

ANDREA CAROLINE RUTHES

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EM MICROALGAS
VERDES ISOLADAS DE FUNGOS LIQUENIZADOS**

Monografia de conclusão do curso de Ciências Biológicas, realizada durante o período de setembro de 2003 a fevereiro de 2004, no Departamento de Bioquímica e Biologia molecular da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

**CURITIBA
2004**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Marcello Iacomini, pela confiança, por seus ensinamentos, lições, orientação e amizade.

Ao colaborador de todo o desenvolvimento deste trabalho, Rodrigo Arantes Reis, pelos ensinamentos, experiências, idéias e amizade.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por me conceder espaço para o desenvolvimento deste trabalho, ao CNPq pelo apoio financeiro durante minha iniciação científica.

Aos Departamentos de Zoologia e Biologia Celular pela disponibilidade de seus equipamentos.

Ao Professor Dr. Guilherme L. Sasaki, pelas idéias e sugestões.

À Professora Dra. Carmen, e ao Lauro, pelas amostras analisadas.

À Ana Helena, Caroline, Fernanda, Elaine e Ricardo, pela amizade, conselhos e sugestões.

Aos colegas de laboratório por toda a amizade, companheirismo e intercâmbio de idéias.

Aos meus pais e meu irmão por estarem sempre presentes na minha vida, pelo apoio e incentivo, e pela compreensão da minha ausência.

Ao meu namorado Anderson, por estar sempre presente nos bons e maus momentos, pela amizade, paciência, dedicação, apoio e amor; pela compreensão dos momentos ausentes.

Às algas por se desenvolverem, permitindo a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho; e a Deus por permitir sua realização, por me dar força e confiança durante todos os momentos da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CULTIVO DOS BIONTES DE FUNGOS LIQUENIZADOS	1
1.2 FOTOBIONTES DE LÍQUENS	3
1.3 CULTIVO DOS FOTOBIONTES	4
1.4 <i>Trebouxia</i>	5
1.5 <i>Ramalina celastri</i>	6
1.6 POLISSACARÍDEOS PRESENTES EM MICROALGAS VERDES	8
1.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS	9
1.8 FIXAÇÃO DE CARBONO	10
1.9 CÁLCIO	16
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 ISOLAMENTO DO FOTOBIONTE	21
4.2 MANUTENÇÃO E CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS	21
4.3 MEIO DE CULTURA	22
4.3.1 BBM – Bold's Basal Medium	22
4.3.2 Meio TM – Meio para <i>Trebouxia</i>	23
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	23
4.4.1 Cultivo Bicarbonato (HCO_3^-)	23
4.4.2 Cultivo Cálcio (Ca^{2+})	24
4.4.3 Cultivo Bicarbonato e Cálcio	24

4.4.4 Cultivo porcentagem CO ₂	25
4.5 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Cultivo Bicarbonato (HCO ₃ ⁻)	27
5.1.2 Cultivo Cálcio (Ca ²⁺)	32
5.1.3 Cultivo Bicarbonato e Cálcio	34
5.1.4 Cultivo Porcentagem CO ₂	35
5.2 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL	37
5.4 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	39
5.4.1 Controles	39
5.4.2 Cultivo Bicarbonato (HCO ₃ ⁻)	43
5.4.3 Cultivo Cálcio (Ca ²⁺)	50
5.4.4 Cultivo Bicarbonato (HCO ₃ ⁻) e Cálcio (Ca ²⁺)	55
5.4.5 Cultivo Porcentagem CO ₂	65
6 CONCLUSÃO	70
Referências Bibliográficas	72

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

GRÁFICO 1. Concentração Bicarbonato	28
GRÁFICO 2. Concentração Bicarbonato	30
GRÁFICO 3. Concentração Bicarbonato	31
GRÁFICO 4. Concentração Cálcio	33
GRÁFICO 6. Concentração Bicarbonato e Cálcio	35
GRÁFICO 7. Concentração CO ₂	36
GRÁFICO 8. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N, Aberto	40
GRÁFICO 9. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N, Fechado	41
GRÁFICO 10. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N, Fechado com CO ₂	41
GRÁFICO 11. Histograma do Tratamento Controle - Tamanho X Número de Células	43
GRÁFICO 12. Histograma do Tratamento Controle - Granulometria X Número de Células	43
GRÁFICO 13. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 3,36mg/ml HCO ₃ ⁻ , Aberto	44
GRÁFICO 14. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 3,36mg/ml HCO ₃ ⁻ , Fechado	45
GRÁFICO 15. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 3,36mg/ml HCO ₃ ⁻ , e CO ₂ , Fechado	45
GRÁFICO 16. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 6,72 mg/ml HCO ₃ ⁻ , Aberto	47
GRÁFICO 17. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 6,72 mg/ml HCO ₃ ⁻ , Fechado	48
GRÁFICO 18. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 6,72 mg/ml HCO ₃ ⁻ , e CO ₂ , Fechado	48
GRÁFICO 19. Histograma do Tratamento Bicarbonato - Tamanho X Número de Células	49

GRÁFICO 20. Histograma do Tratamento Bicarbonato - Granulometria X Número de Células	49
GRÁFICO 21. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , Aberto	51
GRÁFICO 22. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , Fechado	51
GRÁFICO 23. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , e CO_2 , Fechado	51
GRÁFICO 24. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , Aberto	53
GRÁFICO 25. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , Fechado	53
GRÁFICO 26. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , e CO_2 , Fechado	53
GRÁFICO 27. Histograma do Tratamento Cálcio - Tamanho X Número de Células.	55
GRÁFICO 28. Histograma do Tratamento Cálcio - Granulometria X Número de Células	55
GRÁFICO 29. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 3,36mg/ml HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , Aberto	56
GRÁFICO 30. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 3,36mg/ml HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , Fechado	57
GRÁFICO 31. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 3,36mg/ml HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , e CO_2 , Fechado	57
GRÁFICO 32. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 3,36mg/ml HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , Aberto	58
GRÁFICO 33. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 3,36mg/ml HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , Fechado	59

GRÁFICO 34. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 3,36mg/ml HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , e CO_2 , Fechado	59
GRÁFICO 35. Histograma do Tratamento Bicarbonato + Cálcio - Tamanho X Número de Células	60
GRÁFICO 36. Histograma do Tratamento Bicarbonato + Cálcio - Granulometria X Número de Células	60
GRÁFICO 37. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 6,72mg/ml HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , Aberto	61
GRÁFICO 38. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 6,72mg/ml HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , Fechado	61
GRÁFICO 39. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 6,72mg/ml HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , e CO_2 , Fechado	61
GRÁFICO 40. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 6,72mg/ml HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , Aberto	63
GRÁFICO 41. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 6,72mg/ml HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , Fechado	63
GRÁFICO 42. Gráfico de Plotagem, Tamanho por Granulometria – Cultivo meio BBM 3N com adição de 6,72mg/ml HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , e CO_2 , Fechado	63
GRÁFICO 43. Histograma do Tratamento Bicarbonato + Cálcio - Tamanho X Número de Células	64
GRÁFICO 44. Histograma do Tratamento Bicarbonato + Cálcio – Granulometria X Número de Células	64
TABELA 1. Combinações Bicarbonato e Cálcio	25
TABELA 2. Composição Monossacarídica dos Tratamentos	37

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, fechado 42
- FIGURA 2.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, fechado, com adição de 10% de CO₂ 42
- FIGURA 3.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, na concentração 3,36mg/ml HCO₃⁻, fechado 46
- FIGURA 4.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, na concentração 3,36mg/ml HCO₃⁻, com adição de CO₂, fechado 46
- FIGURA 5.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, na concentração 6,72mg/ml HCO₃⁻, fechado 49
- FIGURA 6.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, na concentração 6,72mg/ml HCO₃⁻, com adição de 10% de CO₂, fechado 49
- FIGURA 7.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, na concentração 1x10⁻²g/ml Ca²⁺, fechado 52
- FIGURA 8.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado

em meio BBM 3N, na concentração $1 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, com adição de 10% de CO_2 , fechado	52
FIGURA 9. Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado <i>Ramalina celastri</i> , cultivado em meio BBM 3N, na concentração $2,5 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, fechado	54
FIGURA 10. Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado <i>Ramalina celastri</i> , cultivado em meio BBM 3N, na concentração $2,5 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, com adição de 10% de CO_2 , fechado	54
FIGURA 11. Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado <i>Ramalina celastri</i> , cultivado em meio BBM 3N, combinando as concentrações 3,36mg/ml de HCO_3^- e $1 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, fechado	57
FIGURA 12. Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado <i>Ramalina celastri</i> , cultivado em meio BBM 3N, combinando as concentrações 3,36mg/ml de HCO_3^- e $1 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, com adição de 10% de CO_2 , fechado	57
FIGURA 13. Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado <i>Ramalina celastri</i> , cultivado em meio BBM 3N, combinando as concentrações 3,36mg/ml de HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, fechado	59
FIGURA 14. Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado <i>Ramalina celastri</i> , cultivado em meio BBM 3N, combinando as concentrações 3,36mg/ml de HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, com adição de 10% de CO_2 , fechado	59

- FIGURA 15.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, combinando as concentrações 6,72mg/ml de HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , fechado 62
- FIGURA 16.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, combinando as concentrações 6,72mg/ml de HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , com adição de 10% de CO_2 , fechado .. 62
- FIGURA 17.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, combinando as concentrações 6,72mg/ml de HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , fechado 64
- FIGURA 18.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, combinando as concentrações 6,72mg/ml de HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , com adição de 10% de CO_2 , fechado 64
- FIGURA 19.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, com adição de 20% de CO_2 67
- FIGURA 20.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, com adição de 30% de CO_2 67
- FIGURA 21.** Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, com adição de 40% de CO_2 68

FIGURA 22. Imagem de microscopia óptica, utilizando aumento de 400X, das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, cultivado em meio BBM 3N, com adição de 50% de CO₂ 68

RESUMO

O fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, na tentativa de otimizar a produção de polissacarídeos, foi submetido a tratamentos onde foram variadas as concentrações de HCO_3^- e CO_2 , como fontes alternativas de carbono. Dirigindo o estudo para a fixação de carbono, além de observar as respostas das células do fotobionte com relação ao aumento atmosférico dos níveis de CO_2 (efeito estufa). Foram também variadas concentrações de cálcio adicionadas ao meio, tomando como base evidências de que o cálcio sinaliza para a síntese de polissacarídeos no aparato de Golgi. Na tentativa de verificar uma possível relação entre sua concentração e o aumento da biossíntese de polissacarídeos que não o amido e a celulose. Após um período de 14 dias de cultivo, as células do fotobionte foram centrifugadas, lavadas e liofilizadas, resultando em uma biomassa. A qual foi determinada e comparada entre todos os tratamentos, objetivando a obtenção de um maior desenvolvimento de biomassa. Dos tratamentos que apresentaram maior biomassa foram feitas combinações, e analisados da mesma maneira. Além da biomassa foram analisados os efeitos provocados pelas variações das concentrações de CO_2 , HCO_3^- e Ca^{2+} , sobre a composição monossacarídica, através de hidrólise ácida total, redução e acetilação de 5mg de biomassa de células, e análise em GC e GC-MS. Além dos aspectos morfológicos, tais como tamanho e granulometria das células do fotobionte, analisando dados de citometria de fluxo comparados com imagens de microscopia óptica. Observou-se que quando aumentada à concentração de HCO_3^- há um aumento da composição de glucose das células, além de um aumento do tamanho e granulometria das mesmas. Aumentada à concentração de Ca^{2+} observa-se uma redução da glucose e aumento de manose, além da redução do tamanho e da granulometria das células, indicando uma possível relação da presença de cálcio com a biossíntese de polissacarídeos que não o amido e a celulose. Os resultados mais expressivos foram obtidos quando adicionado CO_2 ao cultivo, favorecendo o desenvolvimento de biomassa do fotobionte em questão.

1 INTRODUÇÃO

Fungos liquenizados são uma associação simbiótica de crescimento lento, formado por um micobionte (fungo) e um organismo fotossintetizante (fotobionte), o qual pode ser uma alga verde (ficobionte) e, ou uma cianobactéria (cianobionte) (NASH, 1996; AHMADJIAN, 1993). A referida liquenização corresponde à aquisição de carbono fixado de uma população por minuto, por simbiontes fotossintetizantes, caracterizando uma forma comum e amplamente distribuída de nutrição em fungos.

A associação simbiótica resulta em um talo estável de estrutura específica (AHMADJIAN, 1993), que consiste de córtex e medula, sendo formados por tecidos do fungo e uma camada do fotobionte, arranjada de maneira que favorece a obtenção de quantidade ótima de luz para a fotossíntese. A forma como as diferentes camadas se arranjam no talo é resultado de pressões adaptativas sofridas ao longo da evolução (AHMADJIAN, 1993). Devido à associação alga-fungo, estes organismos fotossintéticos são capazes de crescer em locais que são impróprios ou limitados para a maioria dos outros organismos (THE SPECIAL BIOLOGY OF LICHENS). Como adaptação a ambientes inóspitos, os fungos liquenizados produzem mais de 500 compostos químicos, como por exemplo, proteínas, metabólitos secundários e polissacarídeos, estes com características únicas, podendo apresentar atividade farmacológica.

1.1 CULTIVO DOS BIONTES DE FUNGOS LIQUENIZADOS

O cultivo de fungos liquenizados tem ganhado notoriedade pela dificuldade de isolamento e crescimento em culturas puras de seus componentes. As lentas taxas de crescimento têm se apresentado como maior obstáculo da fisiologia dos estados axênicos (STOCKER-WÖRGÖTTER, 1995), o que para AHMADJIAN (1967)

caracteriza tais organismos como apresentando grande dificuldade de trabalho experimental. Quando comparado com fungos de vida livre, a taxa de crescimento do micobionte é extremamente lenta, além deste apresentar uma complexa necessidade nutricional.

Os estudos de isolamento de biontes de fungos liquenizados são em sua maioria direcionados para a investigação de ressíntese e desenvolvimento do talo em condições de laboratório, além do estudo de culturas do fotobionte e micobionte isolados, os quais podem apresentar compostos específicos, de grande similaridade química com aqueles obtidos do líquen intacto (CRITTENDEN *et al.*, 1995).

O interesse em fungos, fungos liquenizados e outros organismos que se apresentem como fontes de novas moléculas farmacologicamente ativas, têm aumentado nos últimos anos (PORTER e Fox, 1993). Muitos fungos liquenizados apresentam grande número de compostos secundários, muitos dos quais são exclusivos, não sendo encontrados em nenhum outro grupo de organismos. Grande número destes compostos apresenta atividade antimicrobiana ou outra atividade biológica de potencial valor econômico. A toxicidade destes compostos sugere uma função relacionada com defesa química contra patógenos e animais que possam utilizar fungos liquenizados como potencial fonte de alimento (ELIX *et al.*, 1984).

Em cultura, grande parte dos micobiontes tem a capacidade de biossintetizar compostos secundários encontrados no estado liquenizado nativo (CRITTENDEN *et al.* 1995). No entanto, a abundância de metabólitos encontrados pode ser diferente entre os estados nativo e de cultura, podendo, dependendo do material, ser mais abundante no estado liquenizado ou em cultura.

1.2 FOTOBIONTES DE LÍQUENS

Cerca de 26 gêneros de algas são capazes de formar associações liquênicas, as algas verdes unicelulares são responsáveis por 61%, sendo que o gênero *Trebouxia* é o mais comum dentre todos os gêneros de fotobiontes que apresentam a capacidade de fazer esta associação. *Trentepohlia*, uma clorófita filamentosa está presente em 31% das espécies de fungos liquenizados e 8% apresentam como componente fotobionte uma alga azul (cianobactéria), sendo que as mais comuns encontradas são espécies do gênero *Nostoc* (AHMADJIAN, 1993).

Com base em culturas puras de algas isoladas de talos liquênicos, vários têm sido os trabalhos realizados, principalmente quando se refere à fixação de CO₂ do meio (GOLDSMITH *et al.*, 1997) e a translocação de carboidratos originados de fotossíntese para o fungo, onde são então complexados a polissacarídeos (AHMADJIAN, 1993).

Um padrão de distribuição de micobiontes pode ser gerado, se estes dependerem de tipos particulares de fotobiontes, os quais obedecem alguns requisitos ecológicos. Por exemplo, habitats com umidade média permanente são preferencialmente ocupados por fungos liquenizados com fotobiontes Trentepholiídes. A água na forma líquida é essencial para fungos liquenizados com cianobactérias. Já aqueles com algas verdes do gênero *Coccale* são encontrados em grande número de habitats, com condição de umidade variável, sendo classificados na classe Trebouxiophyceae.

Os fotobiontes em Trebouxiophyceae são os mais importantes na simbiose, ocorrendo em aproximadamente 60% dos fungos liquenizados existentes. Um estudo de TSCHERMAK-WOESS (1988) compilou todo o conhecimento sobre associações de fotobiontes com seus respectivos fungos liquenizados hospedeiros ao observar o relacionamento dos micobiontes e seus respectivos fotobiontes.

RAMBOLD *et al.* (1998), encontraram padrões de associação altamente seletivos, e analisando uma série de fatores, entre eles dados de biologia molecular (rDNA), propuseram a separação do gênero *Trebouxia* em *Asterochloris* e *Trebouxia*. Cladoniaceae, por exemplo, apresenta-se principalmente associada com Trebouxíóides do gênero *Asterochloris*, enquanto *Trebouxia* é comumente mais encontrado nos demais Lecanorales.

PIERCEY-NORMORE e DEPRIEST (2001), estudando seqüências ITS (internal transcribe spacer) de diversos fotobiontes encontraram que vários genótipos de *Asterochloris* estão distribuídos de maneira semelhante em várias taxa de Cladoniaceae, o que rejeita a hipótese de que haveria uma co-especiação dos simbiontes, mas por outro lado não exclui a possibilidade de que esta relação possa apresentar um nível mais detalhado.

1.3 CULTIVO DOS FOTOBIONTES

Grande número de técnicas de isolamento foram desenvolvidas devido aos vários tipos de experimentos envolvendo algas de fungos liquenizados e suas necessidades. Entre estas, utilizam-se a centrifugação, a gel filtração, a micropipetagem e a fragmentação de talo (BUBRICK, 1988), as quais também têm sido utilizadas para o micobionte.

A técnica de centrifugação diferencial (BUBRICK, 1988) consiste de sucessivas centrifugações, com a finalidade de se obter um precipitado de algas livre de fragmentos de talo, com rendimento médio de 60% e taxa de recuperação das células variando entre 20 e 70%.

Gel filtração em coluna de Sepharose, utilizando como solvente de eluição das células a água destilada, apresenta uma recuperação de 30% das células (BUBRICK, 1988).

A micropipetagem é utilizada para obtenção de uma colônia pura a partir de uma única célula, diminuindo consideravelmente o percentual de contaminação; uma variação mais sofisticada desta técnica é a de micromanipulação (BUBRICK, 1988).

O método de fragmentação de talo está entre os mais utilizados para isolamento dos fotobiontes. Neste, o talo é macerado e pedaços são selecionados, colocados para crescimento em meio mineral, onde ocorrerá o crescimento das algas. Entretanto, um inconveniente a ser considerado é o elevado índice de contaminação, principalmente por bactérias e algas epífitas, que vêm a ser organismos que utilizam o talo do líquen como substrato para se desenvolver, sem dependência fisiológica com qualquer um dos biontes (BUBRICK, 1988).

Outra técnica utilizada é a descrita por YAMAMOTO, 1985, adaptada por STOCKER-WÖRGÖTTER (1995), onde o líquen cortado em pedaços, lavado em água corrente, em twen 80% e água estéril. Os pedaços são então macerados e filtrados em membranas de diferentes porosidades. O retido é selecionado em lupa e incubado em meio LBM sólido, contendo extrato de solo, com o objetivo de obter colônias isoladas.

1.4 *Trebouxia*

Esta alga é encontrada como fotobionte na grande maioria dos fungos liquenizados, caracterizada como pertencente à Ordem Pleuratales (MATTOX e STEWART, 1984 citado por AHAMADJIAN, 1993) ou Micrithaminales (MELKONIAN e PELVELING, 1988 citado por AHAMADJIAN, 1993).

Trebouxia pode ser reproduzida em cultura, seja através de autósporos ou zoósporos, sendo formados por clivagem do protoplasma celular (AHAMADJIAN,

1967). Estes são células com parede celular rígida, um par de flagelos, os quais fornecem capacidade de movimentação à célula; aqueles são como células vegetativas em miniatura, e caracteristicamente mais resistentes a variações ambientais que os zoósporos, tais estruturas são formadas pela interrupção na formação de zoósporos e consequente deposição de parede celular ou diretamente por clivagens sucessivas do protoplasma e subsequente deposição de parede celular.

Esta alga apresenta um melhor crescimento em condições heterotróficas, ou seja, em meios contendo fonte de nitrogênio como, aminoácidos, peptona ou hidrolisado de caseína. Por crescer heterotroficamente cria-se um paradoxo, pois se acredita que a alga tenha papel como suporte fotossintético ao talo do líquen. Sendo assim o que possibilitaria o crescimento *in vivo* da *Trebouxia* seria a existência de uma translocação de nutrientes na associação, podendo então criar no talo um ambiente propício para este tipo de crescimento. Estudando a translocação dos nutrientes, observou-se que esta se orienta da alga para o fungo, mas tal estudo foi realizado apenas para alguns tipos de compostos. A idéia de que a alga possa receber nutrientes do fungo, explicaria o porque de em culturas isoladas, esta apresentar preferência por meios orgânicos e, por sofrer um aporte de nutrientes pelo micobionte, poderia gerar um aumento de produtos liberados da alga para o fungo (AHMADJIAN, 1993).

1.5 *Ramalina celastri*

Caracteristicamente um ascolíquen fruticoso, pode ser encontrado no alto de troncos de árvores, onde está sujeito à maior iluminação solar, o que otimiza sua capacidade fotossintética. Fixa-se ao substrato por meio de um disco basal, é

caracterizado por apresentar talo arbustivo, sólido e corticóide, ramos lanceolados desprovidos de sorédios. Pode apresentar pseudomicelas dispostas linearmente no talo, na superfície superior e inferior, além de apresentar ascósporos fusiformes. O líquen *Ramalina celastri* é comumente encontrado no Brasil e em outros países tropicais, ocorrendo em altitudes entre 600-1100m (KASHIWADANI e KALB, 1993).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos no Laboratório de Química de Carboidratos de Líquens do Departamento de Bioquímica da Universidade federal do Paraná, utilizando o líquen *Ramalina celastri*. As glucanas de *R. celastri* foram estudadas por MICENO *et al.* (1991); foi obtida uma α -glucana com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção molar de 3:1. Foram ainda encontradas evidências para a presença de uma β -D-glucana ligada por (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) linear e uma α -D-glucana linear ligada por (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4). A atividade biológica de tais moléculas foi testada em sua forma nativa e quimicamente alterada. Derivados sulfatados apresentaram máxima atividade anti-coagulante em concentrações de 13 e 18 μ g.ml⁻¹ (STUELP, 1997) e atividade anti-tumoral com uma inibição de 59% do crescimento do sarcoma 180 em camundongos na concentração de 20mg.ml⁻¹. Outro polissacarídeo encontrado caracteriza-se por, uma α -manana linear com ligações (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6), presente tanto na célula do fotobionte, quanto no meio de cultura líquido, sendo esta crescida em meio rico (TM, contendo peptona e glucose) (Cordeiro *et al.*, 2003) ou pobre, meio essencial de sais, BBM 3N (RUTHES, 2003). Ainda quando este fotobionte foi crescido em meio enriquecido (TM) pode ser observada grande presença de amido, correspondendo a 3,8% do material obtido, enquanto quando este é crescido em meio essencial de sais, a concentração de amido cai para 1%.

