

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIA
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

**RADIOSENSIBILIDADE GAMA DE *Cladonia substellata*
Vainio (LÍQUEN) E O CONSEQÜENTE EFEITO SOBRE
ROCHAS CALCÁRIAS**

HELENA PAULA DE BARROS SILVA

RECIFE – PERNAMBUCO- BRASIL
JUNHO - 2006

**RADIOSENSIBILIDADE GAMA DE *Cladonia substellata* Vainio
(LÍQUEN) E O CONSEQÜENTE EFEITO SOBRE ROCHAS
CALCÁRIAS**

HELENA PAULA DE BARROS SILVA

**RADIOSENSIBILIDADE GAMA DE *Cladonia substellata*
Vainio (LÍQUEN) E O CONSEQÜENTE EFEITO SOBRE
ROCHAS CALCÁRIAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Aplicação de Radioisótopos.

Orientador: Prof. Dr. Waldeciro Colaço

Co-orientadores: Prof^a. Dra. Eugenia C. G. Pereira

Prof. Dr. : Nicácio H. da Silva

RECIFE – PERNAMBUCO- BRASIL

JUNHO - 2006

Silva, Helena Paula de Barros

Radiossensibilidade gama de *Cladonia substellata* Vainio (líquen) e o conseqüente efeito sobre rochas calcárias / Helena Paula de Barros Silva. – Recife : O Autor, 2006.

45 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Tecnologias energéticas e nucleares – Líquens. 2. *Cladonia substellata* Vainio – Radiação gama – Ácido úsnico. 3. Rochas calcárias – Radiossensibilidade gama – Efeitos conseqüentes. I. Título.

621.039

621.361

CDU (2.ed.)

CDD (22.ed.)

UFPE

BC2006 – 549

**RADIOSENSIBILIDADE GAMA DE *Cladonia substellata*
VAINIO (LÍQUEN) E O CONSEQUENTE EFEITO SOBRE
ROCHAS CALCÁRIAS**

Helena Paula de Barros Silva

APROVADA EM: 02.06.2006

ORIENTADOR : Prof. Dr. Waldeciro Colaço

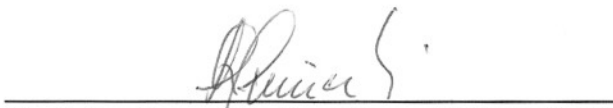
CO-ORIENTADORES: Profa. Dra. Eugenia Cristina Gonçalves Pereira

Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Cosme Rafael Martínez Salinas – DB/UFPB



Prof. Dr. Lauro Xavier Filho - CB/UNIT-SE



Prof. Dr. André Maciel Netto – DEN/UFPE

Visto e permitida a impressão



Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

À minha família,
Aos meus orientadores e
Ao meu querido Léo

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 cursei o Mestrado.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos para a realização do curso.

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

Em especial, aos professores orientadores: Prof. Dr. Waldecir Colaço, do Departamento de Energia Nuclear, que me recebeu 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 Geografia, que além da orientação científica imensurável, foi/é minha amiga, incentivando-me a buscar sempre o melhor, estando presente em todos os momentos relacionados ou não com a pesquisa.

Ao professor Dr. Fernando Mota-Filho, do Departamento de Geografia, que esteve sempre presente dando sugestões importantes para a pesquisa.

Ao Prof. Dr Elmo Silvano de Araújo, a Patrícia Lopes Barros de Araújo e a Letícia Maria de Oliveira do grupo de pesquisa Aplicações de Radioisótopos em Sistema de Polímeros, pelo incentivo e parceria na elaboração da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cosme Rafael M. Salinas pelas sugestões que contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa.

A Mônica e Márcio pela colaboração na parte gráfica dos resultados.

Ao técnico do laboratório de Microbiologia do solo do Departamento de Energia Nuclear, João Batista da Silva Neto, por toda sua ajuda e motivação.

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 Geografia/UFPE; do Departamento de Ciência do Solo/UFRPE e do Laboratório de Produtos Naturais/UFPE.

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

Aos meus amigos pessoais que sempre estiveram presentes na minha vida.

Aos meus sogros e cunhados que sempre me apoiaram e estiveram prontos a ajudar.

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

Aos meus pais e irmãos, que sempre estiveram presentes na minha formação pessoal e profissional.

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

***“Os detalhes da natureza são revelados àquele que tem olhos para perceber,
paciência para observar e capacidade para analisar”.***

Carl P. Swanson

	LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1 -	Modelo esquemático da ultraestrutura do talo liquênico. (A) Fotobionte, ou camada das algas; (B) Hifas medulares ou medula; (C) Hifas corticais ou córtex superior.	04
Figura 2 -	Modelo estrutural do ácido úsnico	06
Figura 3 -	Líquen <i>Cladonia substellata</i> Vainio	17
Figura 4 -	Localização da área de coleta de <i>Cladonia substellata</i>	18
Figura 5 -	Amostras de calcário inteiro e triturado para uso em ensaio	19
Figura 6 -	Localização da área de coleta do calcário, ilha de Itapessoca, localizada no município de Goiana-PE	19
Figura 7 -	Fotografia mostrando a montagem dos experimentos	20
Figura 8 -	Seqüência da coleta das amostras liquênicas e rochosas. A: Placa de Petri contendo líquen irradiado sobre rochas calcárias	21
Figura 9 -	Esquema de extração de substâncias liquênicas por sistema de esgotamento a frio	23
Figura 10 -	Esquema da metodologia para extração de ácido úsnico de <i>Cladonia substellata</i> , segundo Asaina; Shibata (1954), com modificações de Pereira (1998).	24
Figura 11 -	Cromatograma dos extratos orgânicos dos talos <i>in natura</i> de <i>Cladonia substellata</i> Vainio. Os talos irradiados com 0, 20 e 80Gy de radiação gama foram coletados após 1, 2, 3, 7, 15, 30, 60, 90 dias de incubação e depositados sobre calcário. USN (ácido úsnico purificado). EXT (extrato orgânico de <i>Cladonia substellata</i>).	28

- Figura 12 -** Cromatograma dos extratos orgânicos de talos *in natura* de *Cladonia substellata* Vainio, submetidos à irradiação gama (0, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 80Gy), depositado sobre calcário, por 1, 30, 60 e 90 dias. USN (ácido úsnico purificado). EXT (extrato orgânico de *Cladonia substellata*). **31**
- Figura 13 -** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, para: A- Extrato de *Cladonia substellata*; B- Extrato de *Cladonia substellata* não irradiada com radiação gama (0Gy); C- Ácido úsnico purificado e D- Ácido úsnico Merck **32**
- Figura 14 -** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos orgânicos de *Cladonia substellata* submetida a diferentes doses de radiação gama: A)5Gy; B) 7Gy; C) 10Gy; D)15Gy; E) 20Gy; F) 30Gy; G) 40Gy; H); 50Gy; I)60Gy; J) 80Gy. **33**
- Figura 15 -** Área do pico de ácido úsnico (USN) produzido por meio de cromatografia líquida de Alta Eficiência nos extratos orgânicos de *C. substellata* (mg de extrato), submetida a diferentes doses de radiação gama do ^{60}Co . **34**
- Figura 16 -** Difrátogramas por raios X de amostras de calcário mantidas em contato com talos de *Cladonia substellata* submetida a radiação gama. A: rocha natural - amostra controle, B: 10Gy; C: 30Gy e D: 80Gy. **37**

RADIOSENSIBILIDADE GAMA DE *Cladonia substellata* Vainio (LÍQUEN) E O CONSEQÜENTE EFEITO SOBRE ROCHAS CALCÁRIAS

Autora: Helena Paula de Barros Silva

Orientador: Prof. Dr. Waldeciro Colaço

Co-orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Eugenia C. G. Pereira

Prof. Dr. Nicácio H. da Silva

RESUMO

Solo é a superfície inconsolidada que recobre as rochas e mantém a vida animal e vegetal na Terra. É formado a partir da relação do clima e atividades bióticas, modificadas pela topografia, que atua sobre os materiais originários ao longo de certo período de tempo. Em relação às atividades bióticas, destaca-se a exercida pelos líquens, que possibilitam a sucessão na colonização do substrato rochoso, uma vez que podem viver diretamente sobre as rochas, intemperizando-as. Os líquens quando submetidos a diferentes doses e tipos de radiação, são estimulados a produzir suas substâncias em quantidades diferenciadas daquelas que produziriam sem a intervenção da radiação. O objetivo desta pesquisa foi determinar possíveis mudanças na produção do ácido úsnico (USN) pelo líquen *Cladonia substellata*, submetido a diferentes doses de radiação gama, e determinar a capacidade quelante desse líquen quando acondicionados sobre rochas calcárias. Amostras com 2,5g de *C. substellata* foram submetidas a fonte de Co-60-irradiador, taxa de dose de $9,06 \text{ Gy.h}^{-1}$, recebendo doses de 5; 7; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 60 e 80 Gy, e acondicionadas em placas de Petri, contendo calcário triturado. Durante todo o tempo de incubação, as amostras liquênicas foram borrifadas com água deionizada três vezes por semana. Amostras do líquen foram coletadas a cada 1, 2; 3; 7; 15; 30; 60 e 90 dias e, analisadas por Cromatografias em Camada Delgada (CCD) e Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As amostras rochosas controle (não submetidas aos líquens) e, as que estiveram em contato com a *C. substellata* irradiada a 10, 30 e 80 Gy foram analisadas por difratometria por raios X. Os resultados apontaram para um aumento na produção do ácido úsnico diretamente proporcional às doses mais altas, até a de 10 Gy. A partir desta, houve uma

tendência de redução de produção, até uma biossíntese bastante reduzida aos 80Gy. Isso foi corroborado nos experimentos de difratometria por raios X, que demonstraram ser mais facilmente queladas as amostras de calcário que estavam sob *C. substellata* irradiada com 10 Gy. A rocha submetida ao líquen irradiado a 80Gy, que apresentou baixos teores de USN, permaneceu de forma similar ao controle. Foi possível concluir que a *C. substellata* incrementa sua biossíntese de ácido úsnico à medida que aumenta a dose de radiação gama, mas há um limite para tal. A ação quelante do ácido úsnico sobre o calcário foi proporcional ao teor produzido desta substância, o que pode ser extrapolado para condições naturais, onde a radiação excessiva pode influenciar na pedogênese e sucessão ecológica.

Palavras-chave: Pedogênese; Raios gama, ácido úsnico, rochas calcárias, *Cladonia substellata*

GAMMA RADIOSENSIBILITY OF *CLADONIA SUBSTELLATA* VAINIO (LICHEN) AND THE CONSEQUENT CHELATING EFFECT ON CALCAREOUS ROCKS

Author: Helena Paula de Barros Silva

Adviser: Prof. Dr. : Waldecir Colaço

Co-advisers: Prof^a. Dr^a. Eugenia C. G.Pereira

Prof. Dr. : Nicácio H. da Silva

ABSTRACT - Soil is an unconsolidated surface that recovers the rocks and maintains animal and plant life on Earth. It is formed from climatic and biotic relationship, modified by topography that acts on original material, over a long period of time. Concerning biotic activities, one may emphasize that performed by lichens, which allow the succession of rocky substratum colonization, since they can live directly on rocks, weathering them. When submitted to different doses and kinds of radiation, lichens are stimulated to produce their substances in differentiated amounts from the ones that would be produced without radiation intervention. The objective of this research was to determine the possible changes in usnic acid (USN) production by the lichen *Cladonia substellata*, submitted to different doses of gamma radiation, and to determine the chelating capacity of those thalli, when deposited over calcareous rocks. Samples of *C. substellata* (2,5g) were submitted to Co-60-irradiador source, dose rate of 9,06Gy.h⁻¹, receiving doses of 5; 7; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 60 e 80Gy, and kept on Petri dishes, over triturate limestone. During the period of incubation, the lichen samples were sprayed with deionized water, three times a week. Lichen samples were collected at 1, 2; 3; 7; 15; 30; 60 and 90 days, and analyzed by Thin Layer (TLC) and High Performance (HPLC) chromatographies. The control rock samples (not submitted to lichens) and, the ones that were in contact with irradiated *C. substellata* at 10, 30 and 80Gy, were analyzed by X ray diffractometry. The results pointed out an increase in USN production directly proportional to the higher doses, up to 10Gy. Since, there was a tendency for reduction in production, a very reduced biosynthesis at 80Gy occurred. This corroborates the X ray diffractometry experiments, which showed to be more easily chelated when limestone samples were placed under *C.*

substellata irradiated at 10Gy. The rock submitted to irradiated lichen at 80Gy, showed low content of USN, remained in a similar form to control material. It was possible to conclude that *C. substellata* increases its USN biosynthesis in proportion to elevation of gamma radiation dose, but there exists a limit for that. The chelating action of USN on limestone was proportional to produced amount of this compound, that can be extrapolated to natural conditions, where excessive radiation can have influence on pedogenesis and ecological succession.

