



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**

Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE**



DANIELE PEREIRA DE OLIVEIRA SOUSA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS  
FOTOSSINTETIZANTES ASSOCIADOS A LIQUENS**

SÃO LUIS - MA

2022

DANIELE PEREIRA DE OLIVEIRA SOUSA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS  
FOTOSSINTETIZANTES ASSOCIADOS A LIQUENS**

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão – Linha de pesquisa: Determinantes ambientais e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnol.

Coorientador: Prof. Dr. Juliano dos Santos.

SÃO LUIS - MA

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Pereira de Oliveira Sousa, Daniele.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS  
FOTOSSINTETIZANTES ASSOCIADOS A LIQUENS / Daniele Pereira de  
Oliveira Sousa.- 2022.

90 p.

Coorientador(a): Juliano dos Santos.

Orientador(a): Leonardo Teixeira DallAgnol.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
São Luís, 2022.

1. Fotobiontes liquênico. 2. Ilha de São Luis. 3.  
Simbiose. I. dos Santos, Juliano. II. Teixeira  
DallAgnol, Leonardo. III. Título.

DANIELE PEREIRA DE OLIVEIRA SOUSA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS  
FOTOSSINTETIZANTES ASSOCIADOS A LIQUENS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Ambiente.

Aprovada em: 06/10/2022

---

**Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnol (Orientador)**

UFMA - Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof. Dr. Juliano dos Santos (Coorientador)**

UFLA - Universidade Federal de Lavras

---

**Prof. Dr. Andrei Santos Siqueira**

UEA - Universidade do Estado do Amazonas

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Geusa Felipa de Barros Bezerra**

UFMA - Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hivana Patricia Melo Barbosa Dall’Agnol**

UFMA - Universidade Federal do Maranhão

## **AGRADECIMENTOS**

Àquele que se faz presente na minha essência, a Deus, primeiramente agradeço.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais e meu noivo, por todo amor, apoio e confiança dedicada, por sempre estarem presente nas minhas conquistas e me direcionarem a seguir os melhores caminhos. Amo muito cada um e serei sempre grata por tanto!

Aos meus orientadores profs. Drs. Leonardo Teixeira Dall’Agnol e Juliano dos Santos, por terem me mostrado novos e grandes conhecimentos e novas oportunidades, agradeço por toda paciência, amizade, sabedoria e, principalmente, pela confiança depositada em mim na execução deste trabalho. Muito obrigada por serem um exemplo de profissionalismo e dedicação ao seu trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa em Biodiversidade, Bioprospecção e Biotecnologia, em especial: Emanuelle e Igor. E aos amigos, colegas e funcionários do Laboratório de Genética e Biologia Molecular, por todo apoio e suporte na parte experimental e pós-experimental deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente e colegas da turma 16.

A FAPEMA pela concessão da bolsa de mestrado.

A banca examinadora por aceitar fazer parte deste momento.

E a todos os meus amigos, colegas e familiares cujos nomes não estão expressos em palavras, mas estão impressos no meu coração, seja pelo apoio, carinho, ou simplesmente pela existência.

Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como do conhecimento de Deus! Quão insondáveis são os Seus juízos, e quão inescrutáveis os Seus caminhos! Pois, quem conheceu a mente do Senhor? Ou quem foi Seu conselheiro? Nunca houve ninguém como Ele e não há ninguém acima dEle! Porque dEle, e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente.

**(Romanos 11. 33-34 e 36)**

## RESUMO

O Liquen constitui alguns dos mais antigos e diversos simbioses na Terra. São definidos como organismos que por meio de uma associação simbiótica entre fungos (micobionte) e algas unicelulares e/ou cianobactérias (fotobionte) originam um corpo vegetativo estável, com estrutura, fisiologia e ecologia própria, denominada de talo liquênico. Sua importância reside no fato de possuírem alto potencial biotecnológico, graças aos seus inúmeros metabólitos secundários com variadas atividades com propriedades médicas e terapêuticas; e devido sua extrema sensibilidade aos poluentes ambientais sendo, por essa razão, comumente utilizados em estudos de biomonitoramento ambiental. Outrossim, o estudo dos microrganismos fotossintetizantes como simbioses de liquen, apesar de ainda serem bem escassos, fornecem subsídios para reconstrução de histórias evolutivas e uma melhor compreensão na forma como ocorre a interação nessas associações. No estado do Maranhão, precisamente na Ilha de São Luís, ainda não há relatos de estudos envolvendo a comunidade liquênica. Dessa forma, supõe-se que nessa área ainda não foi realizado levantamento em relação à mesma sendo, portanto, este o primeiro estudo da microbiota liquênica nessa região. Desse modo, o presente estudo se preocupou em fazer um levantamento sobre a comunidade liquênica, pois corresponde em um assunto com grande relevância global mediante a velocidade com a qual os ambientes estão se alterando, visto que podem ser usados como sentinelas no acompanhamento das mudanças ambientais; e pelo fato de apresentarem-se bastante promissores como fonte de biomoléculas o que atribui a eles grande importância econômica, uma vez que essas biomoléculas podem resultar eventualmente na produção e síntese de possíveis novos medicamentos e tratamentos contra as doenças. Para isso, foram desenvolvidos dois estudos envolvendo uma revisão de formato integrativa e um estudo inédito que amostraram fungos liquenizados e sua microbiota liquênica na Ilha de São Luís. O primeiro capítulo constou de uma revisão de estudos científicos publicados nas últimas duas décadas sobre os cianoliquens, que mostrou por um lado o quanto esse grupo de organismos ainda é pouco discutido e conhecido e por outro lado o quanto são importantes na síntese de bioprodutos e como biomonitores de poluição ambiental e atmosférica. O segundo capítulo descreveu a composição dos fotobiontes liquênico e serviu para ajudar no levantamento inicial da microflora liquênica na Ilha de São Luís. Os resultados deste trabalho enfatizam a necessidade de mais estudos acerca do assunto e corroboram com o importante papel que a comunidade liquênica desempenha para o meio ambiente e para a saúde humana.

**Palavras-chave:** Fotobiontes liquênico. Ilha de São Luís. Simbiose.

## ABSTRACT

Lichen constitutes some of the oldest and most diverse symbionts on Earth. They are defined as organisms that, through a symbiotic association between fungi (mycobiont) and unicellular algae and/or cyanobacteria (photobiont), originate a stable vegetative body, with its own structure, physiology and ecology, called lichen thallus. Their importance lies in the fact that they have high biotechnological potential, thanks to their numerous secondary metabolites with varied activities with medical and therapeutic properties; and due to their extreme sensitivity to environmental pollutants, they are, for this reason, commonly used in environmental biomonitoring studies. Furthermore, the study of photosynthesizing microorganisms as lichen symbionts, although still very scarce, provides subsidies for the reconstruction of evolutionary histories and a better understanding of how the interaction occurs in these associations. In the state of Maranhão, precisely on the island of São Luís, there are still no reports of studies involving the lichenic community. Thus, it is assumed that no survey has yet been carried out in this area, and therefore this is the first study of the lichenized microbiota in this region. Therefore, the present study was concerned with making a survey on the lichen community, as it corresponds to a subject with great global relevance through the speed at which environments are changing, since they can be used as sentinels in the monitoring of environmental changes; and the fact that they are very promising as a source of biomolecules, which gives them great economic importance, since these biomolecules may eventually result in the production and synthesis of possible new drugs and treatments against diseases. To this end, two studies were developed involving an integrative format review and an unprecedented study that sampled lichenized fungi and their lichen microbiota on São Luís Island. The first chapter consisted of a review of scientific studies published in the last two decades on cyanolichens, which showed on the one hand how little this group of organisms is still discussed and known and on the other hand how important they are in the synthesis of bioproducts and how biomonitors of environmental and atmospheric pollution. The second chapter described the composition of lichen photobionts and served to help in the initial survey of lichen microflora on São Luís Island. The results of this study emphasize the need for further studies on the subject and corroborate the important role that the lichen community plays for the environment and human health.

**Key words:** Lichen photobionts. São Luís Island. Symbiosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática de um talo homômero e de um talo heterômero. ....	14
<b>Figura 2.</b> Líquen fruticoso (gênero <i>Usnea</i> ) .....	15
<b>Figura 3.</b> Líquen crostoso (gênero <i>Caloplaca</i> ).....	16
<b>Figura 4.</b> Líquen folioso ( <i>Parmotrema tinctorum</i> ).....	16
<b>Figura 5.</b> Líquen filamentosos do gênero <i>Coenogonium</i> .....	17
<b>Figura 6.</b> Líquen gelatinoso da espécie <i>Collema flaccidum</i> .....	17
<b>Figura 7.</b> Líquen esquamuloso (gênero <i>Normandina</i> ).....	18
<b>Figura 8.</b> Líquen dimórfico (gênero <i>Cladonia</i> ) .....	18
<b>Figura 9.</b> Mudanças metabólicas durante a interação do micobionte com o fotobionte .....	19
<b>Capítulo 1</b> .....	36
<b>Figura 1.</b> Estruturas moleculares das substâncias bioativas presentes em cianolíquens, mais estudadas nos estudos com líquens.....	49
<b>Figura 2.</b> Diversidade e aspectos do talo de alguns gêneros destacados de cianolíquens.....	50
<b>Figura 3.</b> Famílias mais representativas, em números de espécies, para os cianolíquens que sintetizam compostos bioativos e para os cianolíquens utilizados como biomonitoradores de poluição ambiental distribuídos pelo mundo e encontrados nos artigos revisados .....	51
<b>Figura 4.</b> Países que realizaram estudos com cianolíquens como fontes de biocompostos e como biomonitoradores de poluição.....	51
<b>Figura 5.</b> Trabalhos publicados entre os anos de 1990-2021 acerca dos cianolíquens - fontes de compostos bioativos e utilizados como biomonitoradores de poluição.....	54
<b>Capítulo 2</b> .....	67
<b>Figura 1.</b> Delimitação do campus Bacanga - Cidade Universitária Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, São Luís, MA, Brasil e os locais de coletas ....	72
<b>Figura 2.</b> Pontos de coleta .....	77
<b>Figura 3.</b> Inóculo no tubo de ensaio como meio de cultura.....	79
<b>Figura 4.</b> Espécimes coletados na Cidade Universitária Dom Delgado da UFMA, São Luís, MA, Brasil .....	81
<b>Figura 5.</b> Espécies de cianobactéria e clorófitas isoladas de líquens coletados no campus da UFMA, São Luís, Brasil. ....	82
<b>Figura 6:</b> Produtos de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose usando os primers ITS 1 e ITS 4 e ITSCYA .....	84
<b>Figura 7:</b> Produtos de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose usando os primers SSU – 18S de Chlorophyta; CW e CX – rbcL de cianobactérias .....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais grupos de microalgas (Cyanophyceae e Chlorophyceae) que se associam simbioticamente a fungos liquenizados .....	20
<b>Capítulo 1</b> .....	36
<b>Tabela 1.</b> Cianoliquens como Fontes de Compostos Bioativos (1990 – 2021).....	41
<b>Tabela 2.</b> Cianoliquens Bioindicadores no Monitoramento de Poluição Ambiental (1990-2021).....	45
<b>Tabela 3.</b> Correlação dos trabalhos de cianoliquens, utilizados neste estudo, com seus respectivos países de desenvolvimento e locais de coletas .....	52
<b>Capítulo 2</b> .....	67
<b>Tabela 1.</b> Solução de preparo para meio de cultivo BG-11 .....	74
<b>Tabela 2.</b> Solução de preparo para meio de cultivo BG-11 sem nitrogênio .....	74
<b>Tabela 3.</b> Solução de preparo para meio de cultivo ASM-1 .....	75
<b>Tabela 4.</b> Iniciadores utilizados nas análises filogenéticas.....	76
<b>Tabela 5.</b> Fotobiontes isolados de liquens do campus da UFMA, São Luís, Brasil.....	81

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2. REFERENCIAL TEORICO</b> .....	13
2.1 A simbiose do talo liquênico: tipos, formas e crescimento .....	13
2.2 Os fotobiontes de líquens .....	19
2.3 Cultivo dos fotobiontes liquênico.....	22
2.4 Liquen como biomonitor de poluição ambiental.....	23
2.4.1 Principais gêneros e espécies de liquen utilizados como biomonitores no Brasil e no Maranhão .....	24
2.5 As substâncias liquênicas .....	24
<b>Capítulo 1 - CIANOLIQUENS COMO INDICADORES NO BIOMONITORAMENTO DA POLUIÇÃO E FONTE DE BIOMOLÉCULAS: uma revisão de literatura</b> .....	36
<b>RESUMO</b> .....	37
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>METODOLOGIA</b> .....	39
<b>RESULTADOS</b> .....	39
<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60
<b>Capítulo 2 - A COMUNIDADE LIQUÊNICA DA UFMA, CAMPUS BACANGA: caracterização dos fungos liquenizados e dos microrganismos fotossintetizantes associados.</b> 67	
<b>RESUMO</b> .....	68
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	68
<b>METODOLOGIA</b> .....	70
Caracterização da área de estudo e pontos de coleta.....	70
Coleta, processamento e identificação dos espécimes.....	72
Crítérios de inclusão e exclusão para seleção dos líquens estudados.....	73
Isolamento, cultivo e identificação morfológica dos fotobiontes.....	73
Extração de DNA, Sequenciamento e Identificação Molecular .....	75
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	76
Morfologia e comportamento em cultura .....	81
<b>CONCLUSÃO</b> .....	85
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os líquens ou também fungos liquenizados representam alguns dos mais antigos e diversos simbioses da Terra (YUAN et al., 2005). São definidos como organismos que por meio de uma associação simbiótica entre fungos (micobionte) e algas unicelulares e/ou cianobactérias (fotobionte) são capazes de desenvolver um corpo vegetativo estável, estruturado, com fisiologia e ecologia própria, denominada de talo liquênico (MARCELLI, 2006; NASH III, 2008; SPRIBILLE et al., 2016; WILL-WOLF et al., 2004). O processo de associação é denominado liquenização, no qual concede vida harmônica entre os organismos, conferindo, para ambos, proteção e transferência de substâncias vitais e ocorre em mais de 20% de todas as espécies de fungos conhecidas, representando, cerca de 46% dos fungos do filo Ascomycota existentes (HONDA & VILEGAS, 1998; FERREIRA, 2008; MARCELLI, 2006; NASH III, 2008; SILVA, 2002).

Na simbiose, os micobiontes sintetizam diversos metabólitos secundários (ácidos liquênicos) (ALEXOPOULOS et al., 1996; FLEIG et al., 2008). Enquanto os organismos fotobionte, por sua vez, produzem gás oxigênio resultante do processo da fotossíntese, além de fornecer diversos compostos orgânicos que servem tanto para seu próprio consumo, quanto para a nutrição do micobionte (SCHNEIDER, 1904). Aproximadamente 95% do volume de todo o talo liquênico é composto pelo micobionte, enquanto o fotobionte varia entre 5% e 15%, entretanto, apesar disso a associação simbiótica só acontece porque as algas realizam o processo fotossintético e compartilham o produto orgânico com o fungo, enquanto o fungo protege as algas de alguns fatores ambientais, como a radiação UV (ultravioleta) e herbívoros através dos metabólitos secundários (HUNECK & YOSHIMURA, 1996; MARCELLI, 2006).

Esses organismos compõem um grupo bastante diverso e extremamente complexo, ocorrendo nos mais diversos substratos como: solo, neve, rochas, folhas, casca de árvores e madeira em decomposição (MCMULLIN; ANDERSON, 2014; SPIELMANN, 2006), desde regiões polares e desérticas às florestas tropicais úmidas (DANTAS, 2016) Por conseguinte, a existência de líquens em um determinado habitat e micro-habitat depende dos seus fatores físicos e climáticos que proporcionem as condições mínimas para seu desenvolvimento. Assim, cada região pode apresentar uma comunidade liquênica com propriedades específicas próprias em resposta às suas condições ambientais (HONDA & VILEGAS, 1998).

Os estudos com líquen têm crescido bastante nos últimos anos devido à síntese de metabólitos bioativos (OKSANEN, 2006) e pelo seu alto potencial bioindicador de qualidade

ambiental, estando entre os seres vivos mais utilizados para esse fim (MARCELLI, 2006). Todavia, quando separamos os simbioses e fazemos uma comparação do micobionte com o fotobionte, estes ainda são pouco conhecidos e caracterizados (GONZÁLEZ et al., 2005) devido, principalmente, as inúmeras e grandes dificuldades de isolamento e identificação correta a nível morfológico, haja vista que o talo liquênico geralmente abriga uma flora rica e ampla de fotobiontes associados (RIKKINEN, 2016).

Além disso, tendo em vista que a maioria dos fungos liquenizados, cerca de 90%, contém algas verdes (Chlorophyta) (MUGGIA et al., 2018; LIAS, 2020) os trabalhos divulgados e publicados sobre os fungos liquenizados cujo fotobionte consiste em uma cianobactéria (cianoliquens) ainda são bastante escassos, quando comparados com os que estão em associação com clorófitas (cloroliquens). Como um todo, as tentativas de caracterizar o cianobionte, isto é, o fotobionte cianobacteriano ainda são uma parcela despreciada das simbioses terrestres conhecidas (RIKKINEN, 2016, 2017).

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo geral realizar uma revisão integrativa da literatura acerca dos cianoliquens como biomonitoradores de poluição ambiental e na produção de biomoléculas e caracterizar os microrganismos fotossintetizantes associados a liquen do campus da UFMA, Bacanga, São Luís, Maranhão. Para atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados: (i) identificar os espécimes de liquen coletados no campus Bacanga da UFMA, (ii) isolar e cultivar os microrganismos fotossintetizantes associados as espécies coletadas e (iii) identificar os microrganismos fotossintetizantes obtidos através de técnicas morfológicas e molecular.

Frente a isso, este trabalho está organizado em dois capítulos: o primeiro capítulo “Cianoliquens como indicadores no biomonitoramento da poluição e fonte de biomoléculas: uma revisão de literatura” traz uma revisão integrativa acerca dos estudos com enfoque em cianoliquens, publicados entre os anos de 1990 – 2021, para verificar seus potenciais bioativos e sua abordagem como biomonitoradores de qualidade ambiental. Além de poder contribuir com o conhecimento, em particular, dessa importante associação simbiótica e mostrar as lacunas ainda existentes a respeito dos estudos envolvendo os liquens associados a cianobactérias. O segundo capítulo “A comunidade de liquen da UFMA-Campus Bacanga: caracterização dos fungos liquenizados e dos microrganismos fotossintetizantes associados” aborda a caracterização de algumas espécies de liquens do Campus da UFMA em São Luís, estado do Maranhão, a níveis morfológico e genético, como forma de contribuir para o

fomento do conhecimento da composição e levantamento da comunidade liquênica de São Luís.

Vale ressaltar, que até o presente momento não foi encontrado nenhum estudo para a microbiota liquenizada na Ilha de São Luís – MA, por essa razão supõe-se que nessa área ainda não foi realizado levantamento em relação à mesma e, portanto, este é o primeiro estudo da micoflora liquenizada nessa região.

## **2. REFERENCIAL TEORICO**

### **2.1 A simbiose do talo liquênico: tipos, formas e crescimento**

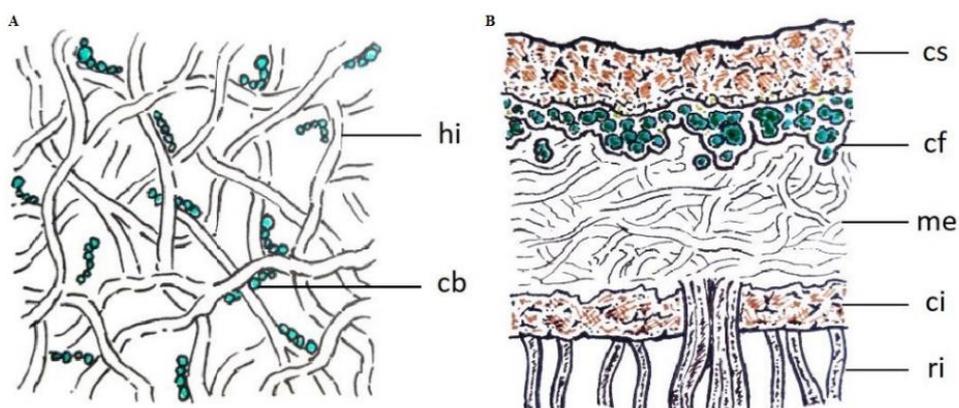
Segundo a Associação Internacional de Liquenólogos (IAL), liquen são definidos como: uma “associação de um fungo com um simbionte fotossintetizante resultando em um talo (talo, por ser destituído de folhas e caule) estável de estrutura específica”. O processo de liquenização é considerado como uma estratégia dos fungos de obterem seu alimento, assim como o parasitismo. Desse modo, deve-se considerar que um líquen é um fungo, ainda que esteja associado de forma permanente a outro organismo (CRESPO et al., 2006; HAWKSWORTH & HILL, 1984; PURVIS, 2000). Por essa razão, no momento de sua classificação sistemática, os líquens se enquadram nos grupos dos fungos e seu nome científico corresponde ao micobionte associado. Além disso, vale salientar que quando se trata de uma abordagem taxonômica (quando o fungo é o foco principal) é correto que se use o termo fungo liquenizado. Já o termo líquen deve ser usado quando se refere à associação como um todo, ou seja, envolvendo o fungo e a alga (CRESPO et al., 2006; MARCELLI 2006).

A maior parte dos fungos liquenizados, são do grupo dos ascomicetes. O talo formado pelo fungo e o fotobionte corresponde em uma estrutura fina, geralmente formando crostas com bordas bem delimitadas, ou ainda mal contornadas. Ele pode apresentar-se de forma simples ou complexas, apresentando uma estrutura morfológica e química bem característica para cada espécie (COCCARO, 2001; MARCELLI, 2006; NASH III, 2008; WILL-WOLF et al., 2004; FLEIG et al., 2008). Como resultado da associação simbiótica os organismos micobionte e fotobionte têm se espalhado por diversos habitats, onde separadamente, ambos na condição de organismos de vida livre seriam incapazes de sobreviver ou seriam raros (GALLOWAY, 1996; GONZÁLEZ et al., 2005; KAPPEN, 1973).

