

SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DE *Ramalina aspera* ATRAVÉS DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR UTILIZANDO BIORREATOR COM MOVIMENTO CONSTANTE

BRUNA MARIA PEREIRA DA COSTA CORDEIRO¹

MÔNICA CRISTINA BARROSO MARTINS²

ALEXSANDRA NASCIMENTO DE CARVALHO³

MARIA DE LOURDES LACERDA BURIL⁴

EMERSON PETER DA SILVA FALCÃO⁵

EUGÊNIA CRISTINA PEREIRA⁶

NICÁCIO HENRIQUE DA SILVA⁷

Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória,
Vitória de Santo Antão, Pernambuco.
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

RESUMO

SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DE *Ramalina aspera* ATRAVÉS DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR UTILIZANDO BIORREATOR COM MOVIMENTO CONSTANTE

São inúmeras as descrições em literatura científica a respeito das propriedades biológicas e farmacológicas de metabólitos secundários produzidos por líquens e de seus carboidratos e glicosídeos, entretanto tais organismos apresentam um crescimento extremamente lento e rendimento baixo nas extrações por métodos usuais. Portanto, com o objetivo de avaliar a capacidade produtora de carboidratos e fenóis, células de *Ramalina aspera* (liquen) (6 g) foram imobilizadas em biorreatores com movimento constante, utilizando caulinita (30 g) como matriz de suporte e NaHCO₃ como fonte de energia nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 mM (30 mL). Os eluatos obtidos foram coletados após 24, 48, 72 h e, após este período a cada sete dias. As amostras extraídas com clorofórmio/metanol (2:1) foram analisadas por CCD, e demonstraram a presença da sacarose nas concentrações de 1,0 e 10 mM e

¹ Graduada em Ciências Biológicas.

² Doutoranda em Bioquímica e Fisiologia.

³ Graduada em Ciências Biológicas.

⁴ Doutoranda em Biologia Vegetal.

⁵ Centro acadêmico de Vitória, UFPE. E-mail: emerson_falco@yahoo.com.br.

⁶ Departamento de Ciências Geográficas, UFPE.

⁷ Departamento de Bioquímica, UFPE.

manose na concentração de 0,1 mM. Os açúcares e fenóis foram produzidos durante todo o período do experimento. A análise dos fenóis não revelou a presença dos principais compostos (ácidos divaricático e salazínico), porém substâncias intermediárias foram obtidas ao longo de todo experimento, apresentando um pico de produtividade a 408 h, na concentração de 1,0 mM do precursor. Os resultados obtidos demonstram que o líquen permaneceu ativo durante todo o experimento e foi capaz de produzir metabólitos secundários de natureza fenólica apesar de o precursor metabólico utilizado ser um precursor indicado para a produção de polióis e açúcares.

Termos para indexação: glicose, fenóis líquênicos, *Ramalina aspera*.

ABSTRACT

SUBSTANCES OBTAINED FROM *Ramalina aspera* BY CELL IMMOBILIZATION IN A BIOREACTOR WITH CONSTANT MOTION

There are several scientific descriptions about biologic and pharmacological properties attributed to the lichenical secondary metabolites. However such organisms has a slow growing and the concentration of this substances obtained throw usual extraction methodologies are very low. Therefore, in order to assess the ability of carbohydrates and phenols production, *Ramalina aspera* cells (6 g) were immobilized in bioreactors with constant motion, using kaolinite (30 g) as a support matrix and NaHCO₃ as an energy source in concentrations of 0.1, 1.0 and 10.0 mM (30 mL). The eluates obtained were collected after 24, 48, 72 h, after this period every seven days. The samples extracted with chloroform / methanol (2:1) were analyzed by TLC and showed the presence of sucrose at concentrations of 1.0 and 10 mM and mannose in 0.1 mM. The sugars were produced during the entire period of the experiment. The analysis of phenols did not reveal the presence of lead compounds (salazinic and divaricatic acids), but intermediates were obtained throughout the experiment, with a peak of productivity to 408 h in 1.0 mM concentration of the precursor.

Index terms: glucose, lichen phenolics, *Ramalina aspera*.