Para *Ramalina celastri* foram inicialmente descritas as técnicas de RMN 1D e 2D, caracterizando estruturalmente os glicolipídeos presentes neste líquen. Foram obtidos glicoglicerolipídeos (MACHADO *et al.*, 1994) e uma galactosilceramida (MACHADO *et al.*, 1997).

1.6 POLISSACARÍDEOS PRESENTES EM MICROALGAS VERDES

De maneira geral, algas verdes apresentam xilose, arabinose, ramnose, manose, galactose e glucose, como componentes não celulósicos da parede celular, podendo apresentar também, aminoaçúcares e ácidos urônicos. A celulose também está presente, mas em quantidade não tão proeminente, como observado em plantas ditas superiores. Algumas algas podem perder totalmente a celulose de suas paredes celulares (PERCIVAL e McDOWELL, 1981, citado por KÖNIG e PEVELING, 1984).

Em 1972 foi obtido um polissacarídeo ácido de parede celular da alga verde *Chlorella pyrenoidosa*, e uma glucuronosilramnose foi isolada do seu hidrolisado ácido, cujas estruturas não foram descritas. OGAWA *et al.* (1999) isolaram um polissacarídeo ácido de *Chlorella vulgaris* a partir de uma solução comercial de célula K-22, as quais apresentam altas taxas de ácido glucurônico e ramnose. Do hidrolisado do polissacarídeo ácido foi isolado um novo trissacarídeo – glucuronosilramnosilramnose, o qual parece ser um novo tipo de polissacarídeo de vegetal, uma glucuronoramnana. A estrutura deste trissacarídeo ácido foi determinada como sendo uma α -D-glucopiranosil-(1→3)- α -L-ramnopiranosil-(1→2)- α -L-raminopirose. Além do trissacarídeo ácido, três oligossacarídeos constituintes do polissacarídeo ácido original tiveram suas características estruturais elucidadas: 2-O-metil-L-ramnose, 3-O-metil-L-ramnose e 3-O- α -D-glucopiranosil-L-ramnopiranosil, corresponde a uma série de compostos de baixo peso molecular de glucuronosilramnose, diferindo das séries conhecidas de galactopiranosil-L-ramnopiranosil, como o 2-O- α -D-galactopiranosil-L-raminopiranosil conhecidos como constituintes de polissacarídeos de vegetais, particularmente de mucilagens e gomas (galacturonoramnanas) destes. Isto demonstra, como já foi mencionado, que o polissacarídeo ácido de *Chlorella vulgaris* é um novo tipo de polissacarídeo

vegetal, correspondendo a uma glucuronoramnana, ou mais especificamente, uma glucuronoramnoglicana.

YALCIN *et al.* (1993), realizando estudos com *Chlorella* sp. obtiveram como resultado após o cultivo da microalga um exopolissacarídeo cuja estrutura não foi demonstrada, e que pela abundância de resíduos de ácido glucurônico, indica um alto potencial como agente geleificante e emulsificador secundário.

As pectinas, polissacarídeos presentes na parede primária de todos os vegetais (O'NEILL *et al.*, 1990); sendo que a homogalacturonana (HGA) corresponde a 60% do total de pectina nos vegetais (O'NEILL *et al.*, 1990; MOHNEN *et al.*, 1996). O HGA é um polímero linear, composto de resíduos de ácido α -D-galactosilurônico ligados em 1 \rightarrow 4.

1.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS

A simbiose é benéfica para ambas às partes e permite que ocorram em condições extremas de umidade e temperatura. No mundo, os fungos liquenizados são representados por cerca de 13.500 espécies. Aproximadamente um terço destas têm sido investigada com relação a compostos de baixo peso molecular, e parecem produzir mais de 200 metabólitos secundários diferentes, muitos dos quais têm apresentado atividade biológica (HUNECK, 1996). Menos de 100 espécies têm sido estudadas acerca de seus polissacarídeos (SASSAKI *et al.*, 2002) onde observa-se a produção de três tipos principais de estruturas: α -glucana, β -glucana e galactomana (GORIN *et al.* 1993; GORIN *et al.* 1983). Tais polissacarídeos liquênicos geralmente podem ser isolados em quantia considerável, assim acredita-se que tenham origem a partir do fungo. Possibilidade esta corroborada por resultados de estudos do conteúdo de polissacarídeos de micobiontes e ficobiontes de fungos liquenizados, crescendo de maneira isolada, onde foi observado que o micobionte produz

polissacarídeos semelhantes aos produzidos pelo fungo liquenizado hospedeiro, enquanto o ficobionte produz polissacarídeos diferentes (TAKAHASHI *et al.*, 1979).

A localização dos polissacarídeos no líquen não é bem estabelecida, podendo tanto fazer parte da parede celular do fungo ou glucanas de reserva, quanto podem ser intracelulares ou parte do material intracelular, que compreende ambas as células, da alga e do fungo (STONE e CLARKE, 1992).

1.8 FIXAÇÃO DE CARBONO

A fotossíntese é naturalmente o principal processo pelo qual o CO_2 é fixado, por plantas e algas. Entre estes organismos é dada grande atenção para as microalgas. As vantagens da fixação de CO_2 pelas microalgas inclui: que colônias isoladas podem crescer em elevadas concentrações de CO_2 ; a biomassa é de rápido crescimento, resultando em uma grande fixação de CO_2 ; e as microalgas podem crescer em condições extremas.

Quando os estudos sobre a utilização de carbono inorgânico foram iniciados, alguns pesquisadores sugeriam que muitas algas eram capazes de utilizar HCO_3^- como fonte de carbono (STEEMANN e JENSEN, 1958); enquanto outros sugeriam que as algas apenas responderiam ao CO_2 livre (KING, 1970; KING e NOVAK, 1974). Após realização de estudos utilizando técnicas de espectrometria de massa, ficou comprovado que tais células possuem capacidade de utilizar ambos, CO_2 e HCO_3^- , para a fotossíntese (BADGER *et al.*, 1994).

A habilidade de organismos fotossintéticos em usar o CO_2 para a fotossíntese, depende em partes das propriedades da Rubisco. Esta possui pouca afinidade por CO_2 , provavelmente porque esta envolvida em uma atmosfera, correspondente ao interior do cloroplasto, que tem níveis muito elevados de CO_2 quando comparado com a atmosfera do meio. Organismos fotossintéticos,

aquáticos, tais como microalgas têm se adaptado a baixos níveis de CO_2 através da concentração interna de CO_2 (MORONEY e SOMANCHI, 1999).

Microalgas e cianobactérias respondem a limitações no carbono inorgânico dissolvido (CID) no ambiente extracelular, pela indução de fotossíntese de alta afinidade de CID, descrito como um mecanismo de concentração de carbono (MCC). Tal mecanismo, MCC é conhecido por envolver gradientes fixos de carbono inorgânico dissolvido de CO_2 e HCO_3^- (GIERSCH, 2003), resultado da indução de sistemas de transporte ativo de CO_2 e/ou HCO_3^- e, em algumas microalgas a indução de anidrase carbônica extracelular (BADGER *et al.*, 1980; KAPLAN *et al.*, 1994; MATSUDA e COLMAN, 1995; MATSUDA *et al.*, 1998; BEARDALL *et al.*, 1998; SÜLTEMEYER *et al.*, 1998a; MORONEY e SOMANCHI, 1999). A aclimatação de células a condições limitantes de CID é caracterizada pelo aumento da capacidade de acumular carbono inorgânico dissolvido intracelular contra o gradiente de concentração que eleva as concentrações de CO_2 em torno da enzima da carboxilação, Rubisco, e desta maneira reduz a inibição da fixação de CO_2 pelo O_2 (Bozzo *et al.*, 2000).

Espécies que utilizam o MCC acumulam alta concentração intracelular de CO_2 na tentativa de aumentar a eficiência da taxa de fixação de carbono pela Rubisco, reprimindo a atividade fotorespiratória da enzima, energeticamente dispendiosa (CANVIN, 1990). O MCC envolve a retirada ativa de HCO_3^- e/ou CO_2 do ambiente, e geralmente requer a atividade da enzima anidrase carbônica (COLEMAN, 1998; LANE e MOREL, 2000a e b), para catalisar a interconversão destas espécies de carbono inorgânico (SÜLTEMEYER, 1998b).

Muitas algas verdes e cianobactérias têm a habilidade de concentrar carbono inorgânico em resposta à sua variação externa durante o crescimento. Quando as células são expostas a baixos níveis de carbono inorgânico, em soluções equilibradas com o ar ambiente (0,035% de CO_2) é induzido o MCC para suprir ativamente a rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/ oxigenase) com CO_2

(AIZAWA e MIYACHI, 1986; BADGER e PRICE, 1994). A síntese de pelo menos sete polipeptídios é induzida concomitantemente com o mecanismo de concentração de carbono (MORONEY *et al.*, 1985; FUKUZAWA *et al.*, 1990; RAWAT e MORONEY, 1991), incluindo uma α -anidrase carbônica (FUKUZAWA *et al.*, 1990). Estudos sugerem que esta anidrase carbônica e os sete polipeptídios induzidos acelerem o equilíbrio das espécies predominantes de carbono inorgânico, HCO_3^- e CO_2 no exterior da membrana plasmática (MORONEY *et al.*, 1985), deste modo permitindo a entrada de CO_2 na célula em uma taxa suficiente para sustentar a fotossíntese.

A elevação nas concentrações de CO_2 na atmosfera é considerada como uma das causas de uma série de potenciais problemas ambientais, representados pelo efeito "greenhouse" (SCHNEIDER, 1989). Sabe-se que o CO_2 atmosférico aumentou aproximadamente 25% desde a Revolução Industrial, e que de maneira geral, as características fotossintéticas de algumas espécies de microalgas são afetadas pela concentração de CO_2 presente no ambiente durante seu crescimento. A afinidade de CO_2 para a fotossíntese é maior em células crescidas sob condições normais de CO_2 , do que para aquelas crescidas em elevadas concentrações de CO_2 (1-5% de CO_2) (AIZAWA e MIYACHI, 1986; TSUZUKI e MIYACHI, 1989; RAVEN, 1991; BADGER e PRICE, 1992; SÜLTEMEYER *et al.*, 1993). Algas crescidas em elevados níveis de CO_2 apresentam uma redução na produção de O_2 ; o pH aumenta assim que o CO_2 é consumido, tornando-se limitante. Concomitantemente com estas mudanças nas características fotossintéticas, a concentração de CO_2 afeta as estruturas intracelulares como pirenóides, vacúolos de amido e a localização mitocondrial (KAPLAN e REINHOLD, 1999; MIYACHI *et al.*, 1986); membranas como a dos tilacóides também exibem diferenças na ultraestrutura e/ou função, quando comparadas células crescidas em altas e baixas concentrações de CO_2 (MIYACHI *et al.*, 1986; TSUZUKI *et al.*, 1986; BÜGER *et al.*, 1988).

Organismos fotossintéticos que concentram CO_2 enfrentam um problema, visto que este pode facilmente se difundir através das membranas biológicas; outro problema enfrentado se deve ao fato de que organismos como microalgas, são compostos por uma ou poucas células, com pronto acesso ao ambiente, e por isso devem evitar a difusão do CO_2 ao mesmo tempo em que permitam a entrada dos demais nutrientes. As microalgas superam tal problema da difusão de CO_2 por acumular HCO_3^- . Algumas espécies, quando estimuladas, apresentam a capacidade de difundir o HCO_3^- através das membranas, ocorrendo de forma mais lenta que o CO_2 (MORONEY e SOMANCHI, 1999). Ainda que, porque o CO_2 é o substrato requerido pela Rubisco, o acúmulo de HCO_3^- deve ser convertido à CO_2 antes que o carbono inorgânico fixado tome lugar. Isto parece ser acompanhado pelo empacotamento da Rubisco no interior da célula algal, gerando CO_2 nesta localidade pela ação de uma anidrase carbônica. Uma elevação local de CO_2 é criada, onde o CO_2 pode competir com o O_2 , no sítio ativo da Rubisco. Permitindo ao CO_2 ser utilizado para a fotossíntese antes que seja difundido da célula. Deste modo, microalgas que concentram CO_2 empacotam a Rubisco em uma localização muito específica, tendendo a concentrar e converter o HCO_3^- a CO_2 , rapidamente no local da Rubisco (MORONEY e SOMANCHI, 1999).

Na maior parte das microalgas a Rubisco ocupa uma localização específica. Nas cianobactérias encontra-se nos carboxissomos, em algas verdes, nos pirenóides. Estudos recentes corroboram a hipótese de que a localização da rubisco é essencial para uma aquisição eficiente de CO_2 do meio (MORONEY e SOMANCHI, 1999).

A evidência fisiológica para a existência da concentração de CO_2 em microalgas se deve a dois fatores. Primeiro, as algas são muito eficientes retirando o carbono inorgânico do meio. São muito mais eficientes do que se esperaria para células que mostram uma afinidade aparente por CO_2 de aproximadamente $1\mu\text{M}$,

contra o $K_m(\text{CO}_2)$ da Rubisco de cerca de $20\mu\text{M}$. Em alguns casos as condições de crescimento da alga influenciam a afinidade da célula pelo CO_2 . As algas unicelulares podem existir em dois estados fisiológicos, dependendo da concentração de CO_2 e/ou pH, durante o crescimento. Com as células crescendo com CO_2 elevado ou baixo pH, aparentemente há uma menor eficiência na assimilação de carbono para fotossíntese. As algas unicelulares seriam induzidas a mudar de um estado fisiológico a outro, pela exposição a concentrações apropriadas de CO_2 ou pH (SPALDING, 1989). Sendo assim, algumas espécies de algas quando crescidas em elevadas concentrações de CO_2 (aproximadamente 10 vezes a concentração do ambiente) não são eficientes na aquisição de carbono inorgânico (MATSUDA *et al.*, 1998). No entanto, se esta mesma alga for crescida em condições limitantes de CO_2 , se torna muito eficiente na retirada de CO_2 e sua fixação. Isto implica que haja mecanismos de transportes indutíveis, decorrentes de tais condições, porque a quantidade de Rubisco não é alterada durante a adaptação de altas para baixas condições de CO_2 .

Segundo, o acúmulo de carbono inorgânico no interior da célula pode ser mensurado diretamente. Na luz cianobactérias podem concentrar HCO_3^- no interior da célula mais de 100 vezes (MILLER *et al.*, 1990). Algas eucarióticas não são tão eficientes, mas podem acumular HCO_3^- pelo menos 20 vezes a mais que os níveis de CO_2 do ambiente. Transportadores de carbono inorgânico e a anidrase carbônica devem capacitar as células ao acúmulo de HCO_3^- no interior da célula. A identidade exata dos transportadores de carbono inorgânico ainda é desconhecida. Trabalhos recentes têm identificado alguns transportadores que podem representar papel significativo no acúmulo de carbono inorgânico (OKAMURA *et al.*, 1997).

Cianobactérias quando crescidas sob condições limitantes de carbono desenvolvem um mecanismo para transporte ativo de carbono inorgânico, o qual pode conduzir as concentrações intracelulares de carbono inorgânico a um excesso

de 1000 vezes a concentração extracelular do mesmo (KAPLAN *et al.*, 1980; SHELPS e CANVIN, 1984; ESPIE e CANVIN, 1987; ESPIE *et al.*, 1988a; MILLER *et al.*, 1990; BADGER e PRICE, 1992). CO_2 e HCO_3^- são transportados por sistemas separados e independentes (ESPIE *et al.*, 1988a, 1988b; MILLER *et al.*, 1988; PRICE *et al.*, 1992; SALON *et al.*, 1996).

Em algas vermelhas os principais produtos da fixação de carbono são polissacarídeos sulfatados da parede celular, amido, e carboidratos de baixo peso molecular, como o floridosídeo, digeneasídeo, manitol e sorbitol (RAVEN *et al.*, 1990; KARSTEN *et al.*, 1999). A distribuição do carbono fixado entre estes produtos finais é influenciada por fatores ambientais, tais como, salinidade (REED *et al.*, 1980; WIENCKE e LÄUCHLI, 1981), disponibilidade de nitrogênio (THEPENIER *et al.*, 1985; EKMAN *et al.*, 1991; MACLER, 1986), disponibilidade de luz (MACLER, 1986), fotoperíodo e temperatura (MENG e SRIVATAVA, 1993). O principal carboidrato de baixo peso molecular fotoassimilado nas algas vermelhas é o floridosídeo (2-O-glicerol- α -D-galactopiranosídeo) (RAVEN *et al.*, 1990; KARSTEN *et al.*, 1999), mas as funções fisiológicas deste composto no acúmulo de carbono, transporte e como um regulador do balanço osmótico não foi bem elucidado (MACLER, 1986, 1988; EKMAN *et al.*, 1991).

A via para a fixação fotossintética de carbono em algas verdes unicelulares e filamentosas é a mesma que a de plantas do tipo C3. O ciclo de redução fotossintética de carbono-C3 (PCRC), que tem o ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) como primeiro produto estável formado na fotossíntese pela carboxilação da ribulose 1-5 bifosfato (RuBP). Via esta elucidada pela primeira vez na alga verde unicelular, *Chlorella*, por CALVIN e colaboradores (BASSHAM e CALVIN, 1957). Desde que a via foi estabelecida utilizando a alga crescida em concentrações elevadas de CO_2 , questionava-se se a alta afinidade das células crescidas em concentrações de CO_2 do ar, era devido a uma via diferente, com maior eficiência na fixação de carbono.

No entanto como dito anteriormente a via de fixação de carbono é a mesma para diferentes concentrações de CO₂, variando apenas as respostas dadas pelas células (SPALDING, 1989).

Em líquens, o fotobionte coloca em circulação, ou seja, disponibiliza mais de 70% do carbono fixado fotossinteticamente, via sítio específico de transporte de membrana, para subsequente utilização pelo micobionte (TAPPER, 1981).

1.9 CÁLCIO

O cálcio tem papel importante no crescimento, desenvolvimento e transdução de sinais em plantas. Para o funcionamento das células vegetais é necessária uma regulação espacial da concentração de cálcio, sendo as bombas de Ca²⁺ e os antiportes Ca²⁺/H⁺ os principais mecanismos pelos quais as células vegetais acumulam cálcio nas organelas (FOX e GUERINOT, 1998; SZE *et al.*, 2000).

Nas células vegetais, as bombas Ca²⁺ são vitais na regulação da concentração citosólica de cálcio, sendo amplamente distribuídas nas membranas, incluindo a membrana plasmática, do vacúolo e do retículo endoplasmático (SEE *et al.*, 2000). Estudos recentes sugeriam que as bombas Ca²⁺ se localizassem no aparato de Golgi (CANUT *et al.*, 1993; LOGAN e VENIS, 1995), mas nenhuma evidência tinha sido provada que esta organela devesse ter papel na captura de cálcio, até o estudo realizado por ORDENES *et al.* (2002), onde utilizando a tapsigargina, um inibidor de Ca²⁺ATPase animal do retículo sarcoplasmático, foi comprovada a atividade de captura e evidenciado o acúmulo ativo de cálcio na vesículas do aparato de Golgi de células vegetais.

O cálcio como transdutor de sinais, atua de diversas maneiras, podendo estar envolvido na síntese de polissacarídeos, onde a UDP-galactose é o substrato utilizado para a síntese de polissacarídeos não celulósicos, como xilo-glucanas,

galactomananas, ramnogalatorunanas I e II, proteoglicanas como arabinagalactanas e glicoproteínas (CARPITA e MCCANN, 2000). Sendo então, a incorporação de galactose nestas macromoléculas catalisada por galactosiltransferases, localizadas no aparato de Golgi (REID, 2000). O arranjo topológico destas faz necessário o transporte de UDP-galactose do citosol para o lúmen do Golgi, onde ocorre a síntese dos polissacarídeos. Por essa razão é provável que a síntese de polissacarídeos de parede celular contendo galactose, assim como a galactosilação de outros aceptores, como glicoproteínas e lipídios, realizada no lúmen do Golgi de vegetais, possa depender do transporte de UDP-galactose.

Evidências foram reportadas para a localização subcelular das glicosiltransferases responsáveis pela biossíntese de pectina. Resultados de tratamento *in vivo* e análises imunocitoquímicas sugerem que a pectina é sintetizada no aparato de Golgi (NORTHCOTE e PICKETT-HEAPS, 1966; HARRIS e NORTHCOTE, 1971; STAEHELIN e MOORE, 1995). Estudos imunocitoquímicos usando anticorpos que reconhecem a homogalacturonana, polissacarídeo péctico e ramnogalacturonana, sugerem que estes polissacarídeos são sintetizados no interior de diferentes compartimentos do aparato de Golgi (ZANG e STAEHELIN, 1992) e são transportados do Golgi em vesículas até sua fusão com a membrana plasmática. Os polissacarídeos são então liberados no espaço extracelular e incorporados na parede (NORTHCOTE e PICKETT-HEAPS, 1966). Sendo assim, o cálcio se faz necessário como importante transdutor de sinais, ativando a formação de vesículas para o transporte dos polissacarídeos sintetizados. Nenhuma ligação direta foi encontrada, do cálcio, na síntese de polissacarídeos, mas sabe-se que está indiretamente relacionado com esta, na sinalização de vesículas, galactosiltransferases, e da UDP-galactose.

2 JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná iniciou seus trabalhos com culturas de biontes isolados de fungos liquenizados com o isolamento do fotobionte do gênero *Trebouxia* do líquen *Ramalina celastri* (Reis, 2000) e com a caracterização dos polissacarídeos presentes neste fotobionte (Cordeiro, 2000; Cordeiro et al., 2003). Atualmente a associação com o grupo de pesquisa de cultivo de biontes de fungos liquenizados da Universidade de Salzburg (Áustria), chefiado pela professora Elfriede Stocker-Wörgötter, possibilitou o isolamento de outros biontes. Sendo assim o Laboratório vem desde então isolando e mantendo cultura de biontes liquênicos isolados para o estudo de seus componentes polissacarídicos e lipídicos.

O cultivo de fungos liquenizados e de seus biontes justifica-se pela não necessidade de se fazer uma extração excessiva dos mesmos do ambiente, mantendo-se assim a integridade ecológica de muitas espécies.

O estudo focado na fixação de carbono torna-se interessante por não se apresentar de forma totalmente compreendida, ou seja, ainda gera muitas dúvidas, tais como, como organismos com mecanismo de concentração de CO₂ vão responder ao aumento atmosférico dos níveis de CO₂ (efeito estufa), a partir desta capacidade de concentração de CO₂. O resultado seria um pequeno aumento na fotossíntese; ou até que ponto o aumento atmosférico dos níveis de CO₂ provocará um favorecimento ou uma retroalimentação negativa, esta última observada em experimentos com elevadas condições de CO₂. Por estes e outros motivos o estudo de fixação de carbono torna-se relevante, além de ser biotecnologicamente interessante, no que se refere ao aumento de produção de compostos, como os polissacarídeos, e ao seu custo relativamente baixo.

Para otimizar as condições de crescimento da alga isolada do líquen *Ramalina celastri*, buscando fontes alternativas de carbono, e tomando como base evidências de que o cálcio transduz sinais para a síntese de polissacarídeos no aparato de Golgi, além da observação da relação existente entre a síntese de polissacarídeos não celulósicos e a referida organela, a utilização do cálcio, no cultivo, torna-se uma ferramenta interessante, para verificação de uma possível relação direta entre sua concentração e o aumento da biossíntese de polissacarídeos, que não a celulose.