A estrutura geral do talo liquênico é composta por um córtex superior e um córtex inferior, constituídos por hifas entrelaçadas e compactadas. Essas hifas normalmente contêm substâncias liquênicas específicas, como pigmentos, por exemplo, e desempenham função de proteção. O córtex inferior pode ou não estar presente, quando presente, podem existir nele estruturas que fixam o líquen ao substrato, como as rizinas, que são formadas por prolongamentos de hifas compactadas. Abaixo do córtex superior, encontra-se a camada de fotobiontes, organizados e dispersos entre as hifas do fungo, cuja atividade fotossintética é facilitada pelos espaços no tecido frouxo da medula subjacente. Posteriormente, encontra-se a medula, composta por hifas com grandes espaços vazios entre si. Essa camada tem a capacidade de armazenamento de água e substâncias liquênicas (JAHNS, 1973; SANDERS, 2001; PURVIS, 2000).

Em algumas espécies, o talo constitui-se em um micélio do fungo pouco estruturado e diferenciado que envolve as células do fotobionte distribuídas de forma irregular e não estratificada. Este tipo de talo é chamado homômero (Figura 1A) é característico de alguns gêneros crostosos e de alguns líquens foliosos, cujo fotobionte consiste em uma cianobactéria do gênero *Nostoc* (HALE, 1983; RONCALLO et al., 2017). O talo da maioria dos líquens é heterômero (Figura 1B) e apresenta estrutura dividida em camadas estratificadas, com as células do fotobionte organizadas a uma camada particular no talo (JAHNS, 1973; RONCALLO et al., 2017).

**Figura 1.** Representação esquemática **A-** de um talo homômero e **B-** de um talo heterômero. Onde, hi = hifas do micobionte, cb = cianobionte, cs = córtex superior, cf = camada de fotobiontes, me = medula, ci = córtex inferior e ri = rizinas



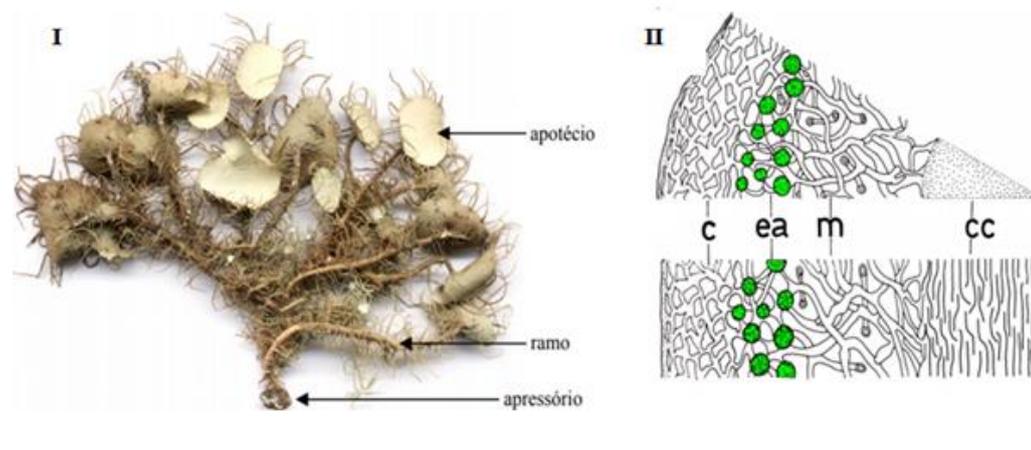
Fonte: DÍAZ GONZÁLEZ et al. (2004), adaptada.

A morfologia do talo liquenizado está grandemente influenciada pelo fotobionte do líquen e seu respectivo contato com o micobionte e o tipo de substrato em que o líquen se

desenvolve auxilia na sua identificação (NASH III, 2008; SHUKLA, 2014). Embora os talos não caracterizem grupos taxonômicos como famílias ou ordens, sua organização estrutural e morfológica apresenta-se sob diversos hábitos (formas de crescimento; aparência etc.) que separam morfológicamente as espécies de líquens em diversos tipos, como: fruticoso (fruticuloso, arbustiva), crostoso (crustáceo), folioso (foliáceo), filamentosos, gelatinoso, esquamuloso e dimórfico (MARCELLI, 2006; SPIELMANN, 2006).

O líquen de talo fruticoso (figura 2) possui ramos semelhantes a pequenos arbustos, podendo ser simples ou divididos; em corte transversal, visto em microscópio, são cilíndricos e achatados. Podem crescer de forma ereta, perpendicular ao substrato, ou de forma pendente a rochas, troncos ou galhos de árvores. Sua estrutura interna apresenta simetria radial, prendendo-se ao substrato por um ou mais pontos chamados na maioria dos estudos de oressório (APTROOT & SCHUMM, 2008; MARCELLI, 2006; SPIELMANN, 2006; XAVIER FILHO et al., 2006; WEBSTER & WEBER, 2007).

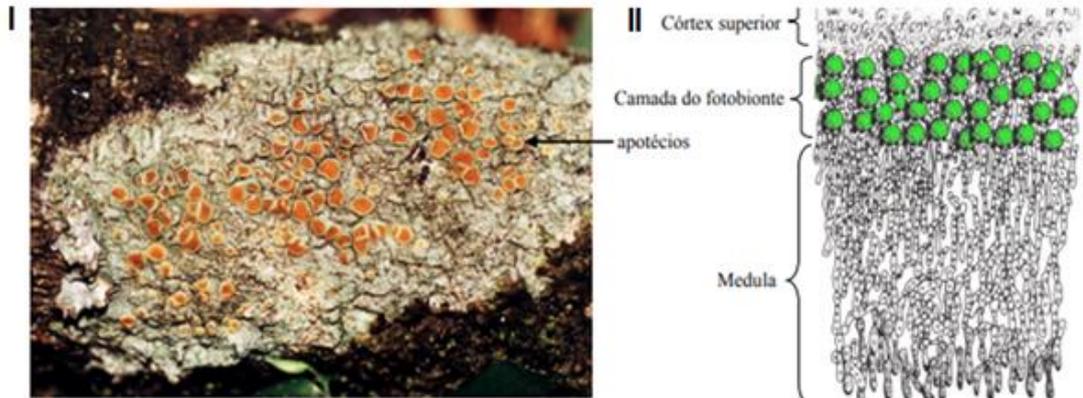
**Figura 2. I** - Líquen fruticoso (gênero *Usnea*), mostrando ramos com apotécios e um oressório basal. **II** – Estrutura geral do líquen fruticoso visto do microscópio, onde c = córtex, ea = fotobionte, m = medula e cc = cilindro central.



Fonte: SPIELMANN & MARCELLI (2006).

Os de talo crostoso (figura 3) apresentam uma estrutura dorsiventral, por isso, são bem achatados e fortemente aderidos ao substrato, formando “crostas”, como o próprio nome indica. Podem estar ou não bem delimitado no substrato e neste tipo de talo o córtex inferior está ausente e as hifas da medula é que prendem o líquen ao substrato. Essa diferenciação pode ser vista ao microscópio e diferencia o talo crostoso do talo folioso (CARLILE et al., 2001; SPIELMANN & MARCELLI, 2006).

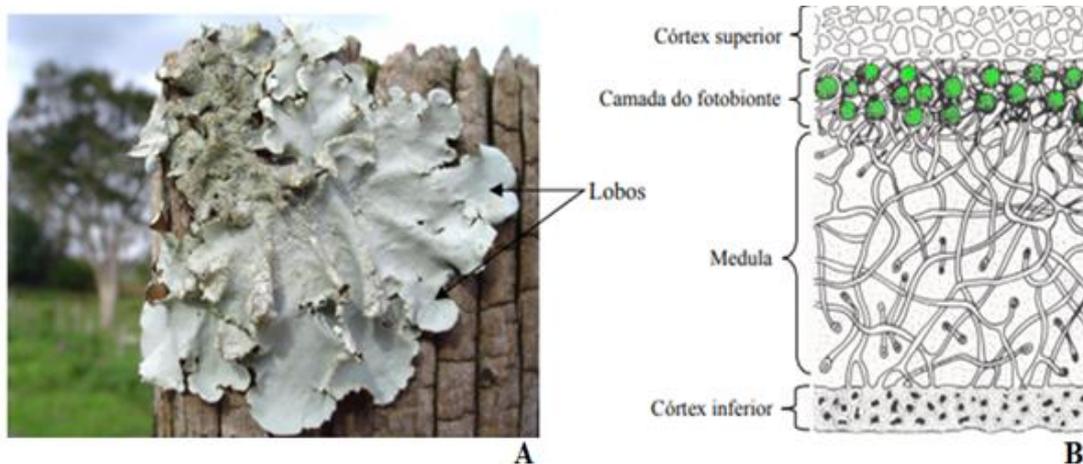
**Figura 3. I** - Líquen crostoso (gênero *Caloplaca*). **II** - Estrutura geral de um líquen crostoso



Fonte: SPIELMANN & MARCELLI (2006).

Líquen de talo folioso (Figura 4) apresentam uma estrutura dorsiventral com divisões mais ou menos arredondadas (lobos) ou mais alongadas e bem definidas que lembram a forma anatômica de uma folha (lacínias). Apresentam um córtex inferior e crescem paralelamente ao substrato, fixando-se pontualmente, isto, de forma menos aderida, através de estruturas de fixação como rizinas ou tomento (HALE, 1983; SPIELMANN & MARCELLI, 2006; XAVIER FILHO et al., 2006).

**Figura 4. A** - Líquen folioso (*Parmotrema tinctorum*), onde se pode observar os lobos bem definidos. **B** - Estrutura geral de um líquen folioso

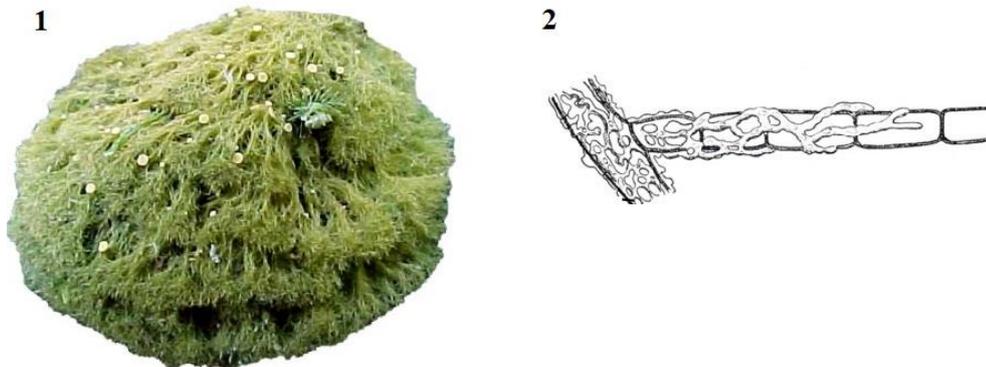


Fonte: SPIELMANN & MARCELLI (2006).

O talo filamentososo (Figura 5) constitui-se como um dos tipos mais simples de talo, é formado por fios muito finos, perceptíveis a olho nu, frouxos e entrelaçados. Um gênero bastante representativo é o *Coenogonium*. Geralmente os líquens com este tipo de talo crescem aderidos a cascas de árvores e são comuns nos locais mais sombreados, sendo

formado por filamentos da alga verde *Trentepohlia*, envoltos por hifas do fungo (MARCELLI, 2006; SPIELMANN, 2006; XAVIER FILHO et al., 2006).

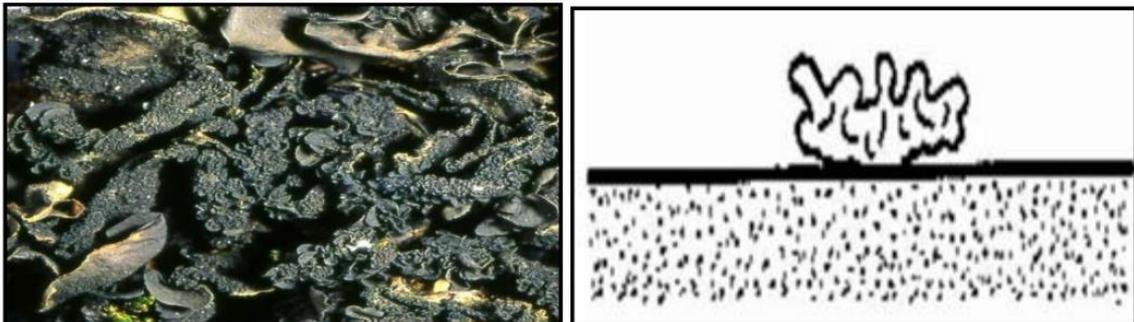
**Figura 5.** 1- Líquen filamentoso do gênero *Coenogonium*. 2 – Filamento de *Trebouxia* envolto por hifas do fungo *Coenogonium*, visto ao microscópio (ZAHLBRUCKNER, 1926)



Fonte: SPIELMANN & MARCELLI. (2006).

O líquen de talo gelatinoso (Figura 6) nada mais é do que líquen de talos homômeros, ou seja, que não possui a camada de fotobionte de forma organizada. Essa desorganização é responsável pela sua forma e consistência gelatinosa. Geralmente o fotobionte é uma cianobactéria, e podem possuir córtex como no gênero *Leptogium*, ou não como é o caso do gênero *Collema*. São rígidos e frágeis quando estão secos e sua coloração em estado úmido varia do verde oliva ao cinza (BARRENO & PÉREZ-ORTEGA, 2003; CHAPARRO DE VALENCIA & CEBALLOS, 2002).

**Figura 6.** Líquen gelatinoso da espécie *Collema flaccidum*



Fonte: LAGARDE (2017); TIÉVANT (2001).

O talo esquamuloso é considerado um tipo de talo crostoso, formada por pequenas escamas agregadas (Figura 7) (NASH III, 2008). Já o talo dimórfico (Figura 8) é a combinação do talo crostoso-fruticoso ou escamoso-fruticoso. É constituído por um talo horizontal (talo primário) aderido ao substrato e outro vertical que leva os corpos frutíferos

(talo secundário) (CHAPARRO DE VALENCIA & CEBALLOS, 2002; SPIELMANN, 2006).

**Figura 7.** Líquen esquamuloso (gênero *Normandina*)



Fonte: <https://www.waysofenlichenment.net/lichens/Collema/>. Foto de Curtis Björk (2012).

**Figura 8.** Líquen dimórfico (gênero *Cladonia*)



Fonte: LAGARDE (2017); TIÉVANT (2001), adaptada.

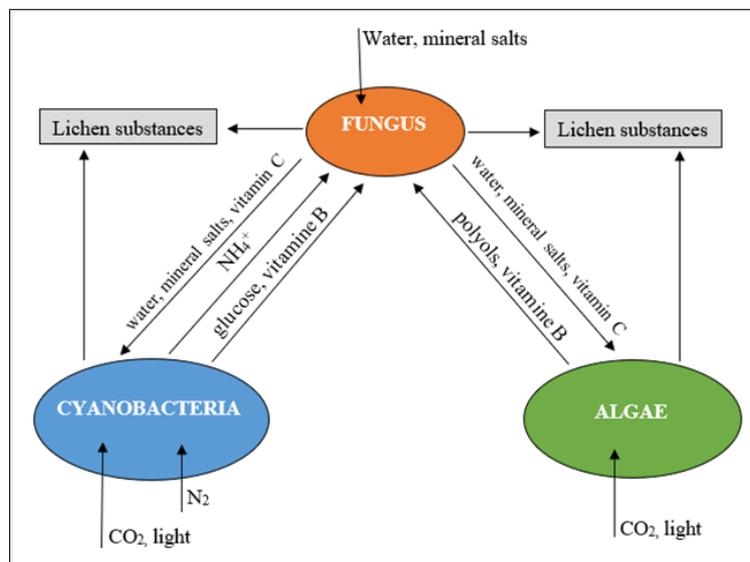
Para a classificação do líquen o substrato também tem grande importância. Desse modo, dentro dos ecossistemas, os líquens que crescem sobre o solo são denominados terrícolas, quando sobre rochas são chamados saxícolas, sobre folhas são foliícolas, sobre o córtex de árvores corticícolas e quando junto a musgos recebem o nome de muscícolas (SPIELMANN, 2006; WEBSTER & WEBER, 2007). O crescimento depende da divisão celular e expansão, tanto do micobionte quanto do fotobionte e naturalmente do metabolismo de carbono do fotobionte, além de condições apropriadas de umidade, temperatura e luz (NASH III, 1996).

## 2.2 Os fotobiontes de líquens

As microalgas caracterizam-se como microrganismos fotossintetizantes, que podem ser procariotas (como as Cyanophyceae) ou eucariotas (como as Chlorophyceae), crescem rapidamente e podem viver sob diversas condições, pois possuem uma estrutura celular simples (LI et al., 2008.) Aproximadamente 40 gêneros de microalgas foram descritos como clorobiontes e cianobiontes líquênicos (FRIEDL & BÜDEL, 2008). Dentre os fotobiontes eucarióticos, representados pelas algas verdes, são classificados em 25-28 gêneros (DePRIEST, 2004), e correspondem a 90% das associações. As cianobactérias são encontradas em 10%. E cerca de 3 a 4% dos líquens apresentam simbiose com ambos os grupos, algas verdes e cianobactérias, simultaneamente (HONNEGER, 1991).

O fotobionte realiza a fotossíntese assimilando pigmentos e fornece açúcares. Quando o fotobionte presente no talo é a uma alga a fotossíntese assimila dióxido de carbono atmosférico (CO<sub>2</sub>) e o carbono é aproveitado pelo micobionte na forma de glicose (BELLENFANT et al., 2010). Quando o fotobionte corresponde a uma cianobactéria, ele fornece substâncias nitrogenadas à associação e é utilizado pelo micobionte na produção de aminoácidos e proteínas. (Figura 9) (CHAPARRO DE VALENCIA & CEBALLOS, 2002; VAN HALUWYN et al., 2009). Polióis e glicose são então transformados pelo fungo em polissacarídeos e metabólitos secundários. Portanto, a associação simbiótica permite a produção de substâncias originais e específicas que não seriam capazes de ser sintetizadas por cada indivíduo sozinho (VAN HALUWYN et al., 2009).

**Figura 9.** Mudanças metabólicas durante a interação do micobionte com o fotobionte



Fonte: VAN HALUWYN et al. (2009), adaptada.

Alguns trabalhos como o de GRUBE et al., 2017; GUSTAVS et al., 2017; MUGGIA et al., 2017; 2018 e RIKKINEN, 2017 revisaram o status de alguns grupos de algas e cianobactérias que fazem associação líquênica. Contudo, grande parte dos táxons ainda são incompreendidos nessa simbiose. Mesmo os gêneros mais estudados ainda são poucos compreendidos, além do que muitas novas diversidades ainda continuam a ser descobertas (MUGGIA et al., 2020).

O principal fotobionte de líquen e o mais bem caracterizado e estudado corresponde a microalga verde do gênero *Trebouxia*, que está presente em aproximadamente 20% das associações líquênicas (DePRIEST, 2004; MUGGIA et al., 2020). Além desse, outros gêneros de clorófitas também são comuns nas associações com fungos liquenizados (Tabela 1). Dentre os cianobiontes, cujo fotobionte é uma cianobactéria, *Nostoc*, *Scytonema*, *Gloeocapsa*, *Stigonema*, *Chroococcidiopsis* e *Calothrix* são os gêneros mais frequentes nas associações líquênica (AHMADJIAN, 1993; BARRENO, 2003, HONEGGER, 1991; RUTHES, 2010), no entanto outros gêneros também têm sido encontrados como cianobiontes de líquen (Tabela 1).