Keywords: Pedogenesis, gamma rays, usnic acid, calcareous rock, *Cladonia substellata*

SUMÁRIO

PÁGINA

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	Os líquens	3
2.1.1	Características gerais	3
2.1.2	Substâncias liquênicas	5
2.1.3	Relação do líquen com o ambiente	6
2.1.4	Líquens como seres pioneiros	7
2.1.4.1	Estudos desenvolvidos pelo Grupo de Liquenologia da UFPE	9
2.2	Radionuclídios e Radiação	10
2.2.1	Radiações corpusculares e eletromagnéticas	11
2.2.2	Relação dos líquens com os radionuclídios e radiações	12
2.3	Rochas	14
2.3.1	O calcário (carbonato de cálcio)	14
2.3.2	Hipótese que norteou o trabalho	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Coleta e acondicionamento do material	17
3.1.1	Líquens	17
3.1.2	Rochas	18
3.2	Irradiação, montagem, coleta, processamento e acondicionamento das amostras	20
3.2.1	Irradiação gama em fonte de Co-60 do material liquênico a ser testado	20
3.2.2	Montagem dos experimentos	20
3.2.3	Coleta do material liquenico e rochoso	21
3.2.4	Processamento e acondicionamento das amostras	21
3.3	Irradiação de <i>Cladonia substellata</i> para isolamento e purificação do ácido úsnico	22

3.4	Irradiação do ácido úsnico	24
3.5	Análise das mudanças fisiológicas do material liquênico	24
3.5.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	24
3.5.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	25
3. 6	Análise das mudanças do material rochoso	25
3.6.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	25
3.6.2	Difratometria por Raios-X	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5	CONCLUSÕES	39
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

Solo é a superfície inconsolidada que recobre as rochas e mantém a vida animal e vegetal na Terra. É constituído por partículas minerais, material orgânico, água e ar, sendo sua principal função o fornecimento de nutrientes para as plantas (LEPSCH, 2002). O solo é formado a partir da influência combinada do clima e de atividades bióticas, modificadas pela topografia, que atua sobre os materiais originários ao longo de certo período de tempo (BRADY, 1979).

Em relação às atividades bióticas, destaca-se a exercida pelos líquens. Estes, além de indicarem a qualidade do ar, participam de um sem-número de reações no sistema vivo, como formadores dos solos, ou interagindo com insetos e outros pequenos animais, fornecendo abrigo e alimento. No que se refere ao papel de formadores do solo, os líquens possibilitam a sucessão na colonização do substrato rochoso, uma vez que eles podem viver diretamente sobre as rochas, intemperizando-as biogeofísica e biogeoquimicamente. O processo biogeoquímico consiste na liberação de substâncias líquênicas que irão atuar na degradação (ou decomposição) química da rocha (PEREIRA, 2002). Dessa decomposição inicial do solo serão criadas condições para o estabelecimento de plantas superiores (LEPSCH, 2002).

Todos esses processos decorrentes da ação dos líquens não originam imediatamente um solo, mas contribuem com outros fenômenos de intemperismo na criação do regolito, que constitui o material gerador dos solos. Por outro lado, há a sucessão ecológica a partir dos seres que se instalam após os líquens (SEAWARD, 1977; NASH III, 1996). Além do mais, quando submetidos a diferentes doses e tipos de radiação, os líquens são estimulados a produzirem suas substâncias em quantidades diferenciadas daquelas que produziriam sem a intervenção da radiação.

Considerando os aspectos anteriormente observados, o objetivo desta pesquisa foi determinar por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), possíveis mudanças na produção do ácido úsnico (USN) extraído de *Cladonia substellata* Vainio (líquen), uma vez que esse líquen possui, aproximadamente, 98,1% de sua composição fenólica de ácido úsnico, quando amostras dessa espécie são submetidas a diferentes doses de radiação gama de Co-60 e

acondicionadas sobre rochas calcárias. As possíveis modificações na composição mineralógica do calcário, em função do tratamento com radiação imposta ao líquen *C. substellata* foram avaliadas pela comparação dos resultados das análises por CCD e Difractometria de raios X.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os líquens

Os líquens tiveram sua primeira descrição feita por Tournefort (1694 – 1698), porém ao descrevê-los ele não os distinguiu dos musgos. Micheli, em 1729, utilizou o termo “leichen” pela primeira vez, que significou planta rasteira ou lambechão. Em 1868, Schwendener demonstrou tratar-se de uma simbiose complexa de fungo e alga, porém essa teoria não veio a ser completamente aceita por todos os cientistas (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976). Atualmente, não se chegou a um consenso em relação à definição de líquen, porém a teoria mais aceita é a estabelecida por Reinke, onde ambas as partes são favorecidas, havendo uma relação de simbiose entre o fungo (micobionte) e a alga (fotobionte) (PEREIRA, 2002).

Pereira (2002) esclarece que durante a Reunião Geral da *International Association for Lichenology* (IAL), em 1981, na Austrália, foram lançadas proposições de definições formais para o líquen, enviadas à revista *Newsletter* (vol. 14 (1): 11), entre elas a de que o líquen é uma associação de um fungo e um simbiote fotossintético, resultando em talos estáveis de ultraestrutura específica (Proposta pelo Comité de Terminologia da IAL) e a de que o líquen é uma associação de um fungo e uma alga, ou cianobactéria, ou ambas, que resultam em uma estrutura estável (proposta por A. L. HUBER e D. K. KIDBEY, Deptº of Soil Science and Plant Nutrition, University of Western, Australia). O que pode ser observado, a partir de então, é que todas as definições propostas dizem ser o líquen uma associação estável alga/fungo.

2.1.1 Características gerais

Margulis; Schwartz (2001) posicionam os seres em uma escala baseada na evolução celular. Nesse sistema de classificação, os líquens estão incluídos no reino Fungi, praticamente isolados e filogeneticamente situados acima dos fungos superiores Zygo, Asco e Basidiomycota. Nesse estudo, o líquen é designado como MYCOPHYCOPHYTA, significando MYCO=fungo, PHYCO=alga e PHYTA=planta.

A simbiose característica dos líquens permite que dois seres bastante distintos, o fotobionte, a alga, pertencente às divisões Chlorophyta ou Cyanophyta (também 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 Pereira (2002), o fotobionte e o micobionte se posicionam de forma peculiar dentro do talo liquênico em camadas sucessivas. Assim, o córtex superior, composto de hifas do fungo entrelaçadas, que visam proteger a camada das algas, a qual vem logo abaixo, protegida por outro feixe de hifas frouxas, a medula, é seguido de um outro feixe de hifas, o córtex inferior (Figura 1).

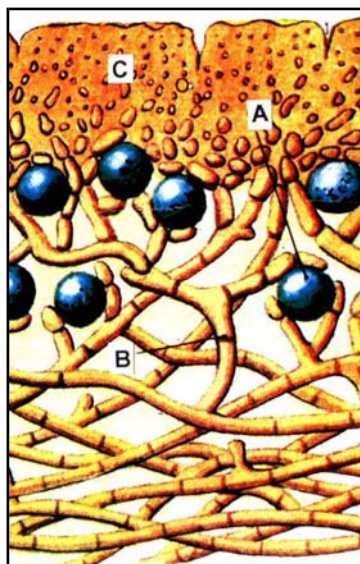


Figura 1 - Modelo esquemático da ultraestrutura do talo liquênico. (A) Fotobionte, ou camada das algas; (B) Hifas medulares ou medula; (C) Hifas corticais ou córtex superior. Pereira (2002).

O talo do líquen pode se apresentar de cores e formas variadas, a depender da espécie e das substâncias que ele contém. O talo foliáceo ou folhoso é semelhante a uma folha sobre o substrato, e dele se destaca com facilidade, enquanto o talo crustoso ou crustáceo se impregna no substrato como se fosse uma mancha nele, sendo impossível destacá-lo. O talo arbustivo ou fruticoloso apresenta-se como sugere o nome, um

arbusto, e, pode ser ereto, ou decumbente, semelhante a uma planta epífita (PEREIRA, 2002).

2.1.2 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, em metabolismo secundário, são produzidas as substâncias liquênicas, únicas neste táxon (CULBERSON, W.; CULBERSON, C. 1970; NASH III, 1996). Sabe-se que essas substâncias liquênicas, antigamente designadas como “ácidos liquênicos”, são quase na totalidade fenólicas, sendo responsáveis pela maioria dos benefícios advindos dos líquens (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976). Dentre esses benefícios destacam-se a ação farmacológica, ação bactericida; utilização na indústria têxtil, farmacêutica, de perfumes e cosméticos. Também são referidos como úteis na fermentação para a produção de álcool, alimentação, entre outros. Dentre todas as atividades, sua interação com o ambiente é uma das mais mencionadas.

Os compostos fenólicos, entre eles os ácidos alifáticos, para e meta depsídeos, depsidonas, benzil ésteres, dibenzofuranos, ácidos úsnicos, xantonas, antraquinas, terpenóides, e derivados do ácido pulvínico, no interior do talo liquênico, tomam forma cristalina e são extra-celulares, depositados sobre as hifas do micobionte. Esse fato confere ao líquen grande capacidade de adaptação às adversidades, visto que esses cristais funcionam como fotorreceptores e/ou fotoindutores, selecionando o tipo de radiação que a eles seja conveniente (PEREIRA, 1998).

Uma das substâncias liquênicas mais estudadas é o ácido úsnico que possui uma atividade biológica bastante diversificada (NASH III, 1996). Essa substância caracteriza-se por ter baixa solubilidade em água. Sua estrutura consta de uma unidade aromática dihidroxilada, de caráter fenólico (anel A), que se liga a uma função cetônica e um grupo metila. O anel B, cíclico de seis carbonos com insaturação, contém uma metila e três grupos cetônicos. O caráter hidrófobo da substância se dá por possuir quatro grupos cetônicos e um anel furano unindo os anéis A e B (figura 02). Seus cristais, de coloração amarela característica, variam de forma, de acordo com o solvente utilizado na recristalização (ASAHINA; SHIBATA, 1954).

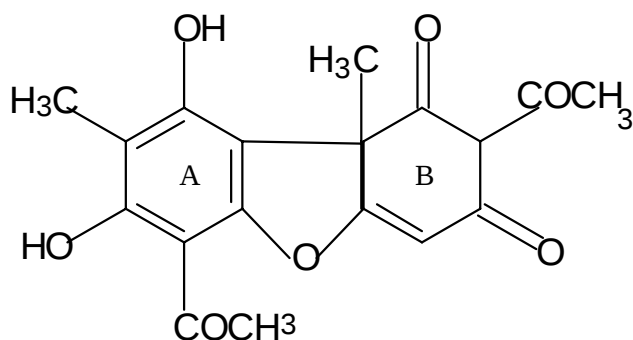


Figura 02 - Modelo estrutural do ácido úsnico. Pereira (2002).

Segundo Pereira (1998), o líquen *Cladonia substellata* possui cerca de 98,1% de sua composição fenólica de ácido úsnico, seu principal composto. A espécie foi descrita por Vainio, em 1887, e novamente estudada por Ahti, em 1973. Ocorre sobre solos arenosos, em áreas mais expostas, no caso dos tabuleiros da Paraíba, ou sobre rochas em decomposição.

A *Cladonia substellata* faz parte da família Cladoniaceae, a mais representativa dentre as incluídas nos líquens Cladoniformes. Esta família pertence à ordem Lecanorales, e é posicionada dentro da classe dos Ascomycetes; possui como fotobionte algas verdes unicelulares. Quanto à adaptação ecológica, as populações de Cladoniaceae estão geralmente confinadas, e têm períodos distintos de erupção ou contração, que dependem dos ciclos de sucessão.

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, é esquamuloso a folioso.

2.1.3 Relação do líquen com o ambiente

Os líquens ocupam qualquer substrato; habitam madeiras queimadas, em decomposição, troncos vivos, folhas, muros, telhados, solos, rochas, dentre outros. Até

vidros provenientes de lixos deixados por “turistas ecológicos” no meio de bosques e trilhas são substratos para líquens (SEAWARD, 1977). Apesar disso, muitas espécies têm preferência por substratos específicos. O *Stereocaulon alpinum* é um líquen terrícola; *Cladonia cornuta* é típica de solos ácidos; *Lichina pygmae* ocorre em paredões rochosos ou rochas à beira mar, dentre outros exemplos. Por serem específicos, obrigatórios ou não, indicam não só o ambiente em que vivem como também os minerais e rochas que usam como substrato. Sua enorme resistência 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; SEAWARD, 1977). Atualmente, acredita-se que um dos principais motivos da sobrevivência dos líquens é o fato de que eles dessecam muito rapidamente. Eles estão freqüentemente muito dessecados na natureza, com o teor hídrico variando entre 2 e 10% do seu peso (RAVEN et al., 2001).

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. Algumas espécies também designam a área onde ocorrem, como a *Alcectoria sarmentosa* de regiões montanhosas, *Caloplaca marina* e *Lichina pygmae* de zonas de maré, ou mesmo a *Orchrolechia parella* e a *Usnea antarctica* encontradas no Mediterrâneo e na Antártica, respectivamente. Daí a possibilidade de considerar os líquens como indicadores biogeográficos (SEAWARD, 1977).

Seaward (1977) relata que a pureza do ar atmosférico é um fator crucial à presença e sobrevivência do líquen, que se alimenta basicamente de forma higroscópica, fixando elementos nele dispersos, notadamente o nitrogênio. Por absorver os elementos dispersos no ar atmosférico, os líquens podem ser utilizados como bioindicadores (indicando, de forma qualitativa, características do ambiente) e biomonitores (indicando, de forma quantitativa, características ambientais).

2.1.4 Líquens como seres pioneiros

O papel tradicionalmente atribuído aos líquens é o de formador de solos, pois são os pioneiros a colonizar a rocha matriz. Entretanto, muito se tem a colocar em

relação a sua função na sucessão de seres. Esses vão se desenvolvendo a medida que os líquens decompõem a rocha e criam substrato orgânico, ou seja, preparam um solo desenvolvido o suficiente à sua instalação, pois requerem umidade e nutrientes, a exemplo dos musgos e vegetais fanerogâmicos.

Sobre a sucessão das plantas, Linnaeus¹ apud SMITH (1921) descreve que os líquens crustosos são os primeiros a se fixarem no substrato rochoso e que, ao envelhecerem, tornam-se uma camada de húmus, criando condições para a adaptação dos musgos, onde esses irão encontrar um local apropriado e alimento. No momento da morte desses, há quantidade de solo suficiente para que plantas herbáceas e arbustivas estabeleçam-se e mantenham sua existência.

Bachmann² apud SMITH (1921) informou que o granito pode ser reduzido por líquens a uma massa granular amarela semelhante à argila, em período relativamente curto de tempo. O autor concluiu que a distribuição do líquen sobre a rocha é direcionada pelo teor de umidade e pelas superfícies que lhe dão ponto de apoio. E ainda quando testou rochas calcárias, descobriu que as que possuíam líquens em sua superfície conseguiam reter e absorver mais água, contribuindo para a instalação de vegetais de maior porte.

