmam que culturas do fotobionte líquênico *Trebouxia erici* é mais sensível à radiação gama que o micobionte de *Parmelia caperata*.

Dessa forma, tendo em vista a radiosensibilidade das algas, procurou-se quantificar os teores de clorofila das amostras de *C. verticillaris* provenientes de Alhandra e Saloá submetidas as diferentes doses de radiação gama, visto que a quantidade deste pigmento está estreitamente relacionada com os percentuais de células de algas vivas, sendo elas as responsáveis pela síntese de carboidratos na simbiose líquênica (MAZZITELLI et al., 2006).

A quantificação de clorofila total nas amostras provenientes de Saloá (figura 23) e Alhandra (figura 24) irradiadas com raios gama, e suas amostras controle, demonstram que a concentração deste pigmento foi maior nas amostras controle em todo o experimento, existindo uma diminuição na sua concentração com o aumento do tempo de coleta. Estes resultados acompanham os obtidos em relação à concentração/acúmulo de FUM.

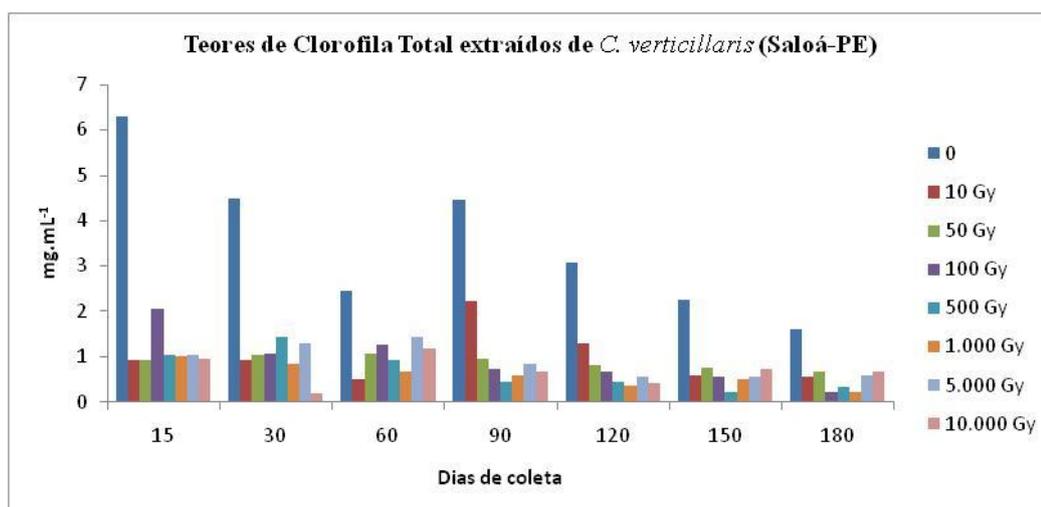


Figura 23: Teores de clorofila total extraídos de *C. verticillaris*, coletada em Saloá-PE, após irradiação gama em diferentes épocas de coleta.

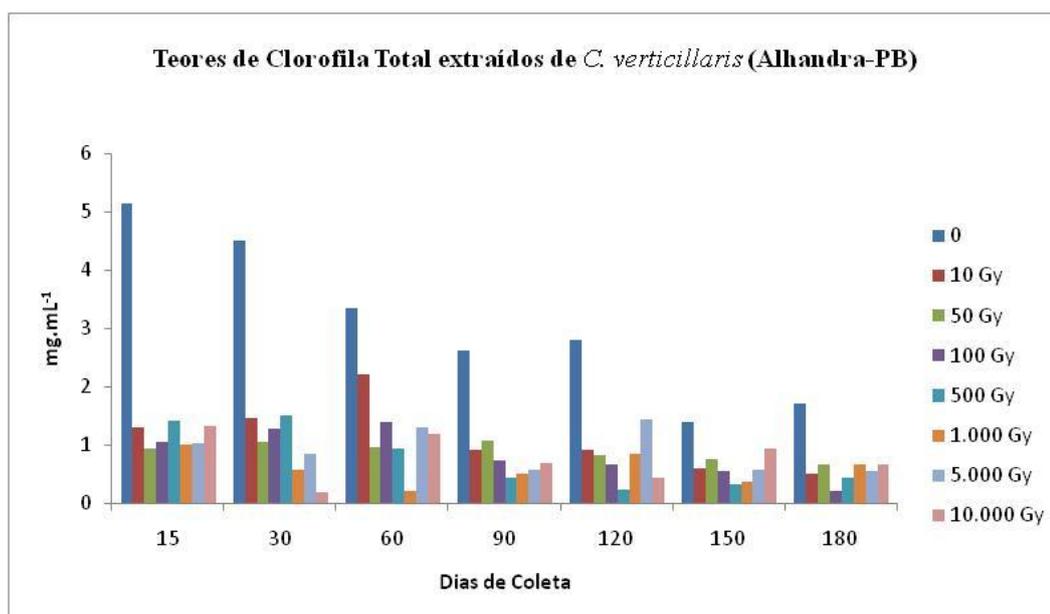


Figura 24: Teores de clorofila total extraídos de *C. verticillaris*, coletada em Alhandra-PB, após irradiação gama em diferentes épocas de coleta.

Os maiores teores de clorofila total encontrados em amostras de *C. verticillaris* provenientes de Saloá, ocorreu na coleta de 90 dias, no tratamento de 10 Gy, apresentando, apenas, 0,20 vezes a amostra controle. Para amostras de Alhandra, o destaque foi para a coleta de 60 dias, na dose de 10 Gy, com teores de 0,66 vezes a amostra controle.

Os menores teores de clorofila total foram encontrados na coleta de 180 dias, com redução de 87% em relação à amostra controle na dose de 1000 Gy, e redução de 88% em relação à amostra controle, na dose de 100 Gy, para Saloá e Alhandra, respectivamente.

Observa-se, ainda, que nas amostras provenientes de Alhandra os teores de clorofila total extraídos das amostras irradiadas com 10 Gy apresentam-se de forma crescente de 15 a 60 dias de coleta. Isto pode ser explicado como provável mecanismo de reparo de DNA, ou fotoreativação, conforme sugerido por Hall (2002) após observar que talos hidratados de *Cladonia arbusculosa* após tratamento com irradiação UVB e acondicionados em baixa temperatura (2°C) diminuem a acumulação de dímeros de piridimina (CPD's).

Gannutz (1972) observou danos causados ao DNA de diferentes algas liquênicas com dose de até 10.000 Gy de radiação gama de uma fonte de Co-60. Nifontova et al. (1995) ao estudarem o efeito da radiação gama em *Cladonia arbuscula*, *Peltigera aphthosa*, *Cetraria islandica* e *Hypogymnia physodes* com doses de 50, 100, 500, 1.000, 5.000 e 50.000 Gy, observaram que os danos a membrana plasmática, respiração, fotossíntese, nitrogênio total e atividade de peroxidase não tiveram relação direta com o aumento da dose de radiação empregada.

Os resultados podem ser ratificados em função dos postulados de Jones; Platt (1969); Pollum; Erbisch (1972); Synder; Platt (1973) e Erbisch (1974) que afirmam a existência da produção de feofitina, resultante da degradação da clorofila em *Cladonia sylvatica* e *C. verticillta* irradiadas com doses agudas ou crônicas de radiação gama.

Dessa forma, ao comparar as amostras provenientes das duas localidades, observa-se que os teores de FUM e de clorofila total, sofreram influência da radiação utilizada, porém o aumento da produção/acúmulo não foi diretamente proporcional ao aumento da dose utilizada.

Portanto, com base nos resultados aqui apresentados e no referencial teórico mencionado é possível verificar uma interferência no metabolismo de espécies liquênicas, quando submetidas à irradiação com raios gama, atribuindo, ao mesmo tempo, ao líquen a capacidade de ativação da biossíntese de seus fenóis, onde foi possível verificar que a radiação gama teve uma maior influência sobre as amostras de *C. verticillaris* coletadas em Alhandra.

A etapa posterior consistiu em quantificar e analisar os teores de FUM dos extratos de *C. verticillaris*, provenientes de Saloá (figura 25) e Alhandra (figura 26), após irradiação ultravioleta do tipo B (UVB), e suas amostras controle, ao longo de 180 dias de experimento.

É possível observar que a produção de FUM nas amostras irradiadas foram, em todas as doses aplicadas, superiores às amostras controle, para ambos os locais de coleta. Estes dados podem ser ratificados por Fernandes et al. (2006) que verificaram após irradiação com UVB um aumento na concentração de ácido úsnico em *Xanthoparmelia microspora* de 228%. Em adição, Begora; Fahselt (2001) sugerem que UVA induz a síntese e o acúmulo de ácido úsnico e atranorina em *Cladonia uncialis*, e ainda Swanson; Fahselt (1997) observaram alterações na concentração do ácido girofórico em talos de *Umbilicaria americana* após irradiação UVB.

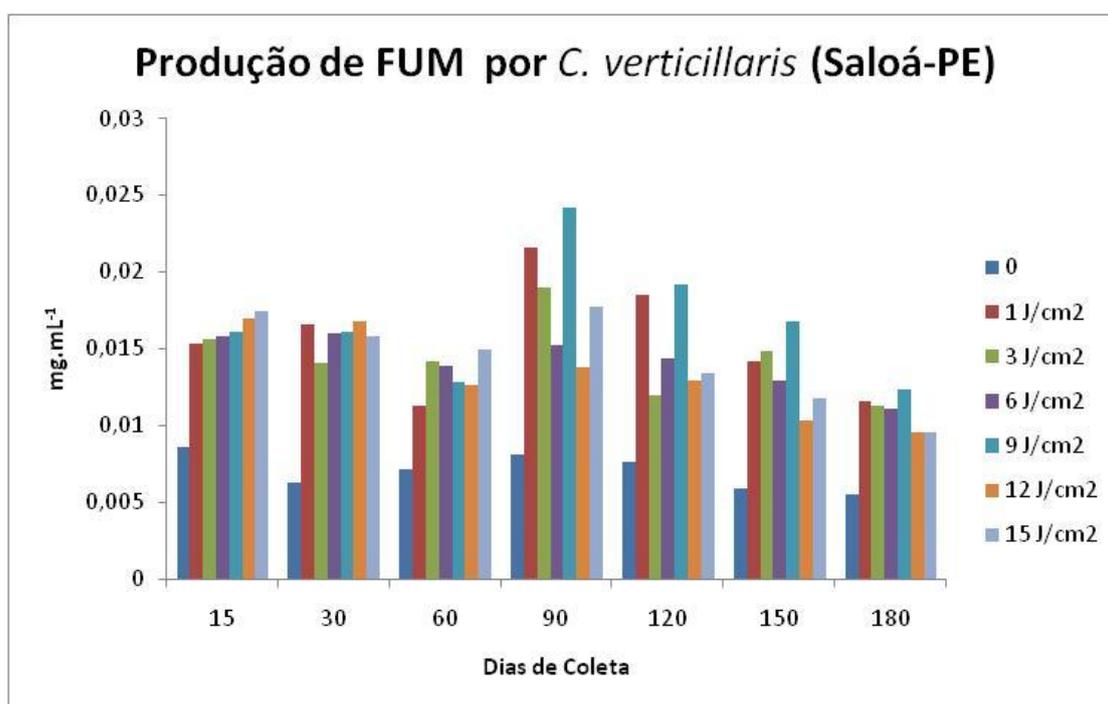


Figura 25 - Concentrações do ácido fumarprotocetrarico extraído dos talos de *C. verticillaris*, coletado em Saloá-PE, submetidos ou não a diferentes doses de radiação UVB, em diferentes épocas de coleta.

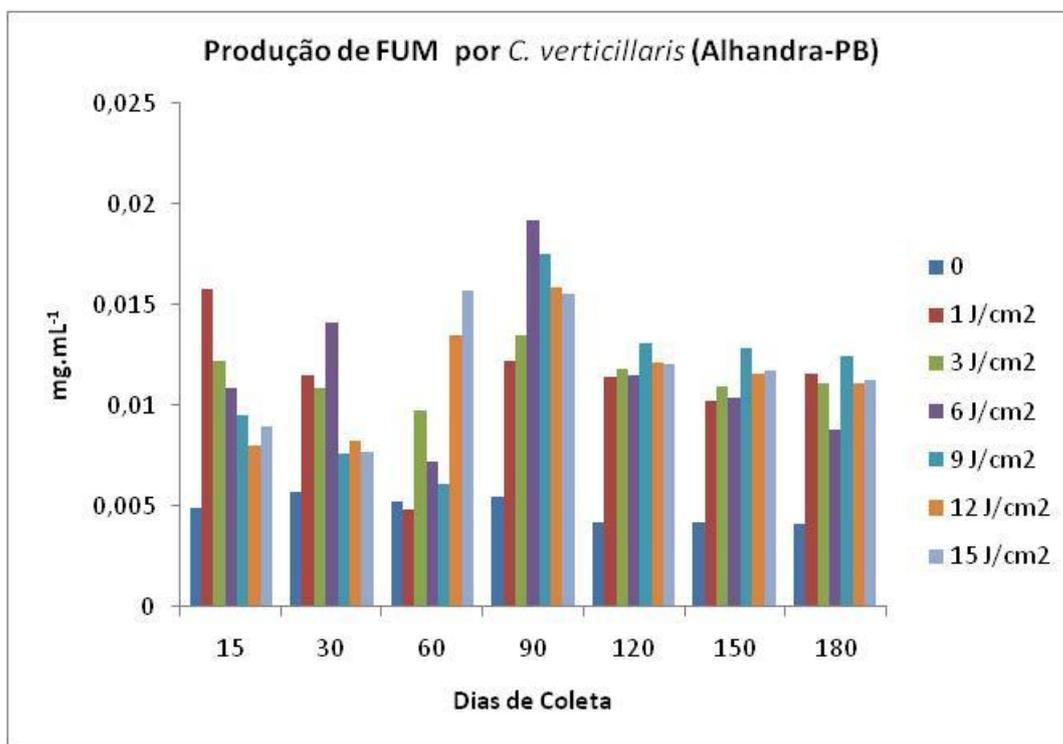


Figura 26 - Concentrações do ácido fumarprotocetrárico extraído dos talos de *C. verticillaris*, coletado em Alhandra-PE, submetidos ou não a diferentes doses de radiação UVB, em diferentes épocas de coleta.

Com base nos dados obtidos foi possível elaborar gráficos comparativos da produção de FUM entre as espécies coletadas em Saloá e em Alhandra nos diferentes tempos de experimento (figura 27).

Na figura 27 é possível observar que aos 15 dias de experimento as amostras de *C. verticillaris* coletadas em Alhandra e em Saloá tiveram a maior produção de FUM ao receber a dose de 1 e 15 J/cm², respectivamente. As amostras de Alhandra produziram 2,03 vezes e as de Saloá 3,19 vezes a mais em relação à amostra controle. Vale salientar que nas amostras de Saloá houve um aumento de produção em função do aumento da dose utilizada; ocorrendo o inverso nas amostras de Alhandra.

Amostras coletadas aos 30 e 60 dias, provenientes de Alhandra e Saloá, não seguiram nenhum padrão de produção/acumulação de FUM em função da dose utilizada. Aos 30 dias as amostras coletadas em Saloá apresentaram uma maior bioprodução sob dose de 1 J/cm², cuja produção foi de 2,66 vezes maior que o controle. Para as amostras de Alhandra a maior produção foi de 2,54 vezes maior que a amostra controle, estimulada pela dose de 15 J/cm². Já na coleta de 60 dias, destaque de

produção foi de 2,08 vezes em Saloá e 2,99 vezes maior que o controle em Alhandra, ambas na dose de 15 J/cm².

Na coleta de 90 dias observa-se um pico máximo de produção de FUM para as amostras tratadas e controle. A maior bioprodução de FUM por *C. verticillaris* de Alhandra ocorreu na amostra exposta a dose de 6 J/cm² de UVB, cuja produção foi de 3,52 vezes a mais que a amostra controle. Já as amostras provenientes de Saloá produziram 2,99 vezes a mais que à amostra controle, expostas à dose de 9 J/cm².