**Tabela 1.** Principais grupos de microalgas (Cyanophyceae e Chlorophyceae) que se associam simbioticamente a fungos liquenizados

Fotobiontes		Exemplos de líquens
Grupo	Gênero	
1. Cianophyta	<i>Chroococcus</i>	<i>Phylliscum</i> , <i>Pyrenopsisidium</i>
	<i>Chroococcidiopsis</i>	<i>Anema nummularium</i> , <i>Peltula euploca</i> , <i>Thyrea pulvinata</i> , <i>Peltula</i> spp.
	<i>Gloeocapsa</i>	<i>Pyrenopsis</i> , <i>Anema</i> , <i>Edwardiella</i> , <i>Gonohymenia</i> , <i>Heppia</i> , <i>Jenmania</i> , <i>Peccania</i> , <i>Phylliscum</i> , <i>Psorotichia</i> , <i>Pyrenopsis</i> , <i>Synalissa</i> , <i>Thyrea</i> , cefalódio de <i>Amygdalaria</i> e <i>Stereocaulon</i> spp.
	<i>Calothrix</i>	<i>Lichina</i> , <i>Porocyphus</i> , <i>Placynthium nigrum</i>
	<i>Hyphomorpha</i>	<i>Spilonema dendroides</i> , <i>S. schmidtii</i>
	<i>Nostoc</i>	Espécies das classes Arctoniaceae, Collemataceae, Pannariaceae, Peltigeraceae,
	<i>Scytonema</i>	<i>Coccocarpia</i> , <i>Cora</i> , <i>Dictyonema</i> , <i>Erioderma</i> , <i>Heppia</i> , <i>Lichenothrix</i> , <i>Thermutis</i> , <i>Pyrenothrix nigra</i> , <i>Heppia lutosa</i>
<i>Rhizonema</i>	<i>Acantholichen pannarioides</i> , <i>Coccocarpia filiformis</i> , <i>C. stellata</i> , <i>Dictyonema aeruginosulum</i> , <i>Athelia andina</i> , <i>Cyphellostereum pusiolum</i>	

Tabela 1 (Continuação)

	<i>Tolythrix</i>	<i>Thermutopsis</i> sp., cefalódio de <i>Placopsis perrugosa</i> e <i>P. stenophylla</i>
1. Cianophyta	<i>Stigonema</i>	Espécies de <i>Ephebe</i> e <i>Spilonem</i> cefalódio de <i>Stereocaulon</i>
2. Chlorophyta		
Classe Trebouxiophyceae	<i>Diplosphaera</i>	<i>Dermatocarpon luridum</i> var. <i>luridum</i> , <i>Agonimia koreana</i> , <i>A. opuntiella</i> , <i>A. repleta</i> , <i>A. tristicula</i> , <i>Neocatapyrenium rhizinosum</i> , <i>Normandina acroglypta</i> , <i>N. pulchella</i>
	<i>Pseudochlorella</i>	<i>Lecidea</i> sp., <i>Micarea assimilata</i> , <i>Trapelia coarctata</i> , <i>Umbilicaria antarctica</i>
	<i>Myrmecia</i>	<i>Bacidia</i> , <i>Catillaria</i> , <i>Dermatocarpon</i> , <i>Lecidea</i> , <i>Psoroma</i> , <i>Verrucaria</i> , <i>Lobaria</i> , <i>Catapyrenium rufescens</i> , <i>Dermatocarpon hepaticum</i> , <i>D. tuckermanni</i> , <i>Placidium squamulosum</i> , <i>Psora decipiens</i>
Classe Trebouxiophyceae	<i>Trebouxia</i>	Espécies de <i>Alectoria</i> , <i>Buellia</i> , <i>Caloplaca</i> , <i>Candelaria</i> , <i>Cetraria</i> , <i>Cladonia</i> , <i>Conotrema</i> , <i>Lecanora</i> , <i>Lecidea</i> , <i>Melanelixia</i> , <i>Melanohalea</i> , <i>Montanelia</i> , <i>Parmelia</i> , <i>Physcia</i> , <i>Ramalina</i> , <i>Rhizoplaca</i> , <i>Stereocaulon</i> , <i>Thamnolia</i> , <i>Umbilicaria</i> , <i>Usnea</i> , <i>Xanthoria</i> , <i>Xanthoparmelia</i>
	<i>Elliptochloris</i>	Espécies de <i>Aspicilia</i> , <i>Buellia</i> , <i>Catolechia</i> , <i>Fuscidea</i> , <i>Leproloma</i> , <i>Micarea</i> , <i>Ramalina</i> , <i>Sticta</i> , <i>Verrucaria</i>
	<i>Pseudococcomyxa</i>	<i>Leproloma</i> sp., <i>Micarea prasina</i> ,
	<i>Heveochlorella</i>	Espécies de <i>Aspidothelium</i> , <i>Aderkomyce</i> , <i>Echinoplaca</i> , <i>Gyalectidium</i> , <i>Pseudocyphellaria</i> , <i>Sticta</i>
Classe Ulvophyceae	<i>Cephaleuros</i> <i>Phycopeltis</i>	<i>Arthonia</i> , <i>Opegrapha</i> , <i>Porina</i> , <i>Trichothelium</i>
	<i>Trentepohlia</i>	<i>Arthonia</i> , <i>Opegrapha</i> , <i>Porina</i> , <i>Trichothelium</i> <i>Arthoniaceae</i> , <i>Anthracotheceum</i> , <i>Chaenotheca</i> , <i>Coenogonium</i> , <i>Cryptothecia</i> , <i>Cystocoleus</i> , <i>Graphina</i> , <i>Graphis</i> , <i>Laurera</i> , <i>Myriotrema</i> , <i>Phaeographis</i> , <i>Porina</i> , <i>Pyrenula</i> , <i>Roccella</i>
	<i>Blidingia</i>	<i>Hydropunctaria amphibia</i> , <i>H. maura</i> , <i>Wahlenbergiella striatula</i>
Classe Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas</i>	<i>Pyronema</i>
	<i>Chlorella</i>	<i>Calicium</i> , <i>Lecidea</i> , <i>Lepraria</i> , <i>Porpidia crustulata</i>
	<i>Chlorococcum</i>	<i>Conotrema</i> , <i>Bacidia</i>
	<i>Gloeocystis</i>	<i>Bryophagus gloeocapsa</i> , <i>Epigloea bactrospora</i>

Fonte: SANDERS & MASUMOTO (2021), adaptada.

Grande parte dos talos liquênicos associados a microalgas verdes tem coloração entre o branco e o cinza, com um toque de verde fornecido pela clorofila. Enquanto nos cianoliquens, as cores variam entre o preto, marrom e cinza-chumbo. Por outro lado, alguns fungos liquênicos produzem substâncias coloridas, que servem para defesa contra o excesso de iluminação e que, por sua vez, podem degradar a clorofila. Neste caso, o talo ou parte dele pode adquirir cores como amarelo, laranja e vermelho (MARCELLI, 2006).

### **2.3 Cultivo dos fotobiontes liquênico**

As tentativas de separar os componentes simbiotes do líquen visam verificar se tais organismos poderiam ser considerados como individuais ou compostos, ou seja, se seriam capazes de sobreviver isolados ou não. Bem como tentar restabelecer a simbiose a partir dos fotobiontes isolados e desta maneira tentar compreender os mecanismos envolvidos no processo de liquenização (HONNEGER, 1991; REIS, 2005; RUTHES, 2010; STOCKER-WÖRGÖTTER, 2001).

O isolamento dos fotobiontes é importante para o estabelecimento de sistemas experimentais para líquens. Esses sistemas são necessários para elucidar fatores associados não somente a simbiose, como também à quimiotaxonomia (STOCKER-WÖRGÖTTER, 1998; YOSHIMURA et al., 2002). Os estudos de isolamento de fotobiontes de líquens estão, em sua maioria, direcionados para o desenvolvimento do talo em condições de laboratório, juntamente com análises e avaliações de culturas do fotobionte e microbionte isolados, os quais podem apresentar compostos específicos (CRITTENDEN et al., 1995).

Todavia, isolar os fotobiontes de líquens não é fácil. Segundo RUTHES (2010) uma das maiores razões para os estudos dos fotobiontes de líquens ainda serem bem escassos é devido as dificuldades encontradas no isolamento e cultivo em condições axênicas, ou seja, em uma cultura livre de qualquer contaminante com apenas o fotobionte específico, haja vista que um único talo liquênico contém uma vasta flora de organismos associados. Em paralelo a isso, as lentas taxas de crescimento também são um grande obstáculo para o sucesso desses processos, comparados aos fungos e algas de vida livre a taxa de crescimento do simbiotes liquênico é extremamente lenta, e este fator tem sido a principal dificuldade para a investigação fisiológica dos estados axênicos (CRITTENDEN et al., 1995; STOCKER-WÖRGÖTTER, 1995).

Contudo, quando o fotobionte é cultivado e isolado há possibilidade de serem feitos diversos estudos comparativos, através de métodos morfológicos, ciclo de vida e moleculares, que permitam sua identificação. Bem como uma melhor compreensão do papel desses

organismos na associação líquênica. Dentre as técnicas utilizadas para o isolamento e cultivo dos simbiontes líquênicos destaca-se a utilização de esporos, fragmentos de talo, conídios, sorédios, ultracentrifugação, micropipetas, dentre outras. Sendo a obtenção de colônias através de esporos e fragmentos de talo as mais utilizadas para micobiontes e fragmentos de talo e micropipetagem para os fotobiontes (AHMADJIAN, 1993; BUBBRICK, 1988; CRITTENDEN et al., 1995).

Com o advento dos métodos de isolamento e cultivo dos simbiontes líquênico, novas perspectivas tornaram-se possíveis para a utilização de líquens nos ramos da biotecnologia e da farmacologia, uma vez que estes representam uma importante fonte de compostos secundários com diversas propriedades bioativas (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2001).

#### **2.4 Líquen como biomonitor de poluição ambiental**

As espécies de líquen, mostram alta sensibilidade à poluentes atmosféricos através de mudanças populacionais na comunidade líquênica como: aparecimento, desaparecimento ou mudança na densidade da população (MAKI et al., 2013). Essa grande sensibilidade está diretamente ligada com a sua biologia, já que são desprovidos de sistema radicular, cutícula e estômatos. Dessa forma, a pureza do ar atmosférico é fator importante para sobrevivência desses organismos, já que eles se alimentam fixando elementos nele presente. Devido a isso, os líquens possuem alto potencial como bioindicador de poluição ambiental e atmosférica, de forma que se por algum motivo o equilíbrio entre os simbiontes for quebrado, isto pode levar a morte do indivíduo (ELIASARO & GUMBOSKI, 2010; PRESTES & VINCENCI, 2019).

Alguns organismos apresentam boa resistência a estresses ambientais, sendo capazes de bioacumular os poluentes atmosféricos, enquanto outras são mais sensíveis a determinados poluentes que são capazes de causar danos fisiológicos, às vezes, de forma irreversível (CANSARAN-DUMAN; ATAKOL; ARAS, 2010). Esta característica permite utilizar o líquen em algumas técnicas de biomonitoramento como: a quantificação das populações líquênicas no ambiente analisado, exame da morfologia do talo e análise dos metais pesados, bem como resíduos de esgoto (FERNANDES, 2018).

Em relação aos métodos tradicionais utilizados para a verificação dos níveis de poluição, o biomonitoramento apresenta diversas vantagens, entre elas o baixo custo de instalação e acompanhamento; a ausência em geral de aparelhos sofisticados para medição dos poluentes; a eficiência no monitoramento de grandes áreas e por longos períodos, bem como possíveis identificação, diagnósticos e formulação de medidas mitigadoras para as presumíveis causas e efeitos estressores, obtendo assim, uma resposta biológica. Além disso,

vale destacar que através do biomonitoramento, também é possível avaliar a efetividade dessas medidas e até mesmo propor soluções para minimizar os impactos ambientais (ANDRADE et al, 2010; CARRERAS & PIGNATA, 2001; FUGA et al., 2005; MOREIRA et al., 2017; SUMITA et al., 2003).

#### **2.4.1 Principais gêneros e espécies de líquen utilizados como biomonitores no Brasil e no Maranhão**

Os gêneros de líquens mais utilizados como biomonitores no Brasil são: *Canoparmelia sp.*, principalmente a espécie *Canoparmelia texana* ao qual apresenta-se abundante em cidades não litorâneas e de grau de poluição elevado no Brasil. Esta espécie tem sido bastante utilizada no mapeamento de metais pesados e de outros elementos químicos (FUGA et al., 2005; SAIKI et al. 2007). E *Parmotrema sp.*, principalmente *Parmotrema tinctorum* devido sua facilidade de identificação (FUGA et. al., 2005; KAFFER; 2011).

O estudo de COCCARO (2001) no estado de São Paulo mostrou que cinco espécies de fungos liquenizados: *Canoparmelia texana*, *Canoparmelia caroliniana*, *Parmotrema tinctorum*, *Parmotrema sancti-angeli* e *Usnea sp.* podem ser utilizadas para estudos de biomonitoramento por acumularem elementos traço. Em outro estudo MARTINS et al. (2008) no Rio Grande do Sul, mostraram que outras quatro espécies sendo elas: *Heterodermia obscurata*, *Physcia aipolia*, *Teloschistes exilis*, *Usnea sp.* além de *Parmotrema tinctorum* são utilizados como bioindicadores da qualidade do ar.

No Maranhão há poucos relatos de estudos realizados utilizando líquen como agentes biomonitores de qualidade ambiental e atmosférica. Após busca na literatura foram encontrados o trabalho de DIAS (2015) na região metropolitana de Imperatriz, que mostrou que a espécie *Parmotrema wrightii* Ferraro & Elix pode ser utilizada como biomonitor para metais poluentes. E o trabalho de SANTOS et. al (2019) no município de São João do Paraíso que estudou gêneros da família Parmeliaceae utilizada como biomonitor ambiental. Outros estudos encontrados, são referentes a diversidade de Parmeliaceae (CUNHA, 2015; SANTOS et al.; 2021) e estudos com extratos líquênico (BRAGA et al., 2015; FERNANDES & BRAGA, 2014) no sudoeste do Maranhão e no cerrado maranhense.

#### **2.5 As substâncias líquênicas**

Como nas plantas, o líquen possui dois tipos de metabólitos: os primários e os secundários. Os metabólitos primários exercem função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e nutrição. Enquanto os metabólitos secundários estão mais associados às

estratégias de defesa contra a herbívoros e competição contra outras espécies por espaço e luz (TAIZ & ZEIGER, 2004; UPRETI, 2015). Estes últimos, também conhecidos como substâncias liquênicas, têm gerado grande interesse dos pesquisadores, devido muitos deles apresentarem importantes propriedades e atividades biológicas (LATAKOWSKA, 2015; RANKOVIĆ & KOSANIĆ, 2021).

Esses metabólitos são frequentemente únicos, com apenas um pequeno número deles encontrados em outros organismos como, os fungos não liquenizados e plantas superiores. Compreendem até 20% do peso seco do líquen e são produzidos principalmente pelo fungo e secretado na superfície das hifas do líquen em formas amorfas ou na forma cristais (MITROVIĆ, 2011; RANKOVIĆ & LONDON, 2019; SÁNCHEZ CHARRY, 2019).

As substâncias liquênicas são enquadradas nos mais diversos grupos químicos como, xantonas, antraquinonas, ácido úsnico, ácido pulvínico, terpenos, carotenoides e outros. (CULBERSON & ELIX, 1989; HUNECK, 2001; MORALES et al., 2009; STANOJKOVIĆ, 2019). Outrossim, as substâncias bioativas, produzidas especificamente pelos fotobiontes também incluem compostos únicos como os carotenoides, ácidos graxos, enzimas, polímeros, peptídeos, toxinas e esteróis. Todas essas substâncias possuem diversas atividades biológicas já comprovadas, como antimicrobiana, antioxidante, anticâncer, antiviral, antígenotóxico, antidiabético e outras, o que lhes confere uma fonte potencial para moléculas bioativas inovadoras com aplicações em diversos setores industriais, farmacêuticos e afins, incluindo o uso como biocombustíveis (CHU, 2012; CHISTI et al., 2007; HARUN et al., 2010; RANKOVIĆ & KOSANIĆ, 2021).

Ademais, o líquen constitui uma importante fonte de biomoléculas, através do uso direto de seus metabólitos secundários visto que constituem importantes bioatividades que, por sua vez, atribui a eles significativa importância nos mais diversos setores econômicos (CRAGG; NEWMAN, 2005).

### 3. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley, 1996.
- AHMADJIAN, V. A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology and identification. **Phycologia**, Oxford, v.6, p. 127-160, 1967.
- AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. New York: John Wiley & Sons, p. 250, 1993.
- ANDRADE, H. P. de; et.al. **Análise cienciométrica global em bioindicadores – um panorama das tendências estabelecidas entre os anos 1998 a 2007**. Vita et Sanitas, Trindade-Go, n.04, jan-dez., 2010.
- APTROOT, A., SCHUMM, F. Key to Ramalina Species Known From, Atlantic Islands, With Two New Species From the Azores. **Sauteria**, 15, 21-57. 2008.
- ARCHIBALD, P. A. *Trebouxia* de pulmaly (Chlorophyceae, Chlorococcales) and *Pseudotrebouxia* gen. nov. (Chlorophyceae, Chlorosarcinales). **Phycologia**, 14(3), 125-137, 1975.
- BARBOSA, H. M. S. (2009). **Influência do nitrogênio na produção de substâncias degradadoras do milonito por *cladonia substellata* (liquen)**. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Disponível em: [https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/6242/1/arquivo3513\\_1.pdf](https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/6242/1/arquivo3513_1.pdf). Acesso em: 10 de ago. de 2021.
- BARRENO E.; PÉREZ-ORTEGA S. **Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos**, Austrias. 2003.
- BELLEENFANT, S.; BEGUINOT, J.; VALLADE, J.; SIRUGUE, D.; LEMMEL, C.; Groupe Lichens de Bourgogne (GLIB). Les lichens une symbiose exemplaire. **Rev. sci. Bourgogne-Nature**. v. 45, 2010).
- BRAGA, G. M. S.; ORLANDA, J. F. F.; FERNANDES, T. F.; SILVA, W. B.; CHAGAS, B. B. Obtenção de extratos liquênicos no cerrado maranhense para controle do *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Pesquisa em foco**, v. 20, n. 1, 2015.
- BUBBRICK, P. Methods for cultivating lichens and isolated bionts. In: GALUN, M. (Ed.) **CRC Handbook of Lichenology**. Vol. III. Boca Raton: CRC Press, p. 127-138, 1988.
- BÜDEL, B. **Phycobionten der Lichinaceen**. Diplom-Thesis. Marburg: Universitat Marburg, 1982.
- CALATAYUD, A.; GUERRA, A.; FOS, S.; BARRERO, E. A new method to isolate lichen algae by using Percoll® gradient centrifugation. **Lichenologist (Lond.)**, v. 33, n. 4, p. 361-366, 2001.
- CALVELO, S. & LIBERATORE, S. Applicability of in Situ or transplanted lichens for assessment of atmospheric pollution in Patagonia, Argentina. **Journal of Atmospheric Chemistry** 49: 199-210. 2004.
- CANSARAN-DUMAN, D.; ATAKOL, O.; ARAS, S. Assesment of air pollution genotoxicity by RAPD in *Evernia prunastri* L. Ach. From around iron-steel factory in Karabük, Turkey. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 7, p. 1171-1178, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22125911>. Acesso em: 10 de ago. de 2021.

- CARLILE, M.J., WATKINSON, C.S., GOODAY, G.W. The fungi. 2nd edition. **Academs Press**. 2001.
- CARRERAS, H. A.; PIGNATA, M. L. Comparison among air pollutants, meteorological conditions and some chemical parameters in the transplanted lichen *Usnea amblyoclada*. **Environmental Pollution**. 2001, 111: 45-52.
- CHAPARRO DE VALENCIA, M.; CEBALLOS, J. A. **Hongos liquenizados**. 1ed. 220 p. Universidad Nacional de Colombia. Editorial El Malpensante S.A. 2002.
- CRAGG, M.G.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacology**, v.100, p.72-79, 2005.
- CHU. W-L. **Biotechnological applications of microalgae**. *IeJSME*: 6 (Suppl 1): S24-S37. 2012.
- COCCARO, D. M. B. **Estudo da determinação de elementos traço em líquens para monitoração ambiental**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. 2001.
- COPPINS, B.J. 1973. The drought hypothesis. In: B.W. FERRY, M.S. BADDELEY & D.L. HAWKSWORTH (eds.). Air pollution and lichens. **The Athlone Press**, London, pp. 124-142.
- COSTA, M.; GARCIA, M.; COSTA-RODRIGUES, J.; COSTA, M.; RIBEIRO, M.; FERNANDES, M.; et al. Exploring bioactive properties of marine cyanobacteria isolated from the Portuguese coast: High potential as a source of anticancer compounds. **Marine Drugs**, 12, 98-114, 2014.
- CRESPO, A., ARGUELLO, A., BLANCO, O., GASCA, C. AND MOLINA, M.C. 2006. Sistemática e valor dos caracteres em líquens. In: *Biologia de Líquens*. Edited by L. Xavier Filho, M.E. Legaz, C.V. Cordoba and E.C. Pereira. **Âmbito Cultural Edições Ltda.**: Rio de Janeiro, pp.471-502.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, 25, 294-306. 2007.
- CRITTENDEN, P. D., DAVID, J. C. HAWKSWORTH, D. L., CAMPBELL, F. S., Attempted Isolation and success in the culturing of broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. **New Phytologist**, 130 (2), p. 267-297, 1995.
- CUNHA, I. P. R.; MARCELLI, M. P.; PEREIRA, E. C. Espécies de *Canoparmelia* s.l. (Parmeliaceae, ascomycetes liquenizados) da região tocantina, MA e TO, Brasil. **Hoehnea**, 42 (2), abr.-jun., 2015.
- CULBERSON, C. F.; ELIX, J. A. Lichen substances. In **Methods in Plant Biochemistry**, Vol. 1: Plant Phenolics, ed. P. M. Dey and J. B. Harborne, pp. 509–535. London: Academic Press, 1989.
- DANTAS, J. O. (2016). **Existe um efeito de borda na Caatinga? Evidência de comunidades de líquens em Poço Verde**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brasil. Disponível em: [https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/4468/1/JACIELE\\_OLIVEIRA\\_DANTAS.pdf](https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/4468/1/JACIELE_OLIVEIRA_DANTAS.pdf). Acesso em: 10 de ago. de 2021.
- DARIENKO, T.; GUSTAVS, L.; EGGERT, A.; WOLF, W.; PRÖSCHOLD, T. Evaluating the species boundaries of green microalgae (Coccomyxa, Trebouxiophyceae, Chlorophyta)

using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. **PloS One**, 10(6), e0127838, 2015.

DePRIEST, P. T. Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986– 2001. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 58, p. 273–301, 2004.

DIAS, M. A. L. **Potencialidade de uso do fungo liquenizado *Parmotrema wrightii* Ferraro & Elix como biomonitor para metais poluentes na região metropolitana de Imperatriz – MA**. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica De Goiás, Goiania. 2015.

DÍAZ GONZÁLEZ, T. E.; FERNÁNDEZ-CARVAJAL A.; M<sup>o</sup> DEL C.; FERNÁNDEZ PRIETO, J. A. Curso de Botânica. **Ediciones Trea**, S.L. 2004.

ELIASARO, S.; GUMBOSKI, E. L. **Levantamento da flora liquênica da Ilha do Mel, Paraná**. Curitiba: Instituto ambiental do Paraná, 2010. Disponível em: [https://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-07/sionara\\_eliasaro.pdf](https://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos_restritos/files/documento/2020-07/sionara_eliasaro.pdf). Acesso em: 29 out. 2020.

ENLICHENMENT, W. OF. **Enlichenment**. Disponível em: <https://www.waysofenlichenment.net/>. Acesso em: 19 ago. 2021.

ETTL, H.; GÄRTNER, G. Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. **Stuttgart: Gustav Fischer Verlag**. 1995.

FEIGE, G. B.; JENSEN, M. Basic carbon and nitrogen metabolism of lichens. In *Algae and Symbioses*, ed. W. Reisser, pp. 277–299. **Bristol: Biopress Limited**, 1992.

FERNANDES, R. F. (2018). Caracterização de líquens do Brasil e da Antártida. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/8285/1/rafaelaferreirafernandes.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2021.

FERNANDES, T. F.; BRAGA, G. M. S. Obtenção de extratos liquênicos do Cerrado Maranhense para avaliação da atividade carrapaticida. **Pubvet**, v. 8, n. 21, p. 2550-2674, 2014.

FERREIRA, E. J. P. D. (2008). **Biomonitorização da qualidade do ar: Caso estudo na envolvente da fábrica de celulose do Caima**. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente). Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal. Disponível em: [https://run.unl.pt/bitstream/10362/1909/1/Jofre\\_2008.pdf](https://run.unl.pt/bitstream/10362/1909/1/Jofre_2008.pdf). Acesso em: 29 out. 2020.

FLEIG, M.; GRÜNINGER, W.; MAYER, W. E.; HAMPP, R. **Líquens da Floresta com Araucária no Rio Grande do Sul**. EdiPUCRS, p. 219, 2008.