3 OBJETIVOS

- ↻ Otimizar condições de crescimento da alga isolada do líquen *Ramalina celastri*, buscando fontes alternativas de carbono;
- ↻ Otimizar as condições de cultivo em meio “pobre” buscando aumentar a produção de polissacarídeos que não o amido;
- ↻ Testar concentrações de CO_2 e HCO_3^- , na produção de biomassa e polissacarídeos;
- ↻ Testar concentrações de Ca^{++} , na produção de biomassa e polissacarídeos;
- ↻ Buscar um maior rendimento de açúcar por grama de biomassa;
- ↻ Analisar características morfológicas (citometria) e fisiológica das células (química), quando cultivadas em diferentes meios.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DO FOTOBIONTE

O fotobionte do fungo liquenizado *Ramalina celastri* foi isolado do talo liquênico utilizando a técnica descrita por REIS (2000), onde o talo do líquen é cortado em pedaços de aproximadamente 1cm^2 , os quais são macerados em graal e pistilo, utilizando 10ml de água destilada. Em sequência, o material é peneirado em peneira fina, originando fragmentos retidos e o peneirado. O material retido em peneira é lavado em água corrente durante 30 minutos e em seguida em água destilada. O material peneirado é centrifugado por 5 minutos a $100 \times g$ visando à remoção de restos de talo, ressuspensão em água destilada e em seguida, centrifugada a $400 \times g$ durante 5 minutos esperando a obtenção de algas livres, provenientes do talo, sendo então ressuspensão em 5ml de água destilada (BUBRICK, 1988). Os fragmentos de talo e alíquotas de 0,1ml do material centrifugado são incubados em meio de sais (BBM) líquido (AHMADJIAN, 1993), onde são cultivados em sala de cultivo, à temperatura de $21^\circ \text{C} \pm 2^\circ$, e fotoperíodo de 12h.

4.2 MANUTENÇÃO E CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS

As colônias utilizadas como pré-inóculo foram crescidas e mantidas, em meio BBM 3N, em sala de cultivo à temperatura de $21^\circ \text{C} \pm 2^\circ$, luz incidente de $45 \text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com 12 horas de fotoperíodo, a partir de inóculo inicial de 1.10^3 células/ml. Tais condições de luz, temperatura e fotoperíodo foram padronizadas por REIS (2000), e a partir de então repetidas nos demais experimentos.

Na tentativa de otimizar as condições de crescimento da alga isolada do líquen *Ramalina celastri*, buscando fontes alternativas de carbono, suas culturas

foram mantidas em sala de cultivo à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, com luz incidente de $45 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e 24 horas de fotoperíodo, a partir de inóculo inicial de 1.10^3 células/ml.

As células do fotobionte foram crescidas em frascos de 60 ml, contendo 10 ml de meio BBM 3N, variando concentrações de bicarbonato (HCO_3^-), cálcio e porcentagem de dióxido de carbono (CO_2). Cada tratamento foi cultivado em triplicata, e crescido durante 14 dias.

4.3 MEIO DE CULTURA

4.3.1 BBM – Bold's Basal Medium confeccionado segundo AHMADJIAN, (1993).

I – Seis soluções estoque:

Preparar cada solução em 400ml de água.

NaNO_3	10,0g	$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	3,0g
KH_2PO_4	7,0g	CaCl_2	1,0g
K_2HPO_4	3,0g	NaCl	1,0g

Adicionar 10ml de cada solução estoque, e completar o volume com água até 1000ml (Parte I).

II – Quatro soluções de sais:

1) H_3BO_3	11,42g/L	3) MoO_3	0,71g/l
2) $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	4,98g/L	$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	1,57g/L
$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	8,82g/L	$\text{Co}(\text{NO}_3)_3.6\text{H}_2\text{O}$	0,49g/L
$\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$	1,44g/L	4) EDTA	50,0g/L e KOH 31,0g/L

Adicionar 1ml de cada uma das soluções de sais na Parte I.

Para uma concentração maior de nitrato, caracterizando o meio BBM 3N, multiplica-se por 3 a quantidade de nitrato colocada no meio e completar o volume com água até 1000ml.

4.3.2 Meio TM – Meio para *Trebouxia*

O meio para *Trebouxia* também é denominado meio rico. Para sua confecção utiliza-se:

- 10g de peptona (1%);
- 30g de glucose (3%);

Para 1000ml de meio BBM, preparado como descrito anteriormente.

Para preparar o meio no estado sólido, adiciona-se, 20g de agar, correspondendo a 2%, de 1000ml de meio, sendo este, BBM ou TM.

4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para obter uma otimização das condições de crescimento foram variadas as condições que se referem à temperatura, fotoperíodo, fontes de carbono inorgânico, porcentagem de CO₂ e concentração de cálcio presente no meio de cultivo.

4.4.1 Cultivo Bicarbonato (HCO₃⁻)

O cultivo do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, variando as concentrações de HCO₃⁻ foi primeiramente padronizado, utilizando como base uma solução mãe de bicarbonato 0,16 mol/L, referindo-se ao bicarbonato de sódio, sendo que para 500ml de solução utiliza-se: 13,61g NaHCO₃

4,03g Na₂CO₃

0,50g K₂HPO₄

Modificado do meio SAG (Sammlung von Algenkulturen (SAG)), descrito por SCHLÖSSER (1982), para *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*, modificado de AIBA e OGAWA (1977) (www.bio.utexas.edu/research/utex).

Para determinar o intervalo que apresente melhor crescimento do fotobionte, este foi então cultivado nas concentrações 0, 0,02, 0,04, 0,08 e 0,16 mol/L de HCO_3^- . Após padronizado o intervalo de crescimento, 0 a 0,08 mol/L, correspondente à 0, 0,84, 1,68, 2,52, 3,36, 5,04, 5,88, 6,72 mg/ml. Os cultivos seguintes foram realizados com e sem adição de CO_2 , equivalente a 10%.

O CO_2 utilizado para os experimentos foi proveniente de uma solução 1M de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), e ácido clorídrico (HCl) 6M. Com a combinação destas soluções, forma-se cloreto de sódio (NaCl) e ácido carbônico (H_2CO_3) que se dissocia, formando água (H_2O) e gás carbônico (CO_2). Este é desprendido, e por diferença de pressão, ocupa o espaço de uma seringa estéril de 5 ml, a partir da qual será injetado nos frascos, onde foi desenvolvido o cultivo das células, passando antes através de um filtro também estéril, cuja porosidade é de 0,22 μm , evitando ao máximo um possível contaminação.

4.4.2 Cultivo Cálcio (Ca^{2+})

As células foram crescidas variando também a concentração de cálcio presente no meio BBM 3N, sendo a concentração de cálcio em 10 ml de meio $2,5 \times 10^{-3}$ g/ml. Esta concentração de cálcio foi variada em 2, 4, 10 e 20x, e determinada a utilização das concentrações correspondentes a 4 e 10x, correspondente à 1×10^{-2} g/ml e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml, respectivamente. Tendo determinado este intervalo de concentrações, os cultivos seguintes foram crescidos nas concentrações padrão, 4 e 10x, com e sem adição de uma atmosfera de CO_2 .

4.4.3 Cultivo bicarbonato e cálcio

Tendo determinado o intervalo ótimo de crescimento do fotobionte, tanto para as concentrações de HCO_3^- quanto para as de cálcio, os tratamentos foram

combinados, na tentativa de otimizar a biomassa de células. Para isto foram feitas combinações como mostrado na tabela 1.

TABELA 1. COMBINAÇÕES BICARBONATO E CÁLCIO

[HCO ₃ ⁻] mol/L	[HCO ₃ ⁻] mg/ml	[CÁLCIO] g/ml
0	0	2,5x10 ⁻³
0	0	1x10 ⁻²
0	0	2,5x10 ⁻²
0,04	3,36	2,5x10 ⁻³
0,04	3,36	1x10 ⁻²
0,04	3,36	2,5x10 ⁻²
0,08	6,72	2,5x10 ⁻³
0,08	6,72	1x10 ⁻²
0,08	6,72	2,5x10 ⁻²

* Tabela apresentando as combinações utilizadas para confecção dos tratamentos analisados durante o presente estudo, quando combinadas às concentrações de bicarbonato e cálcio.

Nas combinações acima, as células do fotobionte foram crescidas com e sem adição de CO₂, sob as condições previamente descritas.

4.4.4 Cultivo porcentagem de CO₂

Segundo dados da literatura, ao aumentar a concentração de CO₂ no meio, há um aumento do carbono fixado, até uma concentração limite, onde há um desfavorecimento do desenvolvimento das células. Para verificar as melhores concentrações de CO₂ para o cultivo deste fotobionte foram feitos tratamentos, crescendo as células no meio básico de sais, BBM 3N com a adição de CO₂, equivalente a 10, 20, 30, 40 e 50% o volume do frasco onde as células estavam sendo crescidas.

4.5 HIDROLISE ÁCIDA TOTAL

As amostras a serem hidrolisadas, 5 mg da biomassa de células, foram tratadas com solução aquosa de TFA 1M (Ácido tri-Fluoracético), durante 8 horas à 100°C. Posteriormente, o TFA remanescente foi removido por evaporação à secura das soluções hidrolisadas. As amostras foram então levadas à redução e acetilação.

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com borohidreto de sódio, em temperatura ambiente por 12h, em pH 10 (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Após este período, os íons sódicos foram retirados por tratamento com resina catiônica. A solução foi filtrada em algodão e levada à secura em evaporador rotatório. O ácido bórico formado foi eliminado na forma de borato de trimetila, através de co-evaporação com metanol.

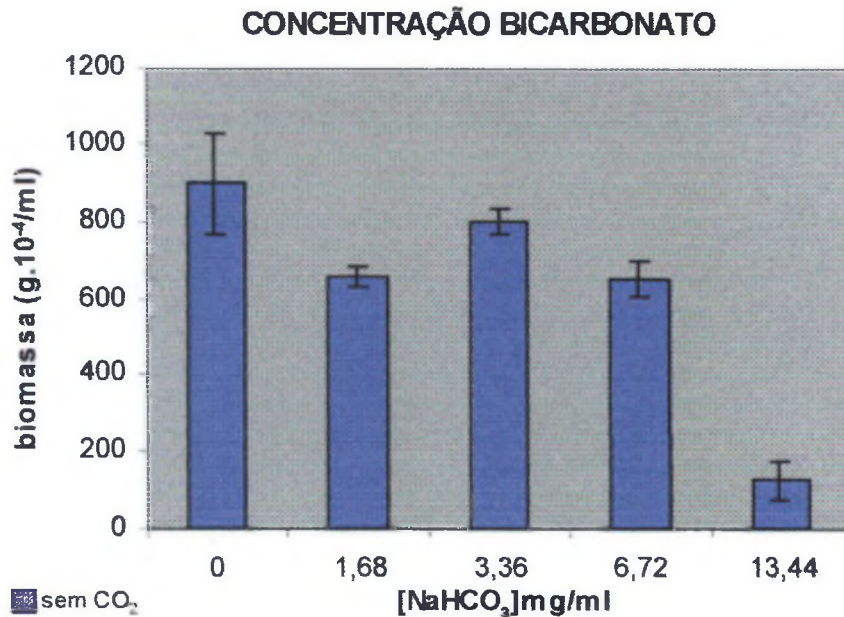
Os alditóis formados foram acetilados com anidrido acético: piridina (1:1, v/v), *overnight* à temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). A reação foi interrompida por adição de gelo e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual, ainda presente na fração clorofórmica foi removida por complexação com sulfato de cobre 2%. Após completa remoção da piridina, o clorofórmio foi evaporado e os alditóis acetatos analisados por GLC (Cromatografia Líquido Gasosa) e GLC-MS (Cromatografia Líquido Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO BICARBONATO (HCO_3^-)

Para a determinação das concentrações de HCO_3^- , onde houvesse um melhor desenvolvimento das células, estas foram crescidas em frascos de 60 ml, contendo 10 ml de meio BBM 3N, variando a concentração de HCO_3^- adicionada, no intervalo de 0 a 13,44 mg/ml. Tais concentrações foram determinadas, pela possibilidade de solubilidade no volume de meio determinado, assim como por observação de relatos da literatura (SCHLÖSSER, 1982, modificado de AIBA e OGAWA, 1977, www.bio.utexas.edu/research/utex). Após um período de 30 dias o cultivo foi finalizado, o meio de cultura centrifugado para separar as células, lavado com água destilada, para a retirada do excedente de sal do meio, diminuindo assim a interferência na biomassa de células. A biomassa celular foi liofilizada para obtenção do rendimento em peso seco. O período de 30 dias foi determinado, através de observações anteriores para o desenvolvimento deste estudo, caracterizando-se por ser o tempo de vida das células, sob as condições de cultivo determinadas. Este cultivo foi realizado, sob condições de aeração, ou seja, os frascos foram mantidos em agitador, possibilitando trocas gasosas. Este sistema permite a manutenção das células por um período maior de tempo, resultando em um rendimento maior de biomassa quando comparado ao cultivo realizado sem aeração.

GRÁFICO 1. PRÉ-CULTIVO VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO ADICIONADA AO MEIO BBM 3N.



* Gráfico relacionando a concentração de NaHCO₃ (mg/ml) pela biomassa de células (g.10⁻⁴/ml), quando as células foram cultivadas por um período de 30 dias, em sistema aberto, em meio essencial de sais (BBM 3N).

No gráfico 1 abaixo, pode ser observada a representação dos resultados deste cultivo, representando a biomassa de células (g.10⁻⁴/ml) pela concentração de HCO₃⁻ (mg/ml). Este e os demais gráficos foram construídos, utilizando a média dos rendimentos de cada tratamento, os quais foram realizados em triplicata e repetidos para confirmação dos resultados.

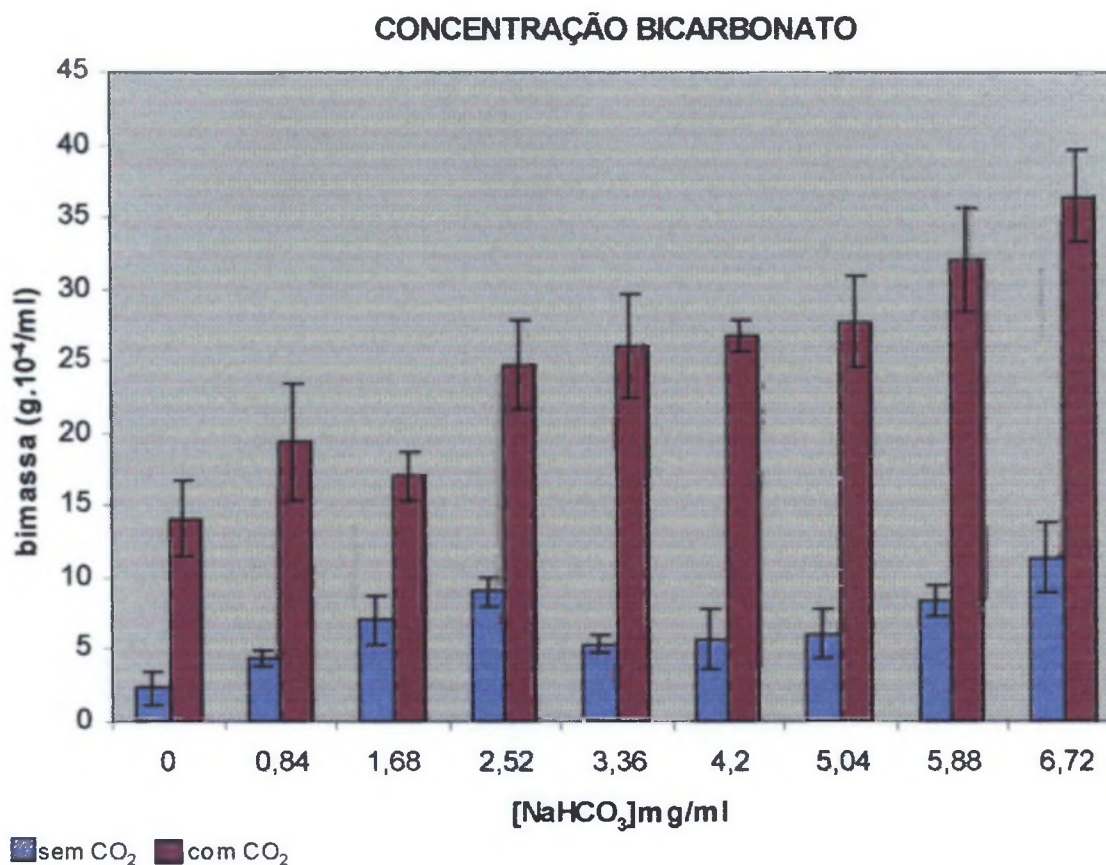
Neste gráfico pode ser observado que as concentrações que apresentam maior biomassa correspondem a 0 e 3,36 mg/ml de HCO₃⁻. Na concentração de 13,44 mg/ml de HCO₃⁻ pode ser observado grande decréscimo na produção de biomassa, tal resultado pode estar refletindo a situação descrita na literatura, que algas, e plantas em geral respondem ao aumento dos níveis de carbono inorgânico, até um ponto em que este se torna limitante ao crescimento, passando a inibir o desenvolvimento das células. Neste caso pode-se considerar que foi atingida a concentração limitante para o desenvolvimento do fotobionte cultivado. Sendo

assim, as células do fotobionte foram então crescidas em um intervalo menor de concentrações, entre 0 e 6,72 mg/ml de HCO_3^- , tentando eliminar o limite de crescimento, visto que o interesse do presente estudo esta voltado para a otimização das condições de crescimento do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*.

No gráfico 2 à seguir podem ser observados os resultados de biomassa ($\text{g} \cdot 10^{-4}/\text{ml}$) pela concentração de HCO_3^- (mg/ml), no intervalo entre 0 e 6,72 mg/ml, determinado pelo experimento demonstrado no gráfico 1, sendo o fotobionte crescido tanto ausência quanto na presença de CO_2 , mas em um sistema fechado, pela impossibilidade de cultivá-lo sob aeração, devido à falta do equipamento. Neste caso e nos demais experimentos discutidos a seguir, as células foram crescidas em sistema fechado, e mantidas por um período menor, quando comparadas com o tratamento representado pelo gráfico 1. O cultivo de 30 dias passa a ser de 14 dias, se este período for estendido, as células cultivadas nos frasco onde há adição de CO_2 morrem, adquirindo uma coloração amarelada, visível. Esse fato também pode estar demonstrando que quando algas são crescidas em níveis elevados de CO_2 com relação aos níveis atmosféricos, estas apresentam uma redução na produção de O_2 , restringindo ainda mais as possibilidades de trocas gasosas. A partir destas observações foi delineado o experimento, ou seja, as condições sob as quais todos os tratamentos realizados foram submetidos. Os cultivos seguintes foram então realizados nas concentrações 0 mg/ml, utilizada como controle, e uma vez que não houve grande diferença entre o intervalo de concentrações de HCO_3^- , correspondente a 2,52 e 5,04 mg/ml, foi utilizada a concentração 3,36 mg/ml, que corresponde a metade da máxima concentração utilizada, e 6,72mg/ml, correspondendo à máxima concentração utilizada, onde não houve grande limitação no crescimento das células algais (gráfico 1) e apresentando uma maior biomassa de células, neste segundo experimento, utilizado como padrão para os tratamentos

seguintes.

GRÁFICO 2. PRÉ-CULTIVO VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO ADICIONADA AO MEIO BBM 3N, COM E SEM ADIÇÃO DE CO₂.

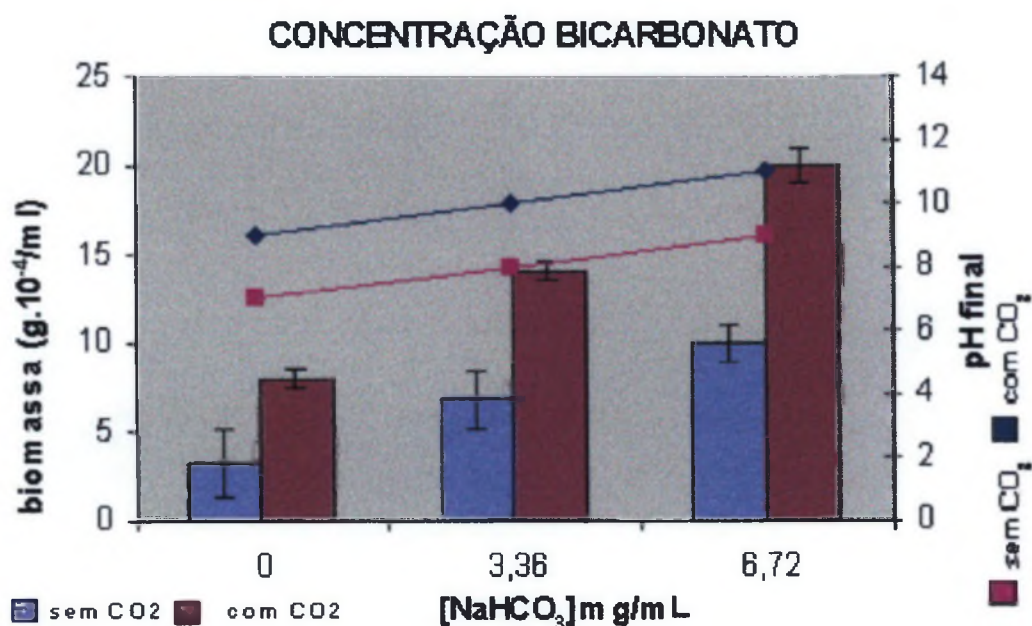


* Gráfico relacionando a concentração de NaHCO₃ (mg/ml) pela biomassa de células (g.10⁻⁴/ml), quando as células foram cultivadas por um período de 14 dias, em sistema fechado, em meio essencial de sais (BBM 3N), com e sem adição de CO₂, correspondendo a 10% do volume do frasco onde esta sendo mantido o cultivo.

Tendo determinado o intervalo de crescimento para o fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, para a concentração de HCO₃⁻ adicionada no meio de cultivo (BBM 3N), as células deste foram crescidas nas concentrações, 0 mg/ml referente ao controle, 3,36 mg/ml e 6,72 mg/ml, correspondendo a concentração média e máxima de HCO₃⁻, respectivamente (gráfico 3). Ao término o cultivo, da mesma maneira que a descrita para o tratamento demonstrado no gráfico 1, o pH do meio foi medido, apresentando uma variação equivalente, tanto quando as células foram crescidas em meios na ausência quanto na presença de CO₂. Pode

ser observado que o pH aumenta, com o aumento da concentração de HCO_3^- adicionada no cultivo, sendo o pH inicial de todos os tratamentos, correspondente a 7,0, ou seja neutro. Este aumento pode estar relacionado: diretamente com a adição do HCO_3^- no meio, implicando que as células não estariam retirando de forma eficiente esta fonte de carbono inorgânico do meio; ao fato de que as células estão incorporando o carbono inorgânico e acumulando na forma de HCO_3^- , o que impede que o CO_2 presente no meio, tanto pela sua adição, quanto pelo seu nível normal atmosférico, se difunda da célula, permitindo a fixação do carbono; ou ainda ao fato de que assim que o CO_2 é consumido, há um aumento do pH.

GRÁFICO 3. CULTIVO VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO ADICIONADO AO MEIO BBM 3 N, COM E SEM ADIÇÃO DE CO_2 .



* Gráfico relacionando a concentração de NaHCO_3 (mg/ml) pela biomassa de células ($\text{g} \cdot 10^{-4}/\text{ml}$) pelo pH final do meio, quando as células foram cultivadas por um período de 14 dias, em sistema fechado, em meio essencial de sais (BBM 3N), com e sem adição de CO_2 (10%), tendo pH 7,0, inicial.