1. INTRODUÇÃO

Hawksworth & Honegger (1994) consideram os líquens como uma associação mutualística estável e ecologicamente obrigatória entre um micobionte (exhabitante fúngico, ascomicetos – 46%) e uma população de células de fotobiontes (inhabitante algas, clorofíceas e o/ou cianobacterias) unicelulares ou filamentosas de localização extracelular. No entanto, outros autores afirmam que o líquen é um fungo que cultiva

fotobiontes entre as hifas de seu micélio, ou seja, para estes autores a liquenização seria um tipo de parasitismo controlado por parte do fungo que mantém a alga a fim de obter o seu alimento (Marcelli & Seaward, 1998).

Nas condições da simbiose, as algas fornecem energia, através de estruturas chamadas haustórios que facilitam a transferência dos carboidratos para os fungos. As fontes de energia são provenientes da fotossíntese da alga na forma de polióis acíclicos, tais como: ribitol, sorbitol e eritritol, para respiração e crescimento do fungo, o que permite dar continuidade a sua via metabólica primária e secundária (Nash III, 2008). O metabolismo primário consiste na produção específica de um único carboidrato (intracelular) pela alga que rapidamente é transferido para o fungo. As substâncias obtidas através da via secundária são chamados ácidos liquênicos e estão na sua maioria localizados na porção extracelular do talo (MacFarlane & Kershaw, 1984).

Os polióis e glicosídeos encontrados nos líquens são carboidratos solúveis em água. O glicerol, eritritol, ribitol, arabinitol, D-volemitol, D-sifulitol são os polióis mais comuns e açúcares mais simples como glucose, sacarose, trealose e outros, que são produtos resultantes da atividade fotossintética da alga ocorrem também em vegetais superiores (Armstrong & Smith, 2009). Glucanas (liquenanas e isoliquenanas) e heteropolissacarídeos contendo manose estão presentes nos líquens em quantidades relativamente altas. O tipo de açúcar produzido depende da alga constituinte do líquen, como por exemplo, as do gênero *Trebouxia* que produzem ribitol, a *Hyalococcus* sintetizam sorbitol e as *Trentepohlia* o eritritol (Honda & Vilegas, 1999). A transferência do açúcar é tão característica na relação alga/fungo que o efluxo rápido e massivo deste produto cessa imediatamente após isolamento da alga do talo liquênico (MacFarlane & Kershaw, 1984). Pesquisas comprovaram que a parede celular do fotobionte é muito mais permeável para perda de carboidratos, quando em comparação com a da alga em estado de vida livre, ou seja, não liquenizada (Hale, 1983).

Os estudos com mono e polissacarídeos dos líquens têm sido desenvolvidos desde a década de 1960. Estas substâncias são de grande interesse, uma vez que os estudos indicam uma possível atividade antitumoral (Olafsdóttir & Ingólfssdóttir, 2001). Hirabayashi *et al.* (1989) relataram a atividade inibitória de um polissacarídeo sulfatado, GE-3-S, contra a replicação de HIV *in vitro*. A atividade do α -D glucana obtida de *Ramalina celastri* também foi capaz de inibir o crescimento do Sarcoma 180 (Assef *et al.*, 2002). A partir deste transporte de carboidratos da alga para o fungo,

substâncias liquênicas secundárias são depositadas sobre a hifa do micobionte (MacFarlane & Kershaw, 1984). Correspondem a cristais insolúveis em água, e são na sua maioria compostos fenólicos, para e meta depsídeos, depsidonas, terpenóides, esteróides entre outros, tais como ácido úsnico, barbático, estítisco, salazínico e divaricático (Honda & Vilegas, 1999).

Grande parte das pesquisas, entretanto, relatam diversas propriedades biológicas relacionadas a metabólitos secundários liquênicos de natureza fenólica. São descritas, atividade antifúngica e antibacteriana, sendo as gram-positivas mais sensíveis (Ribeiro *et al.*, 2006), antitumoral *in vivo* e *in vitro* (Triggiani *et al.*, 2009), antiviral, à exemplo do papilomavirus genital (Scirpa *et al.*, 1999), ação antipirética, analgésica (Muller, 2001) e anti-inflamatória (Vinjayakumar *et al.*, 2000), ação alelopática (Lawrey, 1977) e atividade inseticida (Silva *et al.*, 2009).