FRIEDL, T. Comparative ultrastructure of pyrenoids in *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta). **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 164, p. 145-159, 1989a.

FRIEDL, T.; BÜDEL, B. 2008. Photobionts. In: Nash, T.H. (Ed.), **Lichen Biology**, second ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 9–26.

FUGA A.; SAIKI, M.; MARCELLI, M. Análise de líquens por ativação neutrônica para estudo da poluição atmosférica na cidade de São Paulo. **Internacional Nuclear Atlantic Conference- INAC**, Santos: 2005.

- FUGA, A. (2006). **Uso de líquens epifíticos no biomonitoramento da poluição atmosférica da região metropolitana de São Paulo**. 127 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GALLOWAY, D. J.; Lichen biogeography; In **Lichen Biology**; NASH III, T. H.; Ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1996, p 199.
- GEEBELEN, W. & HOFFMANN, M. 2001. Evaluation of bio-indication methods using epiphytes by correlating with SO<sub>2</sub> pollution parameters. **The Lichenologist** 33: 249-260.
- GEITLER, L. Beitrage zur Kenntnis der Flechtensymbiose. VI. Die Verbindung von Pilz und Alge bei den Pyrenopsidaceen *Synalissa*, *Thyrea*, *Peccania* und *Psorotichia*. **Archiv für Protistenkunde**, 88, 161–179, 1937.
- GONZÁLEZ, I.; AYUSO-SACIDO, A.; ANDERSON, A.; GENILLOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS, Microbiol Ecol** 54:401-415. Madrid, Spain (2005).
- GRIES, G. 1996. Lichens as indicators of air pollution. In: T.H. Nash (ed.). **Lichen Biology**. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 240-254.
- GRUBE, M.; MUGGIA, L.; BALOCH, E.; HAMETNER, C.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Symbiosis of lichen-forming fungi with trentepohlialean algae. In Grube, M.; Seckbach, J.; Muggia, L., (eds), *Algal and Cyanobacterial Symbioses*. London: **World Scientific Publishing Europe Ltd**, pp. 85–110, 2017.
- GUSTAVS, L.; SCHIEFELBEIN, U.; DARIENKO, T. Symbioses of the green algal genera *Coccomyxa* and *Elliptochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). In Grube, M.; Seckbach, J.; Muggia, L. (eds), *Algal and Cyanobacterial Symbioses*. London: **World Scientific Publishing Europe Ltd**, pp. 169–208, 2017.
- HALE, Jr. M. E. **The Biology of Lichens**. 3ed. ed. Baltimore, Edward Arnold, 190 p, 1983.
- HARUN, R et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14 1037-1047, 2010.
- HAWKSWORTH, D. L. & HILL, D. J. 1984. **The lichen-forming fungi**. Blackie & Sonns. Ltd. Glasgow.
- HONDA, N. K. & VILEGAS, W. 1998. A química dos líquens. **Química Nova**, 21(6), 110-125. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v22n1/1145.pdf>. Acesso em: 29 out. 2020.
- HONEGGER, R. Functional aspects of the lichen symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 42: 553-578, 1991.
- HUNECK, S. New results on the chemistry of lichen substances. **Progress in the Chemistry of Organic Products**, ed. W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby and R. E. Moore, pp. 1–276. New York: Springer, 2001.
- HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. 1996. Identification of lichen Substances. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**. Germany.
- JAHNS, H. M. Anatomy, morphology and development. In: *The Lichens*. Edited by V. AHMADJIAN & M.E. HALE. **New York: Academic Press**. 1973.

KAFFER, M. I. **Biomonitoramento da Qualidade do Ar com uso de Líquens na cidade de Porto Alegre**, RS. 2011. 220 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KAPPEN, L.; Response to Extreme Environments; In *The Lichens*; AHMADJIAN, V.; HALE, M. E.; Ed.; **Academic Press**, New York, 1973, p 311.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales. **Jena: Gustav Fischer**, 1998.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales. **Munchen: Elsevier**, 2005.

KRICKE, R.; LOPPI, S. Bioindication: the I. A. P. approach. In: NIMIS, L.; SCHEIDEGGER, C. & WOLSELEY, P. (eds.). *Monitoring with lichens - monitoring lichens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. P. 21-37, 2002.

LAGARDE, A. (2017). **Études phytochimiques du lichen *Nephroma laevigatum* et de ses champignons endolichéniques**. Évaluation des activités antiprolifératives et anti-biofilms. Tese (Doutorado em Química Aplicada e Química das Substâncias Naturais) l'Université de Limoges.

LATKOWSKA, E. et al. Secondary metabolites of the lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. and their presence in spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) bark. In: *Polonia: [s.n.]*. 2015.

LAU, N. S, MATSUI, M., ABDULLAH, A. A. A. Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. **BioMed Research International**, v. 15, 2015.

LEMIEUX, C., OTIS, C.; TURMEL, M. Chloroplast phylogenomic analysis resolves deep-level relationships within the green algal class Trebouxiophyceae. **BMC Evolutionary Biology**, 14(1), 211, 2014.

LIAS. **Primary photobiont**. 2020. Disponível em: <<https://glossary.lias.net/w/index.php?title=Photobiont&oldid=3920>>. Acesso em: 20 dez. 2020.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. H. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 749–756. 2008.

LIMA, E. L. (2013). **Riqueza e composição de líquens corticícolos crostosos em área de caatinga no estado de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco, Recife, Brasil. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/12661/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Edvaneide%20de%20Lima.pdf>. Acesso em: 29 out. 2020.

LOHTANDER, K.; OKSANEN, I.; RIKKINEN, J. Genetic diversity of green algal and cyanobacterial photobionts in *Nephroma* (Peltigerales). **Lichenologist**, 4, 325–339, 2003.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H. & STAHL, D. A. B. *Biología de los Microorganismos*. **Pearson Educación S. A.**, 2015.

MAKI, E. S. et al. Utilização de bioindicadores em monitoramento de poluição. **Biota Amazônia Open Journal Sistem**, v. 3, n. 2, p. 2179-5746, 2013. Disponível em:

<https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/705/v3n2p169-178.pdf>. Acesso em: 29 out. 2020.

MARCELLI, M. P. Estudo da diversidade de espécies de fungos liquenizados do Estado de São Paulo. **Seção de Micologia e Liquenologia**, v.1, p. 1- 27, 1997.

MARCELLI, M. P. Fungos Liquenizados. In: XAVIER FILHO, L. et al. (ed.). **Biologia de Líquens**. Âmbito Cultural Edições Ltda.: Rio de Janeiro. p. 503-520. 2006.

MARTÍNEZ-ALBEROLA, F.; BARRENO, E.; CASANO, L. M.; GASULLA, F.; MOLINS, A.; DEL CAMPO, E. M. Dynamic evolution of mitochondrial genomes in Trebouxiophyceae, including the first completely assembled mtDNA from a lichen-symbiont microalga (*Trebouxia* sp. TR9). **Scientific Reports**, 9(1), 8209, 2019.

MARTINS, M. C. B. et al. Usnic acid potassium salt: An alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–6, 2014.

MARTINS, S. M. A. (2006). **Estudo da comunidade líquênica epífita em *Dodonaea viscosa* L. na restinga do parque estadual de Itapuã, Viamão, RS**. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, Brasil. Disponível em: [http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/pgibt/2014/07/Suzana\\_Maria\\_de\\_Azevedo\\_Martins\\_DR.pdf](http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/pgibt/2014/07/Suzana_Maria_de_Azevedo_Martins_DR.pdf). Acesso em: 29 out. 2020.

MARTINS, S.M.A.; KAFFER, M.I.; LEMOS, A. Líquens como bioindicadores da qualidade do ar numa área de termoeletrica, Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 35(3), p. 425-433, 2008.

MCMULLIN, R.T.; ANDERSON, F. Lichens Comuns do Nordeste da América do Norte. **New York Botanical Garden Press**, Bronx, N. York, 2014.

MITROVIĆ, T.; STAMENKOVIĆ, S.; CVETKOVIĆ, V.; NIKOLIĆ, M.; TOŠIĆ, S.; STOJIČIĆ, D. Lichens as source of versatile bioactive compounds. **Biologica Nyssana**, 2(1), 1-6, 2011.

MOLINS, A.; MOYA, P.; GARCÍA-BREIJO, F. J.; REIG-ARMIÑANA, J.; BARRENO, E. Molecular and morphological diversity of *Trebouxia* microalgae in sphaerothalloid *Circinaria* spp. lichens1. **Journal of Phycology**, 54(4), 494-504, 2018a.

MORALES, E. A.; LÜCKING, R.; ANZE, R. **Una introducción al estudio de los líquenes de Bolivia**. Cochabamba: Universidad Católica Boliviana “San Pablo”, 2009.

MOREIRA, F. D. FONSECA, M. M. FERREIRA, L. AGUIAR, R. A. SANTOS, S. C. CARPENEZ, T. G. SANTIAGO, I. F. Uso de líquens como bioindicadores da qualidade do ar em centro urbano, Juiz de Fora, MG. **6º Simpósio de Gestão Ambiental e Biodiversidade**, 2017.

MOYA, P.; ŠKALOUD, P.; CHIVA, S.; GARCÍA-BREIJO, F. J.; REIG-ARMINANA, J.; VANČUROVÁ, L.; BARRENO, E. Molecular phylogeny and ultrastructure of the lichen microalga *Asterochloris mediterranea* sp. nov. from Mediterranean and Canary Islands ecosystems. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 65(6), 1838-1854., 2015.

- MOYA, P.; CHIVA, S.; MOLINS, A.; JADRNÁ, I.; ŠKALOUD, P.; BARRENO, E.; ONDŘEJ, P. *Myrmecia israeliensis* as the primary symbiotic microalga in squamulose lichens growing in European and Canary Island terricolous communities. **Fottea**, 18(1), 72-85, 2018.
- MUGGIA, L.; CANDOTTO-CARNIEL, F.; GRUBE, M. The lichen photobiont *Trebouxia*: towards and appreciation of species diversity and molecular studies. In Grube, M.; Seckbach, J.; Muggia, L., (eds), *Algal and Cyanobacterial Symbioses*. London: **World Scientific Publishing Europe Ltd**, pp. 111–146, 2017.
- MUGGIA, L., LEAVITT, S., BARRENO, E. The hidden diversity of lichenised *Trebouxiophyceae* (Chlorophyta). **Phycologia**, n. 57(5): 503-524, 2018.
- MUGGIA, L.; NELSEN, M. P.; KIRIKA, P. M.; BARRENO, E.; BECK, A.; LINDGREN, H.; LUMBSCH, H. T.; LEAVITT, S. D. and *Trebouxia* working group. Formally described species woefully underrepresent phylogenetic diversity in the common lichen photobiont genus *Trebouxia* (*Trebouxiophyceae*, Chlorophyta): an impetus for developing an integrated taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 149, 106821, 2020.
- NASH III, T. H.; Photosynthesis, Respiration, Productivity and Growth; In: **Lichen Biology**; NASH III, T. H. Ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1996, p 88.
- NASH III, T. H.; Nitrogen, its Metabolism and Potential Contribution to Ecosystems; In: **Lichen Biology**; NASH III, T. H.; Ed.; Cambridge University Press, Cambridge 1996, p 121.
- NASH III, T. H., **Lichen biology**, 2<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge, 2008.
- NATIVIDAD, J. S. C. (2020). **Patrones de selección de microalgas en comunidades de líquenes terrícolas en biocostras**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universitat de València, Valencia, Espanha.
- O'BRIEN, H.; MIADLIKOWSKA, J.; LUTZONI, F. Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. **European Journal of Phycology**, 40, 363–378, 2005.
- OKSANEN, I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 73, p. 723-734, 2006.
- PARROT, D.; PERESSE, T.; HITTI, E.; CARRIE, D.; GRUBE, M.; TOMASI, S. Qualitative and spatial metabolite profiling of Lichens by a LC-MS approach combined with optimised extraction. **Phytochemical Analysis**, 26, 23-33, 2015.
- PEREIRA, E. C. **LIQUENS**. 2006. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/\\_arquivos/14\\_Biodiv\\_14\\_Cap05.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/14_Biodiv_14_Cap05.pdf). Acesso em: 29 out. 2020.
- PÈREZ, M. J.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. An improved method to isolate lichen algae by gel filtration. **Plant Cell Reports**, v. 4, p. 210-211, 1985.
- POELT, J. **Classification**. - In: V. AHMADJIAN & M. E. HALE (eds.): *The Lichens*. Academic Press, New York and London, pp. 599-632. 1973.
- PRESTES, R. M.; VINCENCI, K. L. Bioindicadores como avaliação de impacto ambiental. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v.2, n. 4, p. 1473-1493, 2019.
- PURVIS, O. W. **Lichens**. London, The Natural History Museum. 2000.

- RANKOVIĆ, B.; KOSANIĆ, M. Biotechnological substances in lichens. **Natural Bioactive Compounds**, p. 249–265, 2021.
- RANKOVIĆ, B.; LONDON, D. Lichen secondary metabolites bioactive properties and pharmaceutical potential, 2nd ed. **Publishing Springer International**, Cham, Heidelberg, New York, 2019.
- REIS, R. A. (2005) **Estudo filogenético de fotobiontes de líquens; Isolamento e cultivo de simbiontes liquênicos; Estudo comparativo de polissacarídeos e ácidos graxos do líquen *teloschistes flavicans* e seus simbiontes**. Tese (Doutorado em Ciências -Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.
- RIKKINEN, J. Molecular studies on cyanobacterial diversity in lichen symbioses. **MycoKeys**. 6. 3–32. 10.3897/mycokeys.6.3869, 2013.
- RIKKINEN, J. Cyanolichens. **Biodivers. Conserv.** v. 24, n. 4, p. 973–993, 2015.
- RIKKINEN, J. **Symbiotic Cyanobacteria in Lichens**. [s.l.] University of Helsinki, 2016.
- RIKKINEN, J. Cyanobacteria in terrestrial symbiotic systems. **Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes**. Springer, Cham., p. 243–294, 2017.
- RONCALLO, K.; BAQUERO, C. P. M.; CERPA, J. D. O.; VÁSQUEZ, J. A. J.; CHEBE, M. A. N. Líquenes: cuando la unión hace la fuerza. **InfoFlora, Boletín de Botánica**. v. 2, p. 16, 2017.
- RUTHES, A. C. Ficobiontes de Fungos Liquenizados e de Vida Livre: **cultivo, caracterização estrutural de polissacarídeos e atividade biológica de um polímero contendo ácido nosturônico**. 188f. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, 2010.
- SAIKI, M., FUGA, A., ALVES, E.R., VASCONCELLOS, M.B.A.; MARCELLI, M. The use of *Canoparmelia texana* lichenized fungi in the study of atmospheric air pollution. In: **Third International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution**, Ljubljana, pp. 705-708. 2003.
- SÁNCHEZ CHARRY, S. **Identificación de los metabolitos secundarios de líquenes del género *Sticta* procedentes del Páramo de Anaime (Anaime - Tolima)**. [s.l.] Universidad de Ibagué, 2019.
- SANDERS, W. B. Lichens: the interface between Mycology and Plant Morphology. **BioScience**, 51 (12): 1025-1035, 2001.
- SANDERS, W. B.; MASUMOTO, H. Lichen algae: the photosynthetic partners in lichen symbioses. **The Lichenologist** 53, 347–393, 2021. Doi:10.1017/S0024282921000335
- SANTOS, A. J. M. et. al. **Ocorrência de Gêneros de Parmeliaceae em Área de Cerrado de São João do Paraíso – MA**. Universidade do Estado do Pará – Campus VIII/Marabá – Anais Eletrônico - ISSN: 2447-7605, n. X, 2019.
- SANTOS, J. S.; DIAS, I. P. R. C.; DA SILVA, I. L. A.; DO NASCIMENTO, G. M. Ocorrência de espécies corticícolas de *Parmotrema* A. Massal. (Parmeliaceae; ascomycota liquenizados) em vegetação de cerrado no estado do Maranhão, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 15, n. 1, 2021.

- SARMIENTO-VIZCAÍNO, A.; BRAÑA, A.; GONZÁLEZ, V.; NAVA, H.; MOLINA, A.; LLERA, E.; et al. Atmospheric Dispersal of Bioactive *Streptomyces albidoflavus* Strains Among Terrestrial and Marine Environments. **Microbial Ecology**, 2016.
- SCHLENSOG, M. & SCHROETER, B. A new method for the accurate in situ monitoring of chlorophyll a fluorescence in lichens and bryophytes. **The Lichenologist** 33: 443- 452. 2001.
- SCHNEIDER, A. **A guide to the study of lichens**. 2 nd. Edition. Boston. Knight and Millet. 2889p., 1904.
- SEPTIÉN, J. T. **CYANOLICHENS: A bibliographical review**. [s.l.] Universidad de La Laguna, 2020.
- SILVA, R. A. (2002). *Cladonia verticillaris* (Líquén), como biomonitor padrão da qualidade do ar no Distrito de Jaboatão – PE. Dissertação (Mestrado em Gestão e Política Ambientais) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Disponível em: [https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/68171/arquivo8344\\_1.pdf](https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/68171/arquivo8344_1.pdf). Acesso em: 29 out. 2020.
- ŠKALOUD, P.; MOYA, P.; MOLINS, A.; PEKSA, O.; SANTOS-GUERRA, A.; BARRENO, E. Untangling the hidden intrathalline microalgal diversity in *Parmotrema pseudotinctorum*: *Trebouxia crespoana* sp. nov. **The Lichenologist**, 50(3), 357-369, 2018.
- SPIELMANN, A. A. & MARCELLI, M. P. **Fungos liquenizados (liquens)**. 1. ed. São Paulo: IBt, 2006.
- SPRIBILLE, T.; TUOVINEN, V.; RESL, P.; VANDERPOOL, D.; WOLINSKI, H.; AIME, M. C.; SCHNEIDER, K.; STABENTHEINER, E.; TOOMEHELLER, M.; THOR, G.; MAYRHOFER, H.; JOHANNESON, H.; MCCUTCHEON, J. P. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. **Science** 353: 488-492, 2016.
- STANOJKOVIĆ, T. Lichen secondary Metabolites. Institute of o nology and Radiologie of Serbia, Belgrade, Serbia. **Springer Nature Switzerland**, ago. 2019.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Experimental cultivation of lichens and lichen symbionts. **Can. J. Bot.** 73 (suppl.1): P.579-589. Canadá, 1995.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Culture methods and culture of selected tropical mycobionts and photobionts as exemplified by South American lichens. In: Marcelli, M. P. and Seaward, M. R. D. (Eds.) **Lichenology in Latin America: Hystory, current knowledge and applications**. São Paulo: CETESB, p. 143-145, 1998.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Experimental studies of the lichen symbiosis: DNA-analyses, differentiation and secondary chemistry of selected mycobionts, artificial resynthesis of two and tripartite symbioses. **Symbiosis**, v. 30, p. 207-227, 2001.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Biochemical diversity and ecology of lichen-forming fungi: Lichen substances, chemosyndromic variation and origin of polyketide-type metabolites (biosynthetic pathways). In **Recent Advances in Lichenology**. Springer, New Delhi. 161-179, 2015.
- SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 55, 909-941, 2016.

- SUMITA, N. M.; MENDES, M. E.; MACCHIONE, M.; GUIMARÃES, E. T.; LICHTENFELS, A. J. F. C.; LOBO, D. J. A.; SALDIVA, P. H. N. *Tradescantia pallida* cv. *Purpurea Boom* in the characterization of air pollution by accumulation of trace elements. **Journal of the Air & Waste Management Association**. 2003, 53: 574-579.
- SUZUKI, M.; PARROT, D.; BERG, G.; GRUBE, M.; TOMASI, S. Lichens as natural sources of biotechnologically relevant bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TIEVANT, P. **Guide des lichens**. 350 espèces de lichens d'Europe. Paris, p. 12-26, 2001.
- TOMASELLI, L. The microalgal cell, Handbook of microalgal culture: **Biotechnology and applied Phycology**, p. 3, 2004.
- UPRETI, D. et al. **Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Biomonitoring and Bioprospection**. In: India: [s.n.]. 2015.
- VAN HALUWYN, C. & VAN HERK, C.M. Bioindication: The community approach. In: NIMIS, P.L.; SCHEIDEGGER, C.; WOLSELEY, P.A. (eds.). *Monitoring with Lichens*. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, pp. 39-64, 2002.
- VAN HALUWYN, C.; ASTA, J.; GAVÉRIAUX, J. P. **Guide des lichens de France - Lichens des arbres** (Belin), 2009.
- WEBSTER, J.; WEBER, R.W.S. *Introduction to Fungi*. 3rd. ed. Cambridge, **Cambridge University Press**, 2007.
- WILL-WOLF, S., HAWKSWORTH, D.L., MCCUNE, B., ROSENRETER, R., SPIMAN, J.M. 2004. Lichenized Fungi. In: MUELLER, G.M., BILLS, G.F., FOSTER, M.S. (eds) *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier, Amsterdam, pp. 173-195.
- XAVIER FILHO, L. et al. *Biologia de liquens*. Rio de Janeiro, RJ. **Âmbito Cultural**, 2006, 624 p. changes in microclimate. *Agricultural and Forest Meteorology*, v.201, p.187-195, 2015.
- YAMAMOTO, Y.; KINOSHITA, Y.; TAKAHAGI, T.; KROKEN, S.; KUROKAWA, T.; YOSHIMURA, I. Factors affecting discharge and germination of lichen ascospores. **J. Hattori Bot. Lab.**, v. 85, p. 267-278, 1998.
- YAMAMOTO, Y.; MIZUGUCHI, R.; YAMADA, Y. Tissue cultures of *Usnea rubescens* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their cultures. **Agric. Biol. Chem.**, v. 49, p. 3347-3348, 1985.
- YOSHIMURA, I.; YAMAMOTO, Y.; NAKANO, T.; FINNIE, J. Isolation and culture of lichens photobionts and mycobionts. In: Kraner, J.; Beckett, R. P.; Varma, A. K. (eds) **Protocols in lichenology: Culturin Biochemistry Ecophysiology and Use in Biomonitoring**. Berlin: Springer Verlag, 2002, p. 15.
- YUAN, X., XIAO, S., TAYLOR, T. N. Lichen-like symbiosis 600 million years ago. **Science**, v. 308, p. 1017-1020, 2005.
- ZAHLBRUCKNER, A. Lichenes. B. Spezieller Teil. **Die natürlichen Pflanzenfamilien** (2nd edn) (A. Engler, ed.) 8: 61-270. Leipzig: W. Engelmann, 1926.