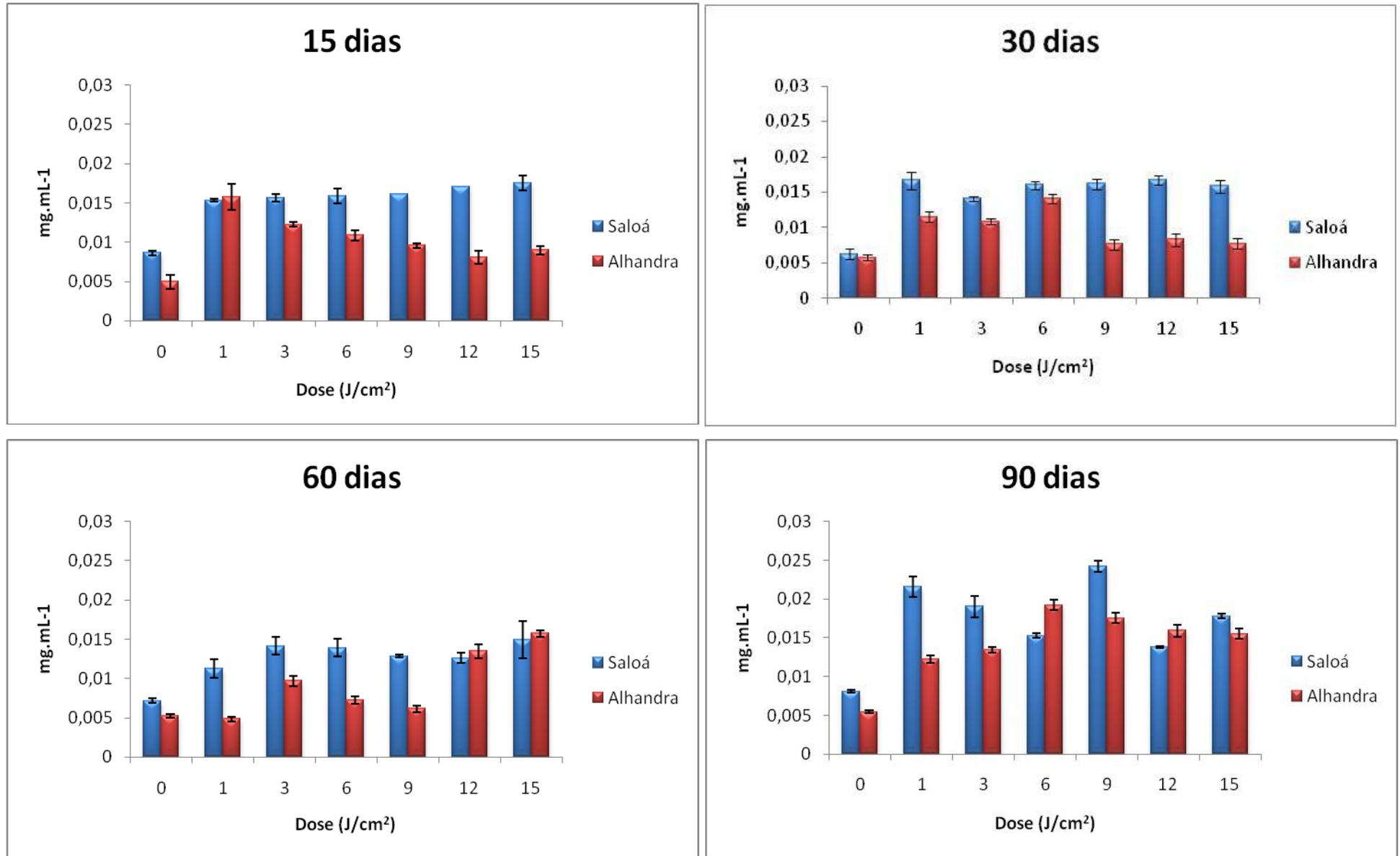
Em seguida, aos 120, 150 e 180 dias, a produção do FUM tende a diminuir de maneira diretamente proporcional ao aumento do tempo do experimento, porém essa produção ainda continuou elevada, apresentando aos 120, 150 e 180 dias, produção de 2,83 (9 J/cm²); 2,50 (9 J/cm²) e 2,25 (9 J/cm²) vezes a amostra controle, para as amostras provenientes de Saloá; para as amostras de Alhandra destacaram-se as produções de 3,12 (9 J/cm²), 3,06 (9 J/cm²) e 2,98 (9 J/cm²), vezes a mais que a amostra controle, respectivamente. Pode ser observado para as amostras de Saloá e Alhandra, que a dose de 9 J/cm² nas 3 últimas coletas obteve destaque na estimulação da produção do FUM.

Vale salientar que, para os experimentos realizados com UVB, as amostras de *C. verticillaris* de Saloá e Alhandra, em nenhum dos tempos de coleta, apresentaram relação direta entre o aumento da produção de FUM e o aumento da dose utilizada. A exceção foi para os primeiros 15 dias de experimento para *C. verticillaris*, onde as amostras coletadas em Saloá apresentaram produções crescentes de FUM em função do aumento da dose utilizada.

O inverso ocorreu em amostras coletadas em Alhandra, também nos primeiros 15 dias de experimento, onde foi possível observar uma diminuição na produção de FUM com o aumento da dose utilizada. Estes dados estão de acordo com Swanson; Fahselt (1997); Begora; Fahselt (2001), Bjerke et al. (2005) e Fernandes et al. (2006) que observaram uma diminuição na produção de metabólitos liquênicos com o aumento da dose de radiação ultravioleta.

Os resultados indicaram, ainda, a existência de uma hiper produção de FUM aos 90 dias de experimento para líquens de ambas as procedências. Esta hiper produção, provavelmente, ocorre para proteger a camada das algas do estresse radioativo (RUNDEL 1978; LAWREY 1986).

Figura 27



Continua na próxima página

Continuação da figura 27

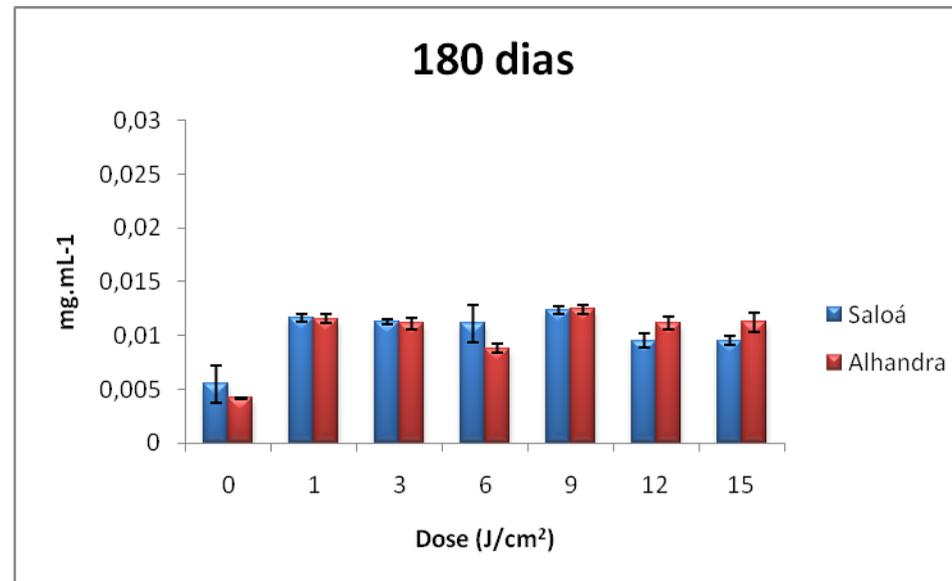
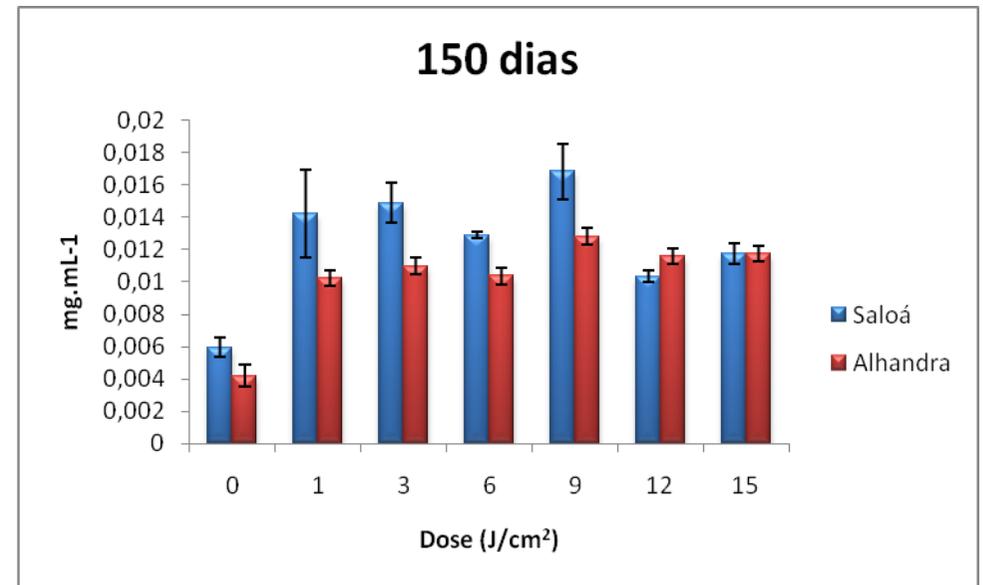
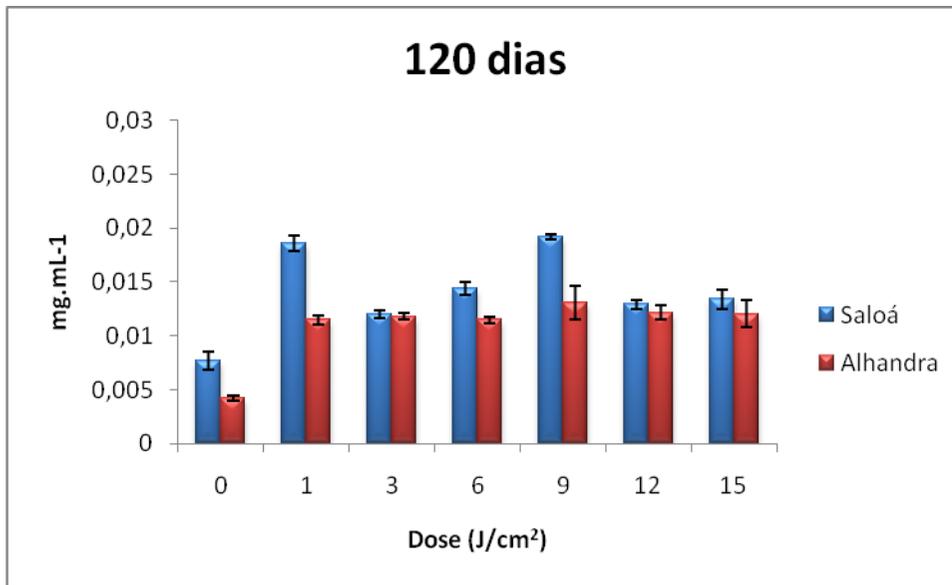


Figura 27 - Produção de Ácido Fumarprotocetrárico (mg.mL⁻¹) em função da dose de radiação ultravioleta (UVB) nos diferentes tempos de coleta. ⊥: Desvio Padrão negativo; ⊤: Desvio padrão positivo.

Este pico de produção aos 90 dias, seguido de uma tendência à diminuição, foi semelhante para as amostras irradiadas com radiação gama, o que provavelmente pode representar um limite na produção/acúmulo de FUM para as espécies coletadas em ambos os locais.

Fernandes et al. (2006) ao irradiar *Xanthoparmelia microspora* com dose de $7\text{mJ}/\text{cm}^2$, observaram um pico máximo de produção aos 15 dias de experimento, onde constataram um aumento na concentração de ácido úsnico em 326,31% para as amostras irradiadas com UVA e 218,94% para as irradiadas com UVB. Em adição, Larsson et al. (2009) observaram que UVB incrementa a biossíntese da parientina em *Xanthoria aureola* após 15 dias de experimento.

Hall et al. (2002) observaram um aumento de até 218% na produção de compostos fenólicos em *Cladonia arbuscula* após exposição a dose de $13\text{kJ}/\text{cm}^2$ de radiação UVB após 7 dias de experimento, sugerindo que esse acúmulo se dá como forma de fotoproteção dos simbiontes e por sua atividade antioxidante. E, ainda, Solhaug et al. (2003) observaram que a radiação UVA e UVB em *Xanthoria parietina* induzem a síntese de parientina.

Em virtude da maior produção do FUM apresentar-se aos 90 dias de experimento, foi realizada CLAE dos extratos de amostras de *C. verticillaris* submetidas às doses de 1, 9 e $15\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UVB (figura 28). Observa-se, de forma geral, uma diferença entre as amostras coletadas em Saloá e em Alhandra em relação à variação nas áreas dos picos correspondentes ao FUM, bem como no seu tempo de retenção (TR) na coluna.

Nos cromatogramas referentes às amostras de *C. verticillaris* provenientes de Saloá irradiadas com doses de 1; 9 e $15\text{J}/\text{cm}^2$ de UVB, o TR para o pico referente ao FUM foi de, aproximadamente, 17,7 minutos. Nestas amostras a produção de FUM foi de 0,023; 0,065 e $0,036\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. A dose que influenciou uma maior produção de FUM por *C. verticillaris*, após exposição UVB, foi $9\text{J}/\text{cm}^2$, dados que estão em conformidade com os obtidos por espectrofotometria.

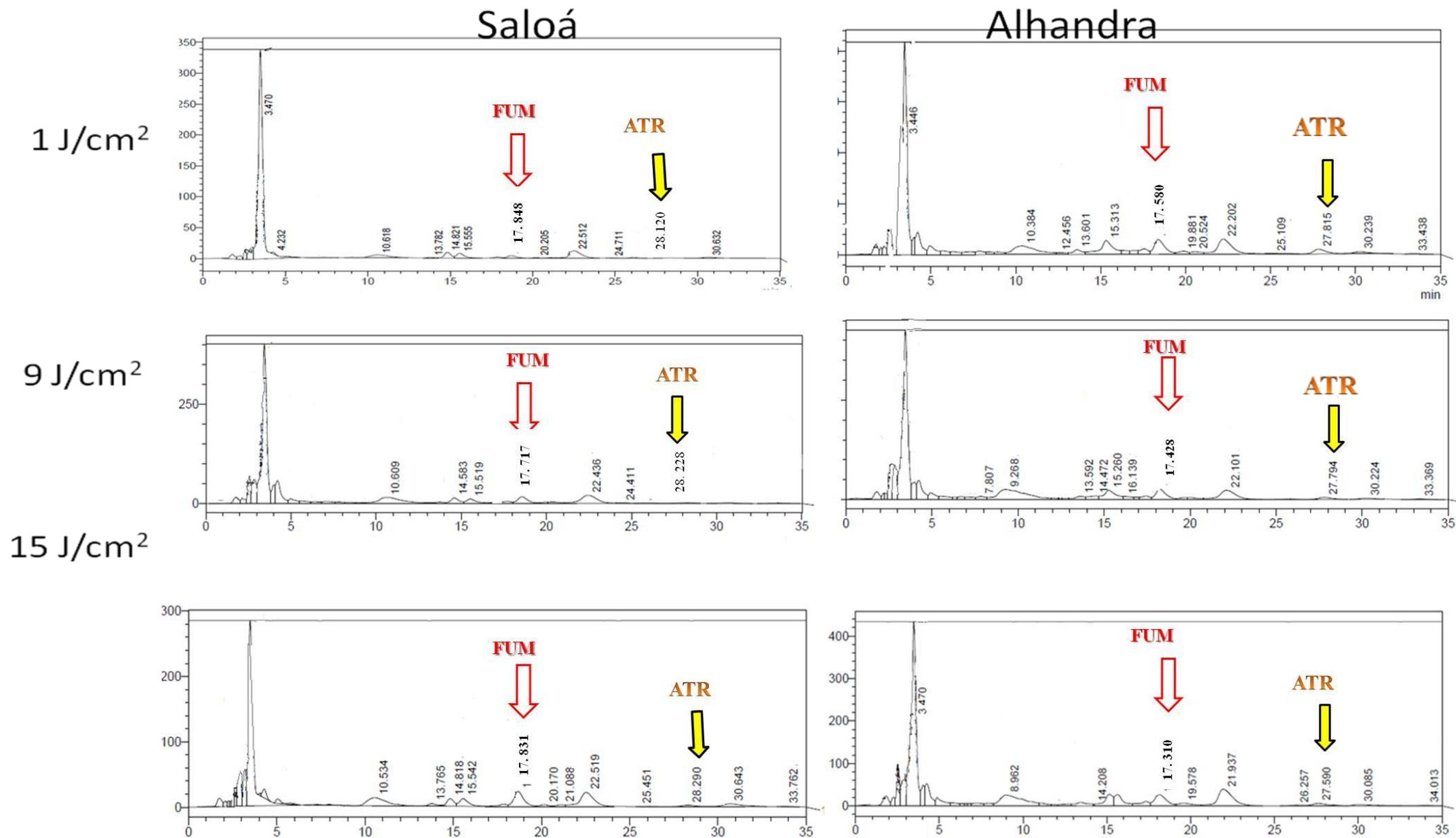


Figura 28 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos orgânicos de *C. verticillaris* submetida a diferentes doses de radiação UVB (1, 9 e 15 J/cm²) após 90 dias de experimento. Onde: FUM: Ácido Fumarprotocetrárico; ATR: Atranorina.