Neste sentido esta pesquisa teve como objetivo avaliar a capacidade das células de *Ramalina aspera* imobilizadas em biorreatores com movimento constante, em presença de caulinita, de produzir açúcares e fenóis a partir do fornecimento de bicarbonato de sódio como precursor metabólico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material liquênico

Amostras do líquen *Ramalina aspera* foram coletadas no município de Limoeiro, agreste do Estado de Pernambuco. O material foi depositado no Herbário da UFP, da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e identificado pelas características morfológicas e químicas do talo, pelo Prof. Dr. Marcelo Marcelli do Instituto de Botânica – São Paulo.

2.2. Imobilização celular

As células de *R. aspera* foram obtidas a partir de 6 g de talo liquênico previamente picotado. O material liquênico foi dividido em partes iguais de 2 g e a cada uma foram adicionados 30 g de caulinita previamente hidratada (água deionizada/2h). A mistura foi acondicionada em três biorreatores de vidro (30 cm x 7 cm de diâmetro). Cada biorreator recebeu uma concentração diferente de precursor bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 10 mM, 1,0 mM e 0,1 mM. O pH foi ajustado a 6,2 e as colunas mantidas sob luz branca ($125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Pereira *et al.*, 1995). Os biorreatores foram fixados

a uma roldana acoplada a um motor de modo a mantê-los em movimento rotatório, a uma velocidade constante durante todo o experimento (Lima, 2005).

2.3. Obtenção das frações com carboidratos e fenóis

Para obtenção dos carboidratos, foram coletadas alíquotas com 24 h, 48 h e 72 h. Após este período a coleta passou a ser aos 07, 14, 21, 28 dias e, até aos 133 dias com uma coleta de fração semanal, enquanto as células estiveram bioproduzindo. A cada coleta igual quantidade de precursor retirada (30 ml) e nas mesmas concentrações, foi reposta aos biorreatores, mantendo, desta forma, constante o volume e a concentração de precursor disponível para as células liquênicas.

2.4. Extração dos carboidratos e dos fenóis

Para a extração dos carboidratos, alíquotas obtidas a partir dos sistemas de imobilização, bem como o talo *in natura* foram submetidas extração com sistema de solvente clorofórmio/metanol (2:1, v/v), por 2 h a 60 °C. O extrato obtido foi refluxado em metanol a 80% durante 3 h a 60 °C e seus resíduos foram tratados com KOH a 100 °C por 2 h, para a obtenção dos açúcares. As amostras foram, então, liofilizadas e analisadas por cromatografia em camada delgada (Iacomini *et al.*, 1999).

Os fenóis foram isolados da fase aquosa através de extrações sucessivas éter/acetato de etila (65:35, v/v), seguida por clorofórmio/acetoneitrila (60:40, v/v) segundo Pereira *et al.* (1999). As frações orgânicas extraídas foram avaliadas individualmente por espectrofotometria a 254 nm e 366 nm e em seguida, reunidos de acordo com a concentração do precursor metabólico utilizada (0,1, 1,0 e 10,0 mM), então evaporados para uma posterior análise qualitativa em cromatografia em camada delgada.

2.5. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise cromatográfica dos açúcares e polióis dos eluatos e talo *in natura* de *R. aspera* foi realizada em placas de sílica gel H, onde foram aplicados 10µL dos extratos do talo *in natura* e eluatos nas diferentes concentrações de precursor e uluídos no sistema de solventes acetona/n-butanol/água deionizada (80:10: 10/v: v: v). As bandas foram reveladas com difenilamina (2% acetona), anilina (2 % em acetona), e

ácido ortofosfórico (85%) (5:5: 1,v/v/v) (Oliveira, 2007). Os carboidratos presentes nos eluatos e nos extratos foram identificados através da comparação dos Rf com os padrões do ácido galacturônico, sacarose, glicose, arabinose, frutose, manose, lactose e galactose.

As amostras contendo os fenóis foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel F₂₅₄₊₃₆₆, em conjunto com os padrões do ácido úsnico, ácido salazínico e uma amostra de extrato etéreo de *Canoparmelia texana*, espécie líquênica que possui como composto majoritário o ácido divaricático. As CCD foram desenvolvidas no sistema de solventes (tolueno/dioxano/ácido acético 90:25:4, v/v), segundo Culbertson (1972), e as bandas formadas foram visualizadas sob luz UV (ultra- violeta) e posteriormente reveladas, borrifando-se ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 10% sobre a placa e submetendo-as ao aquecimento a 60 °C / 10 min.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos carboidratos obtidos a partir do talo *in natura*, através da extração a frio e a quente revelou a presença da glicose no extrato a quente e sacarose no extrato a frio (Figura 1). Estes resultados são compatíveis com Melo (2007) que verificou a presença da manose e glicose em extratos aquosos de *Cladonia verticillaris* e *Cladonia salzmanii*, respectivamente.