## **ARTIGO PARA SUBMISSÃO**

---

### **Capítulo 1**

**CIANOLIQUENS COMO INDICADORES NO BIOMONITORAMENTO DA POLUIÇÃO  
E FONTE DE BIOMOLÉCULAS: uma revisão de literatura**

# CIANOLIQUENS COMO INDICADORES NO BIOMONITORAMENTO DA POLUIÇÃO E FONTE DE BIOMOLÉCULAS: uma revisão de literatura

Daniele Pereira de Oliveira Sousa<sup>1</sup>; Emanuelle Costa Ramos<sup>1</sup>; Leonardo T. Dall’Agnol<sup>1</sup>;  
Juliano dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Maranhão, CEP. 65080-805, São Luís, Maranhão, Brasil.

## RESUMO

Os líquens são caracterizados como uma associação do tipo simbiótica, sendo compostos por um ou mais fungos (micobionte) e uma ou mais algas verdes ou cianobactérias (fotobionte). Por essa razão são classificados de acordo com o fotobionte associado, dessa forma, os líquens cujo fotobionte principal é uma cianobactéria são denominados de cianolíquens, sendo o seu fotobionte chamado de cianobionte. Nesse contexto, este trabalho objetivou realizar uma revisão de literatura com foco nos cianolíquens como biomonitores de poluição ambiental e na produção de biomoléculas. Os trabalhos foram encontrados em diferentes bases de dados, por meio do cruzamento dos descritores utilizando os operadores booleanos “OR” e “AND”. A maioria dos cianolíquens são pertencentes à divisão *Ascomycota* e muitas de suas espécies correspondem ao grupo da ordem *Peltigerales*. As famílias mais representativas em termos de números de espécies foram: *Peltigeraceae*, *Lobariaceae*, *Collembataceae* e *Stereocaulaceae*. Com relação à simbiose a maioria das espécies estão associadas com *Nostoc*. Os cianolíquens foram considerados como ótimos bioindicadores de alterações naturais e/ou antrópicas devido sua alta sensibilidade aos poluentes ambientais. Além disso, foram considerados como organismos de alto potencial biotecnológico pela versatilidade de algumas espécies em sintetizar substâncias biologicamente ativa com diversas atividades biológicas como: anticâncer, antimicrobiana, antioxidantes, e antivirais, por exemplo. Portanto, os cianolíquens mostraram-se altamente importantes não só pelo desempenho dessas funções, como também pelo seu importante papel ecológico nos ecossistemas. O estudo mostrou também que ainda há grandes lacunas em relação aos trabalhos com cianolíquens. Aliado a isso, a exploração desenfreada desses organismos, têm levado muitas espécies ao declínio nos ecossistemas devido suas lentas taxa de crescimento. Por isso, se faz necessário a realização de mais estudos, a fim de se obter conhecimentos mais atuais, completos e mais profundos a respeito desses organismos, bem como para uma melhor compreensão da forma como ocorre a interação nessas associações.

**Palavras-chave:** Biomoléculas. Biomonitores. Cianolíquen. Líquen. Poluição.

## INTRODUÇÃO

Os líquens caracterizam-se como um grupo de organismos que estão simbioticamente associados entre si, sendo compostos por um ou mais fungos e uma ou mais algas verdes ou cianobactérias, ou ambos (SPRIBILLE et al., 2016). As algas verdes como fotobiontes são denominados de “clorobiontes” ou “ficobiontes”, sendo o líquen denominado de

“cloroliquen” ou ficoliquen” (LIAS, 2020; MUGGIA et al., 2018). Já as cianobactérias como fotobiontes são denominados de “cianobiontes”, enquanto o liquen é denominado “cianoliquen” (RIKKINEN, 2015, 2017).

As algas verdes pertencentes à divisão Chlorophyta constituem o maior e mais diversificado grupo de algas (UAB, 2020). Caracterizam-se como seres vivos autótrofos, eucariontes, uni ou multicelulares, coloniais ou cenocíticos, imóveis ou de vida livre (KENNEDY, 2019; PAIM, 2020). A maioria dos fungos liquenizados, cerca de 90%, encontrados na natureza, contém Chlorophyta como único fotobionte ou em companhia de cianobactérias. Dentre as algas verdes formadoras de líquens, as da família *Trebouxiaceae* Friedl e as do gênero *Trentepohlia* C. Martius são os mais conhecidos e estudados (MUGGIA et al., 2018).

As cianobactérias são organismos autótrofos, procariontes, unicelulares ou filamentosas, podendo ser encontradas nos mais diversos habitats, incluindo ambientes terrestres e aquáticos de forma individual ou agrupadas em colônias (LAU; MATSUI; ABDULLAH, 2015). Segundo KOMÁREK et al. (2014) as cianobactérias são divididas atualmente em oito grupos (*Gloeobacterales*, *Synechococcales*, *Oscillatoriales*, *Chroococcidiopsidales*, *Spirulinales*, *Pleurocapsales*, *Chroococcales* e *Nostocales*) bastante diversos sendo os três últimos os que mais aparecem em cianoliquen (MADIGAN et al., 2015; SEPTIÉN, 2020). Aproximadamente 10% dos fungos liquenizados contém cianobactérias como único fotobionte ou em companhia de Chlorophyta. Dentre os gêneros de cianobactérias, *Nostoc* e *Scytonema* são os mais frequentes como simbiontes de liquen (HONDA & VILEGAS, 1999; RIKKINEN, 2015, 2017).

Os líquens têm se destacado nas últimas décadas pela grande versatilidade que algumas espécies possuem em produzir substâncias bioativas com alto potencial biotecnológico, sendo utilizados para os mais variados fins, principalmente, nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (ABED; DOBRETSOV; NASCIMENTO, 2016; SUDESH, 2009; RASTOGI & SINHA, 2009). E ainda, como biomonitorios de poluição atmosférica devido sua alta sensibilidade a gases poluentes como, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e ozônio absorvendo-os de forma direta por todo o seu talo, já que são desprovidos de raiz, estômatos ou cutículas; e pela habilidade em absorver e acumular os metais pesados do meio ambiente (CECCONI et al., 2018; MIKHAILOVA, 2007; TORTORA et al., 2017; NIMIS et al., 2020). Dessa forma, este estudo objetivou realizar uma revisão integrativa da literatura acerca dos cianolíquens como biomonitorios de poluição ambiental e na produção de biomoléculas buscando contribuir

com o conhecimento, em particular, dessa importante associação simbiótica e mostrar as lacunas existentes.

## **METODOLOGIA**

O estudo tratou-se de uma revisão integrativa desenvolvida a partir da pesquisa bibliográfica efetuada em diferentes bases de dados: Google Scholar (Google), ScienceDirect (Elsevier) e PubMed Central (PMC). Foram selecionados os trabalhos acerca dos líquens associados a cianobactérias (cianolíquens), com foco na sua utilização no biomonitoramento como indicadores biológicos de poluição e na produção de substâncias biologicamente ativas.

Os descritores utilizados na pesquisa bibliográfica foram: “lichen”, “cyanolichen”, “biomonitors”, “pollution” e “biomolecules”. A busca dos trabalhos foi realizada por meio do cruzamento dessas palavras utilizando os operadores booleanos “OR” e “AND”. Como critério de inclusão considerou-se artigos, notas científicas, relatórios científicos, livros, monografias, dissertações e teses sobre o tema da pesquisa, publicados entre os anos de 1990 - 2021, nos idiomas português, espanhol e inglês. Como critérios de exclusão suprimiu-se os artigos de revisão, capítulos de livro, trabalhos publicados em anais de eventos, além de artigos com abordagem nos líquens que possuem como fotobionte algas verdes. Além disso, foram rejeitados estudos que enfocassem a diversidade de cianolíquens, taxonomia e fisiologia, estudos sobre o papel dos cianolíquens, estudos comparativos da habilidade das espécies de cianolíquens e estudos comparativos de cianolíquens e musgo, ou cianolíquens e clorolíquens.

A figura 1 foi desenhada com o auxílio do programa *ACD/Chemsketch*. As fotos da figura 2 foram retiradas do *Web of Science*: <https://www.waysofenlichenment.net/>. E as tabelas 1, 2 e 3 e as figuras 3, 4 e 5 foram feitas utilizando o programa *Microsoft Excel 365*.

## **RESULTADOS**

Foram encontrados um total de 544 artigos com a temática proposta. Após a triagem, permaneceram 64 títulos referentes aos fungos liquenizados associados a cianobactérias, consistindo em 42 artigos que abordaram exclusivamente os cianolíquens produtores de substâncias bioativas e 22 artigos sobre os cianolíquens como biomonitores de poluição.

Os trabalhos foram organizados em duas tabelas. Onde a tabela 1 mostra a análise dos trabalhos com os potenciais benéficos de substâncias bioativas e extratos de cianolíquens. Enquanto a tabela 2 mostra os trabalhos em que foram analisados vários oligoelementos,

utilizando como método o biomonitoramento por cianolíquens, bem como a avaliação de sensibilidade em relação a exposição desses organismos aos diferentes poluentes.

A figura 1 mostra as estruturas moleculares de alguns dos bioativos listados na tabela 1, com enfoque nos mais frequentes nos estudos com líquens.

A figura 2, demonstra a diversidade e os aspectos do talo de alguns gêneros das famílias de cianolíquens presentes nos dados das tabelas 1 e 2.

A Figura 3 expressa as famílias mais representativas em termos de números de espécies. Sendo elas: Peltigeraceae, Lobariaceae, Collemataceae e Stereocaulaceae, com 15, 10, 10 e 9 espécies, respectivamente. Sendo que, Stereocaulaceae e Peltigeraceae foram as famílias mais representativas para as espécies fontes de produtos bioativos; e Peltigeraceae e Collemataceae as mais representativas para as espécies utilizadas como biomonitores de poluição ambiental.

Os países e a quantidade de trabalhos realizados com cianolíquens como fontes de biocompostos e como biomonitores de poluição estão indicados na figura 4, a este respeito podemos observar que a maioria dos estudos se concentra nos continentes europeu e asiático, sendo a Turquia o país com o maior número de estudos realizados (oito). Na América do Sul e na América do Norte, destacam-se Brasil e Canadá, com quatro e seis estudos realizados, respectivamente. E a tabela 3 correlaciona os trabalhos, utilizados neste estudo, com seus respectivos países onde foram desenvolvidos, bem como os locais de coleta das amostras de cianolíquens.

Outrossim, a quantidade de trabalhos encontrados entre os anos 1990-2021 é demonstrada na figura 5. A este respeito observa-se que o ano de maior publicação foi 2015 com 8 trabalhos. E pode-se perceber também uma grande lacuna de conhecimento acerca dos estudos realizados nesse intervalo de tempo acerca de cianolíquens como fontes de substâncias bioativas e como biomonitores de poluição, sendo que a literatura disponível foi encontrada somente a partir de 1993. Observa-se também que a quantidade de trabalhos disponibilizados no decorrer dos anos é demasiadamente pequena. Esse baixo número de artigos encontrados corrobora com essa significativa lacuna do conhecimento no que diz respeito ao assunto, reiterada pela avaliação da presente pesquisa. Esses dados só reforçam a necessidade de urgência em se produzir conhecimento sobre o assunto em questão.

**Tabela 1.** Cianoliquens como Fontes de Compostos Bioativos (1990 – 2021)

Cianoliquens		Cianobactéria	Compostos bioativos / extratos	Atividade Biológica	Referências
Família	Gênero ou Espécie	Associada (gênero)			
<b>Peltigeraceae</b>	<i>Peltigera canina</i> (L.) Willd.	<i>Nostoc</i>	Nostoclídeos I e II	Fitotóxica e citotóxica	YANG & SHIMIZU, 1993; KAR; GOGOI; ARGADE, 2005
<b>Pannariaceae</b>	<i>Erioderma leylandii</i> (Taylor) Müll. Arg.	<i>Scytonema</i>	Cloropanmarina, panarina, ácido úsnico	Antiparasitária, fotoprotetora	FOURNET et al., 1997; QUILHOT et al., 2002
<b>Dictyonemataceae</b>	<i>Dictyonema glabratum</i> D.Hawksw		Lectina	Hemaglutinante	ELIFIO et al., 2000
<b>Lobariaceae</b>	* <i>Lobaria pulmonária</i> (L.) Hoffm.		Extratos aquoso, metanólico, de acetona e de álcool rizonílico, pulmonarianina, ácido estíctico, isidioforina	Antiinflamatória e antiulcerogênica, gastroprotetora, anticâncer, antioxidante e antibacteriana	SÜLEYMAN et al., 2003; ODABASOGLU et al., 2004; KARAKUS et al., 2009; ATALAY et al., 2011; SHRESTHA et al., 2014; ATALAY et al., 2015; OZTURK et al., 2019; GOGA et al., 2020
<b>Collemataceae</b>	<i>Collema cristatum</i> (L.) Weber ex F.H.Wigg.	<i>Nostoc</i>	Extrato de acetona, metanol e aquoso e collemin A	Antibacteriana e fotoprotetora	TORRES et al., 2004; RANKOVIC et al., 2007; TEMINA; LEVITSKY; DEMBITSKY, 2010; DEMBITSKY, 2017
<b>Peltigeraceae</b>	<i>Peltigera rufescens</i> (Weiss) Humb.		Extratos de água e metanol	Antioxidante	ODABASOGLU et al., 2005
<b>Collemataceae</b>	<i>Collema flaccidum</i> (Ach.) Ach.		Colleflaccinósidos A e B, colleman (Cf-5-s) e colleflaccinósido B	Antitumoral e possível atividade imunomoduladora	ŘEZANKA & DEMBITSKY, 2006; JENSEN et al., 2010; DEMBITSKY, 2017

**Tabela 1 (Continuação)**

<b>Lobariaceae</b>	<i>Sticta nylanderiana</i> Zahlbr.	<i>Nostoc</i>	Compostos fenólicos (etil-3-formil-2,4-di-hidroxi-5,6-dimetilbenzoato, metil-2,4-di-hidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato, orselinato de etilo), extrato metanólico e ácido lecanórico	Fotoprotetora e antioxidante	ZHANG; GUO & LOU, 2006; HENG et al., 2010
<b>Stereocaulaceae</b>	<i>Stereocaulon paschale</i> (L.) Hoffm.	<i>Stigonema/ Nostoc</i>	Extrato metanólico, extrato do líquen	Antioxidante, antimicrobiana, anticâncer e antidiabética	FRASER et al., 2007; RANKOVIĆ; KOSANIĆ & STANOJKOVIĆ, 2014; CARPENTIER et al., 2017
<b>Peltigeraceae</b>	<i>Peltigera polydactyla</i> (Neck.) Hoffm.		Extratos aquoso e metanólico	Antibacteriana	KARAGÖZ et al., 2009
<b>Stereocaulaceae</b>	<i>Stereocaulon sasakii</i> Zahlbr.		Ácido lobárico	Antimitótica	MORITA et al., 2009
<b>Peltigeraceae</b>	<i>Peltigera praetextata</i> (Flörke ex Sommerf.) Zopf	<i>Nostoc</i>	Extratos metanólico	Antioxidante, antimicrobiana	HENG et al., 2010; SARGSYAN et al., 2021
<b>Peltigeraceae</b>	<i>Peltigera paraetaxtala ...</i>		Extrato aquoso	Antifúngica	SHAHI; SHAHI & UPRETI, 2011
<b>Stereocaulaceae</b>	<i>Stereocaulon halei</i> I.M. Lamb		Lobarina	Antioxidante e possível atividade antidiabética e antiobesidade	ISMED et al., 2012
<b>Peltigeraceae</b>	<i>Solorina crocea</i> (L.) Ach.		Lacases homodiméricas (grandes) e monoméricas (pequenas)	Despolimerização e descoloração dos ácidos húmicos do solo	LISOV et al., 2012

**Tabela 1 (Continuação)**

<b>Stereocaulaceae</b>	<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer ex Funck		Ácido lobárico e lobarstina	Antioxidante, anticâncer, antimicrobiana e inibidora da proteína RecA de <i>Escherichia coli</i>	BHATTARAI et al., 2013; BELLIO et al., 2015; 2017; HONG et al., 2018
<b>Stereocaulaceae</b>	<i>Stereocaulon</i> Hoffm.		Ácido perlatólico	Antimicrobiana e inibidora da proteína RecA de <i>Escherichia coli</i>	BELLIO et al., 2015; 2017
<b>Stereocaulaceae</b>	<i>Stereocaulon evolutum</i> Graewe		Atranorina	Antiviral	VU et al., 2015
	<i>Pseudocyphellaria coriacea</i> (Hook. & Taylor) D.Galloway & James	<i>Nostoc</i>	Extrato de acetona e fiscioporina	Antimetastática / anticâncer	YANG et al., 2015
<b>Stereocaulaceae</b>	<i>Stereocaulon caespitosum</i> Redinger		Tridepsídeo	Antidiabética, antiobesidade, antiproliferativa, citotóxica, de elastase de leucócitos humanos e atividades inibitórias de protease de citomegalovírus humano	YOUN et al., 2018
<b>Lobariaceae</b>	<i>Lobaria</i> (Schreber) Hoffm.		Lobarioid A	Antibacteriana	ZHENG et al., 2018

**Tabela 1 (Continuação)**

<b>Lobariaceae</b>	<i>Sticta parahumboldtii</i> Moncada & Lücking,  <i>Sticta. cf. andina</i> Moncada & Lücking,  <i>Sticta cf. gyalocarpa</i> (Nyl.),  <i>Sticta leucoblepharis</i> (Nyl.) Tuck. & Mont	<i>Nostoc</i>	Ácidos úsnico, evernico e orselínico	Anticâncer, antimicrobiana, antiviral e antioxidante	SÁNCHEZ CHARRY, 2019
<b>Collemataceae</b>	<i>Leptogium</i> (Ach.) Gray.		Extrato de clorofórmio e acetona	Antimicrobiana	VIEIRA et al., 2019
<b>Lobariaceae</b>	<i>Pseudocyphellaria</i> <i>granulata</i> (C. Bab.) Malme		<b>Extrato de acetona e</b> <b>fisciosporina</b>	<b>Anticâncer</b>	<b>YANG et al., 2019</b>

\*Espécies tripartidas.

**Tabela 2.** Cianoliquens Bioindicadores no Monitoramento de Poluição Ambiental (1990-2021)

Cianoliquens		Cianobactéria Associada (Gênero)	Avaliação de sensibilidade/poluento	Referências
Família	Gênero ou Espécie			
Collemataceae	<i>Collema nigrescens</i> (Hudson) DC.		Sensível ao ozônio	SCHEIDEGGER & SCHROETER, 1994
Lobariaceae	* <i>Lobaria pulmonária</i> (L.) Hoffm.		Sensível ao dióxido de enxofre, ao ozônio, a altas concentrações de sal (NaCl) e metais pesados e intolerante ao dióxido de nitrogênio (NO <sub>2</sub> )	SCHEIDEGGER & SCHROETER, 1994; RIGAKARANDINOS & KARANDINOS, 1998; GIBSON et al., 2013; RODRIGUES, 2013; YEMETS; GAUSLAA & SOLHAUG, 2015; MCMULLIN et al., 2017
	<i>Leptogium</i> (Ach.) Gray.	<i>Nostoc</i>	Sensível ao dióxido de enxofre, óxidos de azoto, a poluição atmosférica e intolerante à perturbação ecológica	GEISER et al., 1998; RODRIGUES, 2013; RINDITA; SUDIRMAN & KOESMARYONO, 2015; MCMULLIN et al., 2017; DUTRA et al., 2020
Collemataceae	<i>Collema cristatum</i> (L.) Weber ex F.H.Wigg., <i>Collema coccophorum</i> Tuck., <i>Collema crispum</i> (Hudson) Weber ex F.H. Wigg., <i>Collema fuscovirens</i> (With.) J.R. Laundon, <i>Collema glebulentum</i> (Nyl. ex Crombie) Degel., <i>Collema tenax</i> (Sw.) Ach.		Sensíveis ao ozônio	ST. CLAIR, 1999

**Tabela 2 (Continuação)**

<b>Lobariaceae</b>	<i>Sticta weigelii</i> (Ach.) Vain		Sensível ao dióxido de enxofre	ST. CLAIR, 1999
	<i>*Peltigera aphthosa</i> (L.) Willd.		Sensível ao dióxido de enxofre, ao ozônio e às perturbações antropogênicas (deposição de metal pesado)	ST. CLAIR, 1999; DARNAJOUX et al., 2015
	<i>Peltigera canina</i> (L.) Willd.		Sensível ao dióxido de enxofre e ao ozônio	ST. CLAIR, 1999
<b>Peltigeraceae</b>	<i>Peltigera didactyla</i> (With.) J.R. Laundon	<i>Nostoc</i>	Sensível ao dióxido de enxofre, ao ozônio a deposição de nitrogênio	ST. CLAIR, 1999; STEVENS et al., 2012
	<i>Peltigera rufescens</i> (Weiss) Humb.		Sensível ao dióxido de enxofre, ozônio e mercúrio e tolerante a metais pesados (cobre)	ST. CLAIR, 1999; BAČKOR et al., 2009; PISANI et al., 2011
	<i>Peltigera membranacea</i> (Ach.) Nyl.		Sensível ao aumento da concentração de dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )	BOTTING & FREDEEN, 2006
	<i>Peltigera praetextata</i> (Flörke ex Sommerf.) Zopf.		Sensível a metais pesados (cobre)	BRANQUINHO et al., 2011
<b>Lobariaceae</b>	<i>Pseudocyphellaria anthraxis</i> (Ach.) H. Magn.		Sensível ao ácido nítrico gasoso (HNO <sub>3</sub> )	RIDDELL; PADGETT & NASH, 2012