Ao aflorarem na superfície terrestre, as rochas são alteradas ou levadas a se desintegrar pela ação do vento, da água, do clima, ou ainda, por reações biológicas. Essas alterações recebem o nome de intemperismo, que conceitualmente está subdividido em químico, físico e biológico. Nesse último, destacam-se as atividades biogeofísica e biogeoquímica dos líquens, que decompõem as rochas e minerais, principalmente, pela atividade do micobionte (do fungo) de certas espécies.

A atuação biogeofísica se dá pela capacidade de agir mecanicamente sobre rochas através da penetração de suas rizinas nas microfissuras, as quais se expandem e contraem-se mediante umedecimento ou ressecamento. Isto ocorre em função da umidade do ar atmosférico, fator crucial à existência desse grupo taxonômico (SEAWARD, 1977; NASH III, 1996).

¹ LINNAEUS, C. **O economia Naturae**. 2. ed. Upsala: Amoenitates Academicae, 1762.

² BACHMANN, F. M. The origin and development of the apothecium in *Collema pulposum*. **Arch. Zellforsch**, v. 4 p. 369-430, 1913

O intemperismo biogeoquímico, ocorre por meio da quelação, reação química onde uma substância orgânica, no caso a líquênica, tem a capacidade de captar íons inorgânicos (provenientes da rocha, neste caso).

2.1.5 Estudos desenvolvidos pelo Grupo de Liquenologia da UFPE

Dados já podem ser mencionados acerca da ação de quelação de substâncias líquênicas sobre rochas coletadas em diferentes municípios de Pernambuco.

Andrade; Pereira (2000) referem-se à ação, em meio aquoso, do ácido fumarprotocetrárico, extraído de *Cladonia verticillaris*, sobre amostras de granito, coletadas no município de Jaboatão dos Guararapes, enfatizando que tal substância inicia seu processo de quelação nas primeiras 24h de incubação formando, inclusive, bolhas de CO₂ nas paredes dos recipientes. Esses mencionam também a provável oxidação do ferro, em face à coloração avermelhada do meio líquido no qual as amostras se encontravam. O mesmo granito foi também avaliado utilizando-se o ácido úsnico, extraído de *Cladonia substellata*, como substância teste. Este composto demonstrou ser eficiente na degradação da rocha (COSTA et al., 2000). Ensaio espectroscópicos, empregando espectrometria de plasma induzido (ICP/AES), permitiram identificar e quantificar os elementos mais eficientemente quelados (ferro, alumínio e cálcio) (MOTA-FILHO et al., 2001).

Ensaio com o calcário coletado no Município de Paulista, na propriedade da Indústria de Cimentos Poty foram realizados, em meio aquoso, com ácido úsnico. Essa rocha demonstrou ser bastante susceptível à degradação química. A modificação da substância líquênica foi observada desde as primeiras 24h do experimento, sendo avaliada por ensaios de cromatografia em camada delgada pelo qual se constatou a presença de bandas referentes ao ácido úsnico na sua forma reduzida, além do floroglucinol; ensaios espectroscópicos permitiram identificar e quantificar os elementos mais eficientemente quelados (cálcio, seguido do magnésio e silício). (COSTA, 2000).

Silva, A. et al. (2002) relatam a ação da atranorina extraída de *Cladina dendroides* sobre granito em meio aquoso, indicando que a oxidação dos íons da rocha se deu de forma pronunciada, demonstrando a capacidade quelante da substância líquênica e comprovando sua contribuição na formação do solo e a importância na sucessão ecológica.

Silva, H. et al. (2002) estudaram a ação do ácido úsnico sobre a rocha ignimbrito, coletado no município de Ipojuca-PE, em meio aquoso, indicando por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) a interação do ácido liquênico e a rocha a partir das primeiras 24h, até o final do experimento.

Costa (2003) verificou a degradação do basalto, formador da terra roxa, sob ação do talo *in natura* de *C. substellata* e do ácido úsnico (USN) em meio aquoso. Todos os tratamentos foram submetidos à CCD e à difratometria por raios X. Os resultados indicaram que, nas simulações em meio aquoso houve ação quelante do ácido úsnico, variando a intensidade e rapidez com que se deu esta reação de quelação.

Silva, H. (2005) observou ao analisar o efeito do talo *in natura* de *Cladonia substellata* sobre rochas graníticas e calcárias que a reação de quelação se dá mais intensamente entre o calcário e o referido líquen.

2.2 Radionuclídeos e Radiação

Nuclídeo é denominado a espécie de átomo ou núcleo que tem um número definido de prótons e nêutrons que o caracteriza. Os nuclídeos podem ser estáveis ou instáveis (radioativos). Os últimos são conhecidos como radionuclídeos ou radioisótopos (KELLER, 1981).

Conforme Okuno et al. (1982), os radioisótopos são isótopos instáveis dos elementos. Podem ser usados de duas maneiras: como traçadores, na diagnose ou como fontes de energia, na terapia. São usados como traçadores ou marcadores devido a duas importantes propriedades: possuem comportamento químico idêntico ao de isótopos estáveis do mesmo elemento, e apresentam emissão espontânea de radiação que pode ser detectada, indicando assim sua posição e quantidade. Como fontes de energia, os radioisótopos encontram aplicações por serem detectáveis após absorção ou espalhamento pela matéria, ou por quebrarem moléculas e ionizarem átomos formando íons, iniciando assim reações químicas ou biológicas.

Radiação é uma forma de energia, emitida por uma fonte, e 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). As radiações estão divididas em dois grandes grupos: corpusculares e eletromagnéticas.

2.2.1 Radiações 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 (ODUM, 1972).

As radiações eletromagnéticas 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), raios infravermelhos, raios ultravioleta, raios X e raios gama (OKUNO et al., 1982). Essas radiações diferem entre si pela sua frequência e pelo seu comprimento de onda (OKUNO, 1988).

Os raios gama são um dos tipos de radiação que emitem dos núcleos dos átomos dos elementos radioativos naturais e artificiais; é uma radiação eletromagnética com um comprimento de onda extraordinariamente curto (menor que $1 \text{ \AA}$ ou 10^{-10} m por vez) e que, por isso, possuem uma extraordinária capacidade de penetração. Eles surgem na desaceleração das partículas carregadas, na aniquilação de um par de antipartículas (eletron-pósitron, próton-antipróton, etc.) na cisão espontânea ou artificial dos núcleos dos átomos de urânio e plutônio e em algumas outras reações nucleares (PRASS, A. R. Disponível em: <<http://www.fisicanet.terra.com.br/nuclear/radiacao-gama.pdf>> Acessado em 21/03/2004).

Os raios gama das fontes radioativas naturais e artificiais têm ampla aplicação devido a sua propriedade de penetração na matéria e sua não destruição. 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 detecção de vazamentos, na esterilização de materiais cirúrgicos, na conservação de alimentos, onde irá atuar na ionização de alguns átomos e alterar a estrutura de moléculas vitais de bactérias e microrganismos, provocando a sua morte. Na agricultura pode ser utilizado na criação de novas variedades de plantas com características melhoradas, aumento e melhoramento na produção de alimentos por intermédio do metabolismo vegetal e animal e controle ou eliminação de insetos (OKUNO et al., 1982).

Três grandezas físicas são definidas para medir a radiação: Exposição, Dose absorvida e Dose equivalente.

A exposição é uma grandeza que caracteriza o feixe de raios X e gama e mede a quantidade de carga elétrica produzida por ionização, no ar, por essa radiação, por

unidade de massa do ar. A unidade de exposição, segundo o Sistema internacional, é o Roentgen (**R**) e $1R = 2,58 \times 10^{-4} \text{ C.kg}^{-1}$ (Coulomb por quilograma).

Dose absorvida é a energia média cedida pela radiação ionizante à matéria por unidade de massa dessa matéria, essa grandeza é definida para qualquer tipo de radiação ionizante e para qualquer meio, ao contrário da exposição, que é definida somente para raios X e gama em um dado meio, o ar (OKUNO, 1988). A unidade de exposição, segundo o Sistema internacional, é o gray (**Gy**) e 1Gy é igual a 1J. kg^{-1} (Joules por quilograma).

O efeito biológico, para uma mesma dose absorvida, poderá ser maior ou menor, dependendo do tipo de radiação. Observando esse fato, foi criado o conceito de dose equivalente, que é calculado multiplicando-se a dose absorvida por um fator numérico, adimensional, chamado fator de qualidade (OKUNO et al., 1982). Este leva em conta que a radiação que produz maior número de ionização no tecido, por unidade de comprimento, causa maior dano biológico do que aquela que produz menor número de ionização por unidade de comprimento. No primeiro caso estão partículas alfa, fragmentos de fissão, com fator de qualidade 20 (vinte) e no segundo, raios X e raios gama, com fator de qualidade 1 (um) (OKUNO et al., 1982). A unidade de dose equivalente segundo o Sistema internacional é o Sievert (**Sv**) e 1Sv é igual a dose de radiação absorvida x fator de qualidade, dessa maneira quando o fator de qualidade é 1, $1\text{Sv} = 1 \text{ Gy}$.

2.2.2 Relação dos líquens com os radionuclídeos e as radiações

Erbisch (1977) estudou o efeito da radiação gama de uma fonte de Cs^{137} no líquen folhoso *Parmelia sulcata* Tayl sobre árvores da espécie *Acer rubrum* durante um ano, observando que apenas os líquens que foram irradiados com dose de 100krad (10^3 Gy) apresentaram danos, entre eles: estímulos e quebra de lóbulos, formação de pigmentos escuros, distorção do cloroplasto da alga, modificação no crescimento normal do talo e eventualmente morte. Constatou que, após ter recebido uma grande dose de radiação gama, o líquen não pode realizar suas funções normais de crescimento e deteriora-se. Pollum; Erbisch³ apud ERBISCH (1977) estudaram o efeito da radiação gama no líquen

³ POLLUM, P. A., F. ERBISCH, F. H. 1972. Effects of gamma radiation on the lichen *Cladonia verticillata*. **Bryologist**, v.75, p.48-53, 1972.

Cladonia verticillata e constataram que durante o período de exposição, o líquen apresentou um escurecimento de sua cor com tendência a entrar em colapso. Erbisch⁴ apud ERBISCH (1977) observou o líquen *Cladonia sylvatica* sob radiação gama, os resultados não indicaram danos causados aos líquens.

Os líquens quando submetidos à radiação ultravioleta intensiva são estimulados a sintetizar metabólitos criando, dessa forma, uma proteção contra os perigos da radiação. Racan et al. (2002) observaram, ao comparar substâncias naturais extraídas de líquens com o protetor Nívea sun Spray FPS 5 e com o ocylnmethoxyeinnamate (OMC), que o ácido úsnico foi melhor filtro de raios UVB que o OMC e, semelhante ao protetor Nívea sun Spray FPS 5, sugerindo que tal substância possa vir a ser usada no preparo de bloqueadores solares.

Haal et al. (2002), realizando experimentos em laboratório com o líquen *Cladonia arbuscula* e radiação ultravioleta, observaram um aumento na produção de compostos fenólicos e mediram a atenuação dos raios ultravioleta dentro do talo liquênico através de fibra óptica.

Rubio et al. (2002) estudaram o líquen *Acarospora schleicheri*, coletado nas latitudes 18°S, 19°S, e 33°S em zonas alpinas do Chile, onde as concentrações do ácido rizocárpico foram determinadas e comparadas. Os resultados obtidos sugeriram que a síntese do ácido rizocárpico 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 terrestre e aquáticos, verificaram que os líquens estudados, *Cladina foliácea*, *C. portentosa* e *Cladonia arbusculosa*, e o musgo *Lycopodium annotinum*, não tiveram significativa redução de seu crescimento sob radiação ultravioleta. Já o musgo *Tortula ruralis* teve seu crescimento reduzido com o aumento da radiação ultravioleta. As plantas aquáticas estudadas não tiveram seu crescimento afetado com o aumento desta radiação e algumas plantas terrestres de maior porte tiveram seu crescimento afetado.

Quando o líquen desseca a fotossíntese cessa. Nesse contexto de “vida suspensa” mesmo a luz solar ofuscante, ou extremos de calor e frio, podem ser suportados pelos líquens. A suspensão da fotossíntese depende, em grande parte, do córtex superior do líquen se tornar mais espesso e mais opaco quando seco, dificultando a passagem da

⁴ ERBISCH, F. H. 1974b. Effects of acute and chronic gamma radiation on *Cladonia sylvatica* and *Parmelia sulcata*. USAEC Report C00-2085-7, Michigan Technological University.

energia luminosa. Um líquen úmido pode ser danificado ou destruído por luz intensa ou temperaturas, que não prejudicam o líquen seco (RAVEN et al., 2001).

De La Torre Noetzel et al. (2004) testaram a resistência do líquen *Rhizocarpon geographicum*, coletado em uma elevada altitude no centro da Espanha, com o seu córtex e com esta parte removida, durante os meses de maio e junho de 2001 e julho de 2003. Os resultados obtidos indicaram uma alta redução na atividade fotossintética dos líquens que tiveram seu córtex removido, em relação aos com córtex.

Observando que a radiação tem influência no metabolismo das diferentes espécies de líquens e produção de suas substâncias, o líquen *Cladonia substellata* Vainio foi irradiado com doses de radiação gama para observações de possíveis mudanças na produção do ácido úsnico.

2.3 Rochas

Rochas são produtos consolidados, resultantes da união natural de minerais (TEIXEIRA, 2000). As rochas são classificadas de acordo com seu processo de formação na natureza e estão divididas em três grandes grupos: rochas magmáticas, metamórficas e sedimentares.