Nas cromatografias das amostras referentes aos extratos de *C. verticillaris* de Alhandra irradiadas com 1; 9 e 15 J/cm² de UVB, foi observado que o pico correspondente ao FUM surgiu com TR de, aproximadamente, 17,5 minutos, apresentando produção de 0,045; 0,055 e 0,049 mg.mL⁻¹, respectivamente. A maior produção de FUM foi encontrada nas amostras de *C. verticillaris* expostas à dose de 9 J/cm², estando esses dados em conformidade com os obtidos por espectrometria.

Destacam-se, ainda, na CLAE das amostras de Saloá, substâncias, não identificadas, com TR de, aproximadamente, 10,6; 14,8; 15,5 e 22,5 minutos, onde a produção para as amostras irradiadas com 1 J/cm² foi de 0,065; 0,018; 0,28 e 0,70 mg.mL⁻¹, respectivamente. Nas amostras irradiadas com 9 J/cm², a produção foi de 0,084; 0,026; 0,032 e 0,092 mg.mL⁻¹, respectivamente. E, ainda, nas irradiadas com 15 J/cm² a produção foi de 0,072; 0,24, 0,30 e 0,86 mg.mL⁻¹, respectivamente. Observa-se, de maneira geral, que a dose de 9 J/cm² foi a que causou maior influência na produção das referidas substâncias.

Nos cromatogramas referentes aos extratos de *C. verticillaris* de Alhandra, expostas a 1 J/cm² destacam-se os picos das substâncias referentes ao TR de 10,3; 15,3; 22,2 e 27,8 minutos, cujas respectivas produções foram de 0,073; 0,065; 0,081 e 0,021 mg.mL⁻¹. Nas amostras irradiadas com 9 J/cm², destacam-se os picos das substâncias com TR de 9,2; 15,2; 22,1 e 27,8 minutos, cujas suas respectivas produções foram: 0,12; 0,047; 0,066, 0,018 mg.mL⁻¹. Nas amostras irradiadas com 15 J/cm², o TR das substâncias que obtiveram destaque foi de 8,9; 15,1; 21 e 27,6 minutos, com produções de 0,095; 0,036; 0,095 e 0,015 mg.mL⁻¹, respectivamente.

A diferenciação nos dados obtidos (TR e produção das substâncias) demonstra que doses de radiação UVB influenciam de maneira diferenciada a produção das substâncias liquênicas, o que pode ser corroborado por autores já mencionados (Fernandes et al., 2006; Larsson et al., 2009).

Sabe-se que em *C. verticillaris* a substância produzida em maior quantidade é o FUM seguido de ATR e PRO (AHTI et al., 1993; ATHI; MARCELLI, 1995; HUNECK; YOSHIMUA, 1996 ATHI; MARCELLI, 1995). Entretanto, nos cromatogramas obtidos, foi encontrada uma maior produtividade nos picos referentes a outras substâncias que segundo Grodzinsky (1989) e Pereira et al. (1999) pode ocorrer

devido a algum bloqueio nas etapas metabólicas causado pela radiação, ou como mecanismo de proteção do líquen contra a agressão externa.

Analisando as concentrações de clorofila total dos extratos de *C. verticillaris*, provenientes de Saloá (figura 29) e Alhandra (figura 30), após irradiação UVB, é possível observar que a amostra controle apresentou uma maior concentração destes pigmentos em todo experimento, e que essas concentrações diminuem com o aumento do tempo de experimento.

Os dados podem ser corroborado por Unal et al. (2009) e Kovacik et al. (2011) que observaram que a quantidade de clorofila total diminui com o aumento da dose de radiação UVA em *Physcia semipinnata* e *Xanthoria parietina*. Solhaug et al. (2003) observaram que a radiação UVA e UVB sobre *Lobaria pulmonaria* induzem a síntese de pigmentos fotoprotetores, neste caso a melanina. Lasson et al. (2009) verificaram modificações nas concentrações de clorofila total após irradiação UVB em *Lobaria pulmonaria* e *Xanthoria aureola*. Em adição, Begora; Fahselt, (2001) e Solhaug; Gauslaa (2004) sugerem que síntese de metabólitos secundários está diretamente relacionada com a disponibilidade de pigmentos fotossintetizantes.

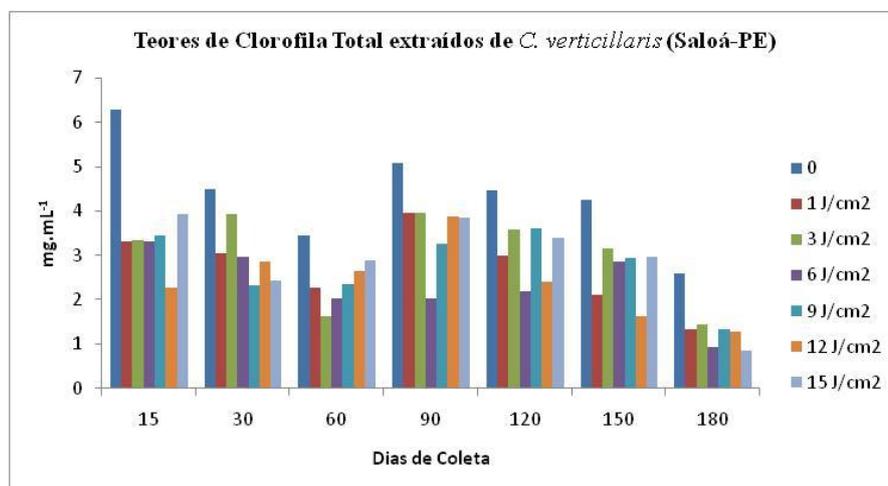


Figura 29 - Teores de Clorofila Total extraídos de *C. verticillaris*, coletada em Saloá-PE, após irradiação UVB em diferentes épocas de coleta.

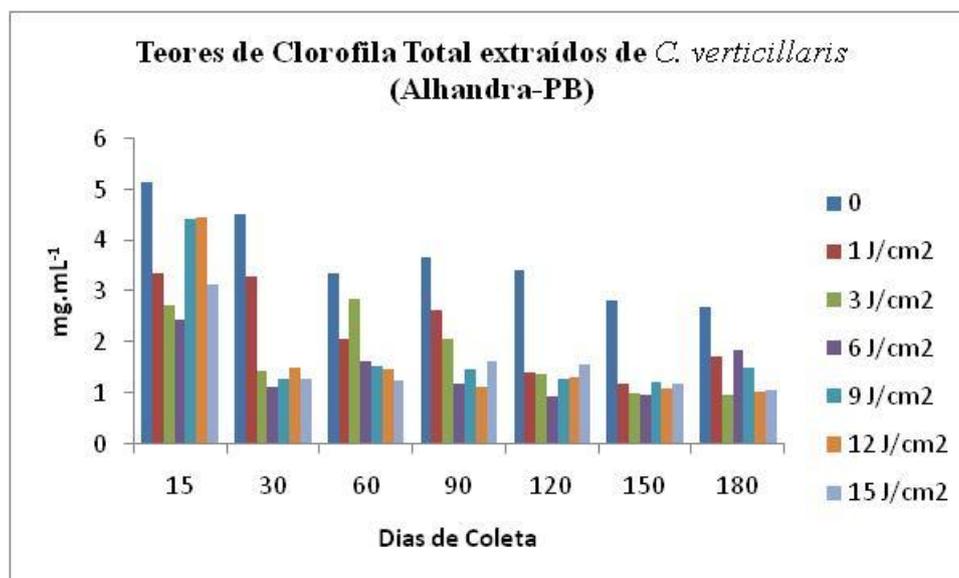


Figura 30 - Teores de Clorofila Total extraídos de *C. verticillaris*, coletada em Alhandra-PE, após irradiação UVB em diferentes épocas de coleta.

Com base nos dados observados, verifica-se que a bioprodução de FUM foi maior nas amostras coletadas em Saloá. Porém foram as amostras provenientes de Alhandra que obtiveram um maior aumento percentual quando comparado à amostra controle.

A maior produção de FUM nas amostras coletadas em Saloá submetidas à radiação UVB, ou não, pode ser explicado por Saloá apresentar uma maior amplitude térmica anual ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), associada a uma maior altitude, o que estimula a bioprodução natural de compostos liquênicos, neste caso o FUM, como forma de proteção dos simbiontes. Em contrapartida, a porcentagem de produção em Alhandra é maior em relação à amostra controle, por responder a um estresse, nesse caso, um excesso de radiação UVB, inexistente no local de coleta.

Em adição, Culberson et al. (1977) verificaram que amostras de *Cladonia chlorophaea* coletada a 1000 m apresentaram uma maior concentração de FUM que as coletadas ao nível do mar; e Rubio et al. (2002) verificaram que as concentrações do ácido rizócarpico em *Acarospora schleicheri* aumentavam de acordo com o aumento da altitude e, conseqüentemente, com o aumento dos índices de radiação UVB.

5. CONCLUSÕES

O líquen *Cladonia verticillaris*, quando submetido à radiação gama e ultravioleta (UVB), produz ácido fumarprotocetrárico, seu composto majoritário, durante seis meses de experimento, independentemente dos tratamentos. As amostras provenientes de Alhandra-PB apresentam um maior aumento na produção do ácido fumarprotocetrárico que as coletadas em Saloá-PE.

O líquen *Cladonia verticillaris* teve sua maior produção do ácido fumarprotocetrárico aos 90 dias de experimento. Nas amostras coletadas em Saloá a maior produção foi nos tratamentos que receberam doses de 9 J/cm² (UVB) e 5.000 Gy (gama). Para as amostras coletadas em Alhandra, as doses de 6 J/cm² (UVB) e 500 Gy (gama), foram as que estimularam a maior produção da referida substância.

Em adição, foi verificado que a dose de 10.000 Gy estimula um aumento de, aproximadamente, 100 vezes na produção de atranorina, substância secundária, em *Cladonia verticillaris* coletada em Saloá e em Alhandra.

A produção de clorofila total, nos quatro experimentos, é maior para as amostras não irradiadas, demonstrando, dessa forma, que as radiações gama e UVB, em todas as doses adicionadas, provocam, provavelmente, danos/alterações nas características fisiológicas de *C. verticillaris*.

Como perspectiva, são sugeridos ensaios químicos complementares para a separação de outras substâncias líquênicas, novas análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, realização de Ressonância Magnética Nuclear e análise em espectrometria de massa, objetivando identificar e quantificar substâncias, provavelmente, produzidas e/ou modificadas pela ação das radiações gama e/ou UVB.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. Chichester: John Wiley e Sons.1993. 250p.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of lichen substances**. Tokio: Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. 240p.
- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER FILHO, L. The lichen Family *Cladoniaceae* in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Bryology**, v. 7, p. 55-70. 1993.
- AHTI, T.; XAVIER FILHO, L. Taxonomy of the *Cladonia verticillaris* complex in South America. *Bibliotheca Lichenologica*, v. 58, p. 5 -25. 1995
- ANDREUCCI, R.. **Proteção Radiológica - Aspectos Industriais**. Ed. Jan 2010. Abendi, Paraná. 124p.
- AZEVEDO, A. C. P. **Radioproteção em Serviços de Saúde**. FIOCRUZ. 30p. 2010 Disponível em <http://www.biossegurancahospitalar.com.br/>. Acessado em 20/12/2010.
- BARSTOW, J. M.; ERBISCH, F. H. Effects of acute gamma radiation and winter temperature-light conditions on photosynthesis of *Cladonia mitis*. **Byologist**, v. 80, p. 83-87. 1977.
- BACKOR, M., FAHSELT, D. Lichen photobionts and metal toxicity (review article). **Symbiosis**, v. 1. 46, p. 1–10. 2008.
- BEGORA, M. D., FAHSELT, D. Usnic Acid and Atranorin Concentrations in Lichens in Relation to Bands of UV Irradiance. **The Bryologist**, v.104, n. 1, p. 134 140. 2001.
- BELIVERMIS, M.; ÇOTUK, Y. Radioactivity measurements in moss (*Hypnum cupressiforme*) and lichen (*Cladonia rangiformis*) samples collected from Marmara region of Turkey. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 101, p. 945-951. 2010.
- BJERKE, J. W., GWYNN-JONES, D., CALLAGHAN, T. V. Effects of enhanced UVB radiation in the field on the concentration of phenolics and chlorophyll fluorescence in two boreal and arctic-alpine lichens. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 139–149, 2005.
- BOARETTO, E., BERKOVITS, D., HOLLOS, G., PAUL, M.. Measurements of natural concentrations of ¹²⁹I in uranium ores by AMS. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 50, p. 280-285. 1990
- BOLUS, N. E. Basic Review of Radiation Biology and Terminology. **Journal Nuclear Medicine Technology**, v. 29, p. 67-73, 2001.
- BORNMAN, J. F. Target sites os UV-B radiation in photosynthesis of hight plants. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology**. v. 4. p. 145-158. 1989.

BRETTEN, S., GAARE, E., SKOGLAND, T., STEINNES, E. Investigations of radiocesium in the natural terrestrial environment in Norway following the Chernobyl accident. **Analyst** **117**, v.3, p. 501-503. 1992

BRODO, I. M., Field studies of the effects of ionizing radiation on lichens, **Bryologist**, v. 67, p.76-87, 1964

BURIL, M. L. L. **Estudo comparativo da síntese, bioprodução fenólica e genética de *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR.** ocorrentes em duas áreas de tabuleiro arenoso. Recife: Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal/UFPE. Recife, 83 p. 2011.

CARDOSO, E. M. **Apostila Educativa: Aplicações da Energia Nuclear** (Comissão Nacional de Energia Nuclear, Rio de Janeiro), 18 p. Disponível em br/ensino/apostilas.asp. Acesso em 23/2/2006.

CHOU, T. W., SALUNKHE, D. K., SINGH, B. Effects of gamma radiation on *Penicillium expansum* L. III. On nucleic acid metabolism. **Radiation Botany**. v.11, n. 5, p. 329-334, 1971.

CONTI, M.E., CECCHETTI, G. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment a review. **Environ. Pollut**, v. 114, p. 471-492. 2001.

CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer-chromatographic method. **J. Chromatog**, p.113-125. 1972.

CULBERSON, W. L.; CULBERSON, C. F. A phylogenetic view of evolution in lichens. **Bryologist**, v 73, p 1-31, 1970.

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L.; JOHNSON, A. Genetic and environmental effects on growth and production of secondary compounds in *Cladonia cristatella*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 11, p. 77– 84. 1983.

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L.; AHWOOD, D. A. Physiography and fumarprotocetraric acid production in the *Cladonia chlorophaea* Group in North Carolina. **Bryologist**, v. 80, p 71-75, 1977.

DE LA TORRE NOETZEL , R.; SANCHO, L. G.; HORNECK, G. Adaptation of epilithic lichens to high levels of UV irradiation. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOT LICHENOLOGY, 5., 2004, Estonia. **Anais...** Estonia: University of Tartu, 2004, p.54.

DIFFEY, B. L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. **Phys. Med. Biol**, v. 36, n. 3, p. 299-328. 1991,

EMBRAPA Solos/UEP Nordeste, 2011. [http:// www. uep. cnps. embrapa. br/uep_historico.php](http://www.uep.cnps.embrapa.br/uep_historico.php). Acessado em 1 de junho de 2011.