**Tabela 2 (Continuação)**

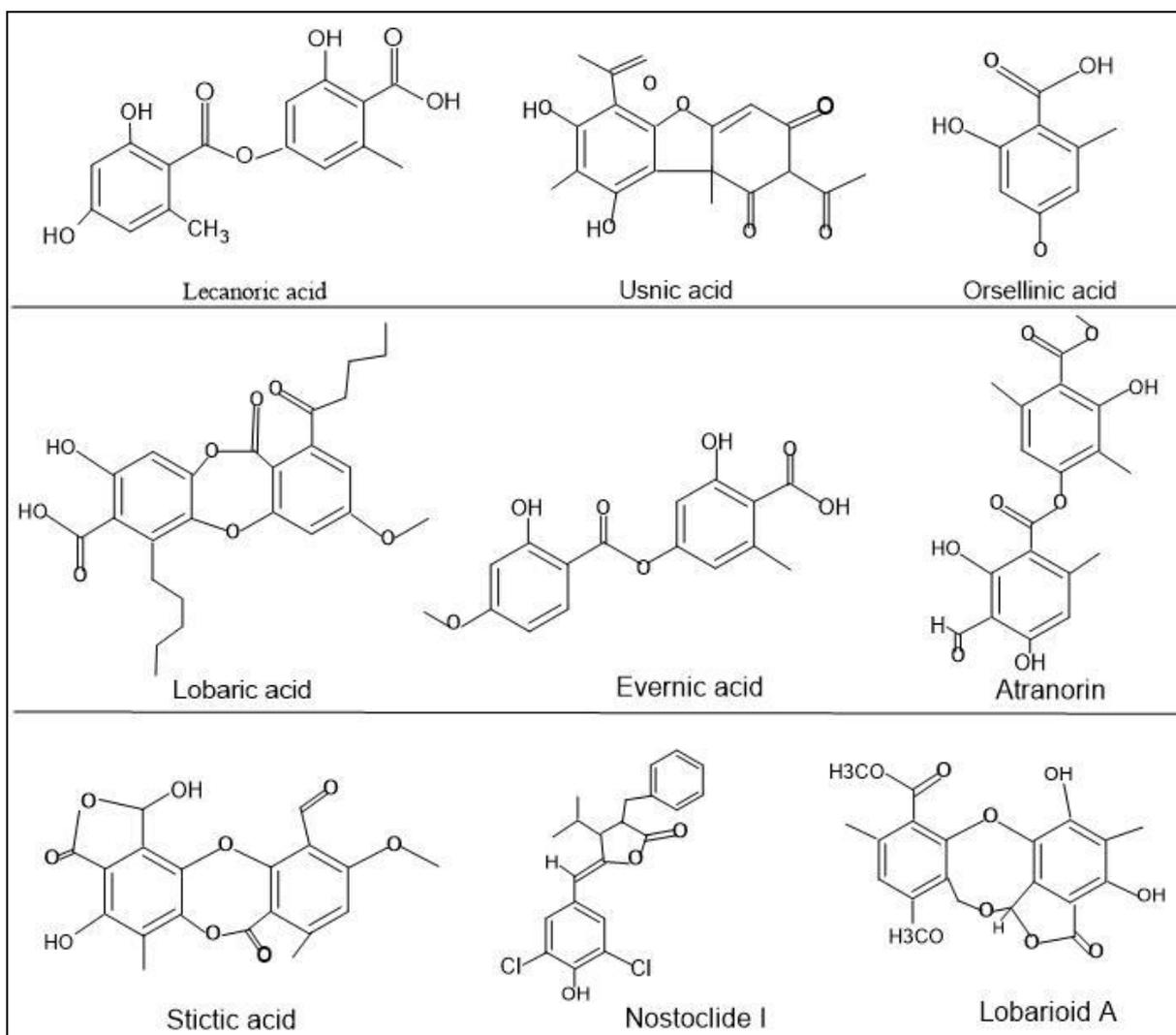
<b>Peltigeraceae</b>	<i>Peltigera hymenina</i> (Ach.) Delise.		Sensíveis a deposição de nitrogênio	STEVENS et al., 2012
<b>Collemataceae</b>	<i>Collema subflaccidum</i> Degel.,		Intolerantes a dióxido de nitrogênio (NO <sub>2</sub> )	GIBSON et al., 2013
	<i>Leptogium laceroides</i> (B. de Lesd.) P.M. Jørg.			
	<i>Leptogium cyanescens</i> (Rabenh) Körb,		Intolerante ao dióxido de nitrogênio (NO <sub>2</sub> ) e sensível a poluição atmosférica	GIBSON et al., 2013; DUTRA et al., 2020
<b>Lobariaceae</b>	<i>Lobaria quercizans</i> Michx., <i>Lobaria scrobiculata</i> (Scop.) DC.,		Intolerantes ao dióxido de nitrogênio (NO <sub>2</sub> ) e à perturbação ecológica	GIBSON et al., 2013; MCMULLIN et al., 2017
<b>Nephromataceae</b>	<i>Nephroma laevigatum</i> Ach.		Intolerante ao dióxido de nitrogênio (NO <sub>2</sub> ) e à perturbação ecológica	GIBSON et al., 2013; MCMULLIN et al., 2017
		<i>Nostoc</i>		
<b>Stereocaulaceae</b>	<i>Stereocaulon japonicum</i> Th. Fr.		Tolerante a metais pesados (cobre)	NAKAJIMA et al., 2013; 2015
<b>Collemataceae</b>	<i>Leptogium azureum</i> (Sw. ex Ach.) Mont., <i>Leptogium milligranum</i> Sierk, <i>Leptogium chloromelum</i> (Ach.) Nyl., <i>Leptogium austroamericanum</i> (Malme) C.W. Dodge		toxitolerantes	BERGER, 2014
<b>Peltigeraceae</b>	<i>Peltigera neopolydactyla</i> (Gyeln.) Gyeln., <i>Peltigera scabrosa</i> Th. Fr.		Sensíveis às perturbações antropogênicas (deposição de metal pesado)	DARNAJOUX et al., 2015

**Tabela 2 (Continuação)**

<b>Nephromataceae</b>	* <i>Nephroma arcticum</i> (L.) Torss.	<i>Nostoc</i>	Sensível às perturbações antropogênicas (deposição de metal pesado)	DARNAJOUX et al., 2015
<b>Coccocarpiaceae</b>	<i>Coccocarpia</i> Pers.	<i>Scytonema</i>	Sensível a poluição do ar	RINDITA; SUDIRMAN & KOESMARYONO, 2015
	<i>Coccocarpia palmicola</i> (Sprengel) Arv. & D. J. Galloway		Intolerante à perturbação ecológica	MCMULLIN et al., 2017
<b>Collemataceae</b>	<i>Collema</i> Fh Wigg., <i>Leptogium corticola</i> (Taylor) Tuck,		Intolerantes à perturbação ecológica	MCMULLIN et al., 2017
<b>Lobariaceae</b>	<i>Pseudocyphellaria perpetua</i> McCune & Miadl.		Intolerantes à perturbação ecológica	MCMULLIN et al., 2017
<b>Nephromataceae</b>	<i>Nephroma</i> Ach.	<i>Nostoc</i>	Intolerantes à perturbação ecológica	MCMULLIN et al., 2017
<b>Pannariaceae</b>	<i>Pannaria conoplea</i> (Ach.) Bory, <i>Pannaria rubiginosa</i> (Thunb.) Delise		Intolerantes à perturbação ecológica	MCMULLIN et al., 2017
<b>Peltigeraceae</b>	<i>Peltigera</i> Willd.		Intolerante - tolerante moderado à perturbação ecológica	MCMULLIN et al., 2017
<b>Stereocaulaceae</b>	* <i>Stereocaulon vesuvianum</i> Pers.		Tolerante a radionuclídeos (137 Cs)	SAVINO et al., 2017
<b>Lichinaceae</b>	** <i>Ephebe brasiliensis</i> (Vain.) Henssen	<i>Stigonema</i>	Sensível a poluição do ambiente e da água	GUMBOSKI et al., 2019

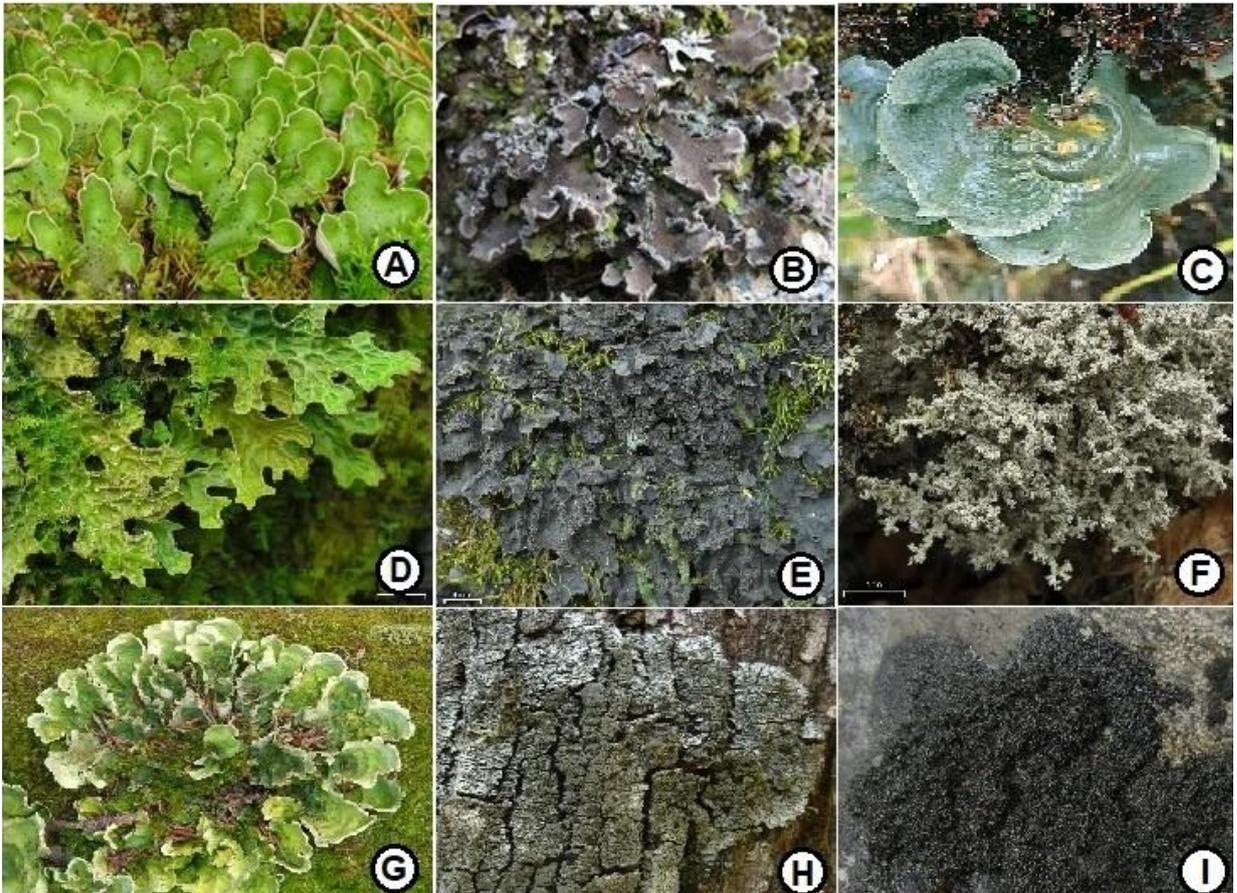
\*Espécies tripartidas. \*\*Espécie semiaquática

**Figura 1.** Estruturas moleculares das substâncias bioativas presentes em cianolíquens, mais estudadas nos estudos com líquens.



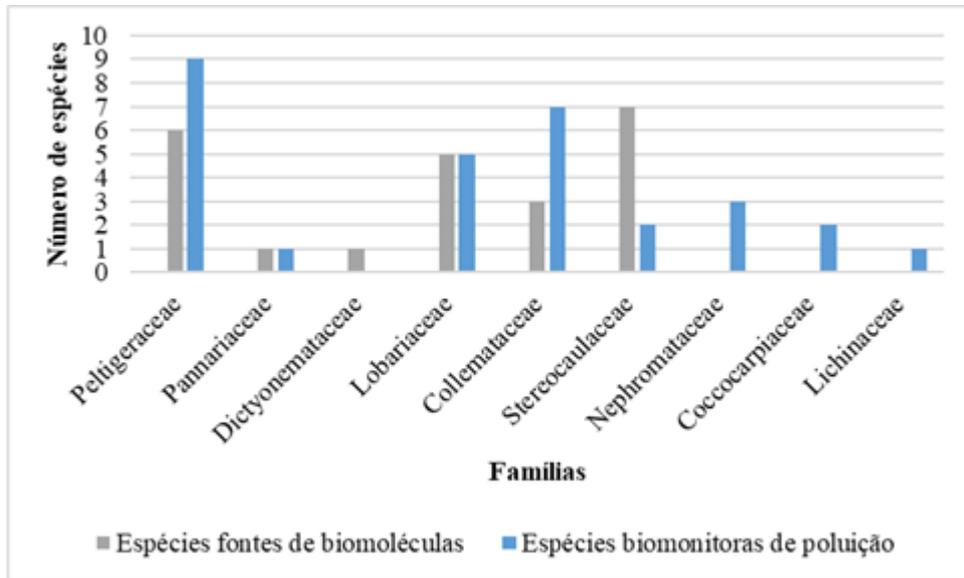
Fonte: Autoria própria.

**Figura 2.** Diversidade e aspectos do talo de alguns gêneros destacados de cianoliquens. **A.** *Peltigera* Willd. Família Peltigeraceae. **B.** *Erioderma* Fée. Fam. Pannariaceae. **C.** *Dictyonema* Fam. Dictyonemataceae. **D.** *Lobaria* (Schreber) Hoffm. Fam. Lobariaceae. **E.** *Leptogium* (Ach.) Gray. Fam. Collemataceae. **F.** *Stereocaulon* Hoffm. Fam. Stereocaulaceae. **G.** *Nephroma* Ach. Fam. Nephromataceae. **H.** *Coccocarpia* Pers. Fam. Coccocarpiaceae. **I.** *Ephebe* Fr. Fam. Lichinaceae.



Fonte: <https://www.waysofenlichenment.net/lichens/gallery>. Fotografias **A, B** de Troy McMullin, **D-F, H, I** de Jason Hollinger, fotografia **G** de Dick Culbert de Gibsons. Fotografia **C** de Dick Culbert, fonte: <https://www.flickr.com/photos/92252798@N07/12956363664>.

**Figura 3.** Famílias mais representativas, em números de espécies, para os cianolíquens que sintetizam compostos bioativos e para os cianolíquens utilizados como biomonitores de poluição ambiental distribuídos pelo mundo e encontrados nos artigos revisados



Fonte: Autoria própria.

**Figura 4.** Países que realizaram estudos com cianolíquens como fontes de biocompostos e como biomonitores de poluição



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 3.** Correlação dos trabalhos de cianoliquens, utilizados neste estudo, com seus respectivos países de desenvolvimento e locais de coletas

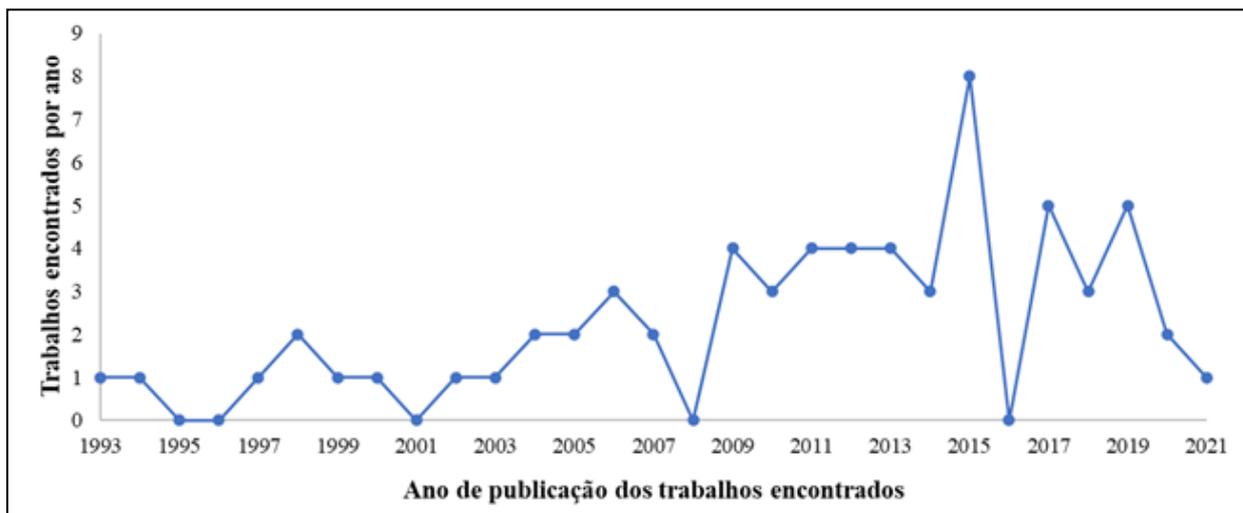
<b>Países</b>	<b>Regiões de coleta das amostras estudadas</b>	<b>Referências</b>
Brasil	Curitiba, Barbacena/MG, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Santa Catarina, Belém do Pará	ELIFIO et al., 2000; DUTRA et al., 2020; GUMBOSKI et al., 2019; VIEIRA et al., 2019;
Chile	Laguna San Rafael	QUILHOT et al., 2002;
Colômbia	Páramo de Anaime	SÁNCHEZ CHARRY, 2019
Paraguai	-	FOURNET et al., 1997
Guatemala	Cidade da Guatemala	BERGER, 2014
Estados unidos	Sudeste do Alasca, Califórnia, Idaho, Condado de Idaho, Floresta Nacional de Clearwater, Colorado, -	GEISER et al., 1998; RIDDELL; PADGETT & NASH, 2012; SHRESTHA et al., 2014; ST. CLAIR, 1999; YANG & SHIMIZU, 1993
Canadá	Aleza Lake Research Forest - Columbia Britânica central, Québec, Cape Breton Highlands National Park, Kejimikujik National Park and National Historic Site (Kejimikujik)	BOTTING & FREDEEN, 2006; CARPENTIER et al., 2017; DARNAJOUX et al., 2015; FRASER et al., 2007; GIBSON et al., 2013; MCMULLIN et al., 2017
Islândia	Akrafjall	JENSEN et al., 2010
Portugal	Lisboa, Açores	BRANQUINHO et al., 2011; RODRIGUES, 2013
Itália	-, Vale de Aosta, monte Vesúvio	BELLIO et al., 2015; BELLIO et al., 2017; PISANI et al., 2011; RANKOVIC et al., 2007; SAVINO et al., 2017
Rússia	-, montanhas Khibiny - região de Murmansk	DEMBITSKY, 2017; LISOV et al., 2012
França	Monte Singgalang – Indonésia, Saint Just - Ille-et-Vilaine	ISMED et al., 2012; VU et al., 2015
Reino Unido	-	STEVENS et al., 2012
Noruega	Sudeste da Noruega	YEMETS; GAUSLAA & SOLHAUG, 2015
Grécia	Peloponeso	RIGA-KARANDINOS & KARANDINOS, 1998
Sérvia	Kopaonik	RANKOVIĆ; KOSANIĆ & STANOJKOVIĆ, 2014
Suíça	Alpes Suíços	SCHEIDEGGER & SCHROETER, 1994

Tabela 3 (Continuação)

Eslováquia	Aldeia de Špania dolina, Murlo – Itália	BAČKOR et al., 2009; GOGA et al., 2020
República Tcheca	Monte Carmelo – Israel e Aldeia de Muslumovo - montes Urais - Rússia	ŘEZANKA & DEMBITSKY, 2006
Turquia	-, Giresun, Artvin, Erzurum, distrito de Murgul, Trabzon	ATALAY et al., 2011; ATALAY et al., 2015; KARAKUS et al., 2009; KARAGÖZ et al., 2009; ODABASOGLU et al., 2004; ODABASOGLU et al., 2005; OZTURK et al., 2019; SÜLEYMAN et al., 2003
Armênia	Tavush Province	SARGSYAN et al., 2021
China	-	ZHANG; GUO & LOU, 2006; ZHENG et al., 2018
Coreia do Sul	Província de Yunnan, Patagonia (Chile), Ilha do Rei George, (Antártica)	HENG et al., 2010; HONG et al., 2018; YANG et al., 2015; YANG et al., 2019; YOUN et al., 2018
Japão	-, Osar-isawa (Akita), Hitachi (Ibaraki), Katsushika (Tokyo), Isehara (Kanagawa), Hakone (Kanagawa), Izu (Shizuoka), Hieisan (Shiga), In-agawa (Hyogo), Koyasan (Wakayama), and Niihama (Ehime), Isehara, Takao, Ueno, Tsukuba, Isehara, Katsushika e Chofu-	BHATTARAI et al., 2013; NAKAJIMA et al., 2013; NAKAJIMA et al., 2015; MORITA et al., 2009
Índia	-, Meerut	KAR; GOGOI; ARGADE, 2005; SHAHI; SHAHI & UPRETI, 2011
Israel	Jerusalém	DEMBITSKY, 2010; TEMINA; LEVITSKY; TORRES et al., 2004
Indonésia	Bogor	RINDITA; SUDIRMAN & KOESMARYONO, 2015

- Regiões não identificadas no estudo.

**Figura 5.** Trabalhos publicados entre os anos de 1990-2021 acerca dos cianoliquens - fontes de compostos bioativos e utilizados como biomonitores de poluição



Fonte: Autoria própria.

## DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra a análise dos potenciais benéficos de substâncias bioativas e extratos de cianoliquens dos trabalhos encontrados. As substâncias bioativas analisadas foram: ácido lecanórico, ácido úsnico, colleflaccinósidos A e B, atranorina, nostoclídeos I e II, cloropnarina, ácido lobárico, panarina, lectina, pulmonarianina, ácido estíctico, isidioforina, collemin A, colleman (Cf-5-s), etil-3-formil-2,4-di-hidroxi-5,6-dimetilbenzoato, metil-2,4-di-hidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato, orselinato de etilo, lobarina, lacases homodiméricas (grandes) e monoméricas (pequenas), lobarstina, ácido perlatólico, fisciosporina, tridepsídeo, lobaroid A, ácido evernico e ácido orselínico. Além disso, algumas espécies de cianoliquens também foram analisadas quanto aos extratos e suas atividades biológicas, os extratos analisados foram: metanólico, aquoso, de acetona, álcool rizonílico e de clorofórmio.