Segundo Ernst (1998), rochas magmáticas resultam da solidificação de uma fusão de silicatos denominada magma. Existem dois tipos principais de rochas magmáticas, as extrusivas, que são formadas pelo extravasamento de matéria total ou parcial fundida à superfície da Terra, e as intrusivas, que são produzidas pela cristalização de magmas que não atingiram a superfície da crosta terrestre. Rochas metamórficas originam-se de rochas que sofreram alterações nas configurações mineralógicas e texturais, provocadas por modificações no ambiente em que foram geradas. Rochas sedimentares são formadas de matérias que resultam da decomposição, desagregação e retrabalhamento, de rochas existentes de várias origens. As rochas sedimentares com maior distribuição na crosta continental são os arenitos, os folhelhos e as rochas carbonáticas, principalmente o calcário.

2.3.1 O calcário

O calcário encontra-se distribuído abundantemente na crosta terrestre apresentando-se em camadas e lentes intercaladas nas formações metamórficas e sedimentares, nos

diversos períodos geológicos. As camadas calcárias têm origem nas acumulações de organismos inferiores, principalmente de ambientes marinhos, e na precipitação de carbonato de cálcio dissolvido nas águas dos rios, lagos, mares e fontes mineralizadas (ABREU, 1960).

Estudos sobre quelação de rochas calcárias por substâncias liquênicas – ácido úsnico (USN), demonstraram a interação entre a rocha e o referido ácido. Costa (2000) estudou o efeito do ácido úsnico extraído de *Cladonia substellata* sobre o calcário, determinando os elementos traços mais quelados pelo USN, através de espectrômetro de emissão atômica (ICP/AES). Os resultados demonstraram que houve interação – substância liquênica e rocha – com vários elementos do calcário. O cálcio foi o elemento quelado em maior teor, seguido do magnésio e silício. Silva, H. et al. (2004) compararam a ação do USN, extraído de *C. substellata* sobre amostras de rochas calcárias e riolíticas, em meio aquoso. Constataram que o calcário foi mais vulnerável à ação da substância, provavelmente pelos teores de minerais mais facilmente quelados, demonstrando reagir, desse modo, mais facilmente com a substância teste. Silva; Pereira (2003) estudaram o efeito do USN, em meio aquoso, e talo *in natura* de *C. substellata* sobre rochas calcárias e graníticas. Os resultados demonstraram qualitativamente que a reação de quelação se dá mais intensamente entre o calcário e o referido ácido.

Considerando os estudos realizados, foi observado que o ácido úsnico interage mais intensamente com o calcário que as outras rochas estudadas, dessa maneira, no presente trabalho, o calcário foi analisado mediante contato com talo *in natura* de *Cladonia substellata* submetida à radiação gama.

2.3.2 Hipótese que norteou o trabalho

Hipótese: Líquens irradiados serão mais eficientes na quelação de elementos do calcário, acelerando e/ou aumentando o processo de pedogênese.

Justificativa: Líquens absorvem radiação, acelerando e aumentando a biossíntese de suas substâncias, estas capazes de degradar quimicamente substratos rochosos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e acondicionamento do material

3.1.1 Líquens

Foram coletados tufos de *Cladonia substellata* Vainio (figura 03), na Reserva Biológica Guaribas, município de Mamanguape – PB (figura 04), situado à margem esquerda da BR-101, sentido João Pessoa - Natal, distando 55km da capital do Estado.

A Reserva Biológica Guaribas encontra-se sobre sedimentos do Grupo Barreiras e depósitos arenosos da Formação Beberibe. O clima da região é, segundo Koeppen, As' (clima quente e úmido com chuvas de inverno antecipadas no outono).

O material coletado foi seco à temperatura ambiente ($28^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$) e acondicionado em caixas de papelão.



Figura 03 - Líquen *Cladonia substellata* Vainio

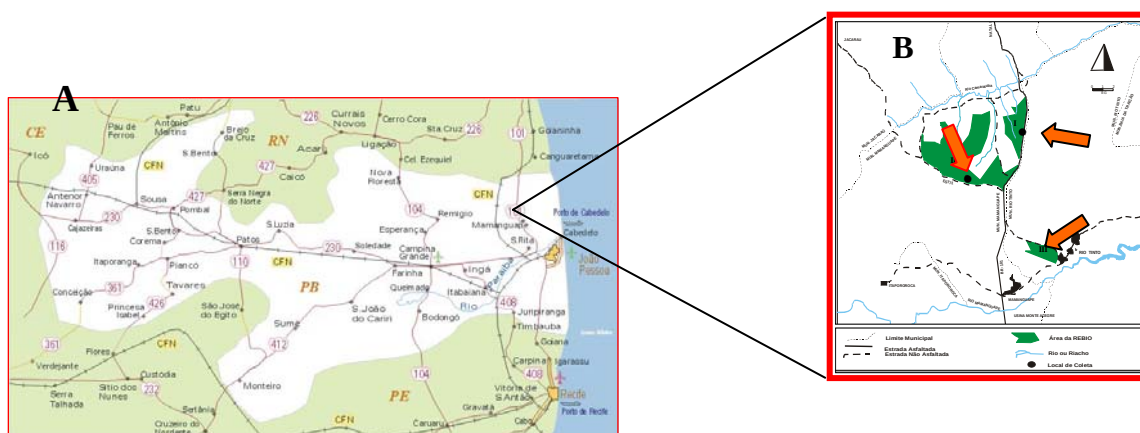


Figura 04 - Localização da área de coleta de *Cladonia substellata*, para A: Mapa da Paraíba, indicando o município de Mamanguape (PARAÍBA, 2004) e B: Reserva Guaribas - IBAMA. → : Área de coleta do líquen. Município de Mamanguape - PB (COSTA, 2003)

3.1.2 Rochas

Amostras de rochas calcárias (figura 05) foram coletadas na ilha de Itapessoca, localizada no município de Goiana-PE (figura 06), em blocos com dimensão aproximada de 10cm^3 , com auxílio de instrumentos apropriados, como escopo e martelo de geólogo. O material selecionado, em blocos de 10cm^3 , foi posteriormente dividido em duas partes: uma reservada para catalogação e a outra triturada para utilização dos experimentos.

O município de Goiana-PE, localizado na Mesorregião da Mata, Microrregião da Mata Setentrional, dista 60 km da capital, Recife, possui uma área de 501km^2 e limita-se ao Norte com o Estado da Paraíba, ao Sul com os municípios de Itaquitinga, Igarassu, Itamaracá e Itapissuma, a Leste com o Oceano Atlântico e a Oeste com os municípios de Condado e Itambé. O tipo climático característico do município é, segundo Koeppen, As' (clima quente e úmido com chuvas de inverno antecipadas no outono).

As amostras de calcário foram coletadas na Formação Gramame (FG) que tem origem marinha fossilífera e tem sua deposição associada à fase marinha transgressiva do Cretáceo Superior (PERNAMBUCO, 2001).



Figura 05 - Amostras do calcário inteiro e triturado para uso em ensaio.

Zona da Mata



Figura 06 - Localização da área de coleta do calcário, ilha de Itapessoca, localizada no município de Goiana-PE (PERNAMBUCO, 2004).

3.2 Irradiação, montagem, coleta, processamento e acondicionamento das amostras

3.2.1 Irradiação gama em fonte de Co-60 do material liquênico a ser testado

Para analisar o efeito da radiação gama sobre o processo de quelacção de rochas calcárias, amostras com 2,5g de *C. substellata* foram colocadas em envelopes de papel para submissão à irradiação gama em fonte de Co-60, recebendo 10 diferentes doses: 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 80 Gy. A irradiação do material liquênico foi realizada no irradiador gama (Co-60 – irradiador, Radionies Laboratory, taxa de dose de 9,06 Gy. h⁻¹, em 04/11/04) no Departamento de Energia Nuclear da UFPE.

3.2.2 Montagem dos experimentos

Amostras (46g) de rocha triturada foram acondicionadas em placas de Petri, com tampa, por triplicado, as quais receberam 2,5g de *C. substellata* irradiada com radiação gama. Placas semelhantes foram montadas para o grupo controle (desta vez recebendo o líquen não submetido à irradiação – 0 Gy). Cada amostra de líquen irradiado foi colocada em uma placa de Petri diferente, sendo, portanto montado um total de 33 placas (10 doses mais o tratamento controle x 3 repetições) para este experimento, conforme esquema da montagem dos experimentos na figura 07. Vale salientar que cada placa de Petri foi borrifada com 2,5 mL de água deionizada, três vezes por semana, durante todo o experimento.

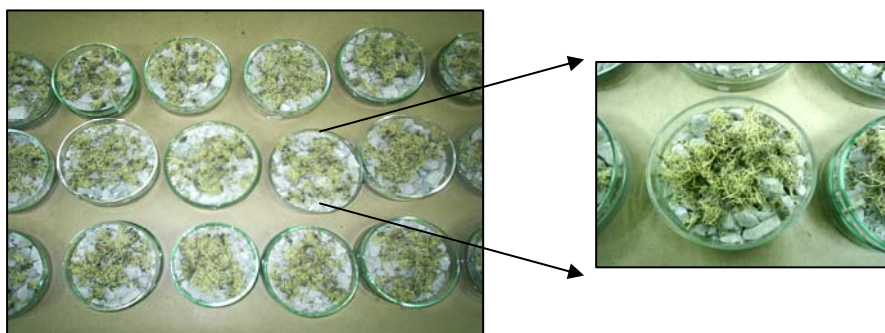


Figura 07 - Fotografia mostrando a montagem dos experimentos.

3. 2. 3 Coleta do material liquênico e rochoso

Após montagem dos experimentos, foram coletadas, de cada placa de Petri, amostras de 0,01g de líquen a 1, 2, 3, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, e acondicionadas separadamente, para posterior análise, seguindo Silva; Pereira, 2003. Amostras de 6g de material rochoso, de cada placa de Petri, foram coletadas após três meses, para posterior análise, seguindo Costa, 2003, de acordo com o esquema na figura 08.

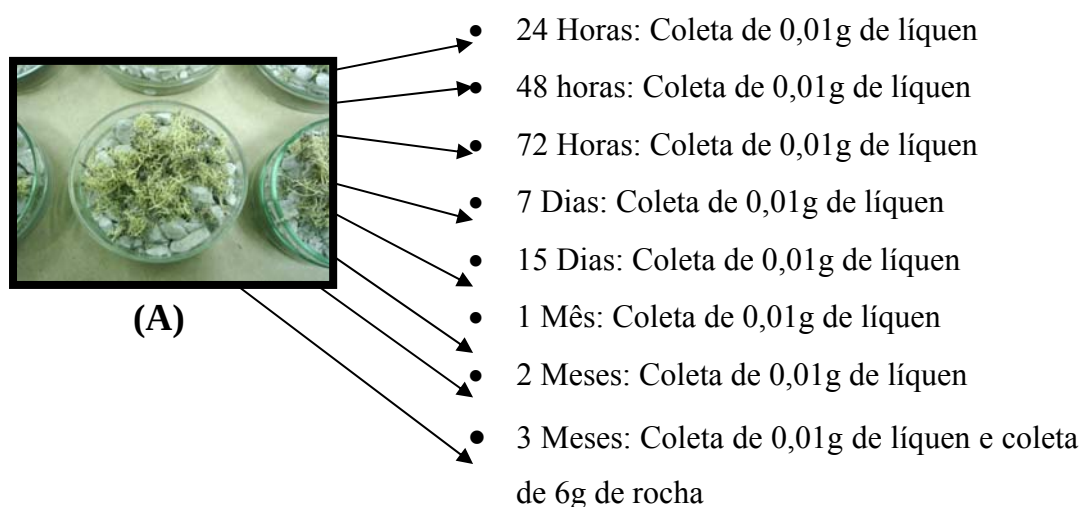


Figura 08 - Seqüência da coleta das amostras liquênicas e rochosas. A: Placa de Petri contendo líquen irradiado sobre rochas calcárias.

3. 2. 4 Processamento e acondicionamento das amostras

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio para testes de detecção de possíveis mudanças no líquen ou na rocha.

As amostras liquênicas foram extraídas por sistema de esgotamento a frio (figura 09), para a realização de cromatografia ascendente em camada delgada (CCD) (CULBERSON, 1972) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo Legaz; Vicente (1983). As amostras rochosas também foram submetidas ao sistema de esgotamento a frio, para análise por CCD.

O sistema de esgotamento a frio consistiu na adição de 3mL de éter ao material – liquênico ($\pm 0,01g$) ou rochoso ($\pm 1g$), agitação e repouso por 24 horas em geladeira. Após 24 horas, o material foi filtrado e colocado em um recipiente separado para secar à

temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$), obtendo-se o extrato etéreo. Ao resíduo foram adicionados 3 mL de clorofórmio, novamente agitado e colocado em geladeira. Após 24 horas, o material foi novamente filtrado e colocado para secar a temperatura ambiente, no mesmo recipiente do extrato etéreo, obtendo-se o extrato etéreo/clorofórmico. Ao resíduo foram adicionados, por fim, 3 mL de acetona, agitando-se e colocando-se o material em geladeira por 24 horas. Após 24 horas, o material foi novamente filtrado e colocado para secar a temperatura ambiente, no mesmo recipiente do extrato etéreo/clorofórmico, obtendo-se o extrato etéreo/clorofórmico/acetônico. Deste, obteve-se o extrato orgânico final, no qual foram realizadas as análises.

3.3 Irradiação de *Cladonia substellata* para isolamento e purificação do ácido úsnico

Para analisar o efeito da radiação gama apenas na produção do ácido úsnico, de *C. substellata*, amostras com 2,5g do líquen foram colocadas em envelopes de papel para submissão à irradiação gama em fonte de Co-60, recebendo dose de 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 80 Gy. A irradiação do material foi realizada no irradiador gama (Co-60 – irradiador, Radionics Laboratory, taxa de dose de $7,115 \text{ Gy.h}^{-1}$, em 23/09/05) no Departamento de Energia Nuclear da UFPE.