No gráfico 3 pode ser observado que com o aumento da concentração de HCO_3^- , há um aumento na biomassa, tanto quando as células foram cultivadas com adição ou não de CO_2 . Fato este condizente com as vantagens apresentadas pela fixação de CO_2 pelas microalgas, ou seja, que estas são capazes de em colônias

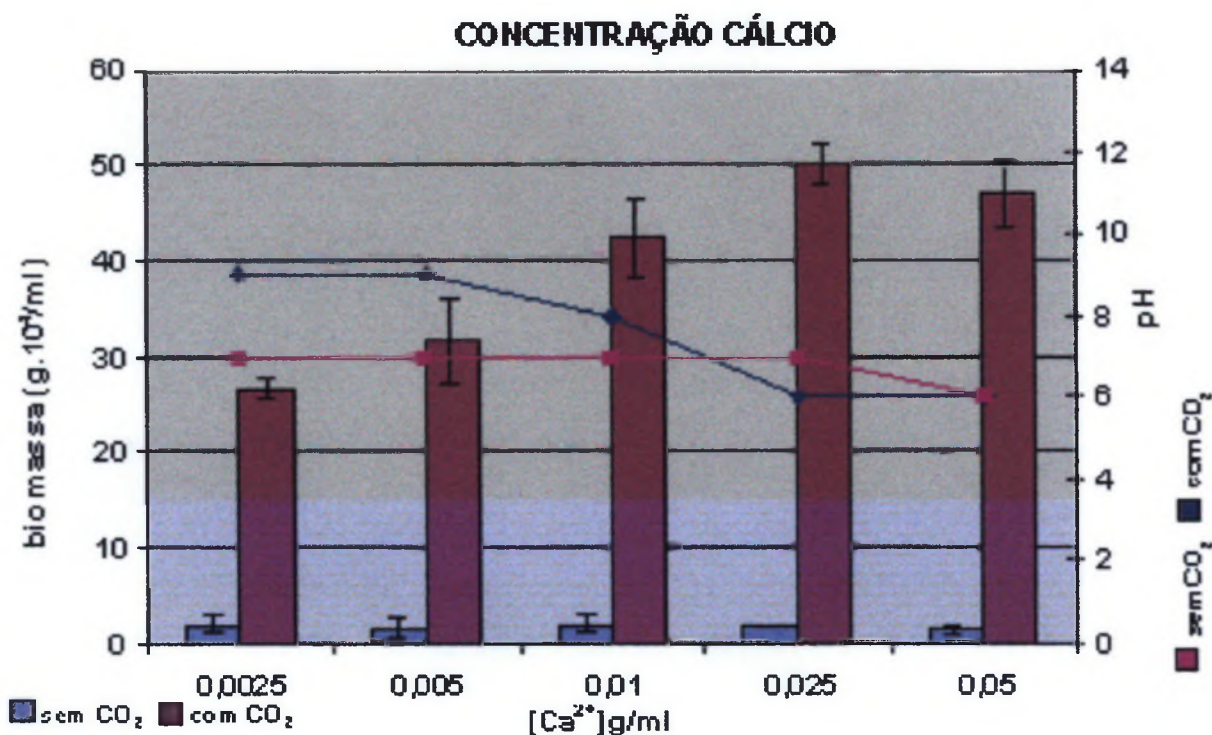
isoladas crescer em elevadas concentrações de CO_2 , sendo a biomassa de rápido crescimento. O CO_2 é utilizado, assim como o HCO_3^- , pois são transportados por sistemas diferentes (ESPIE *et al.*, 1988a, 1988b; MILLER *et al.*, 1988; PRICE *et al.*, 1992; SALON *et al.*, 1996), podendo então fazer com que o fotobionte responda de maneira diferente a diversos estímulos. Tal resposta pode ser observada, quando comparados os gráficos 1, onde foi apenas utilizado HCO_3^- , e os demais gráficos, onde foi variada a concentração de HCO_3^- e também adicionando ou não uma atmosfera extra de CO_2 .

5.1.2 Cultivo com Cálcio

Tomando como base evidências de que o cálcio transduz sinais para a síntese de polissacarídeos no aparato de Golgi, além da observação da relação existente entre a síntese de polissacarídeos não celulósicos e a referida organela, a utilização do cálcio, também foi testada. Nos experimentos envolvendo diferentes concentrações de cálcio no meio de cultivo, assim como nos experimentos envolvendo diferentes concentrações de HCO_3^- , foi realizada uma primeira triagem. Baseado no meio BBM 3N, onde a concentração de cálcio corresponde a $2,5 \times 10^{-3}$ g/ml, foi sugerida uma variação desta concentração. Visto que nenhum relato foi encontrado na literatura, a respeito de qual seria a concentração mais adequada de cálcio para otimização do crescimento de algas, assim como para a produção de polissacarídeos, as concentrações sugeridas como variantes foram 2, 4, 10 e 20x, a concentração de cálcio do meio BBM 3N, correspondendo a 5×10^{-3} , 1×10^{-2} , $2,5 \times 10^{-2}$ e 5×10^{-2} g/ml. A curva de variação das concentrações é mostrada no gráfico 4 a seguir. Observando os dados representados no gráfico, foi determinado que as concentrações de cálcio para o desenvolvimento do cultivo seriam de $2,5 \times 10^{-3}$ g/ml, como controle, 1×10^{-2} g/ml, como uma média do desenvolvimento de biomassa e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml, como o máximo de desenvolvimento de biomassa. Ao término do

cultivo, após 14 dias, o pH foi medido, podendo ser observada uma acidificação do meio assim que a concentração de cálcio é aumentada, e de forma mais acelerada no meio onde foi adicionado CO_2 .

GRÁFICO 4. CULTIVO VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO ADICIONADA AO MEIO BBM 3N, COM E SEM ADIÇÃO DE CO_2 .



* Gráfico relacionando a concentração de CaCl_2 (g/ml) pela biomassa de células (g. 10⁴/ml) pelo pH final do meio, quando as células foram cultivadas por um período de 14 dias, em sistema fechado, em meio essencial de sais (BBM 3N), com e sem adição de CO_2 (10%), tendo pH 7,0, inicial.

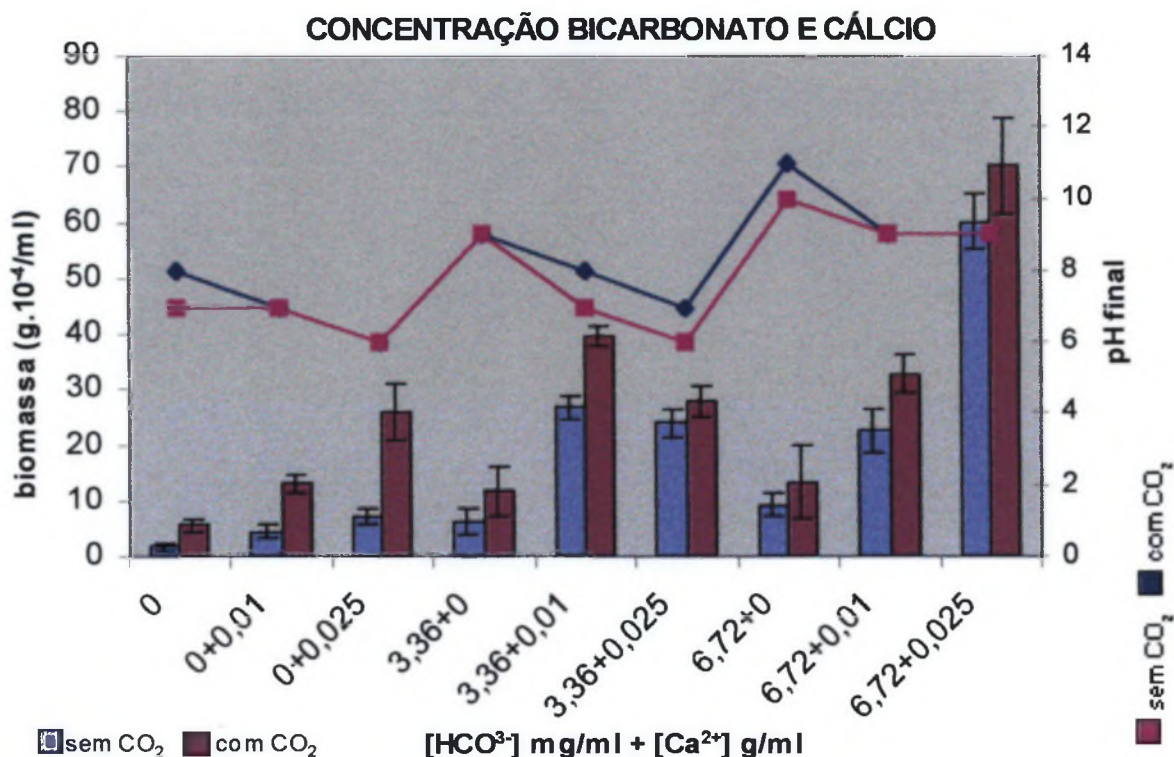
Uma possível explicação para a acidificação do meio corresponde à possibilidade de o cálcio estar sendo utilizado para a síntese de polissacarídeos não celulósicos ácidos, pois sabe-se que o cálcio de alguma forma influencia a síntese de polissacarídeos de parede celular, e que algas verdes de maneira geral podem apresentar parede celular composta de polissacarídeos ácidos, assim como produzir exopolissacarídeos ácidos que se complexão com o cálcio.

5.1.3 Cultivo bicarbonato e cálcio

Após análise dos dados de cultivo, apresentados anteriormente, variando as concentrações de HCO_3^- e cálcio, na ausência e na presença de CO_2 , buscou-se otimizar as condições de crescimento, combinando os dois tratamentos. O resultados das combinações pode ser observado no gráfico 6, onde a maior biomassa esta representada pela combinação de 0,08 mol/L (6,72 mg/ml) de HCO_3^- com $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml de cálcio, tanto quando foi adicionado CO_2 , quando este não foi adicionado. Analisando separadamente os tratamentos, ou seja, levando em consideração, em um primeiro momento apenas a variação da concentração de HCO_3^- , os resultados conferem com os observados no gráfico 3. Assim como quando analisa apenas a variação da concentração de cálcio, os resultados conferem com aqueles apresentados no gráfico 4.

Passando a analisar a combinação dos tratamentos, HCO_3^- e cálcio, observa-se que com o aumento da concentração de cálcio há um aumento da biomassa, com exceção da combinação de 3,36 mg/ml (0,04 mol/L) de HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml de cálcio, ou seja, 4+4, onde há uma maior biomassa do que na combinação 3,36 mg/ml HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml, o que confere com os dados apresentados no gráfico 5, no que diz respeito à concentração de cálcio.

GRÁFICO 6. CULTIVO COMBINANDO AS CONCENTRAÇÕES DE BICARBONATO E CÁLCIO SELECIONADAS DE ACORDO COM A TABELA 1, COM E SEM ADIÇÃO DE CO₂.



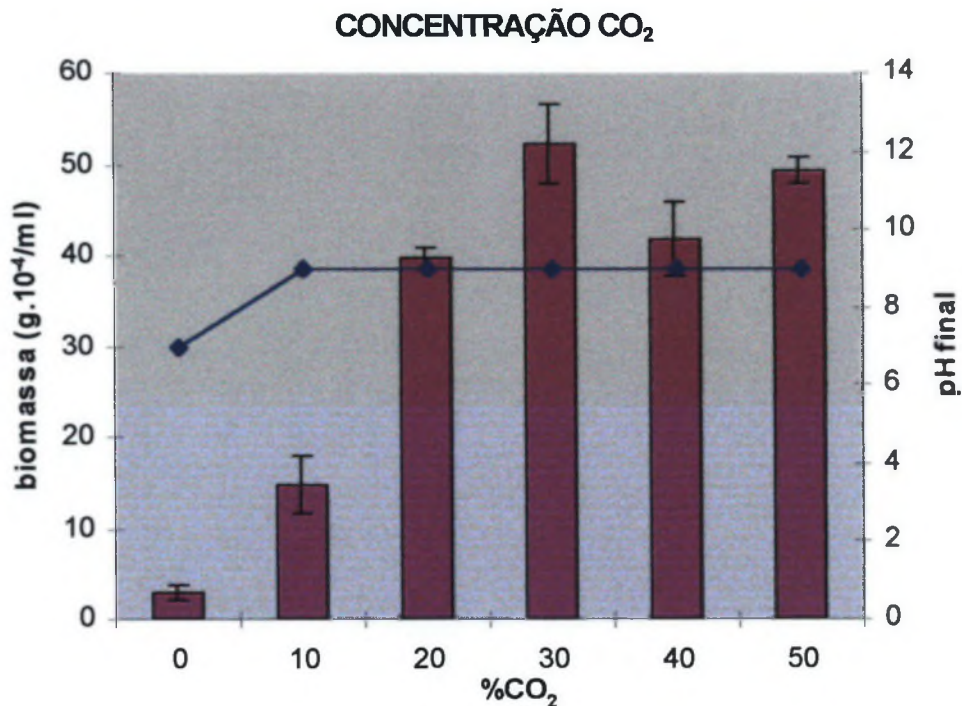
* Gráfico relacionando concentração de Bicarbonato (mg/ml) + Cálcio (g/ml) pela biomassa (g.10⁻⁴/ml) pelo pH final do meio, quando as células foram cultivadas por um período de 14 dias, em sistema fechado, em meio essencial de sais (BBM 3N), com e sem adição de CO₂ (10%), tendo pH 7,0, inicial.

Da mesma forma que foi realizado nos cultivos anteriores, ao seu término, o pH foi medido, podendo ser observada a mesma variação apresentada nos cultivos com diferentes concentrações de HCO₃⁻ e cálcio de forma isolada, ou seja, com o aumento da concentração de HCO₃⁻ há um aumento do pH, e com o aumento da concentração de cálcio, há uma diminuição do pH do meio.

5.1.4 Cultivo porcentagem de CO₂

Observando que com a adição de CO₂ a biomassa é maior do que quando as células são cultivadas sem que este seja adicionado. O fotobionte isolado do líquen *Ramalina celastri*, também foi cultivado em meio BBM 3N, variando a porcentagem de CO₂ injetada no frasco de cultivo (gráfico 7).

GRÁFICO 7. CULTIVO VARIANDO OS NÍVEIS DE CO₂ ADICIONADOS AO FRASCO CONTENDO MEIO BBM 3N, ONDE AS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ESTAVAM SENDO MANTIDAS.



* Gráfico relacionando níveis de CO₂ (%) pela biomassa (g.10⁻⁴/ ml) pelo pH final do meio, quando as células foram cultivadas por um período de 14 dias, em sistema fechado, em meio essencial de sais (BBM 3N), com CO₂, tendo pH 7,0, inicial.

Variando a porcentagem de CO₂ adicionado ao cultivo, observa-se que há um aumento da produção de biomassa, até um certo limite de CO₂, que corresponde a 30% do volume do frasco, onde provavelmente o CO₂ torna-se limitante. A nova elevação da produção de biomassa apresentada em 50% de CO₂, provavelmente esteja representando uma adaptação, cujo mecanismo não é bem conhecido, para posterior estabilização do seu desenvolvimento. Terminado o cultivo, o pH foi medido. Houve variação apenas entre o tratamento controle, sem adição de CO₂ e os demais, que apresentaram valores constantes de pH, à medida que é aumentada a porcentagem de CO₂ adicionada ao cultivo. Como estes tratamentos foram iniciados todos juntos, pode-se inferir que o CO₂ está sendo consumido em uma mesma velocidade em todos os tratamentos, o que explicaria o pH constante, mas

deixa de explicar o aumento de biomassa, a não ser por um maior acúmulo de HCO_3^- na célula algal, para compensar a maior difusão de CO_2 à qual esta sendo imposta.

5.2 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

Seguindo a metodologia descrita anteriormente, para hidrólise ácida total, redução e acetilação, foi possível construir a seguinte tabela (tabela 2), quantificando a composição monossacarídica da biomassa de células para os tratamentos controle, variação da concentração de HCO_3^- e variação da concentração de Ca^{2+} , com e sem adição de 10% de CO_2 .

Como pode ser observado na tabela 2, no que se refere aos controles, há uma variação, na composição de arabinose, a qual apresenta-se reduzida; de glucose apresentando-se aumentada, além da presença de ramnose e glicerol, nos tratamentos onde foi adicionado CO_2 .

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS TRATAMENTOS

FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (%)							
	glu	gal	man	ara	xil	ram	fuc	gli-OH
Controle	6	10	61	5	11	—	7	—
Controle CO_2	16	14	59	1	2	2	3	3
Ca^{2+} 1×10^{-2} g/ml	19	16	17	25	5	18	—	—
Ca^{2+} 1×10^{-2} g/ml CO_2	74	—	26	—	—	—	—	—
Ca^{2+} $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml	87	—	13	—	—	—	—	—
Ca^{2+} $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml CO_2	13	17	55	3	—	—	—	12
HCO_3^- 3,36 mg/ml	17	—	83	—	—	—	—	—
HCO_3^- 3,36 mg/ml CO_2	23	—	58	1	—	2	4	12
HCO_3^- 6,72 mg/ml	19	—	79	—	—	—	—	2
HCO_3^- 6,72 mg/ml CO_2	55	—	34	—	—	11	—	—

* Análise por GLC e GC-MS, após hidrólise ácida total (TFA 8h), redução e acetilação das amostras.

Quando variada a concentração de cálcio, há grande aumento na porcentagem de glucose, comparadas as concentrações 1×10^{-2} g/ml e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml, passando de 19% para 87%, ao mesmo tempo em que galactose, arabinose, xilose e ramnose deixam de ser observadas em $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml. Com adição de 10% de CO_2 , comparando 1×10^{-2} e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml observa-se redução de glucose, de 74% a 13% e aumento de manose, 26% e 55% respectivamente; comparando as concentrações com e sem adição de CO_2 , observa-se que com adição de CO_2 há aumento de glucose e manose, 19% e 74%, 17% e 26%, respectivamente em 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} e diminuição de glucose e aumento de manose, 87% e 13%, 13% e 55%, respectivamente, em $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} . Neste último tratamento, também pode ser observada a presença de galactose (17%), arabinose (3%) e glicerol (12%).

Variando a concentração de bicarbonato adicionada ao meio BBM 3N, o padrão é mantido, ou seja, glucose 17% e 19%, manose 83% e 79%, em 3,36 e 6,72 mg/ml, respectivamente. Adicionando CO_2 há um aumento de glucose e redução de manose, tanto quando comparados os tratamentos de mesma concentração entre si, com e sem adição de CO_2 ou de concentrações diferentes, com CO_2 .

O aumento da concentração de glucose, observada quando adicionado CO_2 ao meio onde foi variada a concentração de HCO_3^- pode estar refletindo a degradação do amido, possivelmente produzido em maior quantidade nestes tratamentos, o que pode ser inferido pela observação do aumento de granulometria das células, dados apresentados a seguir.

Com adição de cálcio, observa-se uma redução do teor de glucose, resultado esperado, visto que se sabe que o cálcio pode influenciar a biossíntese de polissacarídeos não celulósicos e que não sejam o amido.

5.4 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Para analisar morfológicamente as amostras, assim que o cultivo foi terminado, uma alíquota (1 ml), do meio, contendo as células do fotobionte, foi separada para análise de microscopia óptica, na forma de imagem fotográfica, e outra alíquota (1 ml), foi separada para análise morfológica em citômetro de fluxo. Ambas as análises complementam-se, sendo que o observado pela microscopia eletrônica é confirmado pela citometria.

Os tratamentos analisados foram aqueles previamente determinados e discutidos anteriormente, ou seja, os controles com e sem adição de CO₂, e os demais tratamentos, também tanto quando crescidos com e sem adição de CO₂, correspondendo à: 3,36 e 6,72 mg/ml de HCO₃⁻; 1x10⁻² e 2,5x10⁻² g/ml de Ca²⁺; e a combinação destes dois tratamentos.

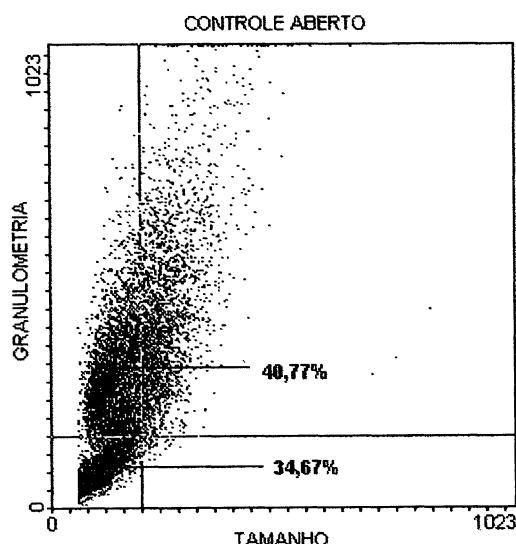
Baseando-se nos dados de citometria, e com a utilização do programa WinMDI 2.8 é possível realizar a seguinte análise, quanto ao tamanho e a granulometria das células, de acordo com as figuras apresentadas. Para a análise morfológica os mesmos dados apresentados anteriormente estão sendo demonstrados a seguir, mas na forma de histogramas, permitindo a comparação mais fina entre os tratamentos aos quais foram submetidas às células do fotobionte.

5.4.1 Controles

Quando o fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri* foi cultivado em sistema aberto, permitindo a ocorrência de trocas gasosas, analisados os aspectos de granulometria e tamanho, pode-se observar pelo padrão apresentado pela área de plotagem deste tratamento (gráfico 8), que as células dividem-se em duas populações, uma abaixo e a esquerda, e outra acima e à esquerda. As populações de células dividem-se em: representantes muito pequenos

e pouco granuloso (34,67%) e pequenos, mas de granulometria média (40,77%), quando comparadas entre si. Há também uma fração significativa de células de maior tamanho e granulometria, representando 24,04% do total de 10^4 células analisadas. Quando o fotobionte foi cultivado em meio BBM 3N, em sistema fechado, apresenta-se caracteristicamente composto por uma única população de células, a qual é constituída por células de diferentes tamanhos e granulometrias, sendo estas variáveis e proporcionais entre si, ou seja, há uma relação direta entre o tamanho da célula e sua granulometria (gráfico 9). No cultivo, onde foi adicionado 10% de CO_2 , porcentagem essa equivalente ao volume do frasco (gráfico 10), observa-se uma população de células, basicamente dividida da mesma forma que a apresentada no gráfico 8. Sendo que 70,66% do total de 10^4 células analisadas são de pequeno tamanho e granulometria, apresentando tendência ainda, há um aumento de tamanho, quando comparada a população apresentada anteriormente (gráfico 9).

GRÁFICO 8. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA -CULTIVO MEIO BBM 3N, ABERTO.



* Gráfico das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

GRÁFICO 9. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, FECHADO.