A análise dos eluatos provenientes da imobilização com movimento constante mostrou a presença da sacarose nas amostras de eluatos nas concentrações de 1,0 e 10 mM e manose na concentração de 0,1 mM (Figura 2).

Diversos carboidratos são observados em líquens dentre os quais podem ser citados as glucanas, polissacarídeos mais freqüentes, sendo as liquenanas e isoliquenanas, obtidas com água fria e quente, respectivamente as mais comuns e, provavelmente produzidas pelo micobionte. Além desses são também referidos como ocorrentes em líquens as pustulanas, nigeranas, laminaranas e pululanas. Em adição, reporta-se a existência de amido e glicogênio nesses organismos. Heteropolissacarídeos, com ênfase aos que contém manose, são também reportados (Honda & Vilegas, 1999).

O líquen durante o experimento apresentou-se produtivo no período de imobilização celular. A análise em CCD mostrou, nos extratos aquosos a quente e a frio a presença de glicose, sacarose e possivelmente ácido galacturônico. Nos eluatos oriundos da imobilização celular do sistema em movimento observou-se que provavelmente, nas células de *R. aspera*, exista manose na concentração de 1,0 mM e

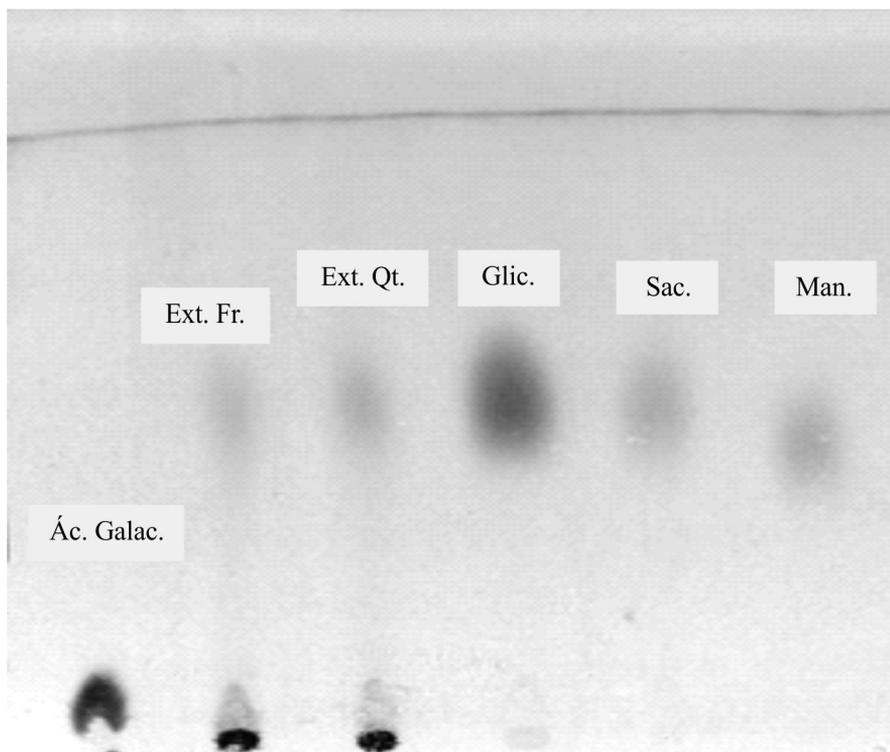


Figura 1. — Cromatoplaça, demonstrando a presença dos açúcares obtidos nas extrações a quente e a frio do talo *in natura* de *Ramalina aspera*. Ác. Galac.— Padrão do Ácido Galacturônico; Ext. Fr. — Extrato a frio; Ext. Qt. — Extrato a quente; Glic. — Padrão Glicose; Sac. — Padrão Sacarose; Man. — Padrão Manose.

glicose na concentração 10,0 mM. Tendo sua melhor produção na concentração de 10 mM. Não houve evidências de ácido galacturônico nestas amostras.