Verificou-se que as espécies apresentaram tanto em seus bioativos, quanto em seus extratos extensas atividades biológicas, como anticâncer, antimicrobiana, antioxidantes, antivirais, antidiabéticas, fitotóxica, citotóxica, antiparasitária, fotoprotetora, hemaglutinante, antiinflamatória, antiulcerogênica, gastroprotetora, antibacteriana, imunomoduladora, antiobesidade, inibidora da proteína RecA de *Escherichia coli*, antiproliferativa, citotóxica, de elastase de leucócitos humanos e atividades inibitórias de protease de citomegalovírus humano. E uma atividade biológica ambiental foi encontrada na espécie *Solorina crocea*, no estudo de LISOV et al. (2012), através de lacases homodiméricas (grandes) e monoméricas (pequenas), responsáveis pela despolimerização e descoloração dos ácidos húmicos do solo.

Além disso, os líquens que colonizam terra fina ou solo perturbado muitas vezes agem como estabilizadores de seu substrato evitando a erosão da superfície. Dessa forma, além das inúmeras atividades medicinais, os líquens também contribuem para o acúmulo primário de matéria orgânica do solo através dos produtos da decomposição do talo ou com compostos orgânicos resultante do processo de lixiviação. Dentre os cianolíquens estudados que apresentam produtos bioativos, vale destacar o da espécie *Solorina crocea*, que produz dois tipos de Lacases; as homodiméricas (grandes) e monoméricas (pequenas) responsáveis pela despolimerização e descoloração dos ácidos húmicos do solo. Segundo LISOV et al. (2012) uma vez liberadas ou lixiviadas no solo, elas têm um potencial para participar de reações extracelulares de síntese de húmus ou degradação.

Na tabela 2, foram analisados vários oligoelementos utilizando o método de biomonitoramento por cianolíquens, bem como a avaliação de sensibilidade em relação a exposição desses organismos aos diferentes poluentes. O oligoelemento cobre foi analisado em *Peltigera praetextata*, em áreas preservadas (não poluídas) de Portugal (BRANQUINHO et al., 2011), e em *Stereocaulon japonicum*, mas em localidades urbanas-industriais do Japão (NAKAJIMA et al., 2013; 2015). Os oligoelementos Na, Mg, Al, P, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Ti, V, Cr, Co, Ni, Cu, Mo, Cd e Pb depositados na Província de Québec no Canadá, foram analisados em *Peltigera aphthosa*, *Peltigera neopolydactyla*, *Peltigera scabrosa* e *Nephroma arcticum* (DARNAJOUX et al., 2015). Em uma área de descarte na Eslováquia, Al, Co, Cu, Fe, Ni, Pb, Sb, e Zn foram analisados em *Peltigera rufescens* (BAČKOR et al., 2009). E em uma área da Noruega, especificamente Co e Zn foram analisados em *Lobaria pulmonária* (YEMETS; GAUSLAA & SOLHAUG, 2015).

Os oligoelementos são considerados como micronutrientes essenciais para os organismos vivos, mas em quantidades excessivas podem ser considerados perigosos para eles. Enquanto isso, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são poluentes ambientais onipresentes gerados principalmente durante a combustão incompleta de materiais orgânicos (por exemplo, carvão, petróleo e madeira) (NADZIR et al., 2017). Os oligoelementos geralmente ocorrem excessivamente em áreas que envolvem atividades humanas. As fontes dos oligoelementos são geralmente provenientes do tráfego, fábricas e emissões de incineradores, e é por isso que mais estudos têm sido focados em áreas urbanas (GIORDANI et al., 2012; INCERTI et al., 2017).

Além disso, vários autores mediram os elementos N (nitrogênio) e S (enxofre) usando o método de biomonitoramento por cianolíquens (Tabela 2). GIBSON et al., 2013 usaram

*Nephroma laevigatum*, *Collema subflaccidum*, *Leptogium laceroides*, *Leptogium cyanescens*, *Lobaria quercizans*, *Lobaria scrobiculata* e *Lobaria pulmonária* para analisar os níveis de dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) no Canadá. Fumigação com HNO<sub>3</sub> gasoso em *Pseudocyphellaria anthraspis* foi utilizado para prever a qualidade do ar nos Estados Unidos (RIDDELL; PADGETT & NASH III, 2012). Em outros estudos, as espécies *Lobaria pulmonária*, *Sticta weigeli*, *Peltigera aphthosa*, *Peltigera canina*, *Peltigera didactyla*, *Peltigera rufescens* e o gênero *Leptogium* sp., foram usados para biomonitorar áreas poluídas com dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>). Outros poluentes atmosféricos e de perturbações ecológicas também foram biomonitorados com as outras espécies de cianolíquens, listados na tabela 2.

Dessa forma, a avaliação da qualidade do ar utilizando esses organismos em sua metodologia, surge como uma forma viável para mensurar os riscos ambientais a que estão submetidas as populações das áreas poluídas, pois fornecem dados que podem auxiliar o desenvolvimento de medidas de prevenção e proteção da saúde (MOREIRA et al., 2017).

A espécie *Lobaria pulmonária* apresenta grande destaque como espécie biomonitora de múltiplos fatores ambientais, como mostrado na tabela 2, devido à sua natureza heterotática, a sua baixa capacidade de dispersão e suscetibilidade a diversos parâmetros ambientais. Além disso, nos estudos analisados, essa espécie é também considerada como uma espécie “guarda-chuva” que pleiteia continuidade espacial e temporal do habitat para manter populações viáveis. Pois muitas vezes em seu hábitat, está na companhia de outros líquens raros ou em perigo e sensíveis a mudanças ambientais (BIANCHI et al., 2020).

Além dessas, as outras espécies de cianolíquens relatadas neste estudo que são utilizadas no biomonitoramento, são amplamente recomendados, pelos autores, para essa finalidade. Tendo em vista que esse método de análise utilizando de observação e quantificação desses organismos como biomonitores, como já mencionado, é considerado simples, de baixo custo e de resultado rápido, mostrando os impactos ambientais e auxiliando na possível identificação e diagnóstico das possíveis causas e efeitos estressores, obtendo assim, uma resposta biológica. Além disso, aprender e compreender as mudanças morfofisiológicas que ocorrem na comunidade líquênica após exposição por poluentes é muito importante também para se ter uma ideia melhor de como a poluição do ar pode causar danos fisiológicos aos seres humanos (PAOLI et al., 2019).

Com relação a composição simbiótica, os cianolíquens são divididos em cianolíquens bipartidos e tripartidos. Onde no primeiro caso, a cianobactéria corresponde como único fotobionte presente na associação, enquanto no segundo há um ficobionte (alga) e um

cianobionte, onde a alga verde fixa o carbono e as cianobactérias fixam o nitrogênio (GRUBE & BERG, 2009; RIKKINEN, 2016). Como espécies do tipo tripartidas, apareceram: *Lobaria pulmonária* (L.) Hoffm., *Peltigera aphthosa* (L.) Willd., *Nephroma arcticum* (L.) Torss., e *Stereocaulon vesuvianum* Pers. (Tabelas 1 e 2).

Com base na simbiose a maioria das espécies estão associadas com *Nostoc*, quatro estão associadas com *Scytonema* e uma com *Stigonema*, sendo que foi encontrada na literatura para a espécie *Stereocaulon paschale* (L.) Hoffm., associação com mais de um cianobionte podendo ser *Stigonema* ou *Nostoc* (Tabelas 1 e 2). Corroborando com estes resultados, *Nostoc* caracteriza-se como o gênero mais comum de cianobactérias em associação com fungos liquenizados de acordo com RIKKINEN (2013).

Dos cianoliquens semiaquáticos, foi encontrado a espécie *Ephebe brasiliensis* (Tabela 2) utilizada no estudo de GUMBOSKI et al. (2019) como uma espécie biomonitora devido à sua ocorrência ser exclusivamente em áreas conservadas (ou seja, Parques Nacionais) e ainda se destaca pelo fato de também poder ser utilizada como bioindicadora de qualidade da água, já que possui hábito semiaquático. Essa espécie possui talo do tipo fruticoso, realiza simbiose com a cianobactéria do gênero *Stigonema* e possui ocorrência em ambientes de água doce no Brasil (Minas Gerais e São Paulo) e no Uruguai (GUMBOSKI et al., 2019; LÜCKING; HODKINSON & LEAVITT, 2016).

Os cianoliquens podem ocupar os mais diversos tipos de substratos como: troncos de árvores, rochas e outros (NIMIS et al., 2020) e os mais diversos tipos de ambientes desde os mais úmidos, até os mais áridos. A diferença entre os cianoliquens que habitam lugares mais úmidos para aqueles de lugares mais áridos está na sua biologia. Enquanto os de ambientes úmidos tendem a possuir talos mais completos estruturalmente, reprodução assexuada e cianobiontes filamentosos como *Nostoc*, os cianoliquens de regiões mais secas tendem a apresentar talos mais sensíveis, reprodução sexuada por esporulação e cianobiontes cocoides (por exemplo, *Gloeocapsa*) (GONZÁLEZ-MONTELONGO & PÉREZ-VARGAS, 2019; NIMIS et al., 2020; RIKKINEN 2013; 2017; RIKKINEN; OKSANEN & LOHTANDER, 2002; SPRIBILLE et al., 2014; SPRIBILLE & MUGGIA, 2013). Além disso, em ambientes mais áridos tem se encontrado uma certa relação entre o número de cianoliquens e a aridez do terreno e, por isso, são considerados como bons bioindicadores de áreas desertificadas (MATOS et al., 2015).

A maioria dos cianoliquens são pertencentes à divisão *Ascomycota* e a maioria de suas espécies estão descritas na ordem *Peltigerales* Walt. Watson, que está subdividida em duas

subordens, *Collematinae* Miadl. & Lutzoni e *Peltigerinae* Miadl. & Lutzoni. No trabalho de LÜCKING, HODKINSON & LEAVITT (2016) são descritas 1.301 espécies dessa ordem com 67 gêneros, sendo o quarto grupo com a maior diversidade de líquens e o grupo com a maior representatividade de cianolíquens, possuindo 10 famílias (LÜCKING; HODKINSON & LEAVITT, 2016; MAGAIN et al., 2018; WEDIN et al., 2009). Outras espécies de cianolíquens estão agrupadas na ordem Lichinales Henssen & Büdel, também pertencente à divisão Ascomycota. E o restante das espécies estão agrupadas em outras ordens como menor diversidade em espécies (LÜCKING; HODKINSON & LEAVITT, 2016; RIKKINEN; OKSANEN & LOHTANDER, 2002).

No que diz respeito aos métodos de identificação molecular de cianolíquens, eles oferecem uma maneira prática para identificar com precisão os genótipos do cianobionte (RIKKINEN, 2016; JAMES et al., 2020). A diversidade genética para o gênero *Nostoc* em muitos cianolíquens tem sido estudada usando nucleotídeos sequenciais do tRNA (UAA) como um marcador genético. Além disso, sequências rDNA 16S e 23S também têm sido utilizadas para relações filogenéticas (RIKKINEN, 2016, 2017).

Todavia, vale ressaltar que como um todo, os cianobiontes já estudados e, portanto, conhecidos ainda apresentam uma parcela mínima de todas as simbioses terrestres. E diversos são os fatores que contribuem para a escassez de trabalhos realizados com foco nesses organismos, como é o caso das dificuldades encontradas no seu isolamento e na sua correta identificação, já que a morfologia desses simbioses presentes no talo pode se comportar como muito distinta da morfologia encontradas nos organismos de vida livre (RIKKINEN, 2016).

Além disso, o estudo dos compostos bioativos a partir de cianolíquens, bem como o uso desse no biomonitoramento gera grandes implicações, principalmente como indicador de saúde dos indivíduos, segundo a presente revisão. Portanto, a ampla variedade de bioatividades identificadas até o momento só reforça ainda mais a necessidade de mais estudos, principalmente em relação aos cianolíquens nos quais são mais escassos em termos de pesquisa. Outrossim, este estudo constata a eficiência do biomonitoramento utilizando cianolíquens, contudo reforça-se mais uma vez a necessidade de mais pesquisas. Pois percebe-se em muitos dos estudos que já foram realizados com esse grupo de organismos que muitos deles ainda permanecem incompreendidos, bem como alguns até desconhecido. Pois ainda há poucas informações a respeito dessa simbiose em particular e as que já existem ainda não os caracterizam tão bem como ocorre nos estudos do micobionte e de clorolíquens.

## CONCLUSÃO

O presente estudo revisou 65 artigos exclusivamente sobre os cianoliquens e seus compostos bioativos, bem como sua utilização no processo de biomonitoramento para estudos de qualidade ambiental. Este estudo também revelou as peculiaridades e as lacunas no conhecimento acerca dos cianoliquens. Além disso, verificou-se que apesar da escassez de trabalhos publicados o número de estudos acerca dessa simbiose e relacionando-os com o biomonitoramento e o conhecimento de seus metabólitos aumentou um pouco nos últimos anos. A maioria dos estudos foi realizada na Europa e Ásia, sendo a Turquia o país com o maior número de trabalhos publicados.

Dentre os cianoliquens estudados houve prevalência para os da família *Peltigeraceae* e dentre os cianobiontes o gênero *Nostoc* prevaleceu em parte majoritária na associação simbiótica. Este estudo confirma que os cianoliquens possuem altas propriedades indicadoras de poluição ambiental, uma vez que são altamente sensíveis aos contaminantes ambientais e gases poluentes da atmosfera. Bem como o seu grande potencial biotecnológico, sendo, portanto, bastante promissores como fonte de biomoléculas, o que atribui a eles grande importância econômica, uma vez que suas substâncias com atividades bioativas podem resultar eventualmente na produção e síntese de possíveis novos medicamentos e tratamentos contra as doenças, como é o caso do câncer, por exemplo.

Todavia, vale ressaltar que houve várias limitações e lacunas neste estudo de revisão envolvendo cianoliquens como biomonitores e na utilização de suas substâncias bioativas. Além da literatura escassa a respeito da diversidade, fisiologia e ecologia desses organismos, as informações sobre o biomonitoramento e utilização desses organismos como fontes de biomoléculas ainda são mínimas, ou nem existem na literatura, em diversas regiões do mundo, incluindo várias localidades do Brasil.

Além disso, aliado a falta de informações, bem como a exploração desenfreada desses organismos liquenico (como um todo, cianoliquens e cloroliquens), principalmente pela amostragem contínua por parte de interesses econômicos, têm levado esses organismos à sua perda nos ecossistemas devido à sua lenta taxa de crescimento. Ademais, salienta-se mais uma vez a necessidade de realização de mais estudos, a fim de se obter conhecimentos mais atuais, completos e mais profundos acerca da biologia, do funcionamento e para uma melhor compreensão da forma como ocorre a interação nessas associações.

## REFERÊNCIAS

- ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. v. 106, p. 1–12, 2009.
- ATALAY, F.; ODABASOGLU, F.; HALICI, M.; CAKIR, A.; CADIRCI, E.; ASLAN, A.; BERKTAS, O. A.; KAZAZ, C. Gastroprotective and Antioxidant Effects of Lobaria pulmonaria and Its Metabolite Rhizonyl Alcohol on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, n. 11, p. 1756–1767, 2015.
- ATALAY, F. et al. Antioxidant phenolics from Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm. and Usnea longissima Ach. Lichen species. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 647–661, 2011.
- BAČKOR, M. et al. Physiological adaptations in the lichens Peltigera rufescens and Cladina arbuscula var. mitis, and the moss Racomitrium lanuginosum to copper-rich substrate. **Chemosphere**, v. 76, n. 10, p. 1340–1343, 2009.
- BELLIO, P. et al. Interaction between lichen secondary metabolites and antibiotics against clinical isolates methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. **Phytomedicine**, v. 22, n. 2, p. 223–230, 2015.
- BELLIO, P. et al. SOS response in bacteria: Inhibitory activity of lichen secondary metabolites against Escherichia coli RecA protein. **Phytomedicine**, v. 29, n. April, p. 11–18, 2017.
- BERGER, G. M. C. **Liquenes como bioindicadores de contaminación aérea en el corredor metropolitano GUATEMALA**, 2014. Disponível em: <[http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_3546.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3546.pdf)>
- BHATTARAI, H. D. et al. A new pseudodepsidone from the Antarctic lichen Stereocaulon alpinum and its antioxidant, antibacterial activity. **Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 9, p. 559–561, 2013.
- BOTTING, R. S.; FREDEEN, A. L. Net ecosystem CO<sub>2</sub> exchange for moss and lichen dominated forest floors of old-growth sub-boreal spruce forests in central British Columbia, Canada. **Forest Ecology and Management**, v. 235, n. 1–3, p. 240–251, 2006.
- BRANQUINHO, C. et al. The relative impact of lichen symbiotic partners to repeated copper uptake. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 1, p. 84–92, 2011.
- CARPENTIER, C. et al. Dibenzofurans and pseudodepsidones from the lichen Stereocaulon paschale collected in northern Quebec. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 1, p. 210–214, 2017.
- DANTAS, J. O. **Existe um efeito de borda na Caatinga? Evidência de comunidades de líquens em Poço Verde**. Sergipe: Universidade Federal de Sergipe, 2016.
- DARNAJOUX, R. et al. Determination of elemental baseline using peltigerelean lichens from Northeastern Canada (Québec): Initial data collection for long term monitoring of the impact of global climate change on boreal and subarctic area in Canada. **Science of the Total**

**Environment**, v. 533, p. 1–7, 2015.

DEMBITSKY, V. M. **The multiple properties of some of the lichenized ascomycetes: Biological activity and active metabolites.** [s.l: s.n.].

DUTRA, V. S. V., SILVA, L. M., BORGIO, A. L., OLIVEIRA, J. E. Z. LÍQUENS COMO BIOINDICADORES DA QUALIDADE DO AR NO MUNICÍPIO DE BARBACENA-MG. **Enciclopédia Biosfera**, 2020.

ELIFIO, S. L.; DA SILVA, M. L. C. C.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. A lectin from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **New Phytol.**, v. 148, p. 327–334, 2000.

ENLICHENMENT, W. OF. **Enlichenment.** Disponível em: <<https://www.waysofenlichenment.net/>>. Acesso em: 19 ago. 2021.

FOURNET, A. et al. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 51–54, 1997.

FRASER, M. H. et al. Medicinal plants of Cree communities (Québec, Canada): Antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 85, n. 11, p. 1200–1214, 2007.

GEISER, L. H. et al. Lichens and allied fungi of southeast Alaska. **Lichenographia Thomsoniana: North American Lichenology in Honor of John W. Thomson**, n. Howe 1913, p. 24-, 1998.

GIBSON, M. D. et al. The spatial and seasonal variation of nitrogen dioxide and sulfur dioxide in Cape Breton Highlands National Park, Canada, and the association with lichen abundance. **Atmospheric Environment**, v. 64, p. 303–311, 2013.

GOGA, M. et al. Biological activity of selected lichens and lichen-based Ag nanoparticles prepared by a green solid-state mechanochemical approach. **Materials Science and Engineering C**, v. 119, p. 111640, 2021.

GONZÁLEZ-MONTELONGO, C. & PÉREZ-VARGAS, I. Looking for a home: Exploring the potential of epiphytic lichens to colonize tree plantations in a Macaronesian laurel forest. **Forest Ecology and Management**, n. 453: 117541, 2019.

GUMBOSKI, E. L., GERLACH, A. C. L., SPIELMANN, A. A., CANÊZ, L. S., MARCELLI, M. P. *Ephebe brasiliensis* (Ascomycota, Lichinaceae): um fungo liquenizado de água doce esquecido. **Rodriguésia**, v. 70, 2019.

HENG, L. et al. The in vitro antioxidant properties of chinese highland lichens. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 11, p. 1524–1528, 2010.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos liquens. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 110–125, 1999.

HONG, J-M.; SUH, S-S.; KIM, T. K.; KIM, J. E.; HAN, S. J.; YOUN, U. J.; YIM, J. H.; KIM, I.-C. Anti-cancer activity of lobaric acid and lobarstin extracted from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. **Molecules**, v. 658, n. 23, 2018.

- ISMED, F. et al. Lobarin from the Sumatran lichen, *Stereocaulon halei*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 8, p. 1693–1698, 2012.
- JAMES, T. Y., STAJICH, J. E., HITTINGER, C. T. & ROKAS, A. Toward a Fully Resolved Fungal Tree of Life. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 74, n. 1, p. 1–23, 2020.
- JENSEN, J. S. R. E. et al. Structural characterisation of a new O-methylated heteroglycan, colleman, from the cyanolichen *Collema flaccidum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 799–807, 2010.
- KAR, A.; GOGOI, S.; ARGADE, N. P. Synthesis of naturally occurring bioactive butyrolactones: Maculalactones A-C and nostoclide I. **Tetrahedron**, v. 61, n. 22, p. 5297–5302, 2005.
- KARAGÖZ, A. et al. Antibacterial activity of some lichen extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 12, p. 1034–1039, 2009.
- KARAKUS, B.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; HALICI, Z.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H. The Effects of Methanol Extract of *Lobaria pulmonaria*, a Lichen Species, on Indometacin-Induced Gastric Mucosal Damage, Oxidative Stress and Neutrophil Infiltration. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, v. 23, p. 635–639, 2009.
- KENNEDY, J. **Green algae (Chlorophyta): Sea life and humans can use green algae for food**. Disponível em: <<https://www.thoughtco.com/green-algae-chlorophyta-2291973>>. Acesso em: 30 dez. 2020.
- KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MARES, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia** 86: 295–335, 2014.
- LAU, N. S, MATSUI, M., ABDULLAH, A. A. A. Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- LIAS. **Primary photobiont**. Disponível em: <<https://glossary.lias.net/w/index.php?title=Photobiont&oldid=3920>>. Acesso em: 20 dez. 2020.
- LISOV, A. et al. Dimeric and monomeric laccases of soil-stabilizing lichen *Solorina crocea*: Purification, properties and reactions with humic acids. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p. 161–167, 2012.
- LÜCKING, R., HODKINSON, B. P. & LEAVITT, S. D. The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota. **Approaching one thousand genera The Bryologist**, v. 119, n. 4, p. 361–416, 2016.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H. & STAHL, D. A. B. *Biología de los Microorganismos*. **Pearson Educación S. A.**, 2015.
- MAGAIN, N., TRUONG, C., GOWARD, T., NIU, D. & GOFFINET, B. Species delimitation in *Peltigera* sect. **Taxon**, v. 67, n. 5, p. 836–870, 2018.

MATOS, P., PINHO, P., ARAGÓN, G., MARTÍNEZ, I., NUNES, A., SOARES, A. M. V. M., BRANQUINHO, C. 2015. Lichen traits responding to aridity. **Journal of Ecology**, v. 103, n. 2): 451-458, 2015.