ERBISCH, F. H. Effects of acute and chronic gamma radiation on *Cladonia sylvatica* and *Parmelia sulcata*. **USAEC REPORT COO-2087-7**, Michigan Technological University, 1974

ERBISCH, F. H. Effects of chronic gamma radiation on the lichen *Parmelia sulcata* Tayl. in the enterprise radiation forest. **Radioecological Studies**. Wisconsin, p. 25-34. 1977.

ERBISCH, F. H.; KALOSIS, J. J. Initial observations of the effects of gamma radiation on oxygen consumption, P³²-uptake and phycobiont of *Cladonia sylvatica* (L.) Hoflin. **Radiation Botany**. v. 13, p. 361-367. 1973.

FERNANDEZ, E.; REYES, A. HIDALGO, M. E. QUILHOT, W. Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology**, v. 42, p. 195-201, 1998.

FERNANDEZ, E.; QUILHOT, W.; RUBIO, C.; HIDALGO, M.; DIAZ, R.; OJEDA, J. Effects of UV Radiation on Usnic Acid in *Xanthoparmelia microspora* (Mull. Arg. Hale) **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 1065-1068, 2006.

FERNÁNDEZ, J. A. R.; QUINTERO, A. B.; ROJAS, V. M. P. A.; VERA, D. D.; CONTRERAS, Z. P.; BRICEÑO, R. V.; PRÜ, E. P. Metabolitos secundarios de líquenes de la zona nival de la Sierra Nevada de Mérida-Venezuela y su papel en la absorción de la radiación ultravioleta. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 65(1), p. 59-72, 2008.

FAHSELT, D. UV absorbance by thallus extracts of umbilicate lichens. **Lichenologist**, v. 25, n. 4, p. 415 – 422, 1993.

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

GANNUTZ T.P. Effects of gamma radiation on lichens — I. Acute gamma radiation on lichen algae and fungi. **Radiation Botany**. v. 12, p. 331–338. 1972.

GLIESSMAN, S. R. Agroecologia: Procesos ecológicos em agricultura sustentável. 2ed. Porto alegre: Ed. Universidade/ UFRGS, 2001. 653 p.

GRODZINSKY, D. M. Radiobiologia rastenii [**Radiobiology of plants**]. Kiev: Naukova umka. 1989.

GÓMEZ-GUZMÁN, J. M.; LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J. M.; HOLM E.; PINTO-GÓMEZ, A. R. Level and origin of 129I and 137Cs in lichen samples (*Cladonia alpestris*) in central Sweden. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 10, p. 200-205. 2011.

GOMES, R. A.; **Efeito Biológico das Radiações**. In ROCHA, A. F. G., Medicina Nuclear. Guanabara Koogan. 1976. 473p.

GONZALEZ, A. L.; Biological effects of low doses of ionizing radiation: A fuller Picture. **IAEA BULLETIN**, v.4. p. 37-45. 1994.

- HALL, R. S. B. Effects of increased UV-B: radiation on the lichen *Cladonia arbuscula* ssp. mitis: UV-absorbing pigments and DNA damage. **Dissertação**. Department of Cell and Organism Biology. 37p. 2002.
- HALL, R. S. B.; BORNMAN, J. F. BJORN, L. O. UV-induced changes in pigment content and light penetration in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp. Mitis. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 66, p. 13-20. 2002.
- HALE, M. E. **The Biology of Lichens**. 3ed. London: Edward Arnold Pub, 1983. 90p
- HIDALGO, M. E.; FERNANDEZ, E.; QUILHOT.; LISSI, E. Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1585-1587, 1994.
- HOFMANN, W., ATTARPOUR, N., LETTNER, H., TURK, R. ¹³⁷Cs: concentrations in lichens before and after the Chernobyl. accident. **Health Phys**, v. 64, p. 70-73. 1993
- HOBBIE, R. K.; ROTH, B. J. **Intermediate Physics for Medicine and Biology**. 4 ed. New York, Springer Verlag, 2007. 616p
- HUNECK, S. Nature of lichen substances. In: Ahmadjian, V., Hale, M.E., JR. **The Lichens**. New York: Academic Press, p. 495- 522, 1973
- HUNECK, S; YOSHIMURA, I. **Identification of Lichen Substances**. Berlin: Springer-Verlag. 1996.
- HUOVINEN, K. AHTI, I.; STENROOS, S. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia* section *Cladonia* and group *Furcatae*. **Bibliotheca Lichenologica**, v. 38, p. 209- 241, 1990.
- IBGE. 2011. <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acessado em 01/06/2011
- JANSEN, M. A. K.; GABA, V.; GREENBERG, B. M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 4, p. 131-135. 1998.
- JONES, J. M.; PLATT, R. B. Effects of ionizing radiation, climate, and nutrition on growth and structure of a lichen, *Parmelia conspersa* (Ach.) Ach. In SYMPOSIUM ON RADIOECOLOGY, 2., 1969, **USAEC REPORT CONF-670503**, p. 111-119, 1969
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia molecular e celular**. 4ed. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1987. 286p.
- KOVACIK, J.; KLEJDUS, B.; STORK, F., MALCOVSKA, S. Sensitivity of *Xanthoria parietina* to UV-A: Role of metabolic modulators. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103, p. 243–250. 2011.
- KELLER, C. **Radioquímica**. 2. ed. Recife: Editora Universitária , 1981. 348p.
- KOHLHARDT-FLOEHR, C; BOEHM F.; TROPPE S.; LADEMANN, J.; TRUSCOTT, T. G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.101, p. 97-102. 2010.

- KRANNER, I.; CRAM, W. J.; ZORN, M.; WORNIK, S.; YOSHIMURA, I.; STABENTHEINER, E.; PFEIFHOFER, H. W. Antioxidants and photoprotection in lichens as compared with its isolated symbiotic partners. **Plant Biology**, v. 102, n. 8, p. 3141-3146, 2005.
- LARSSON, P.; VECEROVAB, K.; CEMPIRKOVAB, H.; SOLHAUGA, A. K. A GAUSLA, Y. Does UV-B influence biomass growth in lichens deficient in sun-screening pigments? **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 215-221. 2009.
- LAWREY J. D. Biological role of lichen substances. **Bryologist**, v. 89, p. 111-122, 1986.
- LAWREY J. D. Chemical Defense in Lichen Symbioses In White, J. F.; Torres M. S. **Defensive Mutualism in Microbial Symbiosi**. CRC Press, 2009. 412p.
- LEGAZ, M. E.; CÓRDOBA, C. V.; PREIRA, E. C.; XAVIEL-FILHO, L.; RODRIGUES, S. A. Biotecnologia de líquens. In Xavier-Filho, L.; Legaz, M. E.; Cordoba, C. V.; Pereira, E. P. **Biologia de líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. 624p.
- LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Endogenous inactivators of alginase, L-arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant Physiol**, v.71, p.300-307, 1983.
- LEGAZ, M. E.; VICENTE, C.; ASCASO, C.; PEREIRA, E. C.; XAVIERFILHO, L. Pigment analysis of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. **Biochem.System. Ecol**, v.. 14, p.. 575-580, 1986.
- LIU, K. N. 1980. **An introduction to atmospheric radiation**. Academic Press Inc., 392 p.
- MARANTE, F. J. T.; CASTELLANO, A. G.; ROSS, F. E; AGUIAR, J. Q.; BARRERA, J. B. Identification and quantitation of allelochemicals from the *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. **J. Chem. Ecol**, v. 29, p. 2049-2071, 2003.
- MARCELLI, M. P. Fungos Liquenizados. In Xavier-Filho, L.; Legaz, M. E.; Cordoba, C. V.; Pereira, E. P. **Biologia de líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. 624p.
- MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco reinos: um guia ilustrado dos filós da vida na terra**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 497 p.
- MAZZITELLI, S. M. A. M.; MOTA-FILHO, F. O.; PEREIRA, E. C.; FIGUEIRA. Utilização de líquens no biomonitoramento da qualidade do ar. In Xavier-Filho, L.; Legaz, M. E.; Cordoba, C. V.; Pereira, E. P. **Biologia de líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. 624p.
- MELO, P. **Radiação gama na funcionalidade e Interação de *Cladonia salzmanii* nyl. (líquen) com o solo**. RECIFE Dissertação de Mestrado, Programa de Pós – graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 2011. 47p.
- MODESTO, Z. M. M; SIQUEIRA, N. J. S. **Botânica**. São Paulo: EPU. 1981. 305p.

MONNAA, F.; POUJOL, M.; LOSNO, R.; DOMINIK, J.; ANNEGARN, H.; COETZEE, H. Origin of atmospheric lead in Johannesburg, South Africa. **Atmospheric Environment**, v. 40, p. 6554–6566, 2006.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z. Naturforsch.*, v. 65c, p. 157-173, 2010.

MOTA FILHO, F., PEREIRA, E. LIMA, E. SILVA, N., FIGUEIREDO, R. Influência de poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1072-1076, 2007

MURRAY, R. L. **Nuclear Energy**. British Library. 6 ed. 2009.532p.

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

NIFONTOVA, M. G., KULIKOV, N. V.; RAVINSKAYA, A. P. Effect of γ -radiation on ^{90}Sr and ^{137}Cs accumulation in lichens. **Ekologia**, v. 6, p. 44-50, 1989.

NIFONTOVA M. G.; RAVINSKAYA, A. P.; SHAPIROJ, I. A. Effect of acute gamma radiation on some physiological features of lichens. **Lichenologist**, v. 27, n. 3, p. 215-224, 1995.

NIFONTOVA, M.; Radionuclides in the moss-lichen cover of tundra communities in the Yamal Peninsula. **The Science of the Total Environment**, v. 160/161, p. 749-752, 1995.

ODABASOGLU, F; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; CAKIN, A.; KARAGOZ, Y.; HALICI, M.; BAYIR, Y. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. **Phytother. Res**, v. 18, p. 938-941, 2004.

OKUNO, E. **Radiação: efeitos, riscos e benefícios**. São Paulo: Ed. Harbra, 1988. 81 p.

OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C. **Física para as ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Ed. Harbra, 1982. 487 p.

OKUNO, E.; VILELA, M. A. C. **Radiação Ultravioleta: características e efeitos**. Ed. 1. São Paulo: Editora Livraria da Física: Sociedade Brasileira de Física, 2005. 76p.

PANNO, J. **The cell: evolution of the first organism**. 2004. 205p.

PAWLIK-SKOWRONSKA, B.; BACKOR, M. Zn/Pb-tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelatins than specimens living in unpolluted habitats. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, p. 64–70, 2011.

PEREIRA, E. C. Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de *Cladoniae* e *Cladina*(líquen). **Dissertação de Mestrado/ UFPE**, 196p. 1989.

PEREIRA, E. C. **Biologia de Líquens**. Recife: Núcleo de Estudos do Meio Ambiente (NEMA/UFPE), 2002. 31p.

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

PEREIRA, E. C.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E.; SILVA, N. H.; SILVA, E. F.; ANDRADE, L. H. C.; Production of lichen metabolites by immobilized cells of *Cladonia clathrata*. **Phyton**, v. 39, p. 79–90, 1999.

PERES, L. **Radiação ionizante: aplicações e riscos**. Rio de Janeiro, 2008, 150p.

PICCOTTO, M.; TRETACH, M. Photosynthesis in clorolichens: the influence of the habitat light regime. **J plant res**. 2010. DOI: 10.1007/s10265-010-0329-2

POLLUM, P. A., F. ERBISCH, F. H. Effects of gamma radiation on the lichen *Cladonia verticillata* (Hoffm.) Schaer. **Bryologist**, v.75, p. 48-53, 1972.

QUILHOT, RUBIO. Química de líquens antárticos. In Xavier-Filho, L.; Legaz, M. E.; Cordoba, C. V.; Pereira, E. P. **Biologia de líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. 624p.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RICKLEFS, R. **Economia da natureza**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 503p.

RIKKINEN, J. What's behind the pretty colours? A study on the photobiology of lichens. **Bryobrothera**, v. 4, Helsinki, 238p. 1995.

ROZEMA, J.; BJORN, L. O. ; BORNMAN, J. F.; GABERSCIK, A.; HADER, D.P.; TROST, T.; GERM, M.; KLISCH, M.; GRONIGER, A.; SINHA, R. P.; LEBERT, M.; HE, Y.-Y.; BUFFONI-HALL, R.; BAKKER, N. V. J.; VAN DE STAAL, J.; MEJKAMO, B. B. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems-an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 6, p. 2-12, 2002.

RUBIO, C.; FERNÁNDEZ, E.; HIDALGO, M. E.; QUIHOT, W. Effects of solar uv-b radiation in the accumulation of rhizocarpic acid in a lichen species from alpine zones of Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v.47, n.1, 2002.

RUNDEL, P.W. The ecological role of secondary lichen substances. **Biochem Systemat Ecol**, v. 6, p. 157- 170, 1978.

SANITA DI TOPPI, L., MUSETTI, R., VATTUONE, Z., PAWLIK-SKOWRON SKA, B., FOSATTI, F., BERTOLI, L., BADIANI, M., FAVALI, M. A. Cadmium distribution and effects on ultrastructure and chlorophyll status in photobionts and mycobionts of *Xanthoria parietina*. **Microsc. Res. Tech**, v. 66, p. 229–238, 2005.

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

SILVA, H. P. B.; COLAÇO, W.; PEREIRA, E.; SILVA, N. Sensitivity of *Cladonia substellata* Vainio (lichen) to gamma irradiation and the consequent effect on limestone rocks. **Int. J. Low Radiation**, v. 7, n. 4, p. 324-332, 2010.

SOLHAUG, K. A.; GAUSLAA, Y.; NYBAKKEN, L.; BILGER, W. UV-induction of sun-screening pigments in lichens. **New Phytologist**, v. 158, p. 91-100, 2003.

STEINNES, E., NJASTAD, O. Use of mosses and lichens for regional mapping of ^{137}Cs fallout from the Chernobyl accident. **J. Environ. Radioact**, v. 21, p. 65 – 73, 1993.

SWANSON, A., FAHSELT, D. Effects of ultraviolet on polyphenolics of *Umbilicaria Americana*. **Canadian Journal of Botany**, v.75, n.2, p. 284-289. 1997.

SYNDER, J. M.; PLATT, R. B. The effects of chronic gamma radiation on the growth of a crustose lichen, *Trapelia ornate* (Sommerfelt) Hertel. **Radiation Botany**, v. 13, p. 269-271. 1973.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 707p.

THOMPSON, J.P. Soil sterilization methods to show VA-mycorrhizae aid P and Zn nutrition of wheat in Vertisols. **Soil Biol. Biochem**, v.22, p. 229–240. 1990.

UNAL, D.; UYANNIKGIL, Y. UV-B induces cell death in the lichen *Physcia semipinnata* (J. F. Gmel). **Turk Biol**, v. 35, p.137-144. 2011.

UNAL, D.; Tuney, I., Esiz-Dereboylu, A., Sukatar, A. The effect of UV-A (352 nm) stress on chlorophyll fluorescence, chlorophyll a content, thickness of upper cortex and determinate DNA damage in *Physcia semipinnata*. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 94, p. 71-76, 2009.

WOODWELL, G. M.; GANNUTZ, T. Effects of chronic gamma irradiation on lichen communities of a forest, **Amer. J. Bot.**, v.54, p.1210-1215, 1967

XAVIER-FILHO, L.; RIZZINI, C. T. **Manual de liquenologia brasileiro**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1976. 431p.

XAVIER-FILHO, L., ARRUDA, E. C., PAULO, M. Q., LEGAZ, M. E. & VICENTE, C., Chemotaxonomical study on *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. and *Cladonia calycantha* (Del.) Nyl. **Phyton**, v. 44, p. 115-119, 1984.

APÊNDICE

APÊNDICE 1: PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA REFERENTE AO TRABALHO DE TESE

• Artigos submetidos

1. Silva, H.; Melo, P.; Barros-Filho, P.; Maciel, L.; Colaço, W.; Pereira, E.; Silva, N. Effects of gamma radiation on *Cladonia verticillaris* (RADDI) FR. (lichen) collected in different environments, enviado à revista Journal of Environmental Radioactivity. Data de submissão: 13/11/2011. Número de registro: JENVRADS-D-11-00480.

2. Patryk Melo; Dário C. Primo; Helena P. de B. Silva; Eugênia C. G. Pereira. Avaliação de atributos químicos de solos incubados com líquens, Enviado à Revista Brasileira de Ciências Agrárias. Data de submissão 6/7/2011. Número de registro: 1678-7542-1-SM.