A análise cromatográfica dos fenóis contidos nos eluatos, Figura 3, não demonstrou a presença dos principais compostos característicos da espécie (ácidos divaricático e salazínico) e sim bandas de compostos não identificados, possivelmente intermediários metabólicos. Entretanto, observou-se nos eluatos nas concentrações de 10 mM bandas com Rf's muito semelhantes ao ácido divaricático, podendo tratar-se de molécula com pequenas diferenças estruturais ou mesmo funcionais do metabólito de interesse.

Observou-se ainda, que a produção destes compostos deu-se ao longo de todo o experimento, com pico de produtividade a 408 h após o início da imobilização celular (Figura 4), com destaque para concentração de 1,0 mM do precursor metabólico que apresenta maior produção ao longo da maior parte do experimento.

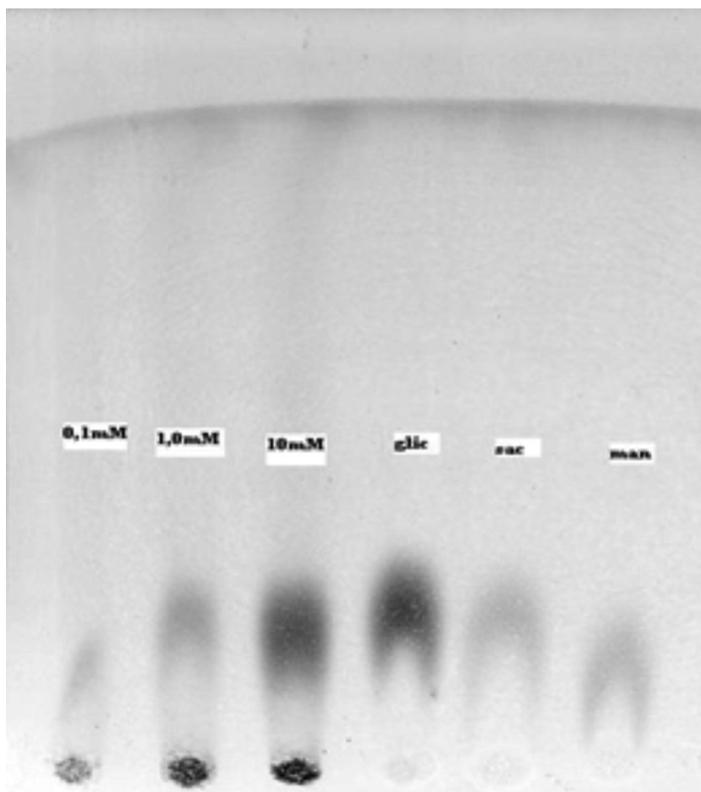


Figura 2. — Cromatoplaça, demonstrando a presença dos açúcares obtidos dos eluatos de células imobilizadas em biorreator com movimento de *Ramalina aspera*. 0,1 mM; 1,0 e 10 mM— amostras obtidas em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio; Glic. — Padrão glicose; Sac. — Padrão Sacarose; Man. — Padrão Manose.

Os resultados apresentados então demonstram que apesar de ser utilizado precursor relatado em outros estudos para a produção de carboidratos e polióis, o líquen foi capaz de bioproduzir metabólitos secundários de natureza fenólica.

Observa-se ainda, que o padrão de produção foi semelhante, em termos qualitativos, àqueles observados por Fontaniella *et al.* (2000), tal fato demonstra que possivelmente não apenas a disponibilidade de precursor induz a síntese em determinada via metabólica líquênica, mas que outros fatores devem interferir neste processo, como a temperatura e fluxo luminoso, não avaliados neste estudo.

As células imobilizadas se mantiveram produtivas durante todo o período do experimento, sendo a concentração de 1,0 mM a que se mostrou mais adequada para produção das substâncias secundárias. Os extratos aquosos obtidos da imobilização revelaram a presença de glicose, sacarose e possivelmente o ácido galacturônico.