Após a irradiação da *C. substellata*, foi realizada a extração do ácido úsnico seguindo-se o modelo de Asahina; Shibata (1954), com modificações de Pereira (1998), conforme figura 10. Assim 2,5g de talo contido nos envelopes de papel foram submetidos à extração com 50 mL de éter e mantido em geladeira durante 72h. Após filtração, o extrato foi evaporado até secar, com posterior cristalização com benzeno e ácido acético. Os cristais obtidos foram analisados por CCD, segundo Culberson (1972), para a análise do grau de pureza dos cristais. As amostras rochosas também foram submetidas ao sistema de esgotamento a frio, para análise por CCD.

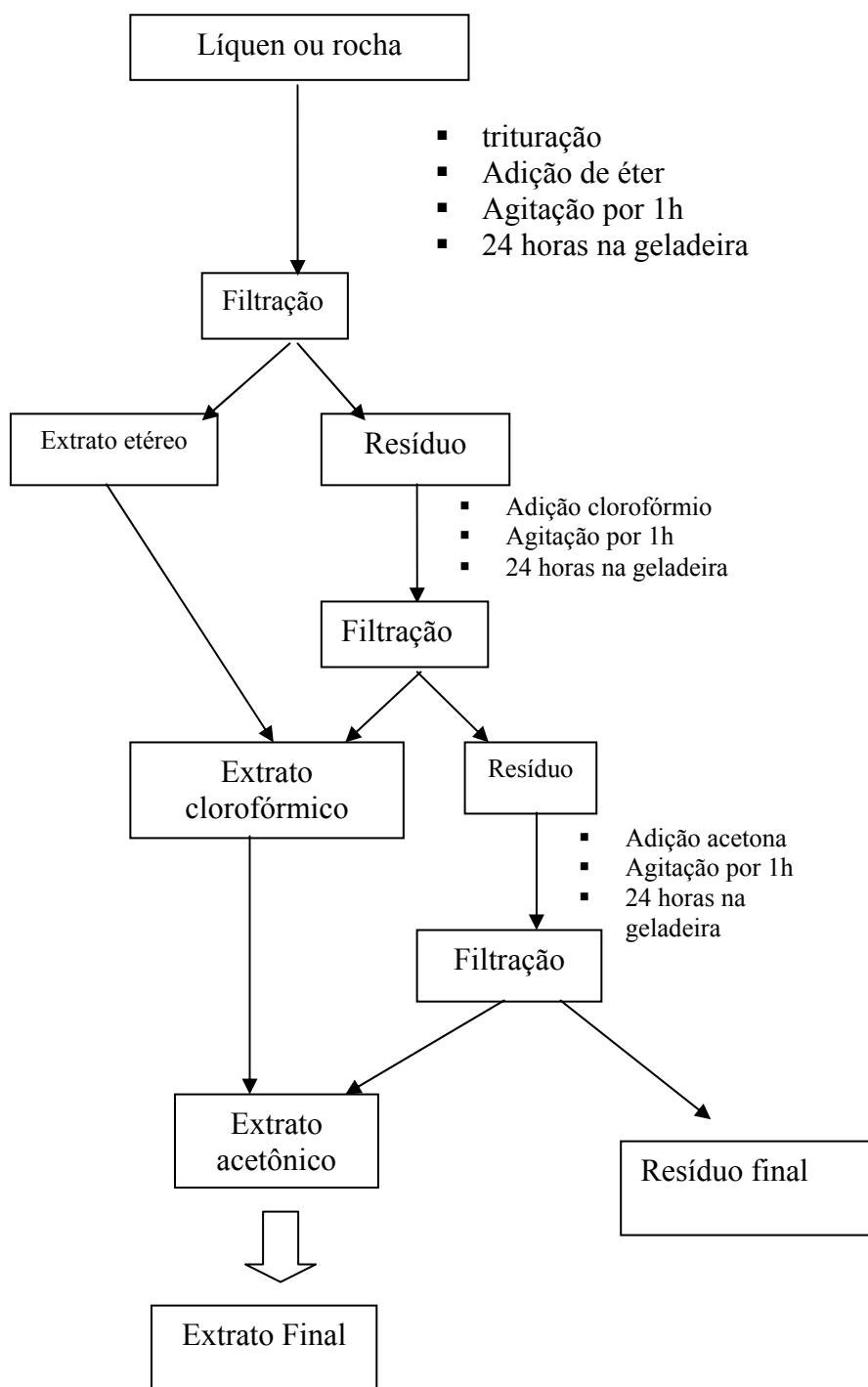


Figura 9 - Esquema de extração de substâncias líquênicas por sistema de esgotamento a frio.

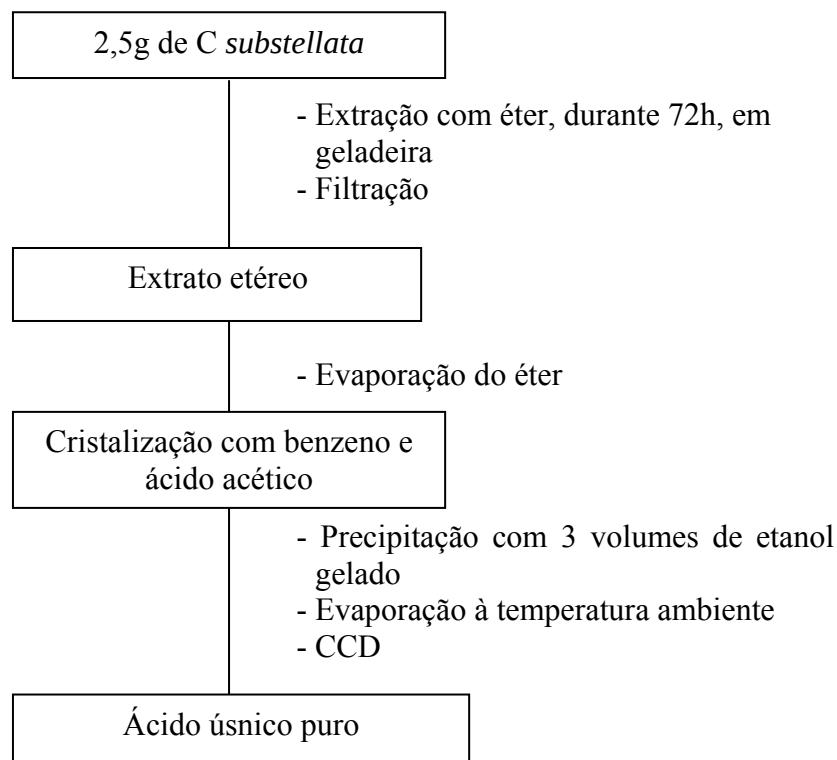


Figura 10 - Esquema da metodologia para extração de ácido úsnico de *Cladonia substellata*, segundo Asahina; Shibata (1954), com modificações de Pereira (1998).

3.4 Irradiação do ácido úsnico

Com o objetivo de analisar as modificações ocorridas no ácido úsnico, purificado de *C. substellata*, após irradiação com raios gama de fonte de Co^{60} , 10 frascos, cada um contendo, 1 mg do ácido foi irradiado com dose de 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 80 Gy. A irradiação do material foi realizada no irradiador gama (Co-60 – irradiador, Radionies Laboratory, taxa de dose de 7.1 Gy.h^{-1} , em 25/09/05) no Departamento de Energia Nuclear da UFPE.

3.5 Análise das mudanças fisiológicas do material liquênico

3.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos de *C. substellata* obtidos pelo sistema de esgotamento a frio, foram submetidos à cromatografia ascendente em camada delgada (CULBERSON, 1972).

Esta análise foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE.

As amostras foram aplicadas sobre placas de sílica Gel F254+366 Merck, e desenvolvidas no sistema A de solventes: tolueno/dioxano/ácido acético (respectivamente, 180:45:5, v/v.), segundo Culberson, 1972.

Após evaporação dos solventes, as placas foram reveladas sob onda de luz ultravioleta curta e longa, posteriormente pulverizadas com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 100°C por 1h.

Os resultados foram avaliados mediante valores de R_f (quociente entre a altura em cm das substâncias separadas-bandas, e a linha de parada do solvente) das amostras testadas e dos padrões da substância líquênica utilizada (ácido úsnico).

3.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos avaliados pela CCD e o padrão de ácido úsnico foram injetados em cromatógrafo líquido Hitachi (acoplado a um detector de ultravioleta a 254nm), nas concentrações de 1mg.mL⁻¹ e de 0,1mg.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), sob fluxo de 1,0mL.min⁻¹, pressão 84atm, atenuação 6, temperatura ambiente (25 ± 3°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.

3. 6 Análise das mudanças do material rochoso

3.6.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos das amostras rochosas obtidos a partir do sistema de esgotamento a frio foram submetidos à cromatografia ascendente em camada delgada segundo Culberson (1972) (seguindo o procedimento estabelecido no item 4.5.1). Esta análise foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica/ CCB/UFPE.

3.6.2 Difractometria por raios X

As análises de Difractometria por raios X foram realizadas com as amostras de calcário antes e depois de serem submetidas ao líquen irradiado com doses de 10, 30 e 80Gy, para verificação de possíveis transformações na composição mineralógica da rocha.

As análises foram realizadas no Setor de raios X do Laboratório de Física da Universidade Federal de Pernambuco. O equipamento de marca Siemens, modelo D-5.000, inclui difratômetro, gerador de alta voltagem, fonte de raios X, sistema colimador X, sistema de detecção, impressora e goniômetro. Ele é controlado por computador e dispõe de programas de tratamento de dados, como procura automática de picos, suavização da curva, procura de possíveis minerais através de difratogramas padrões. As condições de operação do equipamento são: tubo de cobre; voltagem de 40kV; corrente de 40mA e ângulo 2θ , com varredura de 5 a 60°. Aquisição contínua de 0,02° por segundo.

Para a realização das análises, as amostras rochosas foram trituradas até a obtenção de um pó. Em seguida, foram preparadas pela técnica de *back loading*. Essa técnica consiste no pressionamento do pó contra a abertura da lâmina de alumínio, disposta sobre superfície lisa e firme, geralmente vidro, de forma que a amostra fique coplanar com a superfície da lâmina (FAVA et al., 1999), sendo posteriormente colocada no difratômetro e analisada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação qualitativa da composição química de talos líquênicos irradiado ou não, e incubados em laboratório ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) sobre o calcário por três meses, revelou, pela cromatografia em camada delgada (CCD), com o auxílio de substâncias padrão e da reação de coloração de bandas (figura 11), a produção do ácido úsnico (USN), principal composto produzido pela espécie (AHTI et al., 1993), em todas as amostras avaliadas. No entanto, para os extratos do líquen não submetido à irradiação (0Gy) e depositados sobre o calcário, podem ser visualizadas bandas adicionais. Essas bandas correspondem a substâncias acessórias produzidas pela espécie, como observado por AHTI et al. (1993), como os ácidos estítico, constítico e criptoestítico, tendo em vista que, os valores dos Rf observados para esses ácidos são bem inferiores aos determinados para o USN como observaram Pereira et al., (1994) e Huneck; Yoshimura, (1996). Tais compostos, não são bem evidenciados por CCD, por ocorrerem em baixos teores no talo.

Bandas de coloração lilás também foram fortemente evidenciadas em Rf próximos ao do USN. Essas bandas, provavelmente, sugerem a ocorrência de alguma interação dos cátions do calcário com o líquen *C. substellata*, a princípio, por dissolução resultante do borrifamento do material com água deionizada. É provável, também, que os íons minerais tenham sido liberados da rocha por ação do ácido úsnico contido no talo de *C. substellata*, que deve ter percolado com o auxílio da água deionizada. É possível, mesmo sob condições de laboratório, que tenha havido evaporação da água que estava em contato com o calcário com posterior condensação nas paredes da placa de Petri. Então, a absorção do vapor de água, que provavelmente continha íons do substrato rochoso diluídos, pelos líquens, o que pode ter causado complexação com o USN, ou interagido no metabolismo da espécie, promovendo a síntese deste ácido, na sua forma reduzida, ou seu acúmulo no talo, na forma de quelato. Por isso, bandas adicionais às do USN são melhor evidenciadas com maior tempo decorrido do experimento. Tendências semelhantes foram obtidos por Silva, (2005) quando submeteu a *Cladonia verticillaris* ao migmatito, observando a degradação/transformação da rocha desde as primeiras 24 horas de incubação.

O comportamento do líquen se repetiu nas amostras submetidas à irradiação, com ênfase para as irradiadas com 20Gy. No cromatograma (figura 11), observa-se a produção do USN, que se apresenta na forma reduzida ou quelada. As bandas de substâncias queladas são melhor evidenciadas, sobretudo a partir do sétimo dia de observação. Por outro lado, na dose de 80Gy, o líquen parece não metabolizar o USN em teor significativo para ser detectado por CCD.