• Artigo Publicado

1. Sensitivity of *Cladonia substellata* Vainio (lichen) to gamma irradiation and the consequent effect on limestone rocks - Int. J. Low Radiation, v. 7, n. 4, p. 324-332. 2010.

• Trabalhos completos publicados em eventos científicos

1. Influence of gamma radiation on secondary metabolism in lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia verticillaris*. International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2011, Belo Horizonte - MG, outubro, 2011.

2. Gamma radiation effect on the allelopathic potential of *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR. upon *Lactuca sativa* L. International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2011, Belo Horizonte - MG, outubro, 2011.

3. *Cladonia salzmanni* Nyl. (líquen) na modificação dos atributos químicos de um solo arenoso do Nordeste brasileiro. II Congresso Nacional de Educação Ambiental. João Pessoa – PB, outubro de 2011.

4. Radiossensibilidade gama de *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR. (líquen) coletada sobre solos arenosos de Saloá – PE. II Congresso de Proteção Contra Radiações da Comunidade dos países de língua Portuguesa. V Congresso Internacional de Radioproteção. Recife-PE, maio de 2011.

5. Atributos químicos de um solo arenoso após 40 dias de incubação com líquens. XVIII Reunião Brasileira de Manejo e Conservação do Solo e da Água, 2010. Teresina-PI.

6. Influência da radiação gama em *Cladonia substellata* vainio (líquen) e seu conseqüente efeito sobre um solo argiloso. XVIII congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Pernambuco, novembro de 2010;

7. Análise da influência da radiação gama e ultravioleta em diferentes doses sobre *Cladonia substellata* Vainio (líquen). 16º Encontro Nacional de Geógrafos. Porto Alegre-RS, julho de 2010;

8. Análise da influência da radiação ultravioleta em diferentes doses sobre *Cladonia substellata* Vainio (líquen) e seu conseqüente efeito sobre solos argilosos. XVIII congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Pernambuco, novembro de 2010;

9. Gamma radiation influence on *Cladonia substellata* Vainio (lichen) and its effects on limestone rocks radio. International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2009, Rio de Janeiro-RJ, outubro, 2009;

• **Resumos publicados em eventos científicos**

1. Influência da radiação gama na reativação metabólica de *Cladonia substellata* Vainio. Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos, Bogotá – Colômbia, novembro de 2011;

2. Radiossensibilidade gama de *Cladonia substellata* Vainio e *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fries. Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos, Bogotá – Colômbia, novembro de 2011;

3. Teores de clorofila e feofitina em *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR. exposta à radiação UVB. Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos, Bogotá – Colômbia, novembro de 2011;

4. Produção de fenóis de *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR. após exposição à radiação Ultravioleta B. Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos, Bogotá – Colômbia, novembro de 2011;

5. Influência das radiações gama e ultravioleta (UVB) na produção do ácido fumarprotocetrárico de *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR. (*Cladoniaceae*). 62º Congresso Nacional de Botânica, Fortaleza-CE, agosto de 2011;

6. Influencia da radiação ultravioleta em *Cladonia verticillaris* coletada sobre solos arenosos de Alhandra – PB (dados preliminares). 5º Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenólogos, Recife-PE, Novembro de 2010;

7. Líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) fr. exposto à radiação gama: análise quantitativa da produção de clorofila e feofitina. 5º Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenólogos, Recife-PE, Novembro de 2010;

8. Modificação no metabolismo secundário de diferentes líquens por radiação gama (dados preliminares). Congresso da Sociedade Brasileira de Biociências Nucleare, Recife-PE, Outubro de 2010.

9. Influencia da radiação ultravioleta no metabolismo secundário de *Cladonia substellata* (Vainio) (dados preliminares). Congresso da Sociedade Brasileira de Biociências Nucleares, Recife-PE, Outubro de 2010.

10. Quantificação dos teores de clorofila e feofitina em *Cladonia verticillaris* (Raddi) fr. coletadas em Saloá-PE, submetidas a radiação uvb (dados preliminares). XXXIII Reunião Nordestina de Botânica. Aracajú-SE, julho de 2010;

11. Análise do líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) fr. coletada em Alhandra-PB, submetida ao efeito da radiação gama (dados preliminares). XXXIII Reunião Nordestina de Botânica. Aracajú-SE, julho de 2010;

12. Análise comparativa da influencia da radiação gama no metabolismo secundário de *Cladonia substellata* (Vainio) e *Cladonia salzmannii* (Nyl) (dados preliminares). XXXIII Reunião Nordestina de Botânica. Aracajú-SE, julho de 2010;

13. Radiosensitivity gamma on *Cladonia substellata* Vainio (lichen) and the consequent effect on limestone rocks. International conference on the effects of low doses and very low doses of ionizing radiation on human health and biotopes. Rio De Janeiro-RJ, outubro, 2009;

14. Avaliação da reativação metabólica de *Cladonia substellata* Vainio após extração orgânica (dados preliminares). 6º Congresso Latinoamericano de Micología, Mar del Plata, Argentina, novembro de 2008;

15. Estudo comparativo avaliando espécies monitoras da qualidade do ar: *Cladonia verticillaris* e (Raddi) fr. e *Cladia aggregata* nyl, após submetidas às soluções contendo formaldeído sob condições controladas. 4º Encontro Do Grupo Brasileiro de Liquenólogos, Curitiba-PR, outubro de 2008;

16. Reativação metabólica de *Cladonia verticillaris* após extração orgânica (dados preliminares). 4º encontro do grupo brasileiro de liquenólogos, Curitiba-PR, outubro de 2008;

17. Ação do ácido úsnico e *Cladonia substellata* Vainio sobre amostras de migmatito, granito e calcário. 3ª Reunião Brasileira de Estudos liquenológicos, Mogi Guaçu-SP, maio de 2008;

18. Influência da radiação gama na reativação metabólica de *Cladonia substellata* Vainio (dados preliminares). 3ª Reunião Brasileira de Estudos liquenológicos, Mogi Guaçu-SP, maio de 2008;

19. Influencia da radiação gama no metabolismo secundário de *Cladonia substellata* Vainio (líquen). Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos, Lima – Perú, novembro de 2007;

> From: jenvrad@ecomatters.com
> To: barrosleny@hotmail.com
> Date: Mon, 14 Nov 2011 02:56:15 +0000
> Subject: A manuscript number has been assigned: JENVRAD-D-11-00480
>
> Ms. Ref. No.: JENVRAD-D-11-00480
> Title: EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON Cladonia verticillaris (RADDI) FR.
(LICHEN) COLLECTED IN DIFFERENTS ENVIRONMENTS
> Journal of Environmental Radioactivity
>
> Dear Helena Silva,
>
> Your submission entitled "EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON Cladonia
verticillaris (RADDI) FR. (LICHEN) COLLECTED IN DIFFERENTS
ENVIRONMENTS" has been assigned the following manuscript number:
JENVRAD-D-11-00480.
>
> You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial
System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jenvrad/>.
>
>
> Thank you for submitting your work to this journal.
>
> Kind regards,
>
> Shun-ichi Hisamatsu(GE: Fukushima), PhD
> Associate Editor
> Journal of Environmental Radioactivity
>
> For further assistance, please visit our customer support site at
<http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find
answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive
tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further
assistance from one of our customer support representatives.
>

Manuscript Number:

Title: EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON *Cladonia verticillaris* (RADDI) FR. (LICHEN) COLLECTED IN DIFFERENTS ENVIRONMENTS

Article Type: Research Paper

Keywords: Keywords: gamma radiation, lichens, *Cladonia verticillaris*, fumarprocetraric acid

Corresponding Author: Mrs. Helena Paula de Barros Silva, M.D.

Corresponding Author's Institution:

First Author: Helena Paula de Barros Silva, M.D.

Order of Authors: Helena Paula de Barros Silva, M.D.; Patryk Melo, M.D.; Pedro Barros-Filho, degree in geography; Leonardo Maciel, M.D.; Waldeciro Colaço, Ph.D.; Eugenia Pereira, Ph.D.; Nicácio Silva, Ph.D.

Abstract: This research aimed to quantify and compare the bioproduction of fumarprocetraric acid, the main copound produced by the lichen *Cladonia verticilaris* (Raddi) Fr, collected in two different environments in northeast, Brazil, before and after submission to gamma radiation, and, can, thus, identify differences in the bioproduction of theses substances. Lichens samples were collected in Saloá-PE and Alhandra-PB. Samples of *C. verticillaris* (12g) were submitted to gamma irradiator of Co60 in irradiator Gammacell 220 Excel at doses of 0, 10, 50, 100, 5.000 and 10.000 Gy. The results indicated that gamma irradiation at different doses, stimulated bioproduction of FUM, with higher productivity at 90 days of experiment, where samples of Saloá-PE and Alhandra-PB, bioproduced 1.41 and 2.7 times the control sample when exposed to 5000 and 500 Gy, respectively. The samples of *C. verticillaris* from Alhandra-PB by being irradiated with gamma radiation had a greater increase in production of this substance.

EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON *Cladonia verticillaris* (RADDI) FR.
(LICHEN) COLLECTED IN DIFFERENTS ENVIRONMENTS

Helena Silva^{a*}; Patryk Melo^a, Dario Primo^a; Pedro Hildon^b; Leonardo Maciel^c Nicácio
Silva^d; Eugenia Pereira^b; Waldeciro Colaço^a.

^a Nuclear Energy Department, Geosciences and Technology Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^b Geographical Sciences Department, Human Sciences and Philosophy Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^c Center for Studies Primeira Semente, Caxangá Street, 5775, room 17

^d Biochemistry Department, Biological Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

* Author for correspondence. E-mail: barrosleny@hotmail.com Telephone number +55(81)9207-5323

Abstract

This research aimed to quantify and compare the bioproduction of fumarprocetraric acid, the main copound produced by the lichen *Cladonia verticilaris* (Raddi) Fr, collected in two different environments in northeast, Brazil, before and after submission to gamma radiation, and, can, thus, identify differences in the bioproduction of theses substances. Lichens samples were collected in Saloá-PE and Alhandra-PB. Samples of *C. verticillaris* (12g) were submitted to gamma irradiator of Co⁶⁰ in irradiator Gammacell 220 Excel at doses of 0, 10, 50, 100, 5.000 and 10.000 Gy. The results indicated that gamma irradiation at different doses, stimulated bioproduction of FUM, with higher productivity at 90 days of experiment, where samples of Saloá-PE and Alhandra-PB, bioproduced 1.41 and 2.7 times the control sample when exposed to 5000 and 500 Gy, respectively. The samples of *C. verticillaris* from Alhandra-PB by being irradiated with gamma radiation had a greater increase in production of this substance.

Keywords: gamma radiation, lichens, *Cladonia verticillaris*, fumarprocetraric acid.

1. Introduction

After the nuclear accident of Chernobyl in April,1986, when a large amount of radioactive elements were released to the environment, contaminating soil, vegetation,

water, among others, there is a need to monitor these contaminated areas. In this context, biomonitoring or biological monitoring using different species of mosses, lichens and bromeliads has been widely used. The use of lichens as biomonitors of radionuclides has been increasingly studied, mainly due to its great capacity to absorb elements dissolved in the air (BOARETTO et al., 1990; HOFMANN et al., 1993; MONNA et al., 2006; GÓMEZ-GUZMÁN et al., 2011). However, studies demonstrating the effects of ionizing radiation on lichens are still quite scarce. Lichens are defined as symbiotic organisms composed of fungi, the mycobionte, and one or more species of photosynthesizers, the photobiont, which can be green alga or cyanobacteria. This symbiosis can range from parasitism to mutualism strict, depending on the taxonomic groups of fungi and algae (or cyanobacteria) that are involved. Of this "union" are produced lichen substances (CULBERSON; CULBERSON, 1970; NASH III, 1996). These substances, in most phenols are responsible for Most of the benefits from lichens, including: applications in the pharmaceutical industry, textiles, perfums and cosmetics, and is also referred to as agricultural use (HUNECK, 1973; LEGAZ et al., 2006).

Chemical and physiological changes in lichens due to the influence of gamma radiation were observed by Erbisch; Kalosis (1973), Erbisch (1974), Barstow; Erbisch (1977) e Nifontova et al (1995) after irradiating different lichen species with doses up to 50.000 Gy.

In Brazil, on the northeast region, lichens beginning to be studied with the objective to verify the influence of gamma radiation in the production of secondary metabolites. Silva et al. (2010) demonstrated the effect of gamma irradiation on the production of metabolites of *Cladonia substellata* and found that the production of usnic acid follows an upward trend, indicating the existence of a limit on production of this acid, which occurs around the dose of 10 Gy, from which usnic acid levels tend to decrease.

Thus, the objective of this research was to quantify and compare the chemical characteristics - bioproduction of fumarprocetraric acid, in samples of *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr, collected in two different environments in northeast of Brazil, before and after submission to gamma radiation. It can thus identify possible differences in the bioproduction of this substance.

The choice of environments was due to the stem of some species of lichens produce its substances in different amounts depending on the altitude (CULBERSON, et al. 1977; RUBIO et al., 2002, HALL et al., 2002) or microclimates (LEGAZ et al., 1986).

2. Materials and methods

2.1 Collection and packing the lichen material

Tufts of *Cladonia verticillaris* sand trays were collected in the cities of Saloá-PE (altitude 1086 m, Lat. 9°25 'S, Long. 36°79' W) and Alhandra-PB (altitude: 107m, Lat. 7°27'S, Long. 34°57'W) shown in figure 1, in paper bags.

Insert Figure 1 here

2.2 Exposure gamma source of Co⁶⁰

Exposure range for samples of *C. verticillaris* collected in Saloá and the same amount for the samples collected in Alhandra were packed in paper envelopes with 12g each. Each envelope was submitted only once to one of the eight doses: 0,10,50, 100,500, 1.000, 5.000 and 10.000 Gy of Co⁶⁰ in Gammacell 220 Excel irradiator, with dose rates of 7.795 kGy/h (03/02/2009).

2.3 Assembly of the experiments

Lichens irradiated or not (12g) were placed in a petri dish with five replicates and sprayed with deionized water (2,5 mL) three times a week. The samples were collected (1g) at 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days, and packed separately for further analysis.

2.4 Obtaining the extracts

Samples of *C. verticillaris* (1g), freshly collected (control group) or irradiated (treated group) were extracted by depletion system with organic solvents.

2.5 Analysis of samples

2.5.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

Organic extracts of *C. verticillaris*, irradiated or not, were subjected to ascending thin-layer chromatography (Culberson 1972).

2.5.2 High Performance Liquid Chromatography (CLAE)

The lichen extracts and standards were injected into a chromatographer LC-MS-IT TOF. Chimazu (Legaz; Vicente, 1983).

2.5.3 Spectrophotometric assay

The extracts were read in a spectrophotometer BIOCHROM® Libra model S22 at wavelengths of 210, 254 and 366 nm, selected as the maximum peak of FUM in ultraviolet, proposed by Huneck; Yoshimura (1996).

2.6 Statistical analysis

The data were subjected to analysis of variance and then performed regression analysis to estimate the production/accumulation of fumarprocetraric acid in samples of *C. verticillaris* irradiated and in their control group.

3. Results and discussion

The analysis of the thin layer chromatography revealed the presence of fumarprocetraric acid (FUM), its main component, and its auxiliary substances such as procetraric acid (PRO) and atranorin (ATR) in all samples. These substances have been identified in lichens under natural conditions second Huneck; Yoshimura, (1996), Ahti et al. (1993) e Athi; Marcelli (1995). Also, was observed the band related to methylprocetraric acid in samples of *C. Verticillaris* from Alhandra, collected at 15 days and, in samples from Saloá after 180 days of treatment.

The quantification of the concentration of FUM in extracts of control and irradiated samples was carried out based on a calibration curve of the purified FUM, which produced a linear trendline correlation with R^2 equal to 0.989.

The results obtained allowed to calculate the levels of FUM in the different treatment and times of the experiment for each type of radiation.

The production of FUM, after gamma irradiation and its control group, can be seen in Figure 2 for samples collected in Saloá and in Figure 3, for those collected in Alhandra.

Insert Figure 2 and 3 here

At 15 days of the experiment, all samples showed production/accumulation of FUM greater than the control sample, except for samples from Saloá irradiated with 10,000 Gy that produced only 0.88 times compared to the control sample.