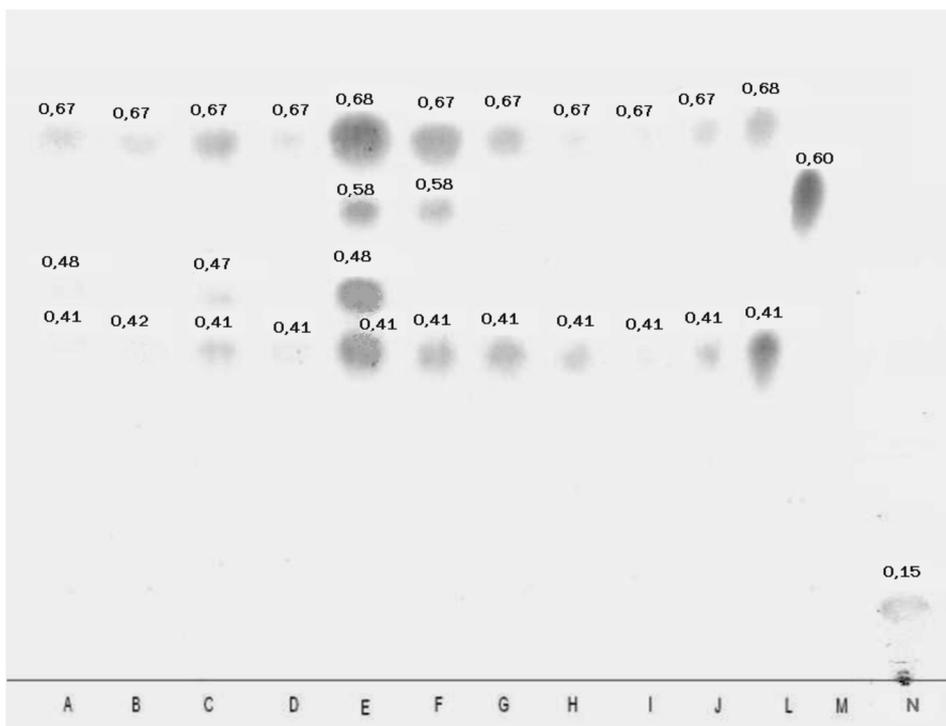


Figura 3. — Cromatograma em camada delgada das duas primeiras coletas de *R. aspera* imobilizadas em sistema fixo com caulinita. A – 1ª coleta, precursor 0,1mM, sistema 1; B – 1ª coleta, precursor 0,1mM, sistema 2; C – 1ª coleta, precursor 1,0mM, sistema 1; D – 1ª coleta, precursor 1,0mM, sistema 2 E – 1ª coleta, precursor 10,0mM, sistema 1; F – 1ª coleta, precursor 10,0mM, sistema 2; G – 2ª coleta, precursor 0,1mM, sistema 1; H – 2ª coleta, precursor 0,1mM, sistema 2; I – 2ª coleta, precursor 1,0mM, sistema 1; J – 2ª coleta, precursor 1,0mM, sistema 2; L – 2ª coleta, precursor 10,0mM, sistema 1; M – Padrão do Ácido divaricático; N – Padrão do ácido salazínico.

Estudos posteriores com diferentes concentrações e novas técnicas de imobilização poderão favorecer a produção tanto dos açúcares, quanto dos fenóis liquênicos de interesse científico, produzidos em biorreatores.

4. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo a Ciência do Estado de Pernambuco – FACEPE pela concessão de bolsa de iniciação científica.

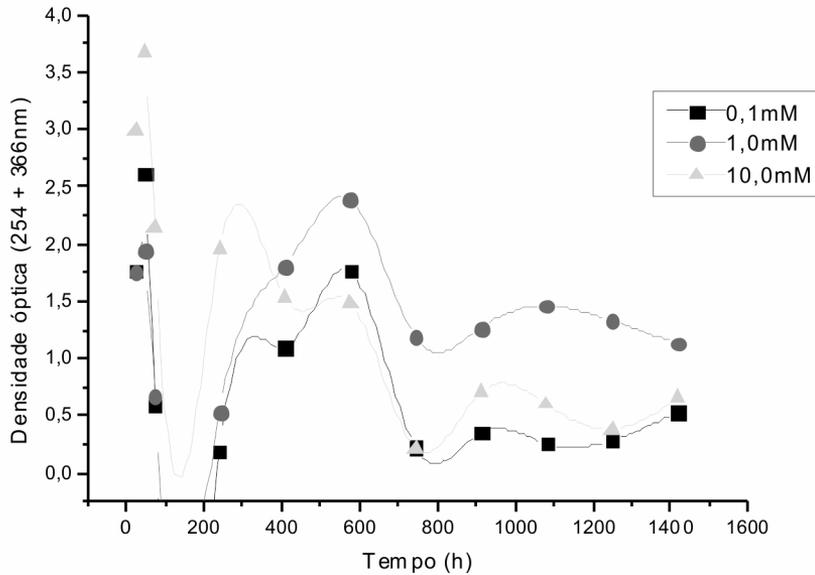


Figura 4. — Produção fenólica de *R. aspera* em diferentes concentrações de NaHCO_3 .