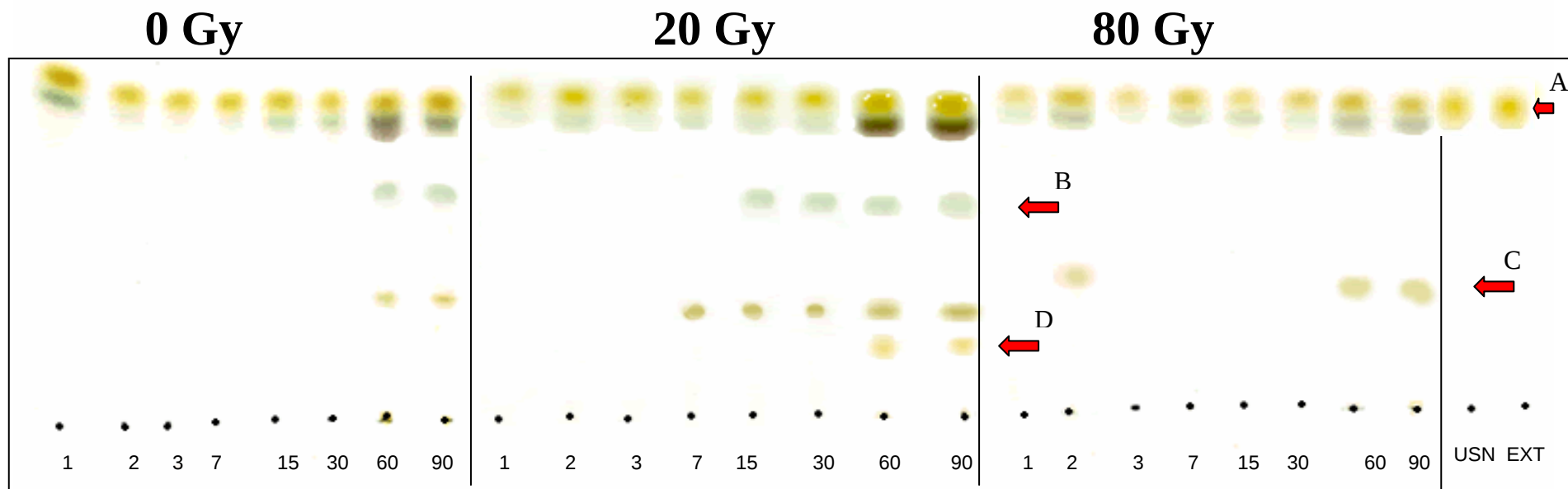


Figura 11 - Cromatograma dos extratos orgânicos dos talos *in natura* de *Cladonia substellata* Vainio. Os talos irradiados com 0, 20 e 80Gy de radiação gama foram coletados após 1, 2, 3, 7, 15, 30, 60, 90 dias de incubação e depositados sobre calcário. USN (ácido úsnico purificado_ padrão). EXT (extrato orgânico de *Cladonia substellata*_controle natural).

A: Linha correspondente ao ácido úsnico;

B: Linha correspondente ao ácido estítico;

C: Linha correspondente ao ácido constítico;

D: Linha correspondente ao ácido criptoestítico.

Neste aspecto, Brodo (1964) sugere que as modificações microclimáticas causam mais danos do que a radiação gama, enquanto Woodwell; Gannutz (1967) afirmam o oposto. Ambas as opções são aceitáveis, pois se tratam de estudos em regiões temperadas, onde a temperatura e a intensidade luminosa variam em cada estação do ano, com ênfase ao fotoperíodo e à infiltração de luz solar durante o período de queda das folhas, deixando os troncos das árvores em distintos níveis de exposição ao longo do ano. Por outro lado, a exposição de amostras de líquens, em ambiente natural, a fontes de radiação gama, sob diferentes doses, afeta o metabolismo e a estrutura dessa espécie (ERBISCH, 1977). Assim, por exemplo, Jones; Platt (1969) e Synder; Platt (1973) respectivamente, atribuem a esta radiação o retardo no crescimento de *Parmelia conspersa* e *Trapelia ornatta*. Em adição a tais efeitos, Erbisch (1977) atribuiu, à radiação gama, um aumento na ramificação e na maturação nas rizinas de *Parmelia sulcata*, com modificação dos lóbulos, inibição no desenvolvimento do talo e danos na estrutura interna, o que incluía a coalescência da hifa do micobionte modificando o formato dos cloroplastos e a produção de um pigmento marrom que, segundo dados de Mota-Filho et al. (2003), pode se tratar da feofitina.

Estudos com radiação gama em doses agudas ou crônicas sobre o líquen *Cladonia sylvatica* demonstram um atraso na evidência dos efeitos causados. Nenhum dano foi registrado até um período prolongado para o crescimento do talo. Neste caso, os podécios apresentaram-se achatados (MICHIGAN TECHNOLOGICAL UNIVERSITY, 1970; ERBISCH, 1974; BARSTOW, 1974;). O mesmo tipo de comportamento foi registrado para *C. verticillata* irradiada com doses agudas de radiação gama (POLLUM; ERBISCH, 1972). A espécie não apresentou danos, nem ativação do crescimento, até quando exposta, por período prolongado, a um regime de alta luminosidade e baixa intensidade de luz. Nesse caso, os podécios tornaram-se marrons, tendendo ao colapso.

Estudos mais detalhados relacionando líquens e radiação foram conduzidos com radiação ultravioleta considerada como radiação não ionizante. O USN demonstrou alta capacidade como bloqueador solar, quando comparado a padrões comerciais (RACAN et al., 2002).

Sabe-se que as substâncias liquênicas tomam forma de cristal, quando depositadas na superfície da hifa do micobionte, e a forma, cor, transparência ou opacidade, capacitam o cristal a selecionar o tipo e a dose de radiação absorvida pelo líquen (SEAWARD, 1977; NASH III, 1996). Dessa forma, pode haver aumento da temperatura do talo para dissolução da neve e do gelo que se depositam sobre os tufos liquênicos, em climas temperados e ou frios, como estratégia para o aumento da capacidade fotossintetizante, ou impedindo a penetração de radiação que desequilibre o metabolismo da espécie. Nesse caso, a ênfase na produção de metabólitos secundários é plenamente justificada.

Por outro lado, é possível que haja um limite de tolerância para tal, demonstrado pelo pico de produtividade, conforme afirmam Haal et al. (2002), quando registraram aumento da produção de metabólitos de *Cladonia arbuscula* submetida à radiação UV em condições de laboratório. Rubio et al. (2002) relataram o mesmo comportamento para *Acarospora schleichen*, em ambiente natural, a distintas latitudes, constatando uma adaptação química da espécie aos diferentes níveis de radiação UV-B (290 - 320nm).

Em virtude da detecção do pico de produtividade de USN aos 60 e 90 dias de incubação, as amostras submetidas aos tratamentos com todas as doses de radiação gama (5 a 80Gy) bem como as do tratamento controle (0Gy), nos tempos de incubação de 1, 30, 60 e 90 dias, foram também avaliadas por CCD (figura 12).

Nos cromatogramas obtidos, foi possível observar um aumento da concentração do USN diretamente proporcional ao aumento da dose de radiação gama, com ênfase às doses de 15, 20 e 30Gy. A partir de 40Gy o teor de USN parece diminuir cada vez mais, até 80Gy.

É possível que as altas doses de radiação gama sejam superiores à capacidade de suporte das células. O aumento da dose absorvida nos tecidos do líquen pode ter impedido a síntese do USN, como fator de adaptação a tal situação. Legaz et al. (1986) informam que talos de *Cladonia verticillaris* promoviam uma maior síntese do ácido fumarprotocetrárico, seu principal composto, quando diretamente expostos ao sol, em ambiente natural. O mesmo líquen, quando protegido pela sombra do dossel de *Anacardium occidentale*, priorizava o acúmulo de clorofilas e outros pigmentos fotossintetizantes.

Os resultados podem, ainda, ser ratificados em função dos postulados de Jones; Platt (1969); Pollum; Erbis (1972); Synder; Platt (1973); Erbis (1974) e que afirmam a existência de efeitos tardios sobre a *Cladonia sylvatica* e a *C. verticillata* irradiadas com doses agudas ou crônicas de radiação gama. Por outro lado, os autores enfatizam os danos estruturais internos ou externos não evidenciando o comportamento fisiológico, salvo a produção de um pigmento marrom que, como mencionado, pode se tratar de feofitina, resultante da degradação da clorofila.

Portanto, com base nos resultados aqui encontrados e no referencial teórico mencionado, é possível verificar uma interferência no metabolismo de espécies liquênicas, quando elas são submetidas à irradiação com raios gama. Ao mesmo tempo, é possível atribuir ao líquen a capacidade de ativação da biossíntese de seus fenóis, ou mesmo a translocação deles dentro do talo, como mecanismo de defesa aos agentes agressores do meio (radiação e ou poluentes). Reyes et al. (1994).

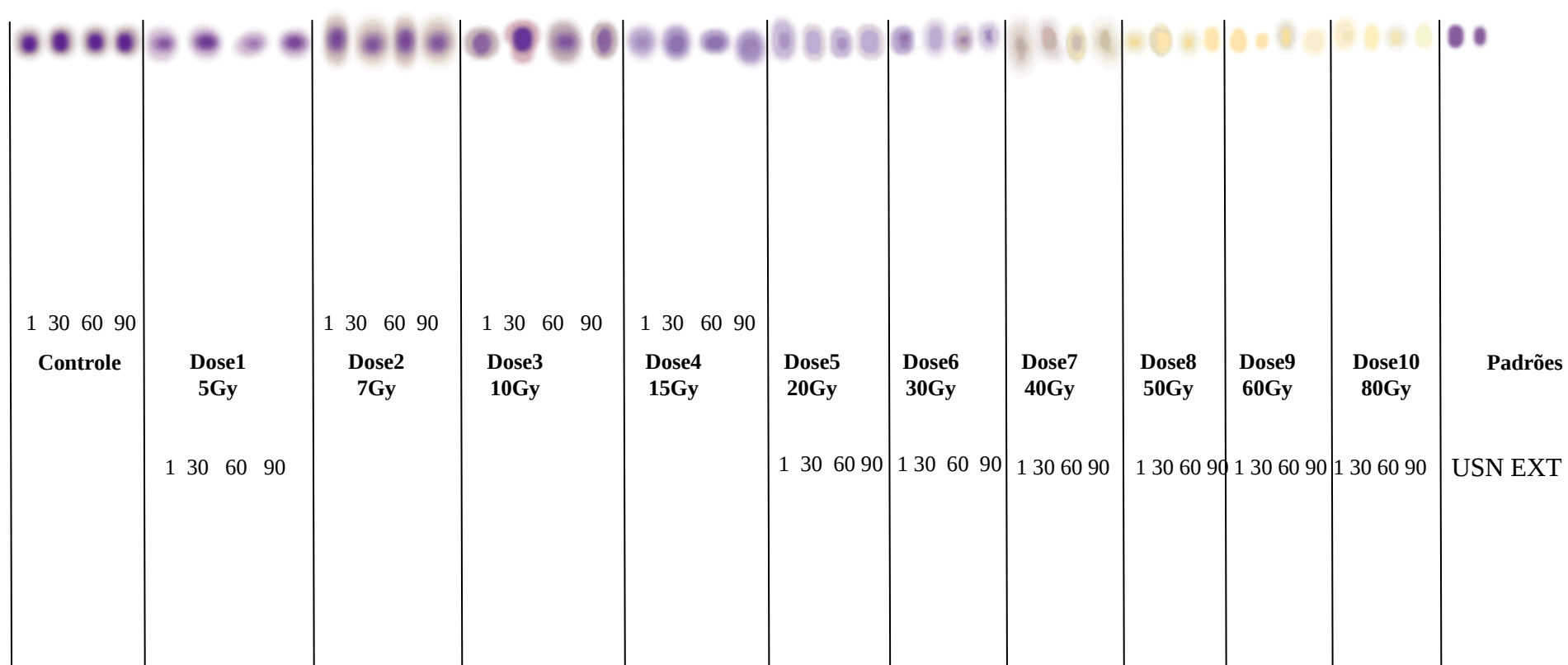


Figura 12-Cromatograma dos extratos orgânicos de talos *in natura* de *Cladonia substellata* Vainio, submetidos à irradiação gama (0, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 80Gy), depositado sobre calcário, por 1, 30, 60 e 90 dias. USN (ácido úsnico purificado). EXT (extrato orgânico de *Cladonia substellat* _controle natural).

Por isso, em análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi possível a quantificação do USN metabolizado por espécimes submetidas a diferentes doses de radiação gama.

Os padrões de USN, extraídos em laboratório e utilizados nas análises, foram avaliados por análise espectroscópica infravermelha. Os resultados obtidos foram comparados com os informados da literatura (EDWARDS et al. 2003), verificando-se grande semelhança nos espectros obtidos (dados não apresentados).

Nas análises realizadas (figura 13), observa-se o comportamento do extrato de *C. substellata*, processado no momento de sua coleta em ambiente natural (controle), e extrato de *C. substellata* acondicionado na placa de Petri, mas sem ter recebido radiação (controle, 0Gy) que permaneceu em contato durante três meses com as rochas calcárias, e os padrões de ácido úsnico purificado (USN) de *C. substellata* e de ácido úsnico Merck (USN Merck) Nas amostras controle (A) e controle 0Gy (B), o USN foi detectado em maior teor no extrato, ratificado pelos cromatogramas do USN purificado de *C. substellata* (C) e do padrão comercial de USN (D). Os dados estão em conformidade com Ahti et al. (1993) e Pereira et al. (1995) que estudaram a espécie, sendo os últimos com amostras da mesma procedência.

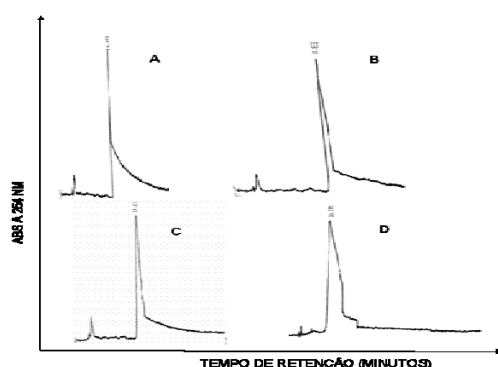


Figura 13 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, para: A - Extrato de *Cladonia substellata*; B - Extrato de *Cladonia substellata* não irradiada (0Gy); C - Ácido úsnico purificado e D - Ácido úsnico Merck.

A figura 14 mostra os resultados da análise por a CLAE dos extratos de amostras de *C. substellata* submetidas às doses de 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40; 50, 60 e 80Gy de radiação gama do ^{60}Co , com seus talos mantidos sobre rochas calcárias por um período de três meses. Observam-se, de forma geral, uma variação nas áreas dos picos correspondentes ao USN, bem como pequenas variações no seu tempo de retenção (TR) na coluna. Os teores de USN metabolizados pelas diferentes amostras de *C. substellata* variam em função da dose administrada como pode ser verificado na figura 15.