In this collecting, the samples from Alhandra produced/accumulated FUM increased proportionally to the dose used. Thus, the dose of 10,000 Gy was a greater stimulant for a major production of FUM, with 2,58 times more than the control sample. This fact also occurred in samples from Saloá until the dose of 100 Gy, with production of 1.36 times the control samples. Thereafter, the concentrations decreased with increasing of the irradiation dose.

There was a peak of productivity in the production of FUM at 90 days, in samples of *C. verticillaris* in both sampling sites. Standing out the production of 1,41 times, at the dose of 5,000 Gy for samples from Saloá, and 500 Gy from samples of Alhandra with production of 2,70 times of the control sample. It is worth mentioning that in this collect, the samples from Alhandra in all treatments, produced FUM in quantities greater than 2 times the control sample.

At 120, 150 and 180 days, observed, in general, in samples collected in Saloá and Alhandra, a decrease in the production of FUM, in all treatments where the concentration was lower than those presented in control samples.

The lowest percentages of production of FUM, in samples of *C. verticillaris*, were found in samples collected at 180 days. In samples collected in Saloá, the dose of 5,000 Gy, produced only 0,5 times the control sample. In the Alhandra's, the lower production was in samples that received dose of 10,000 Gy, with production of only 0.35 times the control sample.

Similar data were found by Silva et al., (2010) who observe a decrease in usnic acid levels in samples of *Cladonia substellata*, three months after being submitted to gamma radiation in a ⁶⁰Co gamma source at doses of 60 and 80 Gy. The results can also be ratified according to the postulates of Synder; Platt (1973); Erbisch (1974) and Pollum; Erbisch (1972) which affirm the existence of late effects on *Cladonia sylvatica* and *Cladonia verticillata* irradiated with acute or chronic doses of gamma radiation.

The found data are consistent with Pawlik-Skowronska; Backor (2011), who observed an increase in concentrations of FUM in *Cladonia furcata* and in stictic and

constitutive, atronorin and zeorin in *Lepraria lobata*, as a defense of lichens of the action of radioactive pollutants, in this case lead (Pb^{210}). These data can also be corroborated by Mota-Filho et al. (2007) who observed changes in the production of secondary metabolites in *C. verticillaris* under the influence of lead acetate and Legaz et al. (1986) report that stalks of *C. verticillaris* promoted greater synthesis of fumarprocetraric acid (1 to 2.5 times) when directly exposed to the sun in a natural environment.

Sanita di Toppi et al., (2005) and Backor; Fahselt, (2008) suggest that morphological and physiological changes in the lichen symbionts, due to environmental aggressors cause changes in the production of lichen substances. As suggested by Grodzinsky (1989) these changes occur, probably due to the destruction of their metabolic pathways. Therefore it is suggested that radiation may have also affected the same way.

Nifontova et al. (1995), observed damage to the plasmatic membrane by analyzing loss of electrolytes, organic compounds and flow of potassium by radiating *Peltigera aphthosa*, *Cladonia arbuscula*, *Cetraria islandica* e *Hypogymnia physodes* with increasing doses of gamma radiation. The authors noted that the biggest changes occurred in samples of *H. physodes* irradiated with 50,000 Gy, with changes of up to 400% in loss of electrolytes, 543.85% in loss of organic compounds and 217,28% in the loss of potassium. In addition, Erbisch; Kalosis (1973) observed the appearance of brown spots on the plasmatic membrane and the presence of many vacuoles in the cytoplasm of the photobiont *Cladonia sylvatica* at a dose of 1000 Gy.

It is known that the plasmatic membrane of the plant cell has several functions, including maintaining a stable chemical composition of the intracellular environment (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1987; RAVEN, 1996; PANNON, 2004). Thus, the damage induced by gamma radiation it can be probably influence in the production of secondary metabolites.

Due to the peak of productivity at 90 days of experiment was carried out a High Performed Liquid Chromatography-HPLC in the sample treated and controls with the objective to view the production of secondary metabolites produced by species after receiving different doses of gamma radiation.

Acid fumarprotocetraric and atronorin levels were detected in the control sample from Saloá and Alhandra, ratified by the chromatograms of FUM and ATR purified of *C. verticillaris* (figure 4), showing retention time (RT) of 17,2 and 27,6 minutes respectively. The data are in accordance with Ahti et al. (1993) and Pereira et al. (1995).

Insert Figure 4 here

Figure 5 shows the HPLC of extracts of *C. verticillaris* from Saloá and Alhandra submitted to the doses of 10, 1.000 and 10.000 Gy of gamma radiation, after a period of ninety days.

Insert Figure 5 here

It is observed, in general, a significant difference between samples collected from Saloá and Alhandra in relation to the variation in the areas of peaks corresponding to FUM, ATR and other substances produced, as well as its retention time (RT) in column.

In the chromatograms referring to samples from Saloá irradiated with 10, 1000 and 10.000 Gy to TR of the peak for the FUM was approximately 18 minutes. In these samples the production of FUM was 0.26; 0.08 and 0.09 mg.mL⁻¹, respectively. The dose that influenced a greater production of FUM by *C. verticillaris* after exposure to gamma radiation was 10 Gy, in accordance with those obtained by spectrophotometry.

In the HPLC analysis, the extracts of irradiated *C. verticillaris* of the Alhandra, it was observed that the TR to the peak of the FUM was approximately 17 minutes in extracts irradiated with 10 and 1000 Gy, with production of 0.41 and 0.014 mg.mL⁻¹, respectively. The extracts of *C. verticillaris* irradiated with 10.000 Gy showed production of 0.31 mg.mL⁻¹ with TR for the substance of 16,26 minutes, due to chemical changes in FUM.

Also was observed that the dose of 10.000 Gy stimulated an increase of approximately 100 times the production of ATR in the samples collected in Saloá and Alhandra.

Data that can be related to possible changes in chemical composition of the substance in question, due to some blockage in the metabolic pathway caused by radiation (SILVA et. al., 2010), or as a protection mechanism of the lichen against

external aggression (LAWREY, 2009, SANITA DI TOPPI et al., 2005 and BACKOR; FAHSELT, 2008).

4. Conclusion

Thus, we can see interference in the metabolism of lichen species when submitted to irradiation with gamma rays, giving the same time, to the lichen the ability of activation of the biosynthesis of its phenols, where it was possible to verify that the gamma radiation had a greater influence on the samples of *C. verticillaris* collected in Alhandra.

5. Acknowledgments

The National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) for granting the scholarship.

6. References

- Ahti, T.; Stenroos, S.; Xavier Filho, L. 1993. The lichen Family *Cladoniaceae* in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. *Tropical Bryology*, 7, 55-70.
- Ahti, T.; Xavier Filho, L. 1995. Taxonomy of the *Cladonia verticillaris* complex in South America. *Bibliotheca Lichenologica*, 58, 5 -25.
- Backor, M., Fahselt, D. 2008. Lichen photobionts and metal toxicity (review article). *Symbiosis*, 1. 1–10.
- Barstow, J. M.; Erbisich, F. H. 1970. Effects of acute gamma radiation and winter temperature-light conditions on photosynthesis of *Cladonia mitis*. *Byologist*, 80, 83-87.
- Boaretto, E., Berkovits, D., Hollos, G., Paul, M.. 1990. Measurements of natural concentrations of ¹²⁹I in uranium ores by AMS. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 50, 280-285.
- Erbisich, F. H. 1974. Effects of acute and chronic gamma radiation on *Cladonia sylvatica* and *Parmelia sulcata*. USAEC REPORT COO-2087-7, Michigan Technological University
- Erbisich, F. H.; Kalosis, J. J. 1973. Initial observations of the effects of gamma radiation on oxygen consumption, P³²-uptake and phycobiont of *Cladonia sylvatica* (L.) Hoflin. *Radiation Botany*. 13, 361-367
- Gómez-Guzmán, J. M.; López-Gutiérrez, J. M.; HOLM E.; PINTO-GÓMEZ, A. R. 2011. Level and origin of ¹²⁹I and ¹³⁷Cs in lichen samples (*Cladonia alpestris*) in central Sweden. *Journal of Environmental Radioactivity*. 10, 200-205.
- Grodzinsky, D. M. 1989. *Radiobiologia rastenii* (Radiobiology of plants). Kiev: Naukova umka.

- Hall, R. S. B.; Bornman, J. F. Bjorn, L. O. 2002. UV-induced changes in pigment content and light penetration in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp. Mitis. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 66, 13-20.
- Hofmann, W., Attarpour, N., Lettner, H., Turk, R. 1993. ¹³⁷Cs: concentrations in lichens before and after the Chernobyl. accident. *Health Phys.* 64, 70-73.
- Huneck, S. 1973. Nature of lichen substances. In: Ahmadjian, V., Hale, M. E. (Eds). *The Lichens*. Academic Press, New York, pp. 495- 522.
- Huneck, S; Yoshimura, I. 1996. *Identification of Lichen Substances*. Springer-Verlag, Berlin.
- Junqueira, L. C. U.; CARNEIRO, J. 1987. *Biologia molecular e celular*, fourth ed. Guanabara, Rio de Janeiro.
- Legaz, M. E.; Vicente, C.; Ascaso, C.;Pereira, E. C.; Xavierfilho, L. 1986. Pigment analysis of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. **Biochem.System. Ecol.** 14, 575-580.
- Legaz, M. E; Córdoba, C. V.; Preira, E. C.; Xaviel-Filho, L.; Rodrigues, S. A. 2006. Biotecnologia de liquens. In Xavier-Filho, L.; Legaz, M. E.; Cordoba, C. V.; Pereira, E. P.(Eds) *Biologia de liquens. Âmbito Cultural*, Rio de Janeiro, pp. 539-580.
- Mota Filho, F., Pereira, E. Lima, E. Silva, N., Figueiredo, R. 2007. Influência de poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. *Quimica Nova*. 30, 1072-1076.
- Monnaa, F.; Poujol, M.; Losno, R.; Dominik, J.; Annegarn, H.; Coetzee. H. 2006. Origin of atmospheric lead in Johannesburg, South Africa. *Atmospheric Environment*. 40, 6554–6566
- Nifontova M. G.; Ravinskaya, A. P.; Shapiroj, I. A. 1995. Effect of acute gamma radiation on some physiological features of lichens. *Lichenologist*. 27, 215-224
- Panno, J. 2004. *The cell: evolution of the first organism*. 1. ed. Facts on file, INC., New York
- Pawlik-Skowronska, B.; Backor, M. 2011. Zn/Pb-tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelatins than specimens living in unpolluted habitats. *Environmental and Experimental Botany*. 72, 64–70
- Pollum, P. A., F. Erbisch, F. H. 1972. Effects of gamma radiation on the lichen *Cladonia verticillata* (Hoffm.) Schaer. *Bryologist*. 75, 48-53.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. 2001. **Biologia vegetal**, sixth ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rubio, C.; Fernández, E.; Hidalgo, M. E.; Quihot, W. 2002. Effects of solar uv-b radiation in the accumulationof rhizocarpic acid in a lichen species from alpine zones of chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 47, 67-72.
- Sanita Di Toppi, L., Musetti, R., Vattuone, Z., Pawlik-Skowron Ska, B., Fosatti, F., Bertoli, L., Badiani, M., Favali, M. A. 2005. Cadmium distribution and effects on

ultrastructure and chlorophyll status in photobionts and mycobionts of *Xanthoria parietina*. *Microsc. Res. Tech.* 66, 229–238.

Silva, H. P. B.; Colaço, W.; Pereira, E.; Silva, N. 2010. Sensitivity of *Cladonia substellata* Vainio (lichen) to gamma irradiation and the consequent effect on limestone rocks. *Int. J. Low Radiation.* 7, 324-332.

Synder, J. M.; Platt, R. B. 1973. The effects of chronic gamma radiation on the growth of a crustose lichen, *Trapelia ornate* (Sommerfelt) Hertel. *Radiation Botany.* 13, 269-271.

Figure legend:

Figure 1. Map indicating the locations of sample collection lichens. (A): Alhandra -PB; (B) Brejo Farm, Saloá-PE. Map: Girlan Silva. Photos: Helena Silva, 2008.

Figure 2. Fumarprotocetraric acid concentrations extracted from the stems of *C. verticillaris*, collected in Saloá - PE, non-irradiated and irradiated with gamma radiation at different times of collection.

Figure 3. Fumarprotocetraric acid concentrations extracted from the stems of *C. verticillaris*, collected in Alhandra-PB, non-irradiated and irradiated with gamma radiation at different times of collection.

Figure 4. High Performance Liquid Chromatography. (A): Fumarprotocetraric acid (FUM); B: Atranorin (ATR); C: Control sample - *C. verticillaris* from Saloá. D: Control sample - *C. verticillaris* from Alhandra.

Figure 5. High Performance Liquid Chromatography of extracts of *C. verticillaris* from Saloá and Alhandra submitted to the doses of 10, 1.000 and 10.000 Gy of gamma radiation, after a period of ninety days. A: Samples collected in Saloá; B: Samples collected in Alhandra. FUM: Fumarprotocetraric acid; ATR: Atranorin.