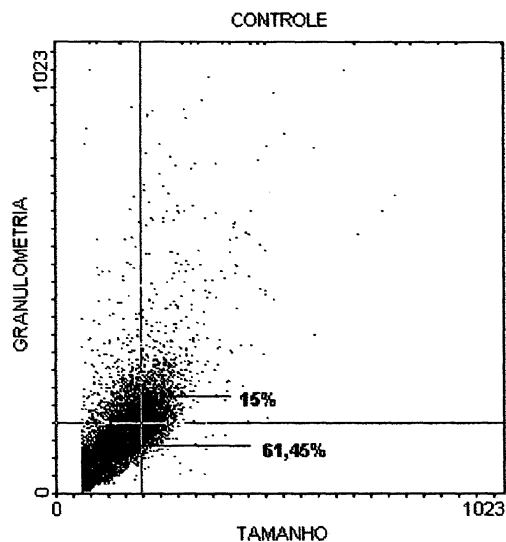
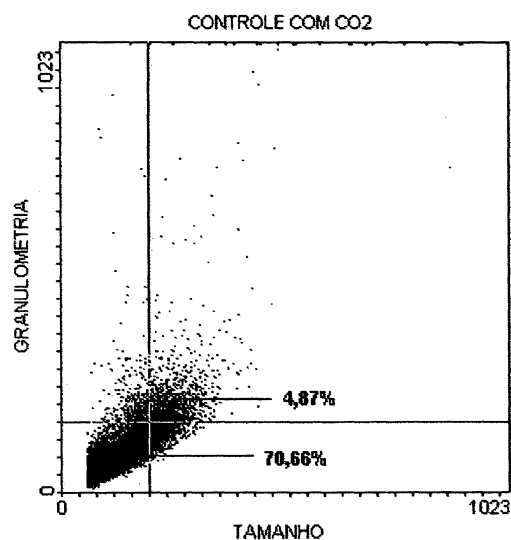


GRÁFICO 10. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA – CULTIVO MEIO BBM 3N, FECHADO COM CO₂.



* Gráficos das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

As posições acima, abaixo, à esquerda e a direita são referentes ao quadrante xy selecionado, 200, 160, respectivamente. O qual foi selecionado por caracterizar uma divisão clara das duas populações apresentadas no gráfico 8, servindo então, como um controle padrão para as demais análises.

Complementando e ilustrando as representações gráficas acima, são apresentadas as imagens de microscopia óptica, figuras 1 e 2, dos representantes cultivados neste tratamento controle, em sistema fechado, sem e com adição de CO₂, respectivamente.



FIGURA 1. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, FECHADO.

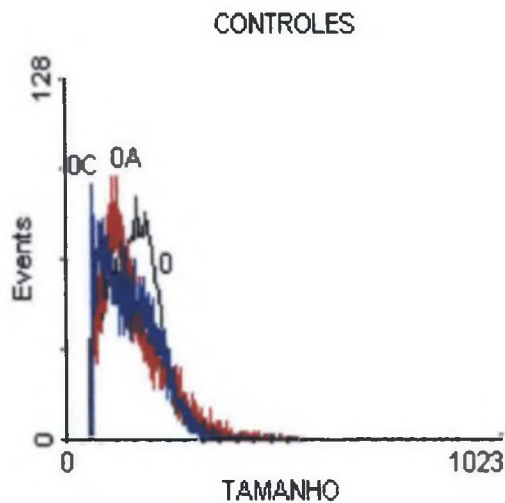


FIGURA 2. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, FECHADO, COM ADIÇÃO DE 10% DE CO₂.

As imagens de microscopia ópticas apresentadas acima corroboram os dados obtidos através das análises de citometria. Com estas observações, é possível inferir que a adição de CO₂, interfere na morfologia da célula, modificando-a quando comparada com as células crescidas no controle sem a adição de CO₂, fazendo com que as células respondam de maneira diferente ao tratamento, apresentando assim um maior rendimento em biomassa.

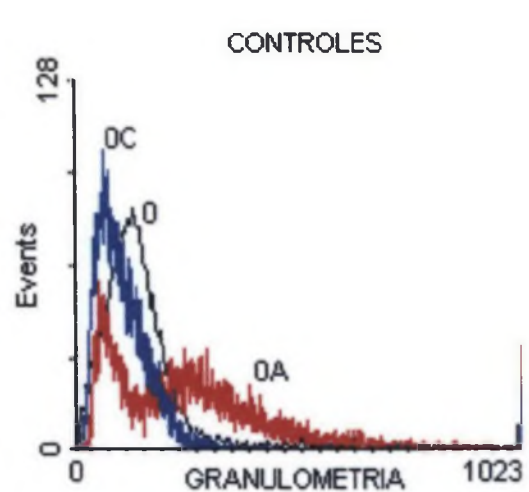
Os histogramas apresentados a seguir (gráficos 11 e 12), permitem uma análise mais fina dos resultados demonstrados nos gráficos 8, 9 e 10 e nas figuras 1 e 2, possibilitando melhor visualização dos efeitos de cada tratamento sobre a morfologia das células do fotobionte.

GRÁFICO 11. HISTOGRAMA DO TRATAMENTO CONTROLE - TAMANHO X NÚMERO DE CÉLULAS.



* Gráfico tamanho por número de células, comparando os tratamentos controle, apresentados anteriormente.

GRÁFICO 12. HISTOGRAMA DO TRATAMENTO CONTROLE - GRANULOMETRIA X NÚMERO DE CÉLULAS.



* Gráfico granulometria por número de células, comparando os tratamentos controle, apresentados anteriormente.

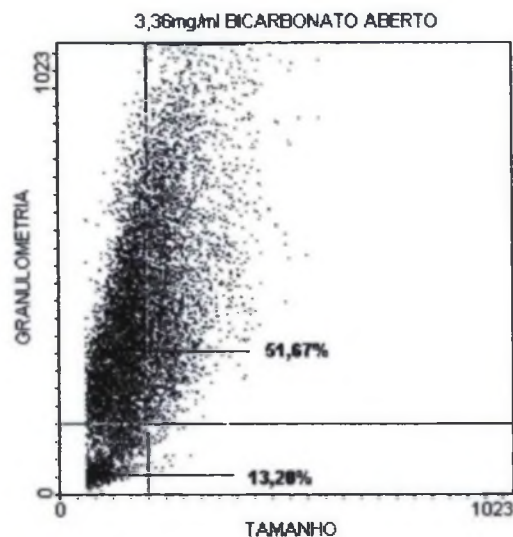
A adição de CO_2 provoca uma diminuição do tamanho das células, em comparação aos demais tratamentos, e no cultivo em sistema aberto, as células apresentam maior granulometria.

5.4.2 Cultivo Bicarbonato (HCO_3^-)

Sendo o fotobionte cultivado na concentração de 3,36 mg/ml de HCO_3^- , em sistema aberto (gráfico 13), as células dividem-se novamente em duas populações, como observado no controle aberto, mas diferente deste, há uma população (abaixo à esquerda), representada por 13,20% de 10^4 células, muito pequena, enquanto a outra população, acima à esquerda, representada por 51,67% do total de células analisadas, muito heterogênea, constituída por células, praticamente do mesmo tamanho, mas de granulometria muito variada, ultrapassando o limite do quadrante selecionado, pode-se observar que esta mesma população apresenta células maiores, 34,71%. Em sistema fechado (gráfico 14), assim como foi observado no controle fechado quando comparado ao controle aberto, as células passam a formar uma única população, as quais apresentam uma diminuição da granulometria e do

tamanho (54,83% de 10^4 células), mas apresentando ainda, quantidade significativa de células de maior granulometria (22,56%) e maior tamanho e granulometria (20,40%). Diferentemente do controle fechado, neste tratamento as células apresentam uma maior heterogeneidade, ou seja, apresentando células maiores e de maior granulometria, enquanto naquele, a população de células apresenta-se de forma mais homogênea, sem grande variação morfológica, quando comparado aos dados apresentados no gráfico 14. Com a adição de CO_2 ao cultivo, quando variada a concentração de HCO_3^- (gráfico 15), pode observar-se à manutenção da tendência de redução da granulometria das células, apresentada no gráfico 14, quando o fotobionte foi cultivado em sistema fechado, sem adição de CO_2 . Além de tender a diminuir a granulometria, as células do fotobionte, isoladas do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, apresentam um pequeno tamanho, 50,08% das 10^4 células analisadas, enquanto algumas apresentam mesmo tamanho e maior granulometria (16,85%), e outras, maior tamanho, ao mesmo tempo em que possuem maior granulometria (18,34%).

GRÁFICO 13. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 3,36 mg/ml HCO_3^- , ABERTO.



* Gráfico das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

GRÁFICO 14. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 3,36 mg/ml HCO_3^- ,

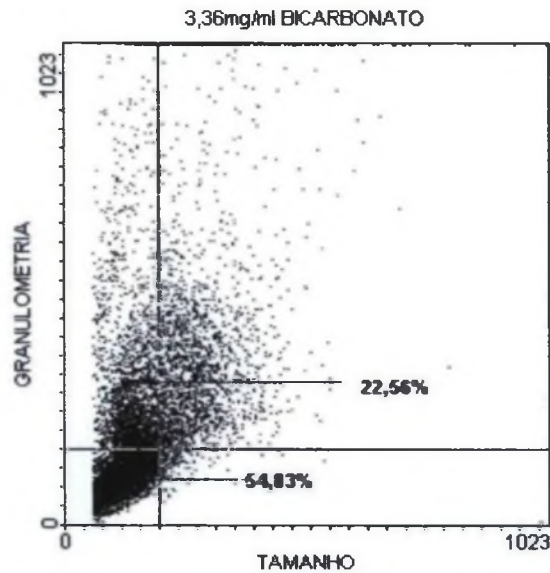
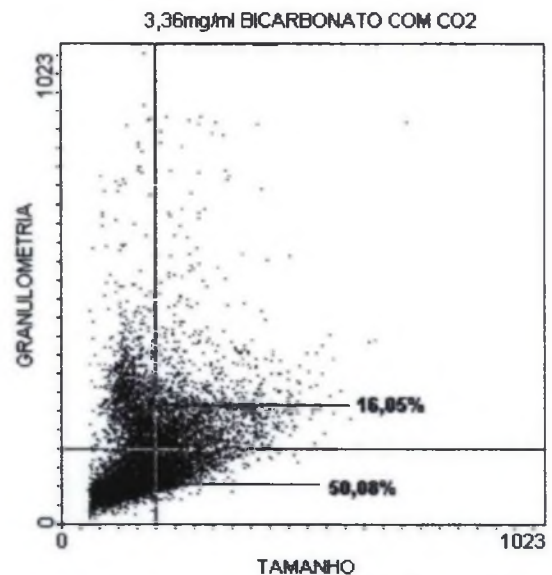


GRÁFICO 15. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 3,36 mg/ml HCO_3^- E CO_2 , FECHADO.



* Gráficos das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

As figuras 3 e 4 correspondem às imagens de microscopia óptica das células crescidas quando variada a concentração de HCO_3^- adicionada ao meio BBM 3N, onde foram cultivadas as células do fotobionte, sem e com adição de CO_2 , respectivamente, na concentração 3,36 mg/ml de HCO_3^- , em sistema fechado. Onde podem ser observadas as variações morfológicas apresentadas pelas células, como resposta ao tratamento a que foram submetidas.

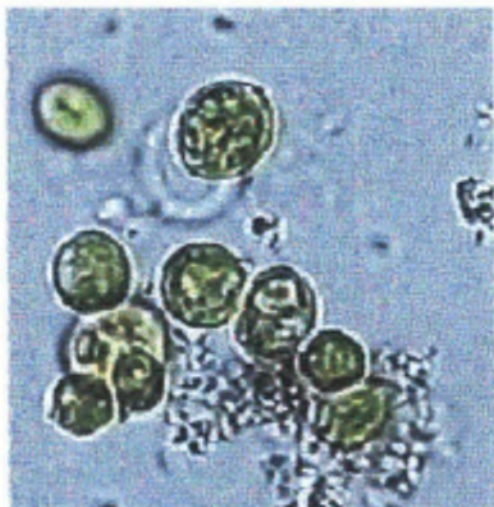


FIGURA 3. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DE CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, NA CONCENTRAÇÃO DE 3,36 mg/ml DE HCO_3^- , FECHADO.

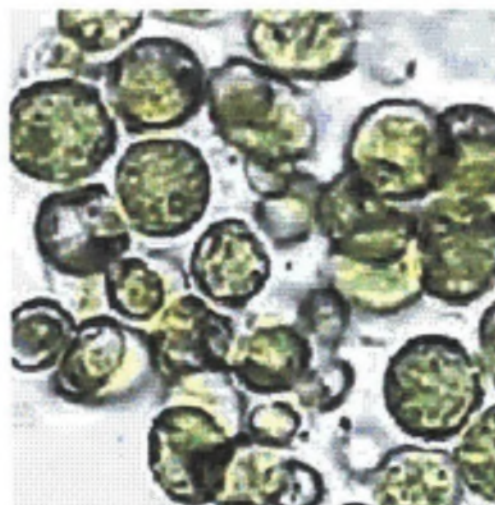
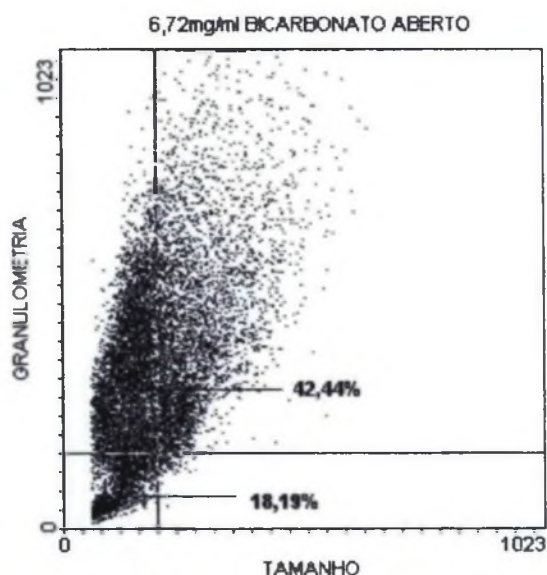


FIGURA 4. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, NA CONCENTRAÇÃO DE 3,36 mg/ml DE HCO_3^- , COM ADIÇÃO DE CO_2 FECHADO.

Com o fotobionte crescido na concentração de 6,72 mg/ml de HCO_3^- , em sistema aberto (gráfico 16), as células apresentam respostas muito semelhantes às células crescidas tanto no controle, quanto com adição de 3,36 mg/ml de HCO_3^- , com algumas variações, mas ainda apresentando-se constituída por duas populações, sendo uma de células de maior granulometria, representada por 42,44% do total de células, e outra por células de pequeno tamanho, como a população descrita, mas de menor granulometria, 18,19%, esta população estende-se, apresentando também células de maior tamanho e granulometria, 38,35%. Caracteristicamente, neste tratamento, as células apresentam-se muito heterogêneas, assim como nos demais cultivos em sistema aberto. Em sistema fechado (gráfico 17) há uma diminuição da granulometria das células, quando estas apresentam pequeno tamanho (19,69 e 27,85%, células à esquerda), enquanto que células de maior tamanho, tendem a apresentar maior granulometria, 49,61% das células analisadas, quando crescidas sob estas condições. Com a adição de CO_2 ao cultivo (gráfico 18), há uma redução da granulometria das células, quando estas apresentam um pequeno tamanho,

27,64% do total de células analisadas, mais evidente do que quando adicionado 3,36 mg/ml de HCO_3^- , com o aumento do tamanho das células, a granulometria tende a aumentar (56,31%), mas não de maneira proporcional, sendo que o aumento de tamanho não está implicando em maior granulometria, pois há células de maior tamanho e menor granulometria.

GRÁFICO 16. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA. - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 6,72 mg/ml HCO_3^- , ABERTO.



* Gráfico das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

GRÁFICO 17. ÁREA DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 6,72 mg/ml HCO_3^- , FECHADO.

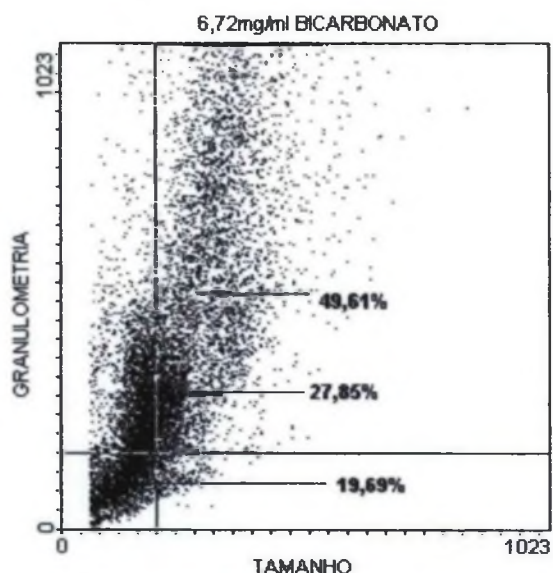
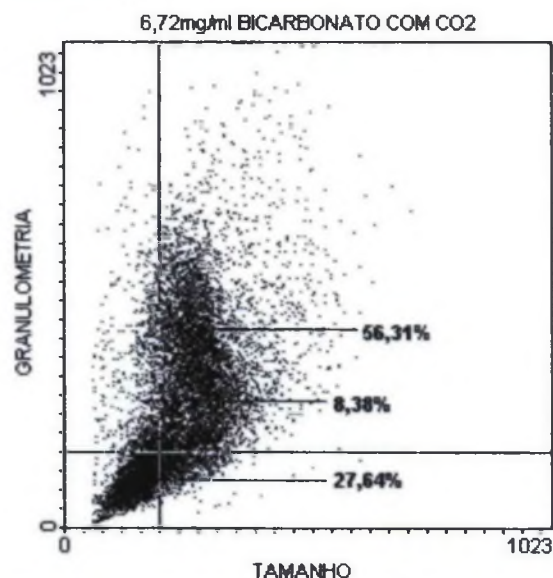


GRÁFICO 18. ÁREA DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 6,72 mg/ml HCO_3^- , E CO_2 , FECHADO.



* Gráficos das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

Para ilustrar os dados dos gráficos apresentados acima, quando as células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri* foram cultivadas em meio essencial de sais, BBM 3N, com adição de 6,72 mg/ml de HCO_3^- , em sistema fechado sem e com adição de CO_2 são apresentadas às imagens de microscopia óptica (figuras 5 e 6), obtidas das células quando crescidas sob as condições pré estabelecidas para este tratamento.

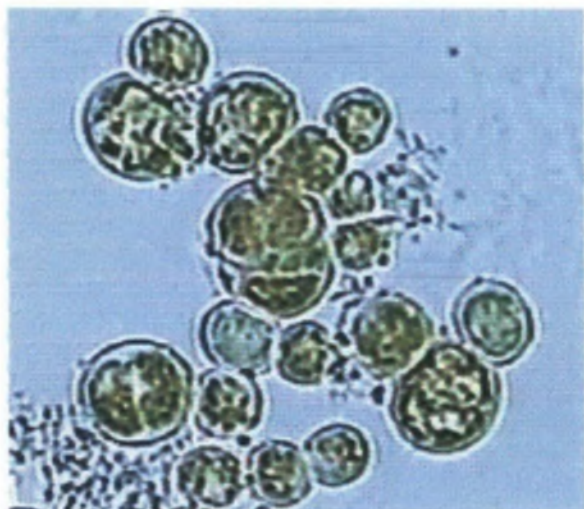


FIGURA 5. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celsa*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, NA CONCENTRAÇÃO DE 6,72 mg/ml DE HCO_3^- , FECHADO.

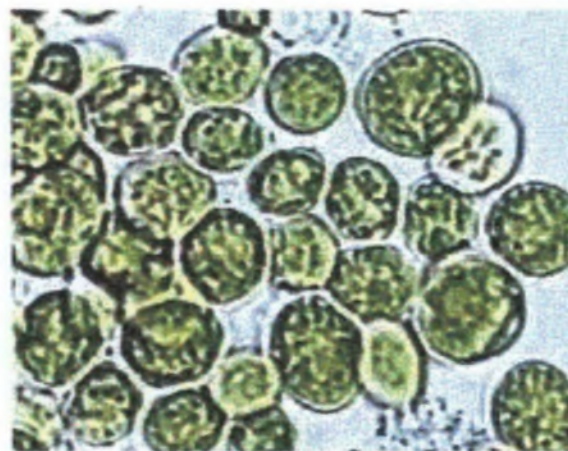
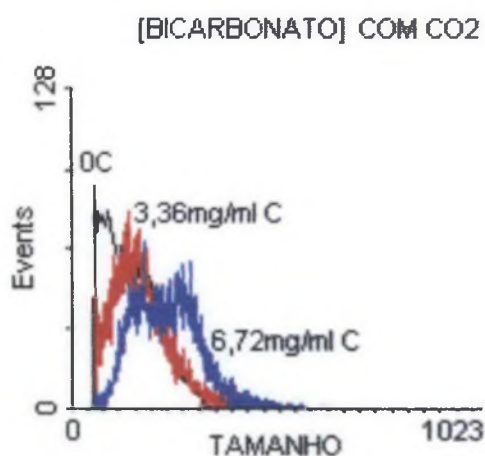


FIGURA 6. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celsa*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, NA CONCENTRAÇÃO DE 6,72 mg/ml DE HCO_3^- , COM ADIÇÃO DE 10% DE CO_2 , FECHADO.

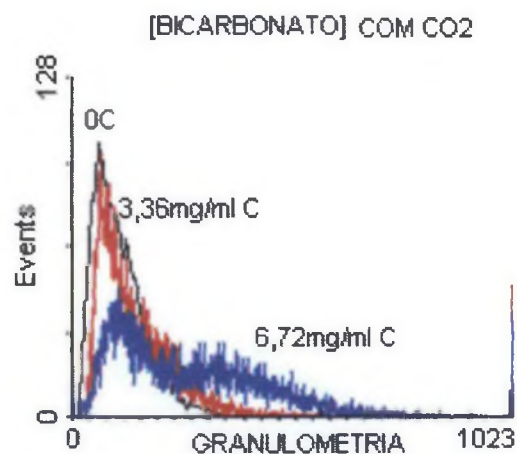
Para que possa ser feita uma comparação entre os efeitos da variação da concentração de HCO_3^- adicionado ao meio de cultura, os histogramas a seguir (gráficos 19 e 20) são apresentados, sobrepondo os resultados da variação de tamanho e granulometria, em resposta ao meio, comparando-os com o controle.

GRÁFICO 19. HISTOGRAMA DO TRATAMENTO BICARBONATO – TAMANHO X NÚMERO DE CÉLULAS.



* Gráfico tamanho por número de células, comparando os tratamentos controle, apresentados anteriormente.

GRÁFICO 20. HISTOGRAMA DO TRATAMENTO BICARBONATO – GRANULOMETRIA X NÚMERO DE CÉLULAS.



* Gráfico granulometria por número de células, comparando os tratamentos controle, apresentados anteriormente.

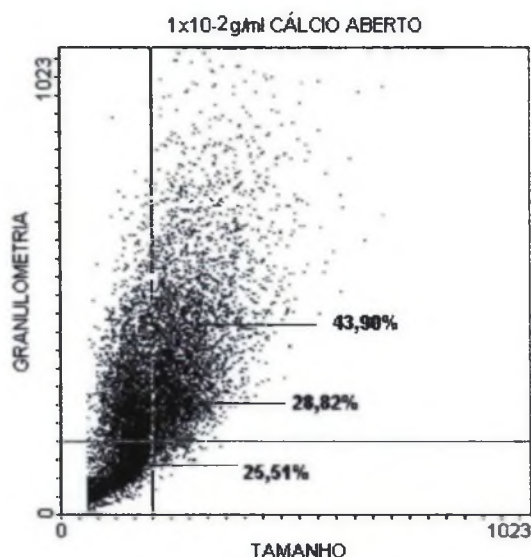
Pode-se observar que o aumento da concentração de HCO_3^- adicionado ao meio de cultivo, provoca um aumento do tamanho e uma grande variação da granulometria das células. São construídos apenas, para os tratamentos onde foram variadas as concentrações de HCO_3^- , com adição de CO_2 , sendo que os tratamentos, aberto e fechado sem adição de CO_2 apresentam as mesmas variações, quando submetidos ao mesmo tipo de análise.