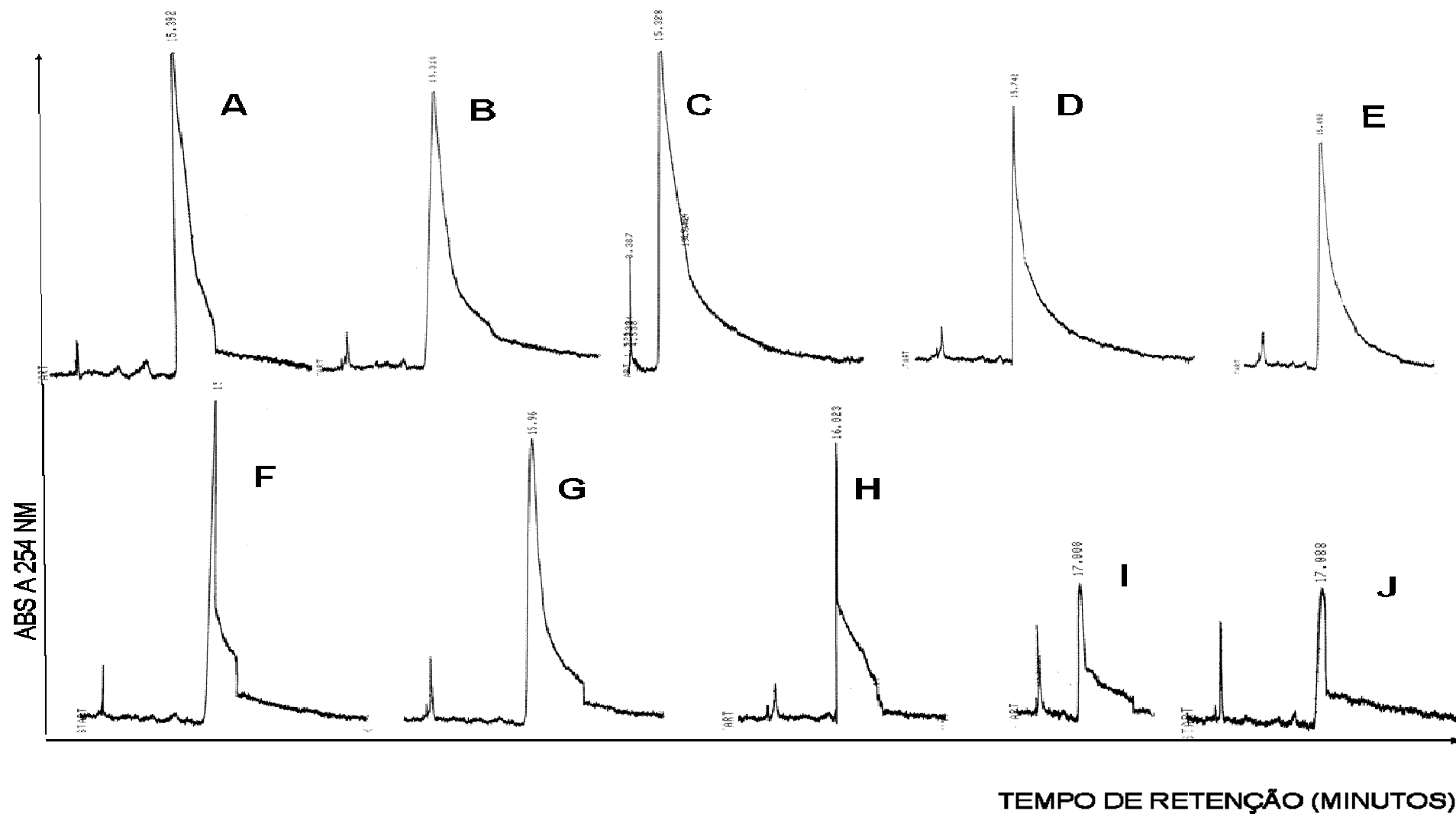


Figura 14 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos orgânicos de *Cladonia substellata* submetida a diferentes doses de radiação gama: A) 5Gy; B) 7Gy; C) 10Gy; D) 15Gy; E) 20Gy; F) 30Gy; G) 40Gy; H) 50Gy; I) 60Gy; J) 80Gy.

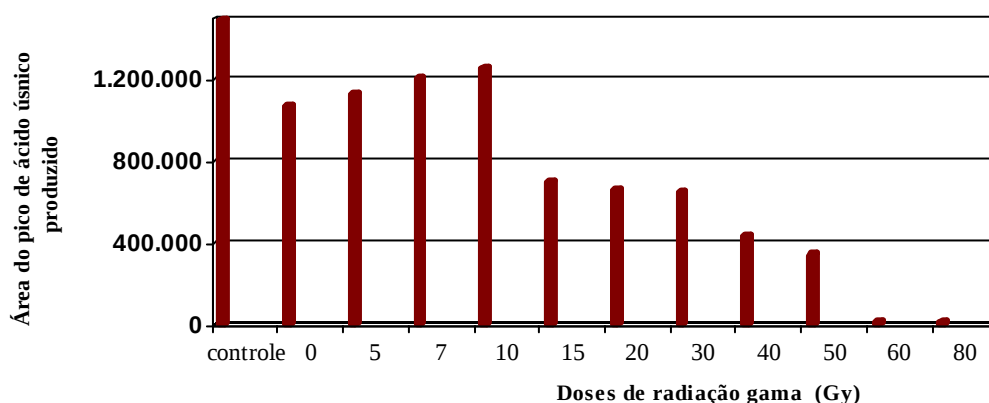


Figura 15- Área do pico de ácido úsnico (USN) produzido nos extratos orgânicos de *C. substellata* (mg de USN/ mg de extrato), submetida a diferentes doses de radiação gama do ^{60}Co .

Observa-se, nas doses iniciais (5 a 10Gy), um aumento na área do pico de USN produzido nas amostras analisadas, enquanto nas doses seguintes de 15 a 80Gy essa área tende a diminuir.

Pesquisas sobre a alteração estrutural no talo de líquens, causadas por poluentes, indicando sua diminuição, são relatadas por Silva (2002), que estudou o comportamento de *C. verticillaris*, submetida à ação de soluções de acetato de chumbo, em condições laboratoriais, observando a degradação das substâncias liquênicas, no interior do talo. O mesmo autor, analisando o efeito de poluentes atmosféricos, em áreas urbana e industrial, sobre a mesma espécie, observou que os líquens tiveram o seu funcionamento extremamente prejudicado, produzindo baixo teor da substância principal - o ácido fumarprotocetrárico (FUM), havendo, por outro lado, uma maior produção do ácido protocetrárico, ratificando a hipótese da biossíntese ser prejudicada pelos poluentes, seja pelo impedimento de parte da fotossíntese, ou por inibição de alguma das etapas metabólicas. Adicionalmente, Mota - Filho et al.¹ estudando o líquen *C. verticillaris*, submetido à ação de dióxido de chumbo, constatou prejuízos na síntese de FUM, e no acúmulo de produtos intermediários de sua biossíntese, ao longo do experimento.

¹ MOTA-FILHO, F. O.; LIMA, E. S.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; FIGUEIREDO, R. C. B. Lead dioxide (PbO_2) effects on physiology and ultra structure of *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. Experiment in laboratory. Submetido a **Química Nova**.

Por outro lado, quando submetidos à radiação gama, ou ultravioleta, os líquens tendem a produzir maior quantidade de seus fenóis, pois, por funcionarem como fotorreceptores e ou fotoindutores, protegem o interior do talo liquênico, preservando suas funções biológicas. (SEAWARD, 1977, NASH III, 1996)

Neste trabalho, a produção do USN por *C. substellata* parece ter obedecido a uma tendência, em função dos níveis de radiação. Ou seja, a medida que a dose aumentou, maiores teores de USN foram requeridos pelas células para garantir a preservação do talo. Porém, os dados também indicam a existência de um limite ou limiar de produção do USN, que ocorre em torno da dose de 10Gy, a partir da qual os teores tendem a diminuir.

A partir dos dados obtidos, duas hipóteses podem ser consideradas: a primeira, que as células alteram seu funcionamento em função da dose de radiação, produzindo maiores teores de ácido úsnico. No entanto, esta disfunção leva à biossíntese de substâncias com alguma modificação estrutural (a ser definida em estudos posteriores); segunda, é que o USN pode ser modificado estruturalmente após sua síntese. Para verificar tais argumentos, foram irradiados talos de *C. substellata*, bem como o USN dela extraído (em ambos os casos, nas doses de 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 80Gy de radiação gama). Este material, quando analisado por CLAE, não evidenciou picos com boa resolução. Dessa forma, não foi possível obter resultados conclusivos nesta etapa dos experimentos.

A etapa posterior do trabalho consistiu em avaliar se os líquens depositados sobre o calcário liberaram USN, com conseqüente formação de quelatos e transformação dos minerais constituintes da rocha.

As amostras rochosas, submetidas a ação da *C. substellata* irradiada sob diferentes doses de radiação gama, demonstraram a reação de quelação entre o USN e os íons da rocha, uma vez que, após revelação da CCD, as bandas antes evidenciadas desapareceram, permanecendo visíveis as que se supõe tratar-se de substâncias orgânicas. Dessa forma, pode-se afirmar que, no cromatograma das amostras rochosas, as bandas não ficaram visíveis após revelação por serem referentes a íons quelados da rocha. No entanto, experimentos realizados anteriormente, com talos de *Cladonia substellata* e diferentes rochas, demonstraram a presença de USN nas placas de CCD dos extratos rochosos, durante todo o experimento, após sua revelação, de acordo com Costa. (2003), Barbosa; Pereira (2004), e Barbosa (2005).

O difratograma por raios X, obtido da análise de amostras de calcário não submetidas à ação do líquen – amostra controle (figura 16 - A), foi comparado com os difratogramas obtidos para o calcário, pré-existent na memória operacional do equipamento. Assim, foi possível constatar a semelhança entre os mesmos. Entretanto, as amostras de calcário

submetidas a *C. substellata* irradiada nas doses de 10, 30 e 80Gy (figura 16 - B, C, D), evidenciaram modificações na altura de alguns picos, bem como o desaparecimento ou surgimento de novos outros, diferentes dos da amostra controle. Dessa maneira, foram constatadas modificações na composição mineralógica do calcário submetido ao contato com *C. substellata* irradiada.

As amostras de *C. substellata* irradiadas com 80Gy propiciaram pouca modificação do calcário, visto que seu difratograma foi semelhante ao do material controle. Já os líquens irradiados a 10 e 30Gy apresentaram diferenças. O calcário submetido a *C. substellata* irradiada com 10Gy apresentou oito picos diferentes dos da amostra controle, enquanto o material irradiado com 30Gy evidenciou quatro picos. Estes dados corroboram as informações obtidas por CCD e CLAE, que demonstram um aumento na produção do USN diretamente proporcional ao aumento da dose de radiação gama. No entanto, este aumento tem um limiar, referente à dose 10Gy, quando a produção de USN começa a decrescer, com teor bastante reduzido de USN aos 80Gy. Por isso, a ação quelante do talo de *C. substellata* foi correspondente à sua produção de USN, em função da radiação emitida.

As modificações mineralógicas observadas por difração de raios X podem ser comparadas com os estudos realizados por Ascaso (1985), que observou o contato entre *Parmelia conspersa* com seu substrato de granito, detectando a presença de cristais de caulinita, haloisita e sílica amorfa. Esse autor demonstrou, também, que o mineral mais frequentemente formado na interface do *Rhipocarpon geographicum* com o granito é a haloisita, enquanto as micas e feldspatos demonstram alterações para a geotita. E ainda, evidenciou que o líquen *Umbilicaria pustulata* não gera minerais, na natureza, como o faz em laboratório, tendo nesse caso produzido a montmorilonita.

Por outro lado, Figueiredo et al. (1993), em estudo sobre a ação do ácido oxálico em exsudados de várias espécies liquênicas, sobre a biotita, detectaram, por difração de raios X, a extração parcial do ferro do mineral sem induzir a oxidação, na qual picos diferentes da amostra controle foram encontrados. Também, Costa (2003) estudou o efeito do USN sobre o basalto, em diferentes condições, e verificou, por meio de difração de raios X, a ação quelante do ácido úsnico, logo nas primeiras 24h, sobretudo nos experimentos em que o material foi submetido ao aumento de temperatura.

Pode-se aceitar, então, que a análise por difração de raios X confirma que as amostras de *C. substellata* irradiadas com radiação gama de ^{60}Co interagem com rochas calcárias, em diferentes intensidades, quando comparadas com amostras não irradiadas.