Figure 1

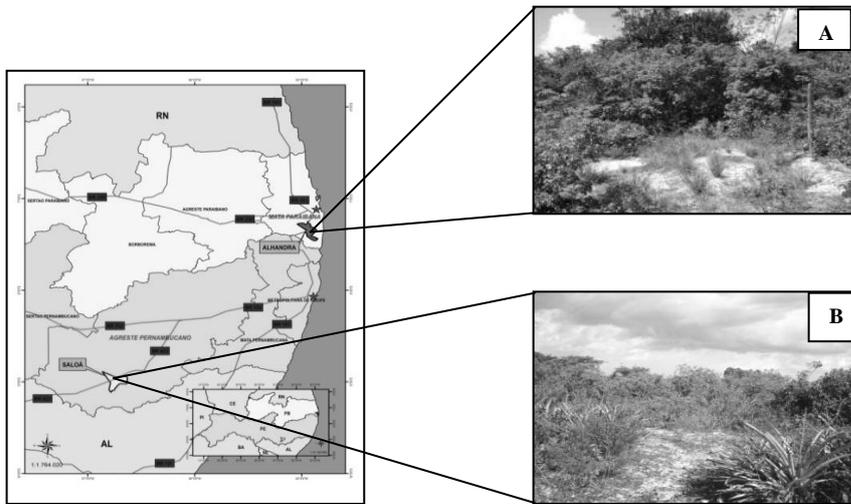


Figure 2

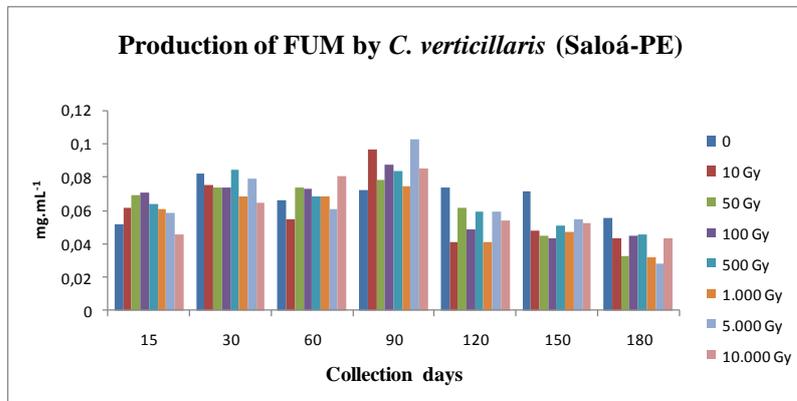


Figure 3

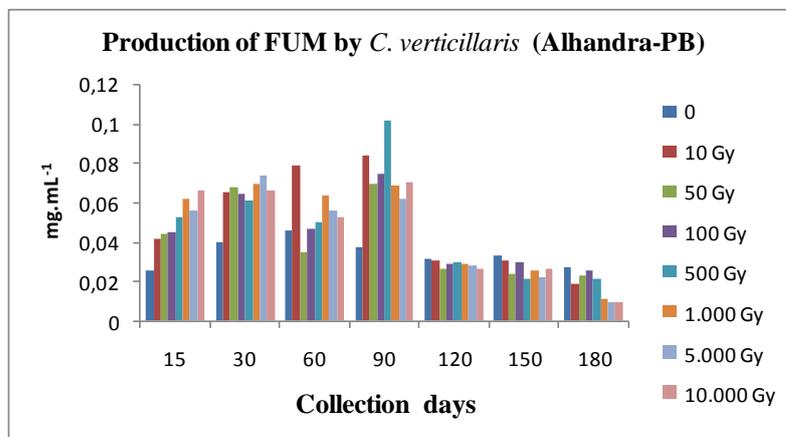


Figure 4

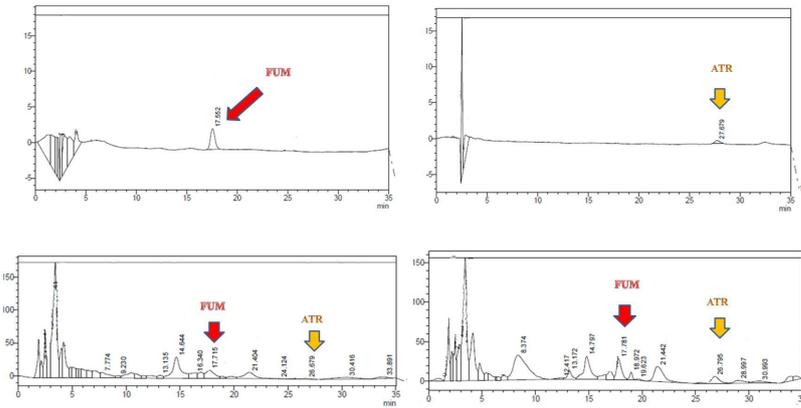
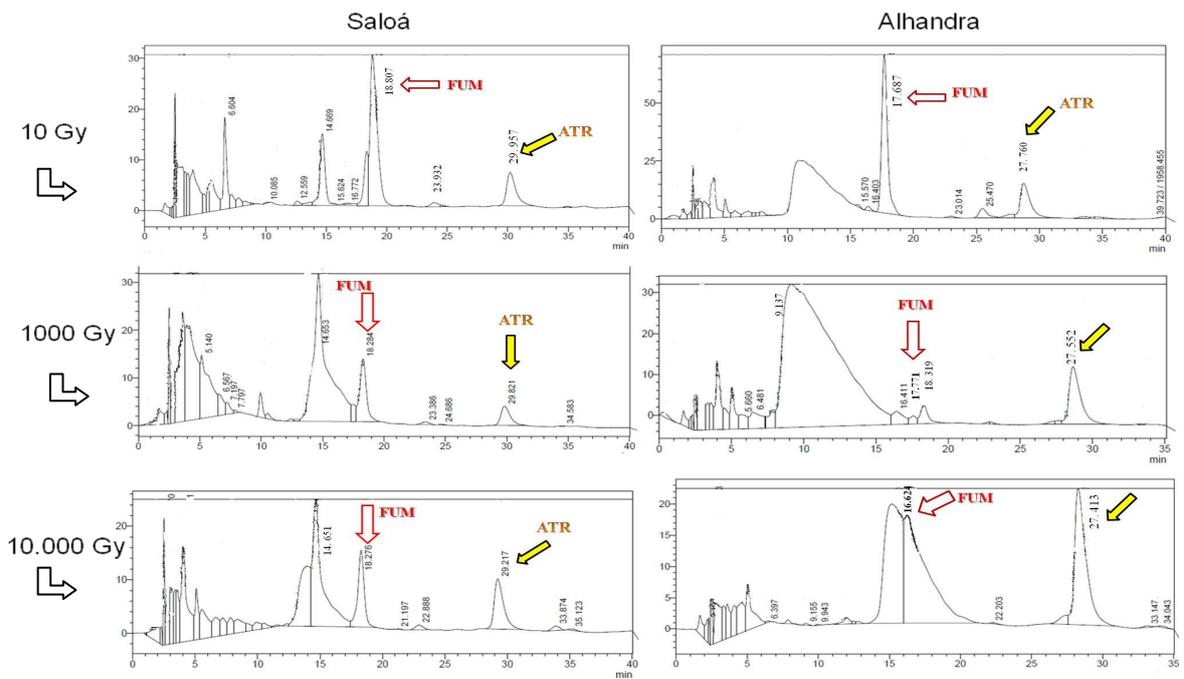


Figure 5



Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)

Brazilian Journal of Agricultural Sciences

PÁGINA INICIAL SOBRE PÁGINA DO USUÁRIO PESQUISA ATUAL ARQUIVOS
 NOTÍCIAS INDEXAÇÃO SUBMISSÃO DE ARTIGOS GUIDELINES SITUAÇÃO DE
 ARTIGOS UFRPE AJUDA QUALIS

Página inicial > Usuário > Autor > Submissões > #1678 > **Resumo**

#1678 Sumário

RESUMO AVALIAÇÃO EDIÇÃO

Submissão

Autores Patryk Melo, Dário Costa Primo, Helena Barros Silva, Eugênia Cristina Pereira
 Título Avaliação de atributos químicos de solos incubados com liquens
 Documento Original [1678-7542-1-SM.DOC](#) 2011-07-06
 Doc. Sup. Nenhum(a) [INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR](#)
 Submetido por Patryk Melo 
 Data de submissão julho 6, 2011 - 01:25
 Seção Agronomia
 Editor Mateus Ribeiro 

Situação

Situação Em fila para Avaliação
 Iniciado 2011-07-06
 Última alteração 2011-07-13

Metadados da Submissão

[EDITAR METADADOS](#)

Autores

Nome Patryk Melo 
 Instituição UFPE
 País Brasil
 Resumo da Biografia Departamento de Energia Nuclear
 Contato Principal para correspondência.
 Nome Dário Costa Primo 
 Instituição UFPE
 País Brasil
 Resumo da Biografia Departamento de Energia Nuclear
 Nome Helena Barros Silva 
 Instituição UFPE
 País Brasil
 Resumo da Biografia Departamento de Energia Nuclear
 Nome Eugênia Cristina Pereira 
 Instituição UFPE
 País Brasil
 Resumo da Biografia Departamento de Ciências Geográficas

Título e Resumo

[SISTEMA ELETRÔNICO DE EDITORAÇÃO DE REVISTAS](#)

[Ajuda do sistema](#)

USUÁRIO

Logado como...

melo

- [Perfil](#)
- [Sair do Sistema](#)

IDIOMA

Português (Brasil)

CONTEÚDO DA REVISTA

Pesquisa

Todos

[Pesquisar](#)

Procurar

- [Por Edição](#)
- [Por Autor](#)
- [Por Título](#)

TAMANHO DE FONTE

INFORMAÇÕES

- [Para Leitores](#)
- [Para Autores](#)
- [Para Bibliotecários](#)

Avaliação de atributos químicos de solos incubados com líquens

Patryk Melo⁽¹⁾, Dário C. Primo⁽²⁾, Helena P. de B. Silva⁽³⁾, Eugênia C. G. Pereira⁽⁴⁾

^{1,2,3}Departamento de Energia Nuclear (DEN), Universidade Federal de Pernambuco., Av. Profº Luiz Freire nº. 1000, Cidade Universitária. CEP 50740-540 - Recife - PE. E-mail: patrykmelo@hotmail.com, darioprino@gmail.com, barrosleny@hotmail.com ⁴Departamento de Ciências Geográficas (DCG), Universidade Federal de Pernambuco. Av. Acadêmico Helio Ramos, s/n, Cidade Universitária. CEP 50740-540 - Recife - PE. E-mail: eugenia.pereira@cnpq.pq.br

RESUMO - Os líquens são organismos que degradam rochas tanto por ação química de suas substâncias, como por ação mecânica por incrustação no substrato, favorecendo o processo de formação do solo. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a interferência de líquens nas propriedades químicas de um Argissolo e um Neossolo durante 40 dias de incubação em laboratório. Utilizou-se no ensaio vasos plásticos de 500g preenchidos com 200g de solos seco ao ar e tamisado em peneira de 2mm. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado constituindo quatro tratamentos e quatro repetições com quantidades crescentes de líquens 0; 1, 5; 2, 5 e 4 t.ha⁻¹ respectivamente. Foram avaliados os valores de pH e de carbono total a cada 15 dias em cada unidade experimental. A incubação de líquens em doses distintas no solo proporcionaram aumento nos valores de pH e nos teores de C até aos 40 dias de incubação. Estes resultados sugerem que a adição de líquens ao solo parece aumentar os atributos químicos do solo.

Palavras-chave: *Cladonia verticillaris*, carbono orgânico, pH

Evaluation of chemical attributes of soils incubated with lichens

ABSTRACT- Lichens are organisms that degrade both rocks by chemical action of its substance, as by mechanical action on the inlay substrate, favoring the process of soil formation. The objective of this study to evaluate the role of lichens in the chemical properties of a Clayey and of a Neossol during 40 days of incubation in the laboratory. It was used in the assay 500g plastic pots filled with 200g of soil dried and sieved in a sieve of 2mm. The experimental design was completely randomized up four treatments and four repetitions with increasing amounts of lichens 0, 1, 5, 2, 5 and 4 t.ha⁻¹ respectively. The values of pH and total carbon every 15 days in each experimental unit. Incubation of lichens in different doses on soil provided an increase in pH and levels of C up to 40 days of incubation. These results suggest that the addition of lichens on the ground appears to increase the soil chemical properties.

Key- words: *Cladonia verticillaris*; organic carbon, pH

INTRODUÇÃO

Os líquens são seres vivos muito simples que constituem uma simbiose de um organismo formado por fungos, o micobionte e algas ou cianobactéria fotobionte, onde o fungo interage com fotobiontes, localizados entre as hifas de seus micélios (Xavier-filho et al., 2006) ocupando diversos substratos como madeiras, troncos vivos, folhas, muros, telhados, solos, rochas, dentre outros (Hale 1993), metabolizando substâncias que tomam forma cristalina, protegendo sua estrutura das adversidades ambientais funcionando, sobretudo, como fotoprotetores naturais (Xavier-filho et al., 2006). Apesar disso, muitas espécies têm preferência por substratos específicos. Por serem

específicos, obrigatórios ou não, indicam não só o ambiente em que vivem como também os minerais e rochas que usam como substrato. Pela fácil adaptabilidade dos líquens a diversos substratos e ambientes, são considerados cosmopolitas, distribuídos dos trópicos aos pólos, existindo espécies polares, bipolares e de ampla distribuição (Seaward 1977).

Os líquens possuem grande resistência e esta, é devida à proteção do córtex superior (camada de hifas), associada à cristalização das suas substâncias no talo, tanto ao nível cortical como medular, funcionando, por vezes como um filtro, selecionando quantidades e tipos de radiações recebidas, ou permanecendo em latência durante períodos onde a temperatura e a luminosidade não o permitem fotossintetizar (Hale 1983). O papel tradicionalmente atribuído aos líquens é o de formador de solos, pois são os organismos pioneiros na colonização da rocha matriz. Entretanto, muito se tem a estudar em relação a sua função na sucessão de seres, uma vez que participam de um sem-número de reações no sistema vivo (Melo, 2011).

Nos processos de formação do solo, a degradação química, que é a alteração/transformação de alguns materiais das rochas se constitui como um dos mais importantes. Os primeiros organismos a se instalarem sobre as rochas aflorantes da superfície terrestre são os líquens (Legaz et al., 2006). À medida que o líquen decompõe a rocha, prepara um solo desenvolvido o suficiente para o estabelecimento de outros seres que requerem umidade e nutrientes, como os musgos e vegetais fanerogâmicos (Sedia & Ehrenfeld 2005). Além do mais, os líquens são utilizados nas indústrias de cosméticos, no fabrico de talcos, perfumes, cremes, óleos os quais são importantes, não apenas pelo aroma agradável, mas também como fonte de glicerol (Legaz et al., 2006).

Evans & Benalp (1999), consideram os líquens organismos que influenciam na fertilidade e estabilidade do solo em regiões áridas. Especificamente em regiões em que os solos possuem pouca vegetação (Benalp & Lange 2003). Com base nisso, as relações ecológicas entre líquens e suas substâncias e a microbiota do solo subjacente, necessitam de mais estudos para obtenção de maior conhecimento da dinâmica dos líquens e sua importância em ecossistemas tropicais em que estudos os sobre suas substâncias são ainda escassos, sobretudo no Brasil e, em particular, na Região Nordeste. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar possíveis mudanças nas propriedades químicas de um Argiloso e de um Neossolo após incubação em laboratório com quantidades crescentes de líquens.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo de incubação de quantidades crescentes de líquens da espécie *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., em um Argissolo amarelo, e um Neossolo quartzarênico, foi conduzido em condições controladas de temperatura (22°C) no Laboratório de Fertilidade do Solo, pertencente ao Departamento de Energia Nuclear (DEN) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), localizado na cidade do Recife-PE.

O Argiloso foi coletado na área experimental do departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, em área sob pastagem e o Neossolo em uma área do tabuleiro costeiro no município de Alhandra, pertencente ao Estado da Paraíba, ambos na profundidade de 0-20 cm. Os solos foram secos ao ar e passado em peneiras de malha de 4mm. Sub-amostras dos solos foram coletadas e submetidas à caracterização química (Tabela 1) consistindo em: pH (H₂O 1: 25) N e C (Embrapa 1999).

O teor de N total foi determinado pelo método de Kjeldahl (Embrapa 1999) e o de carbono pelo método de oxidação via úmida (Snyder, 1984). A mesma caracterização foi realizada também para os líquens utilizados no ensaio (Tabela 1) conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro doses (0; 1,5; 2,5 e 4 t.ha⁻¹) de líquens com quatro repetições.

Vasos plásticos com capacidade para 500 gramas foram preenchidos com 200g de solo em base seca e quantidades de líquens calculadas em gramas de acordo com a densidade do solo. Após o enchimento dos recipientes e a aplicação superficial das doses de líquens, os solos foram umedecido com água destilada. A temperatura do laboratório foi mantida em torno de 22° C e controlada a umidade das parcelas por meio de borrifação manual.

Tabela 1. Caracterização química dos solos e do líquen utilizados no ensaio

Table 1. Chemical characterization of soils and lichen used in the test

Solo e Líquens	pH	N	C
g/kg.....		
Argissolo	6,0	9,4	6,0
Neossolo	5,2	7,6	4,3
Líquens	7,4	7,9	17,22

O ensaio teve duração de 40 dias e foram avaliados valores de pH e de Carbono total (COT) a cada 15 dias. O valor de pH de cada parcela foi determinado em água aos 2, 7, 22 e 40 dias de acordo com a metodologia descrita pela Embrapa (1999) e os valores de (COT) foram obtidos pelo método de oxidação via úmida (Snyder, 1984).

Sub-amostras dos solos foram submetidas a extrações sucessivas com éter dietílico, clorofórmio e acetona, à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$). Posteriormente o material obtido foi acondicionado em temperatura ambiente para evaporação dos solventes, restando no fim deste processo os extratos orgânicos. Foram submetidos à análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Legaz & Vicente 1983), para detecção de possíveis substâncias liquênicas lixiviadas para o solo. Os extratos foram injetados em cromatógrafo líquido Hitachi[®] (acoplado a um detector de ultravioleta a 254nm), na concentração de 1mg.mL^{-1} .

Como parâmetros de análise, foram utilizadas coluna de fase reversa C18, fase móvel metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5, v/v/v), sob fluxo de $0,1\text{mL.min}^{-1}$, pressão 84atm, atenuação 6, temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), conforme (Legaz & Vicente 1983). Os resultados foram avaliados de acordo com o tempo de retenção (TR) das substâncias na coluna e a área dos picos dos cromatogramas obtidos. Vale salientar que esta análise foi realizada no laboratório de Produtos naturais do Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE.

Os dados obtidos no estudo foram submetidos à análise de variância, e em seguida foi realizada análise de regressão para se estimar a dinâmica do carbono orgânico total (COT) e o valor do pH após aplicação de líquens nos solos, por meio do Software estatístico Sisvar[®] (Ferreira 2003), a significância pelo teste F e o valor do coeficiente de determinação (R^2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação e incubação de doses distintas de líquens no Argiloso, após o período de 40 dias proporcionou resultados significativos ajustando-se ao modelo quadrático tanto os valores de pH quanto os teores de carbono total (Figuras 1 e 2). Os valores de pH do solo apresentaram um comportamento crescente até a dose de 4 t.ha^{-1} de líquens, proporcionando valor de pH correspondente a 7,6 na dose de $2,5\text{ t.ha}^{-1}$ e 7,7 na dose 4 t.ha^{-1} respectivamente (Figura 1).