5.4.3 Cultivo Cálcio (Ca^{2+})

Quando testadas as variações de cálcio adicionadas ao meio de cultivo, BBM 3N, analisando as células crescidas na concentração de 1×10^{-2} g/ml, em sistema aberto (gráfico 21), a população de células apresenta-se heterogênea, constituindo apenas uma população de células, a qual é formada por células pequenas, 28,82% e 25,51%, representadas à esquerda do quadrante selecionado, que possuem pequena e grande granulometria, respectivamente. Células de maior tamanho, à direita do quadrante selecionado, correspondendo a 43,90% do total de 10^4 células analisadas são de maior tamanho e granulometria, proporcionalmente, sendo que à medida que o tamanho aumenta a granulometria também aumenta. Diferindo dos cultivos em sistema aberto apresentado anteriormente, este não se apresenta dividido em duas populações. No cultivo em sistema fechado (gráfico 22), as células seguem o padrão apresentado pelas células cultivadas no mesmo tratamento, mas quando em sistema aberto, apresentando uma relação, aumento de tamanho aumento de granulometria. A população de células é dividida em três tipos principais de células, pequenas e de pequena granulometria (41,70%), pequenas e de maior granulometria (20,20%) e de maior tamanho e granulometria (33,29%), quando comparadas com entre si. Adicionando CO_2 (gráfico 23), as células do fotobionte, apresentam o mesmo padrão do gráfico 22, tendendo a uma redução de tamanho em células de baixa granulometria, 73,52%. Assim como tratamento

anterior, as células também são pequenas, de maior granulometria (10,24%), ou de maior granulometria e tamanho (13,20%), seguindo o mesmo padrão apresentado anteriormente.

GRÁFICO 21. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE $1 \times 10^{-3} \text{g/ml Ca}^{2+}$, ABERTO.



* Gráfico das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

GRÁFICO 22. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE $1 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, FECHADO.

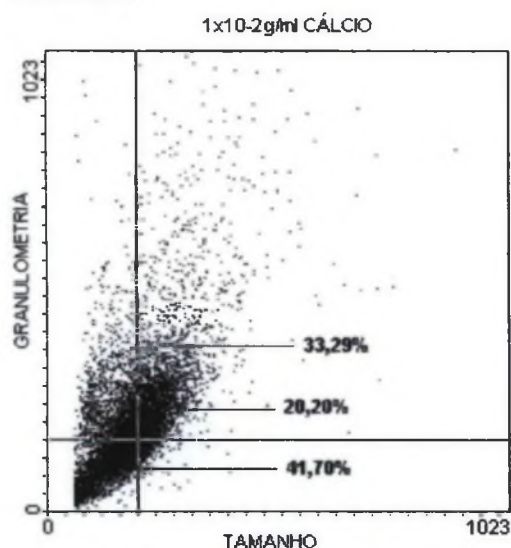
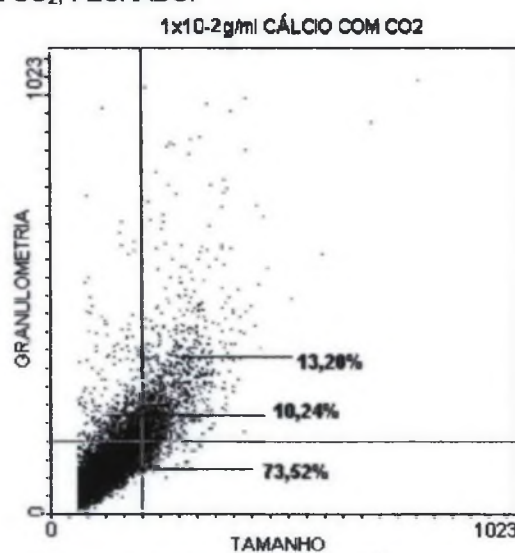


GRÁFICO 23. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA, CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE $1 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, E CO_2 , FECHADO.



* Gráficos das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

Para ilustrar os dados dos gráficos 22 e 23 são apresentadas as figuras de microscopia óptica (figuras 7 e 8), das células do fotobionte cultivadas em meio BBM 3N na concentração de 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , sem e com adição de CO_2 , respectivamente.

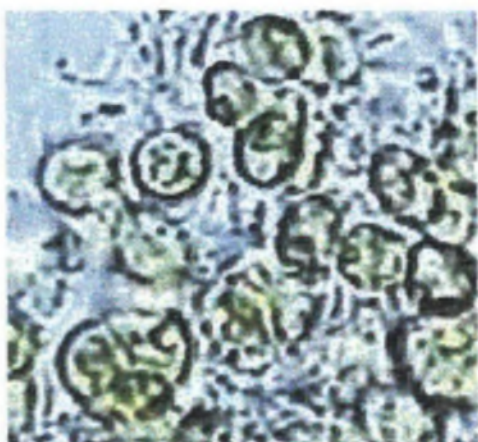


FIGURA 7. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, NA CONCENTRAÇÃO 1×10^{-2} g/ml DE Ca^{2+} , FECHADO.

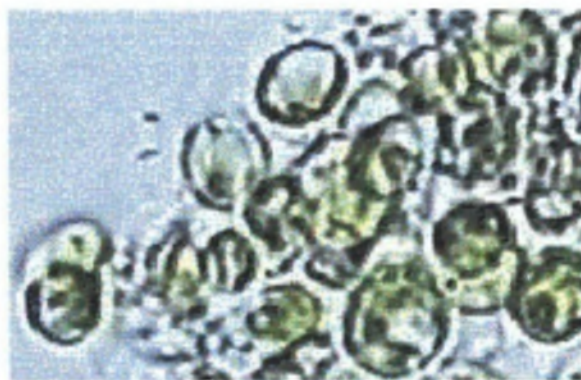
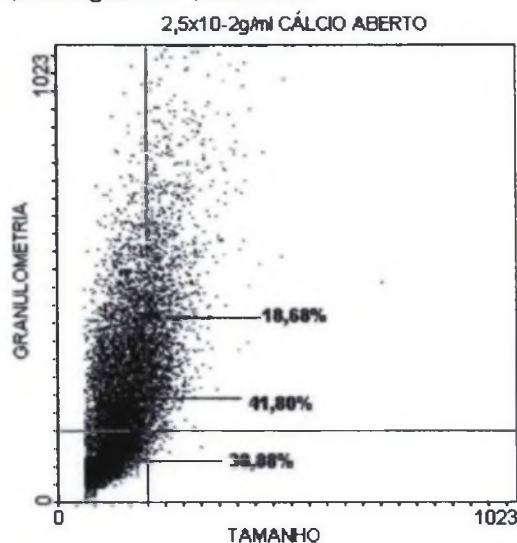


FIGURA 8. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, NA CONCENTRAÇÃO 1×10^{-2} g/ml DE Ca^{2+} , COM ADIÇÃO DE 10% DE CO_2 FECHADO.

Quando o fotobionte é crescido na concentração $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml de cálcio, em sistema aberto (gráfico 24), este apresenta maior uniformidade quanto ao tamanho, quando comparado aos tratamentos anteriormente analisados, sendo a granulometria, o aspecto variável, decorrente das condições do cultivo, ou seja, o tamanho das células é mantido pequeno, enquanto que a granulometria, de pequena a grande, 38,88% e 41,80%, respectivamente. Já em sistema fechado (gráfico 25), há uma certa uniformização da população, devido a uma redução da granulometria e manutenção do tamanho das células, sendo a população formada de células pequenas quanto a granulometria e tamanho, equivalente a 54,91%. Além de tender a um aumento de tamanho das células, correspondendo a 20,52% do total de 10^4 células analisadas. Aquelas que mantiveram o padrão apresentado quando o cultivo foi realizado em sistema aberto, passam a representar 21,71% da população de células, por isso a inferência à tendência de uniformizar a população, pela redução

da granulometria. Com a adição de CO_2 (gráfico 26), as células constituem uma única população, de menor tamanho e granulometria, quando comparadas às variações deste tratamento, correspondendo a 65,01% do total de células.

GRÁFICO 24. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE $2,5 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, ABERTO.



* Gráfico das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

GRÁFICO 25. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE $2,5 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, FECHADO.

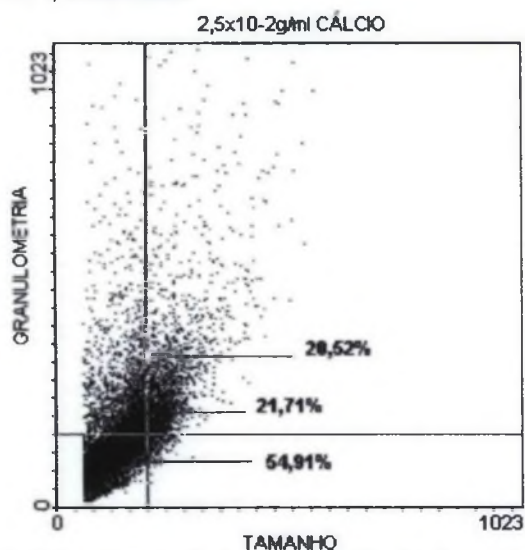
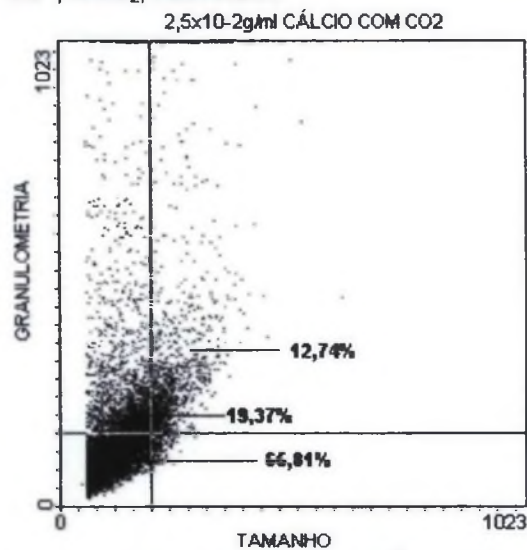


GRÁFICO 26. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE $2,5 \times 10^{-2} \text{g/ml Ca}^{2+}$, E CO_2 , FECHADO.



* Gráfico das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

As figuras 9 e 10 correspondem às imagens de microscopia óptica das células crescidas quando variada a concentração de Ca^{++} , adicionada ao meio BBM 3N, onde foram cultivadas as células do fotobionte, sem e com adição de CO_2 , respectivamente, na concentração $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml de HCO_3^- , em sistema fechado. Onde podem ser observadas as variações morfológicas apresentadas pelas células, como resposta ao tratamento a que foram submetidas.

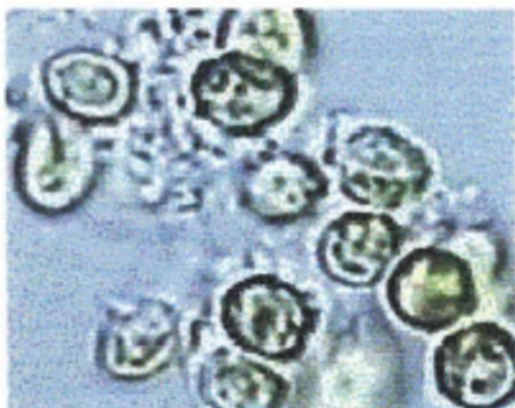


FIGURA 9. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, NA CONCENTRAÇÃO $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml DE Ca^{2+} , FECHADO.

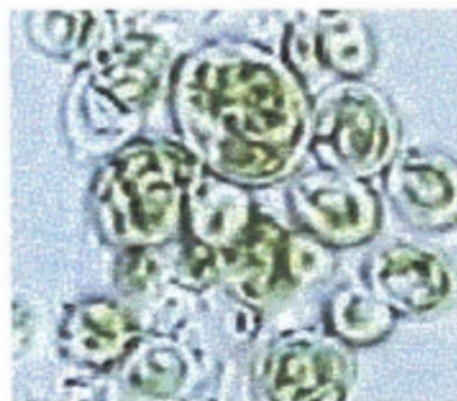
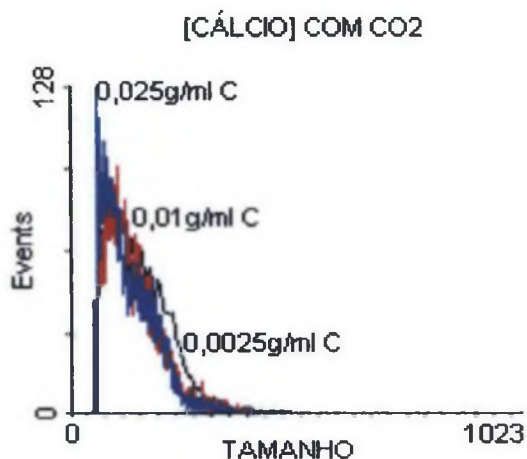


FIGURA 10. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, NA CONCENTRAÇÃO $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml DE Ca^{2+} , COM ADIÇÃO DE 10% DE CO_2 FECHADO.

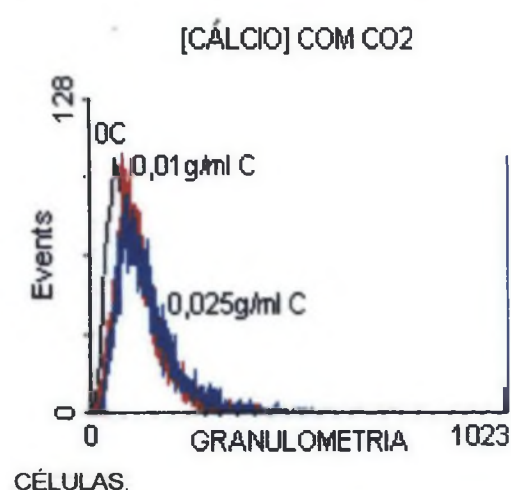
Os histogramas a seguir da mesma maneira que os apresentados anteriormente (gráficos 27 e 28), permitem comparar os dados obtidos, mas quando variada a concentração de cálcio adicionada ao meio.

GRÁFICO 27. HISTOGRAMA DO TRATAMENTO CÁLCIO – TAMANHO X NÚMERO DE CÉLULAS.



* Gráfico tamanho por número de células, comparando os tratamentos controle, apresentados anteriormente.

GRÁFICO 28. HISTOGRAMA DO TRATAMENTO CÁLCIO – GRANULOMETRIA X NÚMERO DE



* Gráfico granulometria por número de células, comparando os tratamentos controle, apresentados anteriormente.

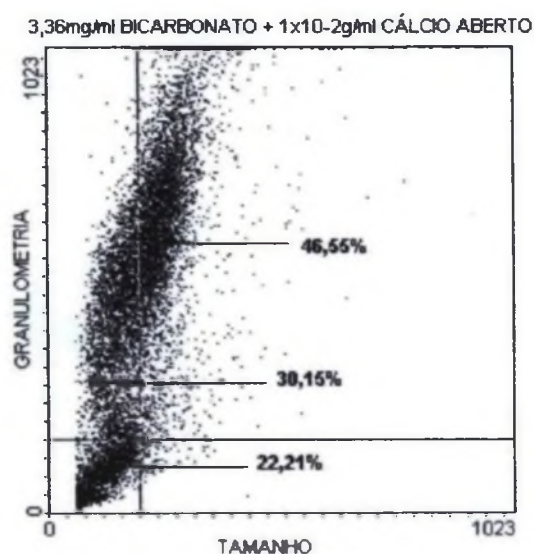
É possível observar, que com o aumento da concentração de cálcio, há uma redução do tamanho das células (gráfico 27), e um pequeno aumento da granulometria (gráfico 28), quando as células são crescidas em frascos, onde foi adicionado CO₂, pelos demais tratamentos, em sistema aberto e fechado sem adição de CO₂, apresentarem os mesmos padrões, quando submetidos ao mesmo tipo de análise.

5.4.4 Cultivo combinação de tratamentos – Bicarbonato (HCO₃⁻) e Cálcio (Ca²⁺)

Quando combinados os tratamentos, 3,36 mg/ml HCO₃⁻ e 1x10⁻² g/ml Ca²⁺, em sistema aberto (gráfico 29), pode-se observar uma divisão muito clara de duas populações de células, sendo uma de constituída por representantes pequenos e pouco granulosa (22,21%), pequenos e maior granulometria (30,15%) e maiores quanto a granulometria e tamanho (46,55%), retomando o padrão de células apresentados nos tratamentos controle e variação da concentração de HCO₃⁻. Em sistema fechado (gráfico 30), as células tendem a uniformidade, onde pode ser observada uma população de células, que quando comparada ao cultivo em meio

aberto, apresenta células de tamanho e granulometria reduzidos. A maior parte das células é de pequeno tamanho e granulometria média, correspondendo a 47,57% do total de células analisadas para este tratamento, e apresentando ainda, células pequenas e de pequena granulometria (22,62%) e maiores em tamanho, variando a granulometria de média a grande (26,72%). No cultivo onde foi adicionado CO₂ (gráfico 31), a população de células apresenta tendência a uma divisão em duas populações, sendo esta da seguinte maneira, uma de células pequenas e de pequena granulometria, correspondendo a 41,51% do total de 10⁴ células analisadas para este tratamento, e outra de células pequenas e maior granulometria, em comparação a anterior, representada por 46,78%.

GRÁFICO 29. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 3,36 mg/ml HCO₃⁻ E 1X10⁻² g/ml Ca²⁺, ABERTO.



* Gráfico das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10⁴ em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

GRÁFICO 30. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 3,36 mg/ml HCO_3^- E 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , FECHADO.

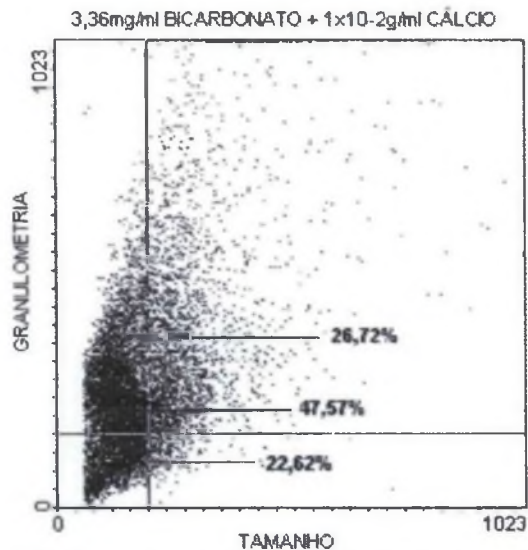
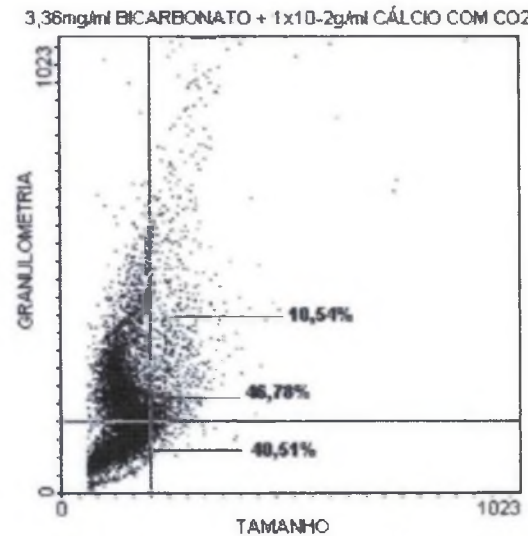


GRÁFICO 31. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 3,36 mg/ml HCO_3^- , 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , E CO_2 , FECHADO.



* Gráficos das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

Complementando e ilustrando os gráficos 30 e 31, acima são apresentadas as figuras de microscopia óptica (figura 11 e 12) do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*, quando crescido em meio BBM 3N, combinadas às concentrações 3,36 mg/ml HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , sem e com adição de CO_2 , respectivamente.



FIGURA 11. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, COMBINANDO AS CONCENTRAÇÕES 3,36 mg/ml DE HCO_3^- E 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , FECHADO.

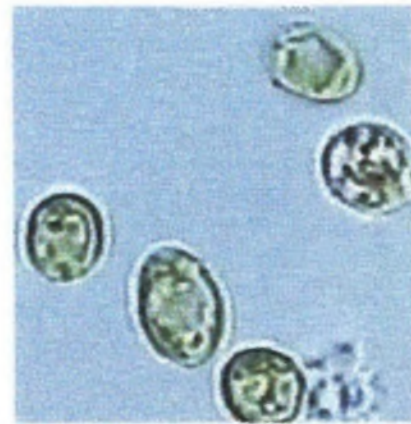
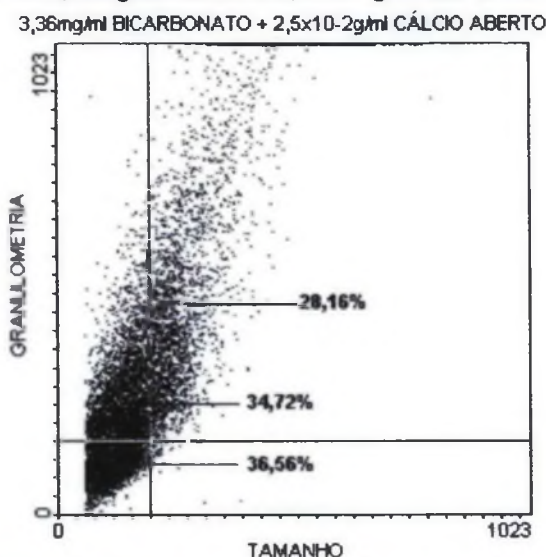


FIGURA 12. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, COMBINANDO AS CONCENTRAÇÕES 3,36 mg/ml DE HCO_3^- E 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , COM ADIÇÃO DE 10% DE CO_2 , FECHADO.

Crescendo o fotobionte com $3,36 \text{ mg/ml HCO}_3^-$ e $2,5 \times 10^{-2} \text{ g/ml Ca}^{2+}$, em sistema aberto, forma-se uma população de células, constituída por 36,56% de células de pequeno tamanho e granulometria, 34,72% de células pequenas e granulometria média, além de 28,16% de células de maior tamanho e granulometria variando de média a grande (gráfico 32). Neste caso as células do fotobionte fogem do padrão apresentado pelos tratamentos controle e variação da concentração de HCO_3^- , assumindo o padrão apresentado nos tratamentos onde foi variada apenas a concentração de cálcio. Em sistema fechado (gráfico 33) a população de células apresenta-se dividida em representantes pequenos e de pequena granulometria (41,11%), pequenos e de maior granulometria (31,16%) e de maior tamanho e granulometria variável (24,99%). Adicionando CO_2 (gráfico 34), pode ser observada uma redução do tamanho e granulometria das células, quando comparado ao cultivo sob as mesmas condições, mas em sistema aberto ou fechado, sem adição de CO_2 .

GRÁFICO 32. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVADAS EM MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE $3,36 \text{ mg/ml HCO}_3^-$, E $2,5 \times 10^{-2} \text{ g/ml Ca}^{2+}$, ABERTO.



* Gráfico das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

GRÁFICO 33. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 3,36 mg/ml HCO_3^- E $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , FECHADO.