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, R.A. & SMITH, S.N. Carbohydrates in the hypothallus and areolae of the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. *Symbiosis* 49:95–100. 2009.

ASSEF, M.I.M., CARNEIRO-LEÃO, A.M., MORETÃO, M.P., AZAMBUJA, A.P., IACOMINI, I. & BUCHI, D.F. Histological and immunohistochemical evaluation of sarcoma 180 in mice after treatment with an α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri*. *Brazilian Journal Morphological Science* 19:49–54. 2002.

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

HAWKSWORTH, D.L. & HONEGGER, R. The lichen thallus: a symbiotic phenotype of nutritionally specialized fungi and its response to gal products. Clarendon Press. 1994. pp. 77–98.

HYRABAYASHI, K., IWATA, S., ITO, M., SSHIGUETA, S., NARUI, T., MORI, T. & SHIBATA, S. Inhibitory effect of a lichen polysaccharide sulfate, GE-3-S, on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 37. 2410. 1989.

HONDA, N.K. & VILEGAS, W.A. Química dos Líquens. Química Nova 21:110–125. 1999.

IACOMINI, M., REIS, R.A. & SASSAKI, G.L. Polissacarídeos de fungos liquenizados. In: Xavier-Filho *et al.* Biologia de líquens. Rio de Janeiro. Âmbito Cultural edições Ltda. 2006. pp.319–338.

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

LIMA, M.J.G. Produção do ácido úsnico de *Cladonia substellata* Vainio (líquen) por imobilização celular, utilizando diferentes métodos. (Dissertação de mestrado). Recife. Universidade Federal de Pernambuco. 2005.

MARCELLI, M.P. & SEAWARD, M.R.D. Lichenology Latin American: history, current knowledge and applications. São Paulo. CETESB. 1998. pp.25–45.

MACFARLANE, J.D. & KERSHAW, K.A. Some aspects of carbohydrate metabolism in lichens. In: Brown, D.H. (Ed.). Lichen Physiology and Cell Biology. New York. Plenum Press. 1984. pp.1–8.

MELO, P. Produção de metabolitos de *Cladonia verticillaris* (líquen) a partir de imobilização celular com manutenção da integridade do talo e análise das frações aquosas. Relatório de Iniciação Científica, PIBIC/FACEPE/UFPE. 2007.

MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:9–16. 2001.

NASH III, T.H. Lichen Biology. Cambridge. Cambridge University Press. 2008.

OLAFSDÓTTIR, E.S. & INGÓLFSÐÓTTIR, K. Polysaccharides from Lichens: Structural Characteristics and Biological Activity. Planta Medica 67:199–208. 2001.

OLIVEIRA, E.M. Estudos de carboidratos presentes nos cladódios de *Opuntia ficus-indica* (palma forrageira), de acordo com a idade e sazonalidade. (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade Federal de Pernambuco. 2007.

PEREIRA, E.C., MOLINA, M.C., PEDROSA, M.M., SOLAS, M.T., VICENTE, C. & LEGAZ, M.E. Production of ribitol by alginate – immobilized cells of the lichen *Cladonia verticillaris*. Annales de Química (Espanha) 91:253–259. 1995.

RIBEIRO, S.M. *et al.* Produção de metabolitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio. Acta Bot. Bras. 20(2):265–272. 2006.

SCIRPA, P. *et al.* A zinc sulphate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesion by human papillomavirus. Minerva Ginecol. 51:255–260. 1999.

SILVA, M.D.C. *et al.* Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: insecticidal activity on *Nasutitermes coniger* (Isoptera: Termitidae). *Inter. biodeterioration & Biodegradation* 63:334–340. 2009.

TRIGGIANI, D. *et al.* Antiproliferative activity of lichen extratcts on murine myeloma cells. *Biologia* 64(1):59–62. 2009.

VIJAYAKUMAR, C.S. *et al.* Anti-inflammatory activity of (+)- usnic acid. *Fitoterapia* 71:564–566. 2000.