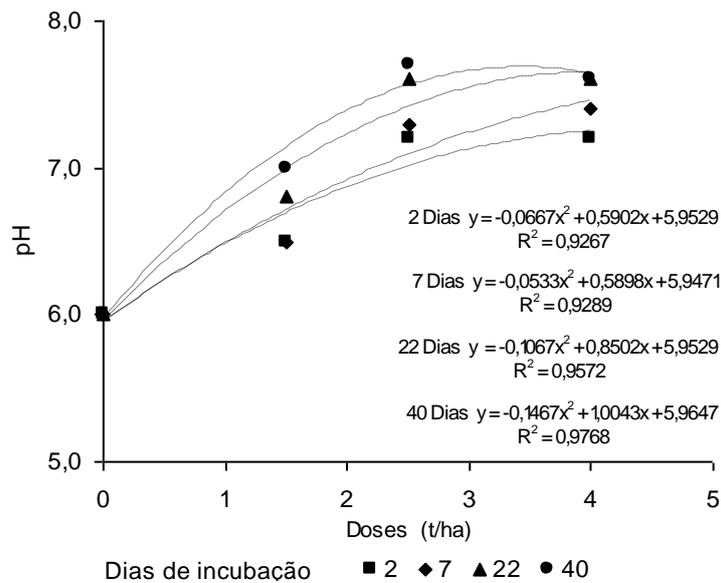


Figura 1. Valores do pH aos 40 dias de incubação com líquens no Argissolo

Figure 1. PH values at 40 days of incubation with lichens on the Clayey

Os resultados indicaram que as doses de líquens causaram aumento nos teores de carbono total do solo de acordo com o aumento das três doses avaliadas. Esse aumento no valor de pH do solo incubado com os líquens pode estar associado a alguma influência de Ca presente nos líquens, que possivelmente favoreceu uma condição de alcalinidade durante o período de incubação e/ou a ação (Figura 5) do ácido fumarprotocetrárico (FUM) lixiviado para o solo (Vasconcelos, 2009). Associado a essa questão tem-se a possibilidade da matéria orgânica contida nos líquens ter complexado os óxidos de alumínio na solução do solo, favorecendo conseqüentemente o aumento do pH (Stevenson 1994). Por outro lado, as substâncias líquênicas são conhecidas por sua habilidade de se complexarem com cátions do substrato mineral, o que se conhece como quelatos (Purvis & Halls, 1996).

Com base nos resultados obtidos, observa-se que os teores de Carbono total do solo aumentaram após a aplicação de líquens (Figura 2). Isso pode ter ocorrido possivelmente devido à presença do FUM detectado por CLAE (Figura 5) e de possíveis outros compostos orgânicos ainda não identificados, tais como a liberação de açúcares por parte das algas e do talo líquênico (Melo 2011).

Benalp & Lange (2003), afirmaram que áreas com presença de líquens apresentam mais carbono e nitrogênio, umidade e outros nutrientes no solo, quando comparadas com áreas de vegetação escassa e sem presença de líquens. Isso evidencia que os

liquens desempenham papel importante nas propriedades químicas do solo em particular elevando os valores do pH e os teores de carbono quando em contato com o solo.

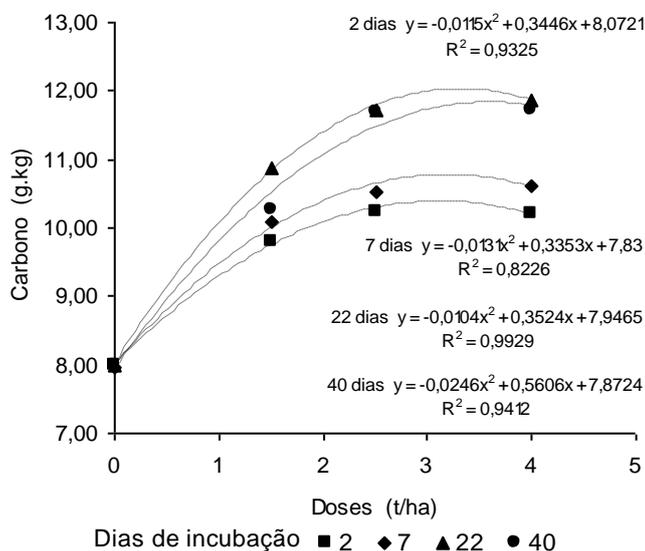


Figura 2. Teor de carbono total do Argiloso incubado com liquens

Figure 2. Total carbon Clayey incubated with lichens

Os dados obtidos demonstraram que até aos quarenta dias de incubação, os liquens quando em contato com o Neossolo ou incubados em quantidades de 1,5, 2,5 e 4 t.ha⁻¹, aumentou também o pH e os teores de carbono total (Figura 3 e 4). Verificou-se uma elevação de pH do solo em todas as quantidades de liquens incubadas. Observa-se que a quantidade de 4 t.ha⁻¹ de liquens apresentou um comportamento com elevação do pH superior quando comparada às demais quantidades. Os resultados indicaram também que as doses de liquens proporcionaram aumento crescente ao longo do tempo nos teores do carbono do solo (Figura 3). Isso pode ser justificado pela interferência de possíveis fatores discutidos anteriormente.

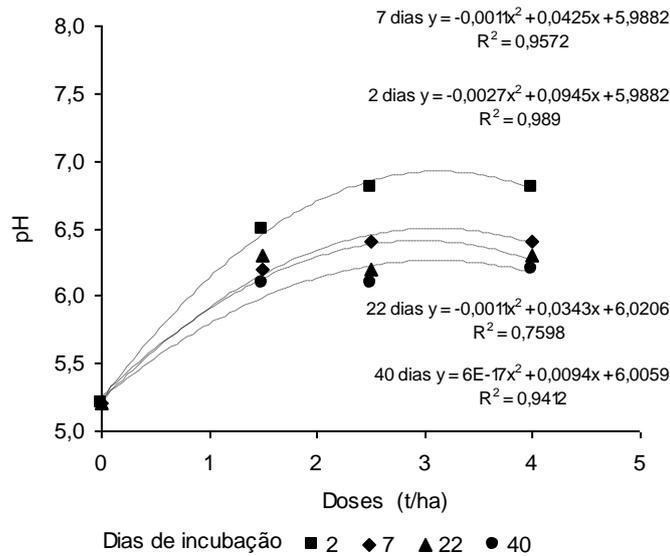


Figura 3. Valor do pH do Neossolo incubado com quantidades crescentes de líquens

Figures 3. PH value of Neossol incubated with increasing amounts of lichens

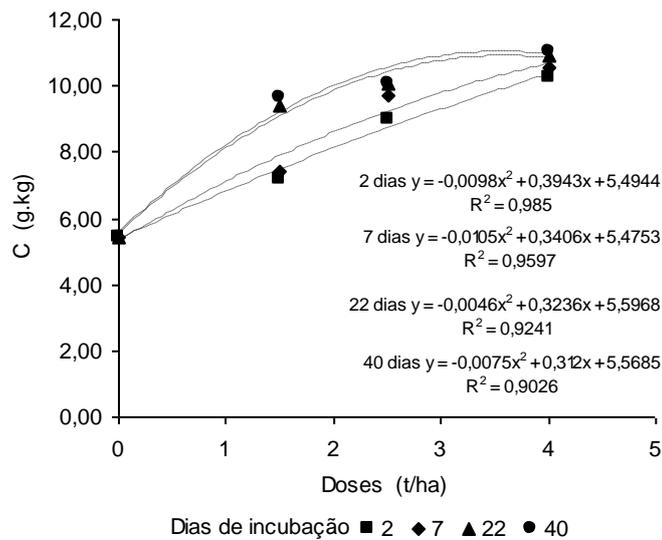


Figura 4. Teor de C do Neossolo ao longo do tempo incubado com quantidades crescente de líquens

Figura 4. C content of the Neossol over time incubated with increasing amounts of lichens

Outra explicação que também pode ser atribuída ao aumento no valor de pH do Neossolo incubado com líquens, e aos teores de carbono total no solo após a aplicação de líquens (Figura 4), é a ação do FUM, substância majoritária da espécie líquênica, que uma vez, lixiviado para o solo mantém faixa de acidez próxima a neutralidade (Vasconcelos, 2009). Esses resultados corroboram com a literatura correlata, em que

outras pesquisas realizadas afirmaram que áreas com presença de líquens apresentam mais carbono e nitrogênio quando comparada com áreas sem a presença desses simbioses. Contudo, os resultados obtidos no estudo, demonstraram que pode haver contribuição importante na melhoria das propriedades químicas do solo com a presença de líquens, principalmente quando a umidade do solo é constante, o que permite maior desenvolvimento deste ser vivo e possivelmente a passagem de substâncias que poderão ser benéficas ao solo, o que sugere estudos mais detalhados neste sentido, uma vez que, há pouquíssimas informações na literatura consultada, para melhor entendimento da permanência ou introdução de líquens sobre a superfície do solo, principalmente em solos com baixo teor de matéria orgânica ou com baixo pH.

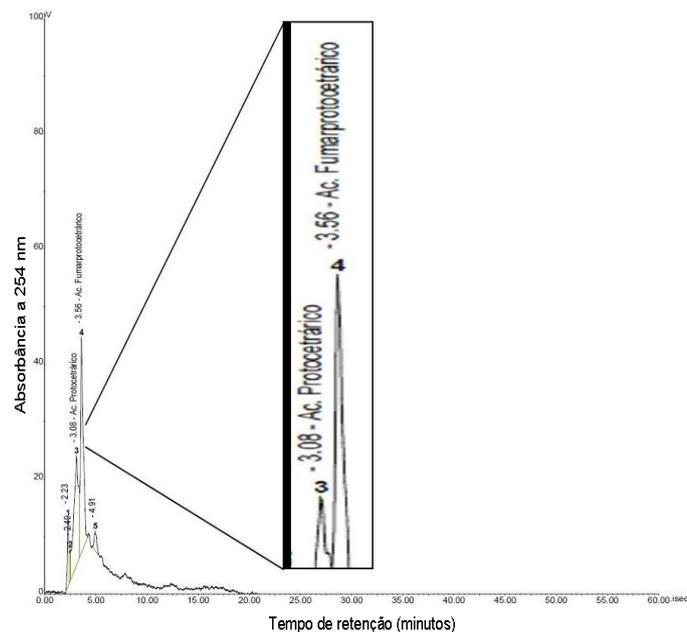


Figura 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Argissolo). Concentração de ácido fumarprotocetrário de 0,0228mg/mL, para: 3 - Ácido protocetrário; 4 - Ácido fumarprotocetrário

Figure 5. High Efficiency Liquid Chromatography (Cleyey). Fumarprotocetrário acid concentration of 0.0228 mg/mL, for: 3 - protocetrário acid 4 - Acid fumarprotocetrário

REFERÊNCIAS

- Ahti, T., Stenroos, S., Xavier Filho, L. The lichen family cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. *Tropical Biology*. 55-50. 1993.
- Belnap, J.; Lange, O.L. *Biological soil crusts : structure, function, and management*. Springer-Verlag: Berlim 131p. 2003.
- EMBRAPA. Embrapa solos, Embrapa Informática Agropecuária. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia, 1999. 370p.
- Evans, R.D.; Benalp, J. Long-term consequences of disturbance on nitrogen dynamics in an arid ecosystem. *Ecology* 80, 150-160. 1999.
- Ferreira, D. *Sisvar software: versão 4.6*. Lavras: DEX/UFLA, 2003. software.
- Hale, M.E. *The Biology of Lichens*. 3ª ed. London: Edward Arnold Pub, 1983. 90p.
- Legaz, M.E.; Millanes, A.M.; Cordoba, C.V. Fisiologia dos liquens. In: Xavier-Filho, L.; Legaz, M.E.; Cordoba, C.V.; Pereira, E.C. *Biologia de Liquens*. Rio de Janeiro: Ambito Cultural, 624p. 2006.
- Legaz, M.E.; Vicente, C. Endogenous inactivators of arginase, L-arginase decarboxylase and agmatine amidohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiology*., v.71, p.300-307, 1983.
- Legaz, M.E.; Millanes, A. M.; Cordoba, C. V.. Fisiologia dos liquens. In: Xavier-Filho, L.; Legaz, M. E.; Cordoba, C. V.; Pereira, E. C. *Biologia de Liquens*. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006, 624p.
- Melo, P. *Radiação gama na funcionalidade e interação de Cladonia salzmannii Nyl. (líquen) com o solo*. Universidade Federal de Pernambuco, 2011. Dissertação de Mestrado.
- Purvis, O.W.; Halls, C. A review of lichens in metal-enriched environments. *Lichenologist* 28, 571-601. 1996.
- Seaward, M.R.D. *Lichen Ecology*. London: Academic Press, 1977. 550p.
- Sedia, E.G.; Ehrenfeld, J.G. Differential effects of lichens, mosses and grasses on respiration and nitrogen mineralization in soils of the New Jersey Pinelands. *Community Ecology* 144, 137-147, 2005.
- Snyder, J.D.; Trofymow, J.A. A rapid accurate wet oxidation diffusion procedure for determining organic and inorganic carbon in plant and soil sample. In *Comm. Soil Science Plant Analysis*. 15 (5): 587-597, 1984.
- Stevenson, F.J. *Húmus chemistry: gênese, composição e reações*. 2ed. New York, John Wiley & Sons, 1994. 496p.

Vasconcelos, T.L. Influência do fósforo na produção de substâncias transformadoras do solo sob *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. Universidade Federal de Pernambuco, 2009. Dissertação de Mestrado.

Xavier-Filho, L., Legaz, M.E., Cordoda, C. V., Pereira, E. C. Biologia de Líquens. I de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. 624p.

Sensitivity of *Cladonia substellata* Vainio (lichen) to gamma irradiation and the consequent effect on limestone rocks

Helena Paula de Barros Silva*

Nuclear Energy Department,
Energetical and Nuclear Technologies Post-Graduation Program,
Geosciences and Technology Center,
Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Brazil
Email: barrosleny@hotmail.com
*Corresponding author

Waldeciro Colaço

Nuclear Energy Department,
Geosciences and Technology Center,
Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Brazil
Email: wcolaco@ufpe.br

Eugênia C. Pereira

Geographical Sciences Department,
Human Sciences and Philosophy Center,
Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Brazil
Email: eugenia.pereira@pq.cnpq.br

Nicácio Henrique da Silva

Biochemistry Department,
Biological Sciences Center,
Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Brazil
Email: nhsilva@uol.com.br

Abstract: The lichens play an important role in decomposition of the rocky substrate, through the chemical weathering of their substances. In this paper, we wanted to determine the influence of gamma rays on usnic acid production by *Cladonia substellata*. Samples of lichens were exposed to gamma rays from a Co-60 source, receiving different doses on gamma irradiator. After irradiation, the lichens were packed over shredded limestone. For 90 days the lichen samples were collected and analysed by high performance liquid chromatography. The rocks samples were analysed by X-ray diffractometry. We realised that *C. substellata* increases the usnic acid biosynthesis when the

APÊNDICE 2: CO-ORIENTAÇÕES DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- **Orientações concluídas**

1. Pedro Hildon dos Santos Barros Filho. Trabalho: Efeito da radiação gama sobre *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. Co-orientação bolsa de iniciação científica PIBIC/FACEPE 2009/2010.

2. Iwelton Madson. Trabalho: Efeitos da radiação ultravioleta em *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr, coletada de solos de Saloá-PE. Co-orientação bolsa de iniciação científica PIBIC/UFPE. 2009/2010.

3. Bruno Bastos. Trabalho: Efeitos da radiação ultravioleta em *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr, coletada de solos de Alhandra-PB. Co-orientação de Estágio Supervisionado/ Graduação em Ciências Ambientais/UFPE. 2009/2010.

- **Orientação em Andamento**

1. Tamara Letícia de Paula. Influência da radiação gama na bioprodução de metabolitos secundários de *Parmotrema andinum* por imobilização celular. Co-orientação bolsa de iniciação científica PIBIC/FACEPE 2011/2012.

APÊNDICE 3: PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS

- Radiação gama na funcionalidade e interação de *Cladonia salzmannii* Nyl. (líquen) com o solo. 2009 à 2011.
- Efeito da radiação gama no potencial alelopático de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. sobre *Lactuca sativa* L. 2010 à 2014.
- Viabilidade da produção contínua de metabólitos bioativos de líquens: influência da radiação gama na produtividade celular de *Parmotrema andinum* e *Cladonia substellata*. 2010 à 2014.