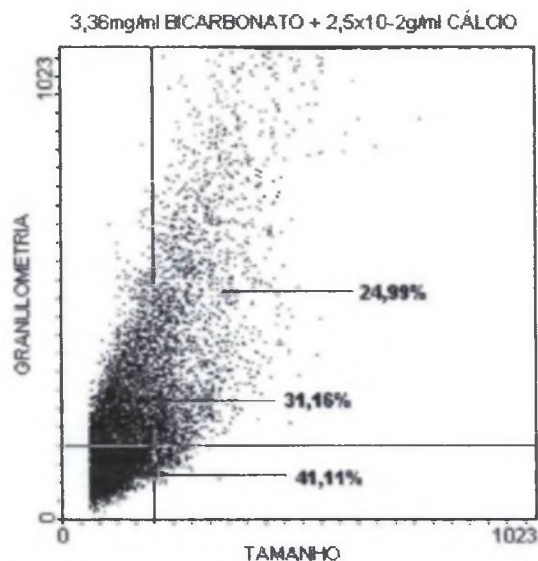
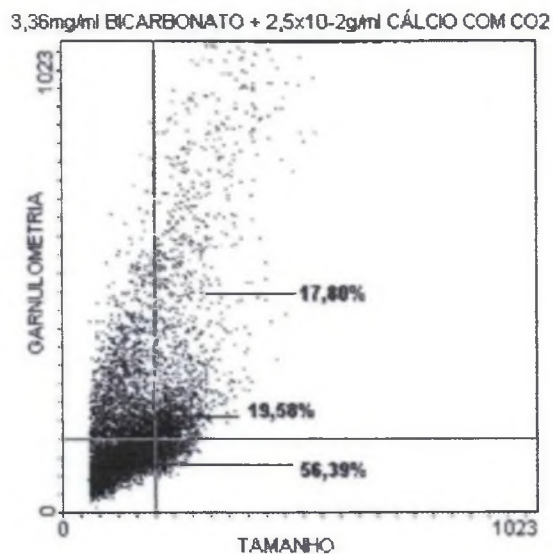


GRÁFICO 34. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 3,36 mg/ml HCO_3^- , $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , E CO_2 , FECHADO.



* Gráficos das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

As figuras 13 e 14, apresentadas a seguir ilustram e complementam os dados apresentados nos gráficos 33 e 34, referentes ao cultivo do fotobionte, em meio BBM 3N, combinando as concentrações 3,36 mg/ml HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , sem e com adição de CO_2 , respectivamente.

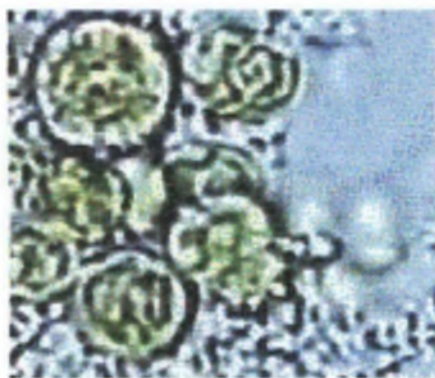


FIGURA 13. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, COMBINANDO AS CONCENTRAÇÕES 3,36 mg/ml DE HCO_3^- E $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , FECHADO.

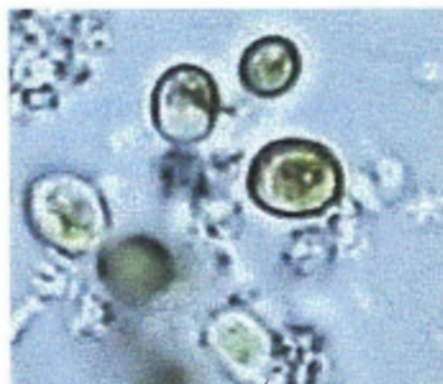
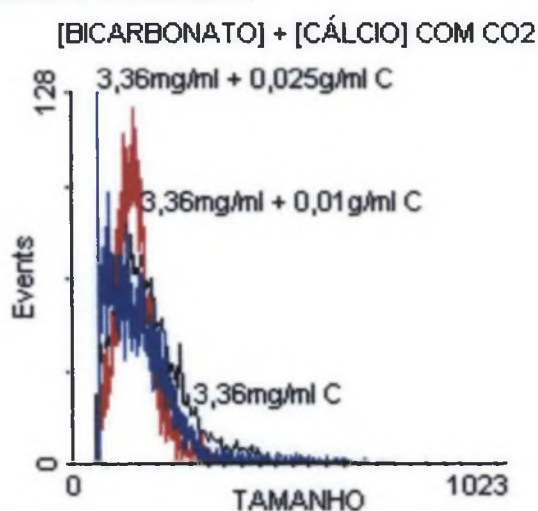


FIGURA 14. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, COMBINANDO AS CONCENTRAÇÕES 3,36 mg/ml DE HCO_3^- E $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , COM ADIÇÃO DE 10% DE CO_2 , FECHADO.

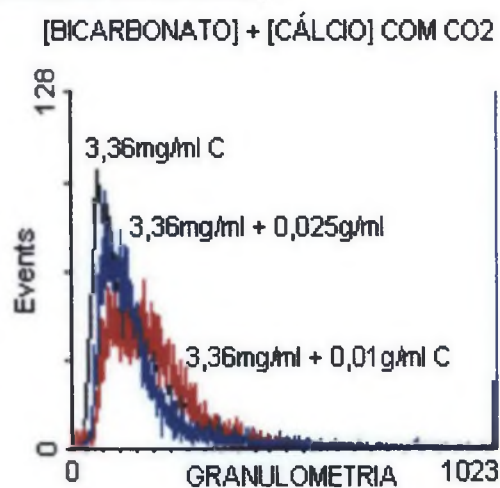
Complementando os dados apresentados anteriormente, com relação ao tratamento onde foram variadas as concentrações de HCO_3^- , 3,36 mg/ml e a de cálcio, 1×10^{-2} e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml, os histogramas (gráficos 35 e 36), permitem uma melhor comparação das variações provocadas pelos diferentes tratamentos, em resposta as condições de crescimento das células do fotobionte.

GRÁFICO 35. HISTOGRAMA DO TRATAMENTO BICARBONATO + CÁLCIO – TAMANHO X NÚMERO DE CÉLULAS.



* Gráfico tamanho por número de células, comparando os tratamentos controle, apresentados anteriormente.

GRÁFICO 36. HISTOGRAMA DO TRATAMENTO BICARBONATO + CÁLCIO – GRANULOMETRIA X NÚMERO DE CÉLULAS.



* Gráfico granulometria por número de células, comparando os tratamentos controle, apresentados anteriormente.

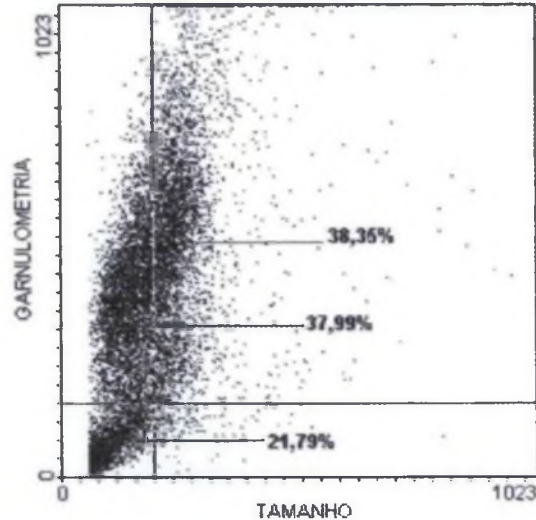
Pode-se observar que com o aumento da concentração de Ca^{2+} , há uma redução do tamanho das células (gráficos 35) e um aumento na granulometria das mesmas (gráficos 36).

Na combinação 6,72 mg/ml HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , quando o fotobionte foi crescido em sistema aberto (gráfico 37) são observadas duas populações de células como nos tratamentos controle, concentração de HCO_3^- , e combinação de 3,36 mg/ml HCO_3^- e 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} . Uma das populações é formada por células pequenas quanto ao tamanho e granulometria (21,79%) e a outra por células com tamanho e granulometria crescentes, 38,35% e 37,99%, respectivamente. Em sistema fechado (gráfico 38), ainda há a separação em duas populações de células, mas observa-se uma tendência a redução da granulometria das células, quando

estas apresentam um pequeno tamanho. Adicionando CO_2 (gráfico 39), pode ser observado, uma nova separação em duas populações, semelhante aquela apresentada quando as células são crescidas em sistema aberto (gráfico 37).

GRÁFICO 37. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 6,72 mg/ml HCO_3^- E 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , ABERTO.

6,72mg/ml BICARBONATO + 1×10^{-2} g/ml CÁLCIO ABERTO



* Gráfico das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

GRÁFICO 38. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 6,72 mg/ml HCO_3^- E 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , FECHADO.

6,72mg/ml BICARBONATO + 1×10^{-2} g/ml CÁLCIO COM CO_2

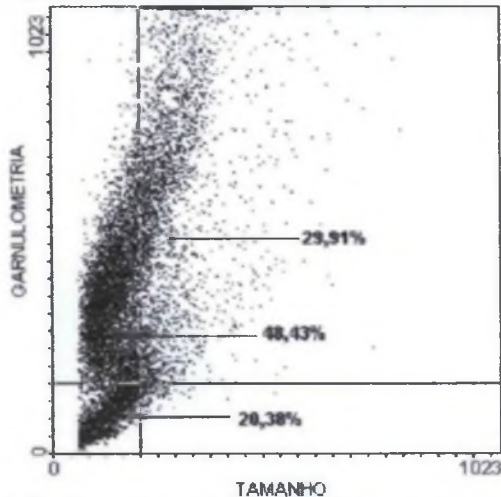
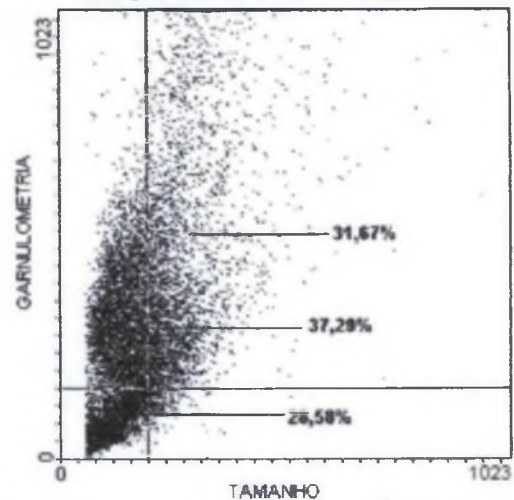


GRÁFICO 39. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 6,72 mg/ml HCO_3^- , 1×10^{-2} g/ml Ca^{2+} , E CO_2 , FECHADO.

6,72mg/ml BICARBONATO + 1×10^{-2} g/ml CÁLCIO



* Gráficos das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

As figuras 15 e 16 ilustram os dados apresentados nos gráficos 38 e 39, representando as variações morfológicas das células do fotobionte, quando crescido, combinadas às concentrações $6,72 \text{ mg/ml HCO}_3^-$ e $1 \times 10^{-2} \text{ g/ml Ca}^{2+}$, sem e com adição de CO_2 , respectivamente.



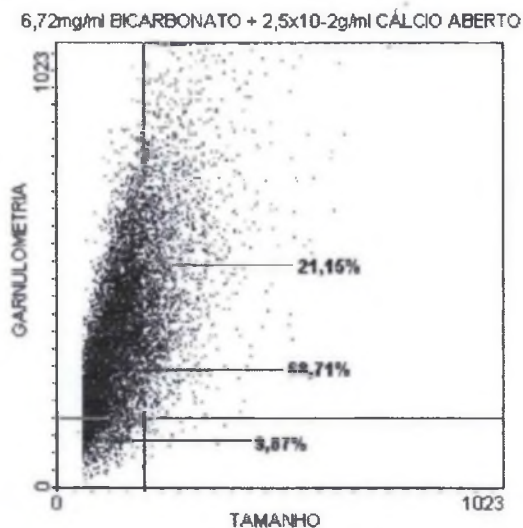
FIGURA 15. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, COMBINANDO AS CONCENTRAÇÕES $6,72 \text{ mg/ml HCO}_3^-$ E $1 \times 10^{-2} \text{ g/ml Ca}^{2+}$, FECHADO.



FIGURA 16. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, COMBINANDO AS CONCENTRAÇÕES $6,72 \text{ mg/ml HCO}_3^-$ E $1 \times 10^{-2} \text{ g/ml Ca}^{2+}$, COM ADIÇÃO DE 10% DE CO_2 , FECHADO.

No cultivo combinando $6,72 \text{ mg/ml HCO}_3^-$ e $2,5 \times 10^{-2} \text{ g/ml Ca}^{2+}$ (gráfico 40), a população de células assume o mesmo padrão apresentado pelos tratamentos onde foi variada a concentração de cálcio e combinadas as concentrações $3,36 \text{ mg/ml HCO}_3^-$ e $2,5 \times 10^{-2} \text{ g/ml Ca}^{2+}$, constituindo-se de células de pequeno tamanho e granulometria variável. Em sistema fechado (gráfico 41) a população apresenta uma redução na granulometria das células, quando comparada ao cultivo em sistema aberto, sob as mesmas condições, a maior parte das células é de pequeno tamanho e granulometria média (59,35%). Com adição de CO_2 (gráfico 42) há uma nova separação em duas populações, as quais apresentam-se, divididas, em pequenas quanto ao tamanho e granulometria (27,94%), pequenas e de média granulometria (45,78%), apresentando ainda células de maior tamanho e granulometria (23,66%).

GRÁFICO 40. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 6,72 mg/ml HCO_3^- E $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , ABERTO.



* Gráfico das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

GRÁFICO 41. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 6,72 mg/ml HCO_3^- E $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , FECHADO.

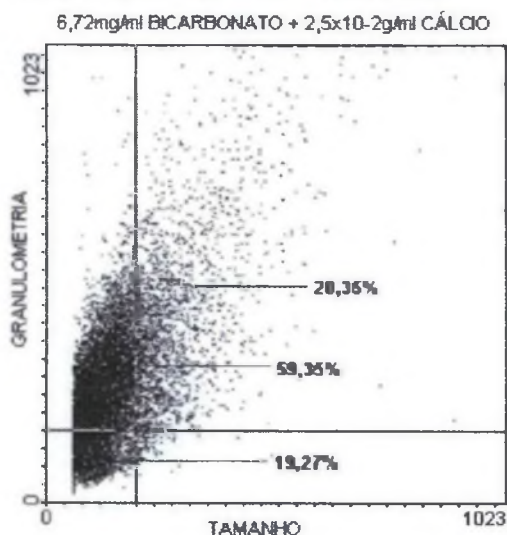
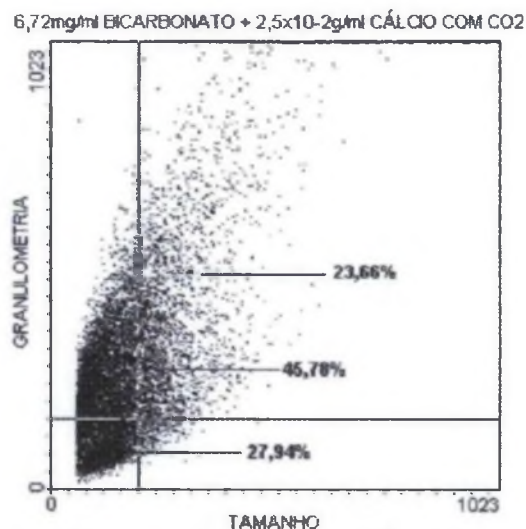


GRÁFICO 42. GRÁFICO DE PLOTAGEM, TAMANHO POR GRANULOMETRIA - CULTIVO MEIO BBM 3N, COM ADIÇÃO DE 6,72 mg/ml HCO_3^- , $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , E CO_2 , FECHADO.



* Gráficos das células do fotobionte, tamanho por granulometria, quando analisadas 10^4 em citômetro de fluxo, representando as proporções de células nas populações determinadas pelo quadrante selecionado (200,160; x, y).

As figuras 17 e 18 representam os dados dos gráficos 41 e 42, ilustrando o padrão das células quando cultivadas na combinação de 6,72 mg/ml HCO_3^- e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , sem e com adição de CO_2 .



FIGURA 17. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celsastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, COMBINANDO AS CONCENTRAÇÕES 6,72 mg/ml DE HCO_3^- E $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , FECHADO.

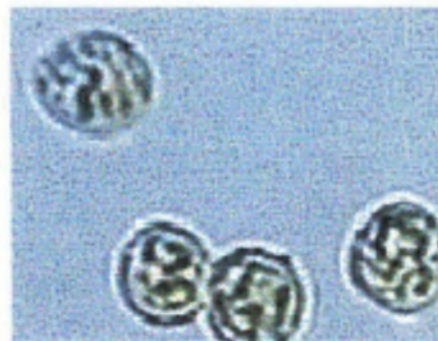
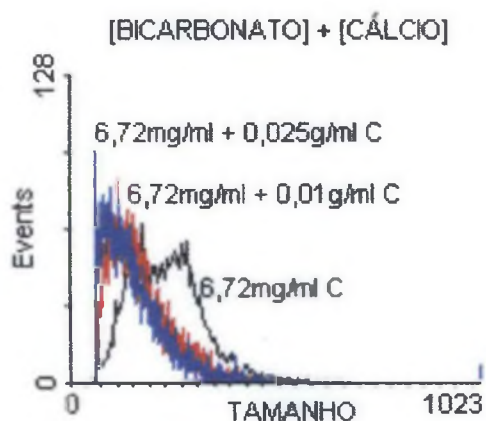


FIGURA 18. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celsastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, COMBINANDO AS CONCENTRAÇÕES 6,72 mg/ml DE HCO_3^- E $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} , COM ADIÇÃO DE 10% DE CO_2 , FECHADO.

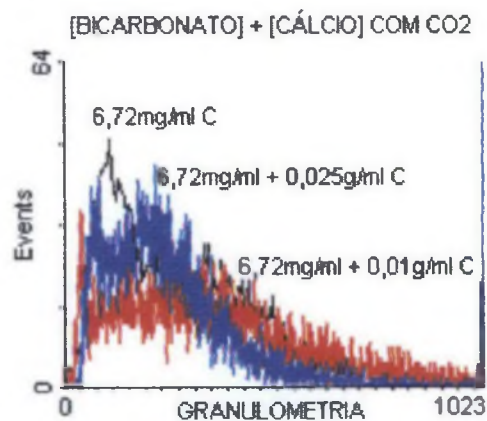
Os histogramas a seguir (gráficos 43 e 44), construídos a partir dos dados apresentados anteriormente, para os tratamentos onde foram combinadas as concentrações de HCO_3^- e Ca^{2+} , 6,72 mg/ml e 1×10^{-2} e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml, respectivamente, permitem uma melhor visualização das alterações morfológicas, quanto ao tamanho e granulometria das células do fotobionte, isolado do fungo liquenizado *Ramalina celsastri*.

GRÁFICO 43. HISTOGRAMA DO TRATAMENTO BICARBONATO + CÁLCIO – TAMANHO X NÚMERO DE CÉLULAS.



* Gráfico tamanho por número de células, comparando os tratamentos controle, apresentados anteriormente.

GRÁFICO 44. HISTOGRAMA DO TRATAMENTO BICARBONATO + CÁLCIO – GRANULOMETRIA X NÚMERO DE CÉLULAS.



* Gráfico granulometria por número de células, comparando os tratamentos controle, apresentados anteriormente.

O aumento da concentração de cálcio provoca uma diminuição do tamanho das células e aumento da granulometria, como foi também observado quando variada apenas a concentração de cálcio e combinadas as concentrações 3,36 mg/ml HCO_3^- e 1×10^{-2} e $2,5 \times 10^{-2}$ g/ml Ca^{2+} .

Os gráficos e figuras apresentados neste item, análise das características morfológicas, demonstram que quando permitida a troca gasosa, em sistema aberto, há um favorecimento do desenvolvimento das células do fotobionte, assim como ocorre quando há adição de CO_2 no cultivo, apresentando um maior tamanho, quando comparadas a células crescidas em sistema fechado sem adição de CO_2 . Esse favorecimento também pode ser observado com o aumento da concentração de HCO_3^- adicionada ao meio de cultivo. Quando adicionado cálcio ao meio de cultivo, há uma redução do tamanho das células, ao passo que a granulometria aumenta. Combinados os dois tratamentos, na concentração máxima de HCO_3^- e Ca^{2+} , há um maior rendimento em biomassa, ao mesmo tempo em que as células apresentam um decréscimo do tamanho e uma maior granulometria. Sendo assim, pode-se considerar que há uma relação do HCO_3^- e do CO_2 , que favorece o aumento do tamanho das células. Da mesma forma que na presença de cálcio, as células não se desenvolvem muito em tamanho, mas apresentam-se muito granulosas, o que pode estar ligado com a produção de polissacarídeos, ou mesmo uma grande vacuolização, no caso de produção de reserva.

5.4.5 Cultivo Porcentagem CO_2

Após análise dos rendimentos de biomassa dos tratamentos controle, variação da concentração de bicarbonato e cálcio, e combinação das concentrações de bicarbonato e cálcio, com e sem adição de 10% de CO_2 , foi possível observar que a adição de CO_2 favorece o desenvolvimento de biomassa das células do fotobionte isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri*. Sendo assim foi testada

também a variação da porcentagem de CO₂ adicionada ao frasco onde as células foram crescidas, em 10, 20, 30, 40 e 50%. O tratamento que apresentou maior biomassa foi aquele onde foi adicionado 30% de CO₂. Para este tratamento não foram feitas análises em citômetro de fluxo, por se tratar de um experimento posterior, complementar à tentativa de otimizar a produção de polissacarídeos em microalgas isoladas de fungos liquenizados.

Como parte da análise morfológica foram feitas imagens de microscopia óptica, a partir das quais podem ser feitas algumas comparações, as quais devem ser posteriormente corroboradas pelos dados de citometria.

Com adição de 10% de CO₂, o tratamento corresponde ao controle, onde pela análise do gráfico 10 pode ser observada a constituição por uma única população de células, formada majoritariamente por células pequenas e de pequena granulometria, tais aspectos podem ser observados na figura 2 apresentada anteriormente, e a seguir.



FIGURA 2. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celsastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, FECHADO, COM ADIÇÃO DE 10% DE CO₂.

No cultivo onde foi adicionado 20% de CO₂ (figura 19), quando comparada a imagem do tratamento controle (figura 2), pode ser observada uma certa homogeneidade quanto ao tamanho das células, não descartando que haja variações. Com adição de 30% de CO₂, onde foi observado o maior

desenvolvimento de biomassa para esse tratamento, quando analisadas suas células, na figura 20, observa-se maior variação de tamanho das células, e também um aumento de granulometria, quando comparadas às imagens de microscopia óptica, para os tratamentos 10, 20 e 30% de adição de CO₂.

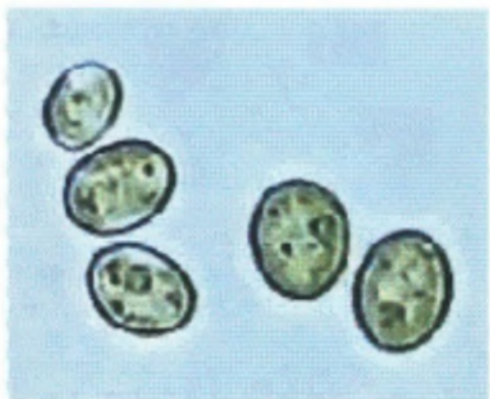


FIGURA 19. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celsastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, FECHADO, COM ADIÇÃO DE 20% DE CO₂.

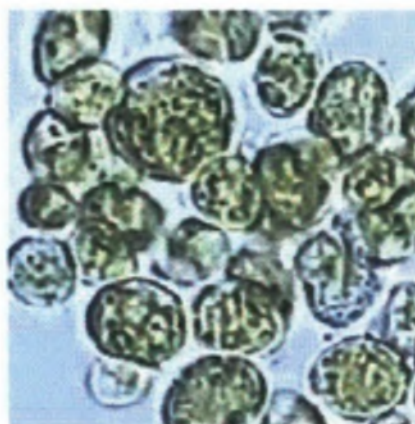


FIGURA 20. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celsastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, FECHADO, COM ADIÇÃO DE 30% DE CO₂.