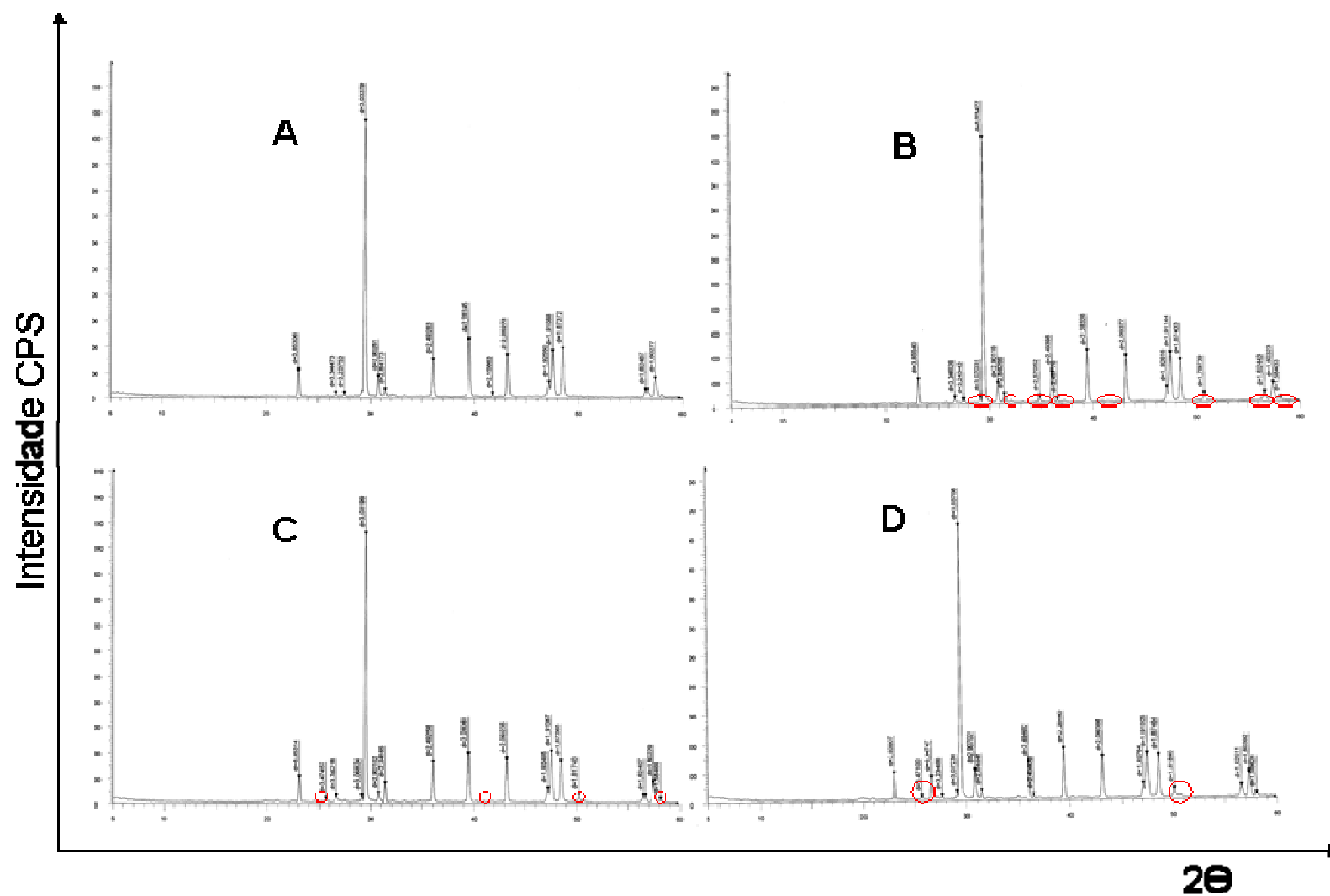


FIGURA 16: Difratomogramas por raios X de amostras de calcário mantidas em contato com talos de *Cladonia substellata* submetida à radiação gama. A: rocha natural - amostra controle, B: 10Gy; C: 30Gy e D: 80Gy. ○ : Picos adicionais aos detectados na amostra controle

6 CONCLUSÕES

O líquen *Cladonia substellata* Vainio, quando submetido à radiação gama em laboratório, produz ácido úsnico durante três meses de irradiação, mas a dose de radiação e o tempo de incubação influenciam o seu metabolismo e, a sua conseqüente biossíntese. A um aumento na produção de ácido úsnico (USN), como provável mecanismo de defesa contra a ação aumentada da radiação gama. No entanto, existe um limiar de tolerância para tal, a partir do qual um a um decréscimo na produção do USN em doses mais elevadas.

Face à biossíntese diferenciada do USN, em função da dose de radiação gama empregada nas amostras de *C. substellata*, o efeito quelante do calcário foi diretamente proporcional à quantidade deste ácido no talo liquênico.

É provável que, em ambiente natural, os líquens expostos à doses elevadas de radiação natural, ou de suas fontes emissoras, possam interferir no processo de pedogênese e ou de sucessão ecológica dos ecossistemas.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, S. F. **Recursos minerais do Brasil**. 2 ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Tecnologia, 1960.
- ANDRADE, M. M. C.; PEREIRA, E. C. Ação do ácido fumarprotocetrárico sobre amostras de granito da Região Metropolitana do Recife. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 6.; 2000, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2000. p. 64, vol. 1.
- AHMADJIAN, V.; JACOBS, J. B. Artificial restablishment of lichens. VI. Compararision between natural and synthetic thalli of *Usnea strigosa*. **Lichenologist**, v. 17, p. 149-166, 1981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00242829> > Acesso em 11/05/2004.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of lichen substances**. Tokio: Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. 240p.
- ASCASO, C. Structural aspects of lichens invading their substrata. In: VICENTE, C.; BROWN, D. H.; LEGAZ, M. E. **Surface Physiology of lichens**. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 1985. p. 87-113.
- AHTI, T. S.; XAVIER-FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, northeast Brasil. **Tropical Biology**, Costa Rica. v.7, p. 55-77, 1993.
- BARBOSA, H. M. S.; **Influência da temperatura nas propriedades quelantes do ácido úsnico de *Cladonia substellata* sobre migmático**. Recife: Monografia de Bacharelado em Geografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2005, 63p.
- BARBOSA, H. M. S.; PEREIRA, E. C. Influência da temperatura na ação quelante do ácido úsnico, e avaliação do comportamento do talo *in natura* de *Cladonia substellata* sobre riolito e ignimbrito da Região metropolitana do Recife In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 11.; 2004, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2004. CD-ROM.
- BARSTOW, J., Physio-ecological studies on gamma irradiated and nonirradiated *Cladonia sylvatica* (L.), p.37, Michhigan Technological University, Houghton, Mich, 1974
- BRADY, N. C., **Natureza e propriedades dos solos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1979. 647p

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

COSTA, D. L. C. R. **Ação do ácido úsnico sobre rochas da Região Metropolitana do Recife**. Recife: Monografia de Bacharelado em Geografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2000, 63p.

COSTA, D. L. C. R.; SILVA, A. M.; ANDRADE, M. M. C.; SILVA, N. H.; MOTA-FILHO, F. O.; PEREIRA, E. C. Ação do ácido úsnico sobre amostras de granito da RMR. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51. 2000, Brasília. **Resumos...**Brasília: UNB, 2000. p. 78.

COSTA, D. L. C. R. **Avaliação do processo de pedogênese do basalto a partir da ação do ácido úsnico sob condições ambientais da Região Metropolitana do Recife**. Recife: Dissertação de Mestrado em Geografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 2003. 125p.

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

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

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.

EDWARDS, H. G. M.; NEWTON, E. M.; WYNM-WILLIAMS, D. D. Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, rizorcarpic acid, calcin, pulvinic dilactone and usnic acid. **Journal of molecular structure**. p. 27-37, 2003. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/jphotobiol>> Acesso em: 21/09/2005

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

ERNST, W. G. **Minerais e Rochas**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1998.155 p.

FAVA, N.; TORRES, M. G.; LENHARO, S. L. R.; MARTINS, E. S.; BOAVENTURA, G. R.; GASPAR, J. C. Caracterização e quantificação de argilo – minerais por difractometria de raios X e termogravimetria. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIMENTO, 5., 1999, SÃO PAULO. **Anais...** São Paulo: ABCP,1999. p. 15p

FIGUEIREDO, M. O.; SILVA, T. P.; PRUDENCIO, M. L.; GOUVEIA, M. A.; WAERENBORGH, J. C.; PEREIRA, L. C. Biodegradação de granitos: comportamento da biotite face ao ácido oxálico dos exsudados liquênicos. In: CONGRESSO DE GEOQUÍMICA DOS PAÍSES DE LÍNGUA PORTUGUESA, 2; 1993, Porto. **Memórias....** Porto: Universidade do Porto, 1993

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. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/jphotobiol>> Acesso em: 21/11/2004

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

HUNECK, S.; YOSHIMUARA, I. **Identification of lichen substances**. Springer-Verlag, Berlim, Germany, 1996. 493p.

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

KELLER, C. **Radioquímica**. 2. ed. Recife: Editora Universitária , UFPE, 1981. 348p.

LEPSCH, I. F. **Formação e conservação dos solos**. São Paulo: Oficina de Textos, 2002. 178p.

LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Endogenous inactivators of arginase, 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.; XAVIER-FILHO, L. Pigment analysis of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. **Biochem. System. Ecol.**, v. 14, p. 575-58, 1986

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco reinos: um guia ilustrado dos filos da vida na terra**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 497 p.

MICHIGAN TECHNOLOGICAL UNIVERSITY, Effects of irradiation on lichens and lichen-forming fungi and algae, **USAEC REPORT COO-2085-2**, Michigan Technological University, 1970

MOTA-FILHO, F. O.; PEREIRA, E. C. G.; LIMA, E. S.; SILVA, A. M.; SILVA, N. H.; COSTA, D. L. R. Ação do Ácido Úsnico de *Cladonia substellata* Vaino (líquen) sobre Amostras de Granito da Região Metropolitana do Recife. In: CONGRESSO DE GEOQUÍMICA DOS PAÍSES DE LÍNGUA PORTUGUESA, 6; 2001, Lisboa :**Resumos...** Lisboa: 2001. p. 375-379.

MOTA-FILHO, F. O.; SILVA, N. H.; ANDRADE, L. H. C.; PEREIRA, E. C. G.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Análise de pigmentos de plantas e líquens no Recife como parâmetro de avaliação da poluição ambiental. **Revista de Geografia DCG/UFPE**, Recife, v. 20, n. 02, p. 43-61, 2003.

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

ODUM, E. P. **Ecologia**. 3. ed. México: Nueva Editora Interamericana, 1972. 639 p.

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.

PARAÍBA. Ecos da Paraíba. Guia virtual. **Mapa rodoviário da Paraíba**. Disponível em <<http://www.geocities.com/ecosdaparaiba/mapa1.html> >Acessado em 11/10/2004

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

PEREIRA, E. C.; NASCIMENTO, S. C., LIMA, R. M. C., SILVA, N. H.; OLIVEIRA, O. T. M.; BOITARD, M.; BERIEL, H., VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tokai J. of Exp. And Clin. Medicine**, v.19, p. 47 – 52, 1994 .

PEREIRA, E. C.; PEREYRA, M. T.; MATOS, S. C.; SILVA, N. H.; ANDRADE, L.; VICENTE, C. Bioproduction of usnic acid from acetate by kaolinite immobilized cells of *Cladonia substellata* Vainio. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae (Polônia)** v. 64 (2): p. 171-174, 1995.

PERNAMBUCO. CPRH - Companhia Pernambucana do Meio Ambiente. **Diagnóstico Sócio-ambiental do Litoral Norte**. Recife, 2001.

PERNAMBUCO. Secretaria de desenvolvimento urbano. **Mapa da Zona da Mata Pernambucana**. Disponível em <<http://municipioonline.com.br>> Acessado em 11/10/2004

PRASS, A. R. Física.net. Disponível em: <<http://www.fisicanet.terra.com.br/nuclear/radiacao-gama.pdf>> Acessado em 21/03/2004.

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

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

RACAN, F.; ROSAN, S.; BOEHM, K.; FERNANDEZ, E.; HIDALGO, M. E.; QUIHOT, W.; RUBIO, C.; BOEHM, F.; PIAZENA, H.; OLTMANNS, U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. 2002. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jphotobiol> Acesso em: 21/11/2004

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.; MEIJKAMO, B. B. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems - A experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. **Journal of Photochemistry and**

Photobiology. V. 6. p. 2-12. 2002. Disponível em:
<<http://www.elsevier.com/locate/jphotobiol>> Acesso em: 21/11/2004

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**. Concepción; v.47, n.1, 2002.

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

SILVA, A. M.; SILVA, H. P. B.; COSTA, D. L. C. R.; PEREIRA, E. C.; MOTA-FILHO, F. O.; SILVA, N. H.; LIMA, E. Rochas graníticas sob ação de substâncias liquênicas (atranorina) extraídas de *Cladina dendroides*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53., 2002, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2002. p. 103.

SILVA, H. P. B.; SILVA, A. M.; COSTA, D. L. C. R.; PEREIRA, E. C.; MOTA-FILHO, F. O.; SILVA, N. H.; LIMA, E.; MACIEL, L. N. Q. Análise comparativa do efeito do ácido úsnico sobre elementos do granito e ignimbrito. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 54., 2002, Goiânia. **Anais...** Goiânia : UFG, 2002. CD ROM.

SILVA, H. P. B.; PEREIRA, E. C. G. Influência da temperatura do ácido úsnico, e avaliação do comportamento do talo *in natura* de *Cladonia substellata* Vainio sobre granito e calcário da região metropolitana do Recife. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 10; 2003, Recife. **Anais...** Recife: UFPE, 2003. CD-ROOM

SILVA, H. P. B.; SILVA, A. M.; COSTA, D. L. C. R.; PEREIRA, E. C.; MOTA-FILHO, F. O.; SILVA, N. H.; LIMA, E.; MACIEL, L. N. Q.; BARBOSA, H. M. S. Estudo comparativo sobre a ação quelante do ácido úsnico sobre amostras de calcário e riolito da região metropolitana do Recife. In: CONGRESSO NORDESTINO DE BOTÂNICA, 22., 2004, Petrolina. **Anais...** Petrolina: UNEB, 2004. CD ROM.

SILVA, H. P. B. **Influência da temperatura na ação quelante do ácido úsnico, e avaliação do comportamento do talo *in natura* de *Cladonia substellata* sobre granito e calcário da Região Metropolitana do Recife-PE**. Monografia de Bacharelado em Geografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.. 2005. 54p

SMITH, A. L. **Lichens**. London: Cambridge University Press, 1921. 464p. Editores Seaward, M. R. D.; Tansley, A. G.

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

TEIXEIRA, W. **Decifrando a Terra**. 2. ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2000. 568 p.

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.