No cultivo com adição de 40% de CO₂ (figura 21), a granulometria observada quando foi adicionado 30% de CO₂ é mantida, e uma nova homogeneidade de tamanho pode ser observada. Já meio de cultivo, onde foi adicionado 50% de CO₂ (figura 22), pode-se observar, manutenção do tamanho das células, com relação aos tratamentos apresentados anteriormente, e uma certa redução da granulometria das células.

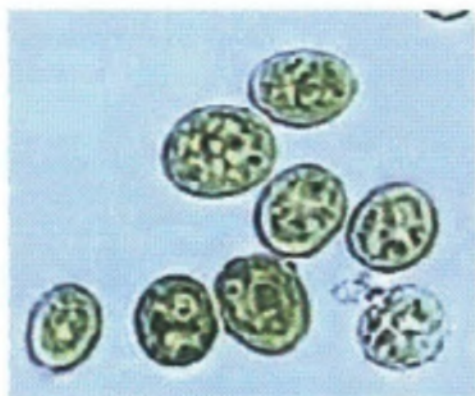


FIGURA 21. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, FECHADO, COM ADIÇÃO DE 40% DE CO₂.



FIGURA 22. IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA, UTILIZANDO AUMENTO DE 400X, DAS CÉLULAS DO FOTOBIONTE ISOLADO DO FUNGO LIQUENIZADO *Ramalina celastri*, CULTIVADO EM MEIO BBM 3N, FECHADO, COM ADIÇÃO DE 50% DE CO₂.

Como dito anteriormente, os dados sugeridos a partir das imagens de microscopia óptica, devem ser confirmados através de uma análise morfológica mais específica, fornecendo então, resultados concretos dos efeitos da variação da porcentagem de CO₂ adicionada ao cultivo, sobre os aspectos morfológicos da célula do fotobionte.

Os resultados apresentados refletem um estudo recente, novo, sobre o qual não são encontrados muitos relatos na literatura, e que da maneira que foi realizado apresenta-se como um ponto de partida para experimentos futuros, cujo resultado seja a otimização da produção de polissacarídeos em microalgas verdes isoladas de fungos liquenizados.

Nas figuras apresentadas anteriormente neste item de resultados e discussão, pode-se observar a presença de material denso entre as células, este pode inferir presença de exopolissacarídeo, produzido e secretado pelas células do fotobionte. Quando é variada a concentração de cálcio adicionada ao meio de cultivo, as células crescem fortemente aderidas ao fundo do frasco no qual são crescidas, e à medida que esta é aumentada, a presença do possível

exopolissacarídeo fica mais evidente, apresentado em maior quantidade, sugerindo a influencia do cálcio na biossíntese de polissacarídeos. O mesmo é observado variando a concentração de bicarbonato, e quando variada a porcentagem de CO₂ adicionada ao meio, mas com menos intensidade que a observada com o aumento da concentração de cálcio.

6 CONCLUSÃO

Analisados todos os tratamentos experimentados, durante o desenvolvimento deste estudo, pode-se concluir que:

↻ A adição de CO_2 provoca um maior desenvolvimento de biomassa.

↻ Com o aumento da concentração de HCO_3^- adicionada ao meio BBM 3N, há um aumento da biomassa de células, e à medida que consumido provoca um aumento do pH.

↻ Aumentada a concentração de cálcio adicionada ao meio de cultivo, há também um aumento da biomassa de células, e uma diminuição do pH.

↻ Variada a porcentagem de CO_2 adicionada aos frascos onde as células foram crescidas, o maior desenvolvimento de biomassa é apresentado pela concentração 30%.

Quanto à composição monossacarídica:

↻ Com adição de CO_2 , há um aumento de glucose e uma diminuição de manose.

↻ À medida que a concentração de HCO_3^- adicionada ao meio BBM 3N, a composição de glucose e manose apresenta-se pouco variável.

↻ Aumentando a concentração de cálcio, há uma diminuição de glucose e aumento de manose, ou seja, a biossíntese de polissacarídeos não celulósicos e que não são amido é favorecida.

Quanto à morfologia:

↻ Com adição de CO_2 há uma diminuição do tamanho das células, e a granulometria apresenta-se variável.

↻ Aumentando a concentração de HCO_3^- as células apresentam

um maior tamanho e granulometria, esta pode refletir maior presença de grânulos de amido, o qual é degradado refletindo na composição monossacarídica, com o aumento de glucose.

↻ Quando a concentração de cálcio adicionada ao meio BBM 3N é aumentada, as células apresentam menor tamanho e granulometria levemente aumentada.

↻ Combinados os tratamentos de variação da concentração de HCO_3^- e Ca^{2+} , a células responde obedecendo ao padrão apresentado pelas células quando apenas é variada a concentração de cálcio, redução de tamanho e granulometria variável.

Referências Bibliográficas

AHMADJIAN, V. A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology and identification. **Phycologia**, 6: p. 127-160, 1967.

AHMADJIAN, V. **The Lichen symbiosis**, New York, John Wiley and Sons, 2^a ed. 1993.

AIZAWA, K. AND MIYACHI, S. Carbonic anhydrase and CO₂ concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 39, p. 215-233. 1986.

BADGER, M. R.; KAPLAN, A.; BERRY, J. A. Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii* evidence for a carbon dioxide concentrating mechanism. **Plant Physiol.** v.66, p.407-413. 1980.

BADGER, M.R., PRICE, G.D., The CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. **Plant Physiol.** v.84, p. 606-615. 1992.

BADGER, M. R.; PALMQVIST, K.; YU, T. W. Measurement of CO₂ and HCO₃⁻ fluxes in cyanobacteria and microalgae during steady-state photosynthesis. **Physiol. Plant.** v. 90, n. 3, p. 529-536. 1994.

BADGER, M. R. and PRICE, G. D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 45, p. 369-392. 1994.

BASSHAM, J.A. and CALVIN, M.,. **The Path of Carbon in Photosynthesis**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 1957.

BEARDALL, J.; JOHSTON, A.; RAVEN, J. Environmental regulation of CO₂ concentrating mechanisms in microalgae. **Can. J. Bot.** v.76, p.1010-1017. 1998.

BOZZO, G. G.; COLMAN, B. AND MATSUDA, Y. Active transport of CO₂ and bicarbonate is induced in response to external CO₂ concentration in the green alga *Chlorella kessleri*. **Journal of Experimental Botany.** v.51, n.349, pp.1341-1348. 2000.

BUBRICK, P. Methods for cultivating and isolated bionts. In: GALUN, M., **CRC Handbook of Lichenology**. Florida. Vol. 3, CRC Press, p.127-138, 1988.

BÜGER, J.; MIYACHI, S.; GALLAND, P.; SENGER, H. Quantum requirements of photosynthetic oxygen evolution and 77 K fluorescence emission spectra in unicellular green algae grown under low- and high-CO₂-conditions. **Bot. Acta.** v. 101, p. 229-232. 1988.

CANVIN, D. T. Photorespiration and CO₂ concentrating mechanisms. In: D. T. Dennis and D. H. Turpin (eds.) **Plant Physiology, biochemistry and molecular biology**. Longman. Scientific and Technical. 1990.

CANUT, H.; CARRASCO, A.; ROSSIGNOL, M.; RANJEVA, R. Is vacuole the richest store of IP₃ mobilizable calcium in plant cells? **Plant Sci.** v. 90, p. 135-143. 1993.

CARPITA, N. and MCCANN, M. **Biochem. & Mol. Biol. of Plants.** (BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W. and JONES, R., eds). p. 52-108. 2000.

COLEMAN, J. E. Zinc enzymes. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 2, p. 222-234. 1998.

CORDEIRO, L. M. C. **Caracterização estrutural de polissacarídeos extraídos do fotobionte isolado do líquen *Ramalina celastri***. Curitiba. Tese de Mestrado. Departamento de bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 99p. 2000.

CRITTENDEN, P. D.; DAVID, J. C.; HAWKSWORTH, D. L.; CAMPBELL, F. S. Attempted isolation and success in culturing of broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. **New Phytologist**. v.130, n.2, p.267-297. 1995.

EKMAN, P.; YU, S.; PEDERSEN, M. Effects of altered salinity darkness and algal nutrient status on floridoside and starch content, α -galactosidase activity and agar yield of cultivated *Gracilaria sordida*. **Br. Phycol. J.** v.26, p. 123-131. 1991.

ELIX, J. A.; WITTHON, A. A.; SARGENT, M. V. Recent progress in the chemistry of lichen substances. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 45, p. 103-224, 1984.

ESPIE, G. S.; CANVIN, D. T. Evidence of Na^+ independent HCO_3^- uptake by the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. **Plant Physiol.** v.84, p.125-130.1987.

ESPIE, G. S.; MILLER, A. G.; BIRCH, D. G.; CANVIN, D. T. Simultaneous transport of CO_2 and HCO_3^- by the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. **Plant Physiol.** v.87, p.551-554. 1988a.

ESPIE, G. S.; MILLER, A. G.; CANVIN, D. T. Characterization of the Na^+ requirement in cyanobacterial photosynthesis. **Plant Physiol.** v.88, p.757-762. 1988b.

FOX, T. C. and GUERINOT, M. L. Molecular biology of cation transport in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 49, p. 669-696. 1998.

FUKUZAWA, H.; FUJIWARA, S.; YAMAMOTO, Y.; DIONÍSIO-SESE, M. L.; MIYACHI, S. cDNA cloning, sequence, and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*: regulation by environmental CO_2 concentration. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 87, p. 4383-4387. 1990.

GIERSCH, C. Stationary diffusion gradients associated with photosynthetic carbon flux – a Study of compartmental versus diffusion –reaction models. **Journal of Theoretical Biology**. v.224, p. 385–397. 2003.

GOLDSMITH, S. J.; THOMAS, M. A.; GRIES, C. A. A new technique for photobiont culturing and manipulation. **Lichenologist**. London, v.29, p.559-569. 1997.

GORIN, P. A. J.; BARRETO-BERGTER, E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In: Aspinall, G. O. editor. **The Polysaccharides**. Vol.2 New York; Academic Press. P.389-394. 1983.

GORIN, P. A. J.; BARON, M.; SILVA, M. L. C.; TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciencia e Cultura** (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science) v.45, p.27-36. 1993.

HARRIS, P. J. and NORTHCOTE, D. H. Polysaccharide formation in plant golgi bodies. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 237, p. 56-64. 1971.

- HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. **Identification of lichen substances**. Berlin: Springer Verlag. 1996.
- KAPLAN, A.; BADGER, M.R.; BERRY, J. A. Photosynthesis and the intracellular inorganic carbon pool in the bluegreen alga *Anabaena variabilis*: response to external CO₂ concentration. **Planta**. v.149, p.219-226. 1980.
- KAPLAN, A.; SCHWARTZ, R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; RONEN-TARAZI, M.; REINHOLD, L. Physiological and molecular studies on the response of cyanobacteria to changes in the ambient inorganic carbon accumulation. In: BRYANT D, ed. **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrech: Kluwer Academic Press, p.469-485. 1994.
- KAPLAN, A. and REINHOLD, L. CO₂ Concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 50, p. 539-570. 1999.
- KARSTEN, U.; WESR, J. A.; ZUCACARELLO, G. C.; NIXDORF, O.; BARROW, K. D.; KING, R. J. Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (Rhodophyta). **J. Phycol.** v.35, p.967-976. 1999.
- KING, D. L. The role of carbon in eutrphication. **J. Water Pollut. Control Fed.** v. 42, n. 12, p. 2035-205. 1970.
- KING, D. L. and NOVAK, J. T. The kinetics of inorganic carbon-limited algal growth. **J. Water Pollut. Control Fed.** v. 46, n. 7, p. 1812-1816. 1974.
- KÖNIG, J.; PEVELING, E. Cell walls of the phycobionts *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia*: constituents and their localization. **Lichenologist**. v.16, n. 2, p. 129-144, 1984.
- LANE, T. W. and MOREL, E. M. M. Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt and carbon dioxide in the marine diatom *thalassiosira weissflogii*. **Plant Physiol.** v. 123, p. 1-8. 2000a.
- LANE, T. W. and MOREL, E. M. M. A biological function for cadmium in marine diatoms. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v.97, p. 4627-4631. 2000b.
- LOGAN, D. C. and VENIS, M. A. Characterisation and immunological identification of calmodulin-stimulated Ca²⁺-ATPase from maize shoots. **J. Plant Physiol.** v. 145, p. 702-710. 1995.
- MACHADO, M. J.; GORIN, P. A. J.; TORRI, G.; IACOMINI, M. The occurrence of glycolipids in the lichen *Ramalina celastri*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.27, p.523-526, 1994.
- MACHADO, M. J.; GUERRINI, M.; GORIN, P. A. J.; TORRI, G.; IACOMINI, M. Galactosphingolipid from the lichen *Ramalina celastri*. **Phytochemistry**., Oxford, v.45, p.651-653, 1997.
- MACLER, B. A. Regulation of carbon flow by nitrogen and light in the alga *Gelidium coulteri*. **Plant Physiol.** v.82, p.136-141. 1986
- MACLER, B. A. Salinity effects on photosynthesis, carbon allocation, and nitrogen assimilation in the red alga *Gelidium coulteri*. **Plant Physiol.** v.88, p.690-691. 1988.

MATSUDA, Y.; COLMAN, B. Induction of CO₂ and bicarbonate transport in the green alga *Chlorella ellipsoidea*, I. Time course of induction of the two systems. **Plant Physiology**. v.108, p.247-152. 1995.

MATSUDA, Y.; BOZZO, G. G.; COLMAN, B. Regulation of dissolved inorganic carbon transport in green algae. **Can. J. Bot.** v.76, p.1072-1083. 1998.

MENG, J. and SRIVATAVA, L. M. Variations in floridoside content and floridoside phosphate synthase activity in *Porphyra perforata* (Rhodophyta). **J. Phycol.** v.29, p.82-84. 1993.

MICENO, A. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Galactomannan and isolichenan components of the carbohydrate-rich lichen *Ramalina eckloni* (Spreng.) Mey and Flot. **Agric. Biol. Chem.** Tokyo, v.55, p.1391-1392, 1991.

MILLER, A. G.; ESPIE, G. S.; CANVIN, D. T. Chlorophyll *a* fluorescence yield as a monitor of both active CO₂ and HCO₃⁻ transport in cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. **Plant Physiol.** v.86, p.655-658. 1988.

MILLER, A. G.; ESPIE, G. S.; CANVIN, D. T. Physiological aspects of CO₂ and HCO₃⁻ transport by cyanobacteria: a review. **Can. J. Bot.** v.68, p.1291-1302. 1990.

MIYACHI, S.; TSUZUKI, M.; MARUYAMA, I.; GANTAR, M.; MIYACHI, S.; MATSUSHIMA, H. Effects of CO₂ concentration during growth on the intracellular structure of *Chlorella* and *Scenedesmus* (chlorophyta). **J. Phycol.** v. 22, p. 313-219. 1986.

MOHNEN, D.; DOONG, R. L.; LILJEBJELKE, K.; FRALISH, G.; CHAN, J. Cell free synthesis of the pectic polysaccharide homogalacturonan. *In* J Visser, AGJ Voragen eds. **Pectins and Pectinases**. p. 109-126. 1996.

MOORE, B. G. and TISCHER, R. G. Extracellular polysaccharides of algae: effects on life-support system. **Science**. v.13, p.586-587. 1964.

MORONEY, J. V.; HUSIC, H. D.; TOLBERT, N. E. Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiol.** v.79, p. 177-183. 1985.

MORONEY, J. V.; SOMANCHI, A. How do algae concentrate CO₂ to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation? **Plant Physiology**. v.119, p.9-16. 1999.

NASH III, T. H. Introduction in: Nash III, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge, Cambridge University Press, p.1-7. 1996.

NORTHCOTE, D. H. and PICKETT-HEAPS, J. D. A function of the Golgi apparatus in polysaccharide synthesis and transport in the root-cap cells of wheat. **Biochem. J.** v. 98, p. 159-167. 1966.

OGAWA, K.; IKEDA, Y.; KONDO, S. A new trisaccharide, α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranose from *Chlorella vulgaris*. **Carbohydrate Research**.v.321, p.128-131. 1999.

O'NEILL, M.; ALBERSSHEIM, P.; DARVILL, A. The pectic polysaccharides of primary cell walls. *In* PM Dey, ed. **Methods in Plant Biochem.** v. 2, p. 415-441. 1990.

OKAMURA, M.; PRICE, G. D.; BADGER, M. R.; OGAWA, T. OMATA, T. The *cmpABCD* genes of the cyanobacterium *Synochococcus* sp. PCC 7942 encode a HCO_3^- transporter. **Plant Cell Physiol.** 38:s30. 1997.

ORDENES, V. R.; REYES, F. C.; WOLFF, D.; ORELLANA, A. A thapsigargin-sensitive Ca^{2+} pump is present in the *Pea* Golgi apparatus membrane. **Plant Physiol.** v. 129, p. 1820-1828. 2002.

PIERCEY-NORMORE, M. D. and DE PRIEST, P. T. Algal switching among lichen symbiosis. **Am. J. Bot.** v.88, p.1490-1498. 2001.

PORTER, N., FOX, F. M. Diversity of microbial products: Discovery and applications. **Pesticide Science**, v. 39, p. 161-168, 1993.

PRICE, G. D.; COLMAN, J. R.; BADGER, M. R. Association of carbonic anhydrase activity with carboxysomes isolated from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7920. **Plant Physiol.** v.100, p.784-793. 1992.

RAMBOLD, G.; FRIEDL, T. and BECK, A. Photobionts in lichens: possible indicators of phylogenetic relationships. **The Bryologist.** v.101, p.392-397. 1998.

RAVEN, J. A.; JOHNSTON, A.M. AND MACFARLANE, J. J. Carbon metabolism, In COLE, K. M. and SHEATH, R. G. (eds.). **Biology of the red algae.** Cambridge University Press. Cambridge, pp.147-170. 1990.

RAVEN, J. A. Implications of inorganic carbon utilization: ecology, evolution and geochemistry. **Can. J. Bot.** v. 69, p. 908-924. 1991.

RAWAT, M. and MORONEY, J. V. Partial characterization of a new isoenzyme of carbonic anhydrase isolated from *Chlamydomonas reinhardtii*. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 9719-9723. 1991.

REED, R. H.; COLLINS, J. C. AND RUSSEL, G. The effects of salinity upon galactosyl-glycerol content and concentration of the marine red alga *Porphyra purpurea* (Roth). **C. Ag. J. Exp. Bot.** v.31, p.1539-1554. 1980.

REID, J. S. G. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 3, p. 512-516. 2000.

REIS, R. A. **Isolamento do fotobionte presente no liquen ramalina celsatri.** Monografia, Dep. Bioquímica, setor de Ciências Biológicas. UFPR. 2000.

SALON, C.; MIR, N. A.; CANVIN, D. T. HCO_3^- and CO_2 leakage from *Synechococcus* UTEX 625. **Plant Cell Environ.** v.19, p.260-274. 1996.

SASSAKI, G. L.; REIS, R. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The glucans of lichenized fungi. **Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg** (In: Biodiversity and ecology-Proceedings of the fourth meeting of Latin American Lichenologists). p. 195-211, 2002.

SCHNEIDER, S. H. The greenhouse effect: Science and policy. **Science.** v. 243, p. 771-781. 1989.

SZE, H.; LIANG, F.; HWANG, I.; CURRAN, A. C.; HARPER, J. F. Diversity and regulation of plant Ca^{2+} pumps: insights from expression in yeast. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 51, p. 433-462. 2000.

SHELP, B.J. and CANVIN, D.T., Evidence for bicarbonate accumulation by *Anacystis nidulans*. **Can. J. Bot.**, 62: 1398-1403. 1984.

SPALDING, M. H. Photosynthesis and photorespiration in freshwater green algae. **Aquatic Botany**. v.34, p.181-209. 1989.

STAEHELEIN, L. A. and MOORE, I. The plant Golgi apparatus structure, functional organization and trafficking mechanisms. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v.46, p. 261-288. 1995.

STEEMANN, N. E. and JENSEN, P. K. Concentration of carbon dioxide and rate of photosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa*. **Physiol. Plant.** v. 11, n. 1, p. 170-180. 1958.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Experimental cultivation of lichens and lichen symbionts. **Can. J. Bot.** 73 (suppl.1): P.579-589. Canadá, 1995.

STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Chemistry and biology of (1-3)- β -glucans. **Victoria**. Australia: la Trobe University Press. p.60-75 e 283-358. 1992.

STUELP, P. M. **Atividade anti-coagulante de α - e β -D-glucanas extraídas do líquen *Ramalina celastri* modificadas quimicamente.** Curitiba, 1997 114p. Tese de Mestrado. Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SÜLTMAYER, D. F.; BIEHLER, K.; FOCK, H. P. Evidence for the contribution of pseudocyclic photophosphorylation to the energy requirement of the mechanism for concentrating inorganic carbon in *Chlamydomonas*. **Planta**. v. 189, p. 235-242. 1993.

SÜLTEMAYER, D. C. Carbonic anhydrase in eukariotic algae: characterization, regulation and possible function during photosynthesis. **Can. J. Bot.** v.76, p.962-972. 1998a.

SÜLTEMAYER, D. C.; KLUGHAMMER, B.; BADGER, M. R., PRICE, G.D. Protein phosphorylation and its possible involvement in the induction of the high-affinity CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria. **Canadian Journal of Botany**. v.76, p.954-961. 1998b.

TAPPER, R. Glucose uptake by *Trebouxia* and associated fungal symbiont in the lichen symbiosis. **FEMS Microbiology Letters**. v.10, p. 103-106. 1981.

TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T. SHIBATA, S. Polysaccharide of lichen symbionts. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v.27, n.1, p.238-241. 1979.

THE SPECIAL BIOLOGY OF THE LICHENS. Disponível:<http://www.lichen.com/biology.html>. Acesso em 09/12/1999.

THEPENIER, C.; GUDIN, C. AND THOMAS, D. Immobilization of *Porphyridium cruentum* in polyurethane foams for the production of polysaccharide. **Biomass**. V.7, p.225-240. 1985.

TSCHERMAK-WOESS, E. The algal partner. In: GALUN, M. **Handbook of Lichenology**, v.1. CRC Press, Boca raton, p.39-92. 1988.

TSUZUKI, M.; GANTAR, M.; AIZAWA, K.; MIYACHI, S. Ultrastructure of *Dunaliella tertiolecta* cells grown under low and high CO₂ concentrations. **Plant Cell Physiol.** v. 27, p. 737-739. 1986.

TSUZUKI, M. and MIYACHI, S. The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. **Aquat. Bot.** v. 34, p. 85-104. 1989.

WIENCKE, C. AND LÄUCHLI, A. Inorganic ions and floridoside as osmotic solutes in *Porphyra umbilicalis*. **Z. Pflanzenphysiol.** v.1035, p.247-258. 1981.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, v.2, p.65-68. 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, v.2, p.211-215. 1963b.

www.bio.utexas.edu/research/utex. Acessado em agosto de 2003.

YALCIN, Z.; HICSASMAZ, B.; BOZOGLU, F. Characterization of the extracellular polysaccharide from freshwater microalgae *Chlorella* sp. **Debensm,-Wiss, u,-Technol.** v.27, p.158-165. 1994.

ZANG, G. F. and STAEHELIN, L. A. Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells: immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. **Plant Physiol.** v. 99, p. 1070-1083. 1992.