MCMULLIN, R. T. .; URE, D.; SMITH, M.; CLAPP, H.; WIERSMA, Y. F. Ten years of monitoring air quality and ecological integrity using field-identifiable lichens at Kejimikujik National Park and National Historic Site in Nova Scotia, Canada. **Ecological Indicators**, v. 81, n. May, p. 214–221, 2017.

MORITA, H. et al. Antimitotic activity of lobaric acid and a new benzofuran, sakisacaulon A from *Stereocaulon sasakii*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 13, p. 3679–3681, 2009.

MUGGIA, L., LEAVITT, S., BARRENO, E. The hidden diversity of lichenised Trebouxiophyceae (Chlorophyta). **Phycologia**, n. 57(5): 503-524, 2018.

NAKAJIMA, H. et al. Effect of metal stress on photosynthetic pigments in the Cu-hyperaccumulating lichens *Cladonia humilis* and *Stereocaulon japonicum* growing in Cu-polluted sites in Japan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 97, p. 154–159, 2013.

NAKAJIMA, H. et al. Effects of Cu on the content of chlorophylls and secondary metabolites in the Cu-hyperaccumulator lichen *Stereocaulon japonicum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 477–482, 2015.

NIMIS, P. L., MARTELLOS, S., CHIARUCCI, A., ONGARO, S., PEPLIS, PITTAO, E. & NASCIMBENE, J. **Exploring the relationships between ecology and species traits in cyanolichens: A case study on Italy** *Fungal Ecology*, 2020.

ODABASOGLU, F. et al. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 11, p. 938–941, 2004.

ODABASOGLU, F. et al. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. **Fitoterapia**, v. 76, n. 2, p. 216–219, 2005.

OZTURK, S. et al. Lichens exerts an anti-proliferative effect on human breast and lung cancer cells through induction of apoptosis. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 259–267, 2019.

PAIM, A. **Algas verdes: ancestrais de todas as plantas terrestres**. Disponível em: <<http://segundocientista.blogspot.com/2015/09/algas-verdes-ancestral-de-todas-as.html?m=1>>. Acesso em: 4 jan. 2020.

PISANI, T. et al. Physiological effects of mercury in the lichens *Cladonia arbuscula* subsp. *mitis* (Sandst.) Ruoss and *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb. **Chemosphere**, v. 82, n. 7, p. 1030–1037, 2011.

QUILHOT, WANDA ; RUBIO, CECILIA ; FERNÁNDEZ, ERNESTO; HIDALGO, M. E. EFECTOS DE LA RADIACIÓN UV SOLAR EN LA ACUMULACIÓN DE 1'-CLOROPANARINA EN. v. 80, p. 75–80, 2002.

RANKOVIC', B.; MIŠIĆ, M.; SUKDOLAK, S.; MILOSAVLJEVIC, D. **Italian Journal of Food Science: Introduction**. [s.l: s.n.]. v. 19

RANKOVIĆ, B.; KOSANIĆ, M.; STANOJKOVIĆ, T. Stereocaulon paschale lichen as antioxidant, antimicrobial and anticancer agent. **Farmacía**, v. 62, n. 2, p. 306–317, 2014.

ŘEZANKA, T.; DEMBITSKY, V. M. The colleflaccinosides, two chiral bianthraquinone glycosides with antitumor activity from the lichen *Collema flaccidum* collected in Israel and Russia. **Natural Product Research**, v. 20, n. 10, p. 969–980, 2006.

RIDDELL, J.; PADGETT, P. E.; NASH, T. H. Physiological responses of lichens to factorial fumigations with nitric acid and ozone. **Environmental Pollution**, v. 170, p. 202–210, 2012.

RIGA-KARANDINOS, A. N.; KARANDINOS, M. G. Assessment of air pollution from a lignite power plant in the plain of Megalopolis (Greece) using as biomonitors three species of lichens; impacts on some biochemical parameters of lichens. **Science of the Total Environment**, v. 215, n. 1–2, p. 167–183, 1998.

RIKKINEN, J. Cyanolichens. *Biodivers. Conserv.* v. 24, n. 4, p. 973–993, 2015.

RIKKINEN, J. Cyanobacteria in terrestrial symbiotic systems. **Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes. Springer, Cham.**, p. 243–294, 2017.

RIKKINEN, J.; OKSANEN, I.; LOHTANDER, K. **Lichen Guilds Share Related Cyanobacterial Symbionts** Finlândia, 2002. Disponível em:  
<[www.sciencemag.org/cgi/content/full/297/5580/357/](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/297/5580/357/)>

RINDITA; SUDIRMAN, L. I.; KOESMARYONO, Y. Air Quality Bioindicator Using the Population of Epiphytic Macrolichens in Bogor City, West Java. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 22, n. 2, p. 53–59, 2015.

RODRIGUES, F. arte naturais que nos indicam a qualidade do ar LÍQUENES : estas pequenas obras de arte naturais que nos indicam a qualidade do ar. 2013.

SÁNCHEZ CHARRY, S. **Identificación de los metabolitos secundarios de líquenes del género *Sticta* procedentes del Páramo de Anaime (Anaime - Tolima)**. [s.l.] Universidad de Ibagué, 2019.

SARGSYAN, R. et al. Antimicrobial and antioxidant potentials of non-cytotoxic extracts of corticolous lichens sampled in Armenia. **AMB Express**, v. 11, n. 1, 2021.

SAVINO, F. et al. Thirty years after chernobyl: Long-term determination of <sup>137</sup>Cs effective half-life in the lichen *Stereocaulon vesuvianum*. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 172, p. 201–206, 2017.

SCHEIDEGGER, C.; SCHROETER, B. Effects of ozone fumigation on epiphytic macrolichens: Ultrastructure, CO<sub>2</sub> gas exchange and chlorophyll fluorescence. **Environmental Pollution**, v. 88, n. 3, p. 345–354, 1994.

SEPTIÉN, J. T. **CYANOLICHENS: A bibliographical review**. [s.l.] Universidad de La Laguna, 2020.

SHAHI, S. K.; SHAHI, M. P.; UPRETI, D. K. Utilization of lichen metabolites as natural antifungal drug against dermatophytosis. **Journal of Pharmaceutical Research and Opinion**, v. 1, n. 1, p. 34–36, 2011.

- SHRESTHA, G.; EL-NAGGAR, A. M.; ST. CLAIR, L. L.; O'NEILL, K. L. Anticancer Activities of Selected Species of North American Lichen Extracts. **Phytother. Res.**, 2014.
- SPRIBILLE, T., MUGGIA, L. Expanded taxon sampling disentangles evolutionary relationships and reveals a new family in Peltigerales (Lecanoromycetidae, Ascomycota). **Fungal Diversity**, v. 58, p. 171–184, 2013.
- SPRIBILLE, T.; TUOVINEN, V.; RESL, P.; VANDERPOOL, D.; WOLINSKI, H.; AIME, M. C.; SCHNEIDER, K.; STABENTHEINER, E.; TOOMEHELLER, M.; THOR, G.; MAYRHOFER, H.; JOHANNESSEN, H.; MCCUTCHEON, J. P. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. **Science**, v. 353, p. 488–492, 2016.
- SPRIBILLE, TOBY; TØNSBERG, TOR; STABENTHEINER, EDITH; MUGGIA, L. Reassessing evolutionary relationships in the filamentous cyanolichen genus *Spilonema* (Peltigerales, Lecanoromycetes). **The Lichenologist**, v. 3, n. 43, p. 373–388, 2014.
- ST. CLAIR, L. L. **Establishment of a lichen monitoring program and baseline in the San Juan and Rio Grande National florests Colorado** Colorado, Estados Unidos, 1999.
- STEVENS, C. J. et al. Terricolous lichens as indicators of nitrogen deposition: Evidence from national records. **Ecological Indicators**, v. 20, p. 196–203, 2012.
- SÜLEYMAN, H. et al. Anti-inflammatory and antiulcerogenic effects of the aqueous extract of *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6–7, p. 552–557, 2003.
- TEMINA, M.; LEVITSKY, D. O.; DEMBITSKY, V. M. Chemical constituents of the epiphytic and lithophilic lichens of the genus *Collema*. **Records of Natural Products**, v. 4, n. 1, p. 79–86, 2010.
- TORRES, A. et al. A new UV-B absorbing mycosporine with photo protective activity from the lichenized ascomycete *Collema cristatum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 4, p. 780–784, 2004.
- UAB. **Cap4**. Disponível em: <<https://uab.ufsc.br/biologia/files/2020/08/Cap4.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2020.
- VIEIRA, V. H. DE C. et al. Atividade antimicrobiana de fungos liquenizados ocorrentes no campus Belém da Universidade Federal do Pará, estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 10, n. 0, p. 1–7, 2019.
- VU, T. H. et al. Depsides: Lichen metabolites active against hepatitis C virus. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2015.
- WEDIN, M. et al. Slippery when wet: Phylogeny and character evolution in the gelatinous cyanobacterial lichens (Peltigerales, Ascomycetes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 3, p. 862–871, 2009.
- YANG, X.; SHIMIZU, Y. Nostociide I and ii, Extracellular Metaboiites from. v. 34, n. 5, p. 761–764, 1993.
- YANG, Y. et al. Lichen secondary metabolite, physciosporin, inhibits lung cancer cell motility. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 2015.

YANG, Y. et al. Lichen secondary metabolite physciosporin decreases the stemness potential of colorectal cancer cells. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 1–13, 2019.

YEMETS, O.; GAUSLAA, Y.; SOLHAUG, K. A. Monitoring with lichens - Conductivity methods assess salt and heavy metal damage more efficiently than chlorophyll fluorescence. **Ecological Indicators**, v. 55, p. 59–64, 2015.

YOUN, U. J. et al. Chemical constituents from the Antarctic lichen, *Stereocaulon caespitosum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 80, n. June, p. 73–75, 2018.

YUAN, X., XIAO, S., TAYLOR, T. N. Lichen-like symbiosis 600 million years ago. **Science**, v. 308, p. 1017–1020, 2005.

ZHANG, H. J.; GUO, H. F.; LOU, H. X. Secondary metabolites from the Chinese lichen *Sticta nylanderiana* A. Z. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 10, p. 760–762, 2006.

ZHENG, Y. et al. Lobarioid A, unusual antibacterial depsidone possessing an eight-membered diether ring from the edible lichen *Lobaria* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 8, p. 743–746, 2018.

## **ARTIGO PARA SUBMISSÃO**

---

### **Capítulo 2**

A COMUNIDADE LIQUÊNICA DA UFMA, CAMPUS BACANGA: caracterização dos fungos liquenizados e dos microrganismos fotossintetizantes associados.

## **A COMUNIDADE LIQUÊNICA DA UFMA, CAMPUS BACANGA: caracterização dos fungos liquenizados e dos microrganismos fotossintetizantes associados**

Daniele Pereira de Oliveira Sousa<sup>1</sup>; Emanuelle Costa Ramos<sup>1</sup>; Igor Santana Ribeiro<sup>1</sup>;  
Leonardo T. Dall'Agnol<sup>1</sup>; Juliano dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Maranhão, CEP. 65080-805, São Luís, Maranhão, Brasil.

### **RESUMO**

Considerando que estudos sobre líquen na região Nordeste, sobretudo no estado do Maranhão são bastante escassos e a fim de aumentar o conhecimento sobre os mesmos nessa região, este estudo objetivou caracterizar os microrganismos fotossintetizantes associados a líquen na Cidade Universitária Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão, Bacanga, São Luís, Maranhão. Bem como identificar os espécimes de líquen coletados, isolar e cultivar os microrganismos fotossintetizantes associados as espécies coletadas, e identificar as espécies de microrganismos obtidas através de técnicas morfológicas e genéticas. A coleta dos líquens, foi realizada em dois pontos escolhidos no campus da UFMA, sendo amostrados um total de 26 espécimes. A identificação morfológica dos espécimes foi realizada através de características importantes na taxonomia. Também, foram utilizados testes de coloração com KOH a 40 %, I<sub>3</sub>K e NaClO para a observação da presença ou ausência de reações químicas com determinados compostos secundários. Para o isolamento dos microrganismos fotobiontes foi utilizado o método de fragmentação do talo líquênico recém-coletado e inoculação em meios de cultura BG-11 com e sem nitrogênio e ASM-1. A caracterização morfológica dos fotobiontes foi realizada através de observações em microscópio óptico. Os isolados também foram identificados utilizando marcadores gênicos filogenéticos e funcionais específicos. A caracterização morfológica permitiu a identificação dos espécimes como talos de hábitos crostoso (P5A1, P3A1 e P3A2) e folioso (P4) e as cepas P5A1 como pertencente a espécie *Nostochopsis lobatos* e P3A1, P3A2 e P4 pertencentes ao gênero *Trebouxia*. Descrição esta que será confirmada pelo sequenciamento genético. Os resultados confirmam a diversidade existente de líquens crostoso e folioso no campus da UFMA e sugerem mais estudos, principalmente, com espécies que tenham potencial como biomonitores, haja vista que a pouca observação de talos líquênico mais sensíveis, como os fruticosos e os gelatinosos, podem indicar que o local pode não estar em ótimas condições em termos de qualidade ambiental.

**Palavras-chave:** Líquens. *Nostochopsis*. Simbiontes líquênico. *Trebouxia*.

### **INTRODUÇÃO**

A interação entre um fungo (micobionte) e uma alga e/ou cianobactéria (fotobionte) resulta em uma relação do tipo simbiótica conhecida como líquen. O micobionte desempenha um papel importante na associação, pois além de conferir proteção ao fotobionte, também define o nome científico e a morfologia do talo líquênico que pode ser classificado como crostoso (fixa-se firmemente no substrato), foliáceo (fixa-se parcialmente no substrato) e

fruticoso (fixa-se pontualmente no substrato). O fotobionte, por sua vez, também influencia na morfologia do talo liquênico e disponibiliza alimento para o fungo (NASH III, 2008).

Aproximadamente 20% de todas as espécies de fungos conhecidas na natureza estão simbioticamente associadas a algas ou cianobactérias (MARCELLI, 2006; WEBSTER & WEBER, 2007). Contudo, quando comparados ao micobionte, os fotobiontes de líquens são pouco conhecidos e estudados. Uma das maiores dificuldades no estudo de fotobiontes, e conseqüentemente a razão para a escassez de dados sempre foi a necessidade de se isolar o fotobionte, uma vez que os caracteres taxonômicos só podem ser observados por meio da cultura desses organismos (FRIEDL, 1989; REIS, 2005; RUTHES, 2010).

De acordo com HONNEGER (1991) e HELMS (2003) a identidade dos fotobiontes é conhecida para menos de 2% das espécies de líquens estudadas. Além disso, ressalta-se que ainda que os componentes simbióticos dos líquens já tenham sido descritos de forma extensiva em trabalhos encontrados na literatura, a comunidade de microrganismos fotossintetizantes que habitam estes nichos ainda é pouco caracterizada. Os líquens constituem um reservatório rico, para o isolamento de uma grande diversidade de microrganismos, muitos deles representando uma fonte inexplorada e rica de metabólitos (GONZÁLEZ et al., 2005).

Portanto, o estudo dos microrganismos fotossintetizantes associados aos líquens é de grande relevância, não apenas por fornecerem compostos orgânicos para o fungo, mas também por apresentarem flutuações temporais e espaciais em sua composição e biomassa, que são indicadores eficientes das alterações naturais ou antrópicas. Não obstante, a versatilidade de algumas espécies confere a esses microrganismos inserção em inúmeras aplicações comerciais como: alimentação humana e animal, produção de biocombustíveis, biofixação de CO<sub>2</sub>, biorremediação de efluentes urbanos e industriais e ainda, bioindicadores de qualidade ambiental (BOZELLI & HUSZAR, 2003; NASCIMENTO, 2016).

A identificação morfológica dos líquens, geralmente, é feita através das análises das características macroscópicas referentes à coloração do talo e características morfológicas que indicam o tipo de talo (RAMÍREZ & CANO, 2005). Já a identificação molecular consiste na utilização de marcadores genéticos. Dentre os mais utilizados em estudos filogenéticos de líquens, destacam-se o gene que codifica a subunidade menor do DNA ribossomal mitocondrial (SSU, do inglês mitochondrial small subunit) e os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear (ITS, do inglês internal transcribed spacer) (CRESPO et al., 2001; CRESPO et al., 1999).

A respeito dos fotobiontes, existem várias metodologias descritas para seu isolamento e cultivo, porém, os métodos mais utilizados são a obtenção de colônias através de micropipetagem e fragmentos de talo (AHMADJIAN, 1993; CRITTENDEN et al., 1995). A identificação morfológica, geralmente, é realizada através dos métodos microscópicos tradicionais baseados na morfologia e pigmentos do fotobionte (EBENEZER, 2011). Enquanto a identificação molecular tem sido realizada através de sequências dos genes 16S e 23S rDNA (RIKKINEN, 2016, 2017). Além de ampliações das regiões ITS (KROKEN & TAYLOR, 2000), sequenciamentos do gene *nspA* utilizando os marcadores *PmemPKS1F* e *PmemPKS1R* (KAMPA et al., 2013) e outros.

Considerando-se que estudos sobre líquens na região Nordeste, sobretudo no estado do Maranhão, é bastante escasso e que sua ocorrência em regiões de vegetação amazônica pode contribuir para a descoberta de substâncias de importância médica e farmacêutica, além de também poderem ser organismos com potencial para biomonitoramento de qualidade ambiental, e para aumentar o conhecimento sobre os mesmos, optou-se por analisar espécies existentes na Cidade Universitária Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), campus Bacanga, pela disponibilidade de espécies liquênicas ainda não estudadas e por ser uma área de fácil acesso.

O estudo com fungo liquenizado já foi realizado em diversos estados brasileiros, incluindo o Maranhão, porém nenhum registro foi encontrado para o município de São Luís, até o presente momento. Sendo este, o primeiro estudo florístico com líquens nesta região. Assim, este estudo tem como objetivo (i) caracterizar os microrganismos fotossintetizantes associados a líquens do campus da UFMA, Bacanga, São Luís, Maranhão, (ii) identificar os espécimes de líquens coletados no campus Bacanga da UFMA, (iii) isolar e cultivar os microrganismos fotossintetizantes associados as espécies coletadas, e (iv) identificar as linhagens obtidas através de técnicas morfológicas e genéticas.

## **METODOLOGIA**

### **Caracterização da área de estudo e pontos de coleta**

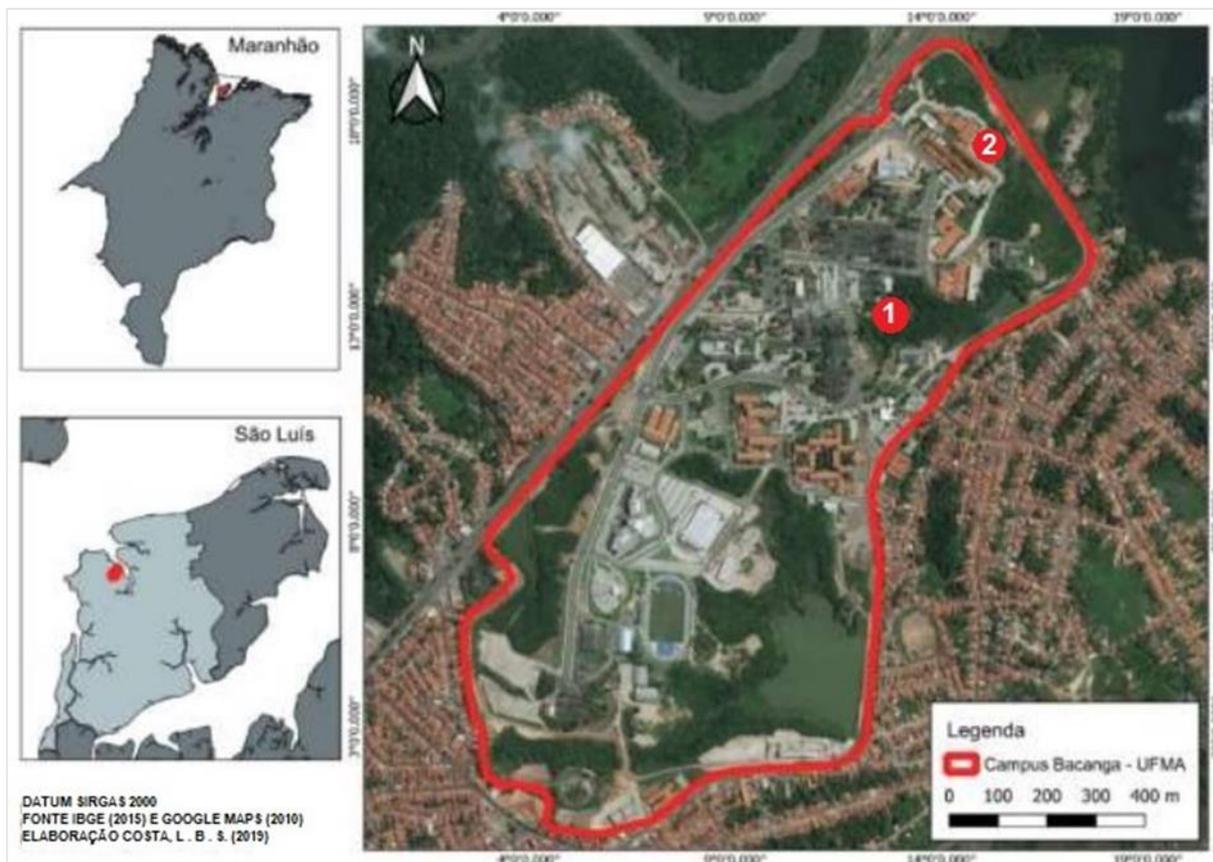
A Cidade Universitária Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), está localizada no bairro Bacanga, município de São Luís, estado do Maranhão, Brasil, entre as latitudes 2°32'20.7" S e as longitudes 44°16'58.4" W, em uma área de transição entre o semiárido nordestino e tropical úmido da Amazônia (COSTA & ALMEIDA JR, 2020). O clima atuante da Reserva Ambiental do campus é o tropical quente e úmido, possuindo baixas

amplitudes térmicas e com elevadas precipitações pluviométricas em determinadas épocas do ano. Todavia, as alterações na cobertura vegetal, a pavimentação e a construção de novos prédios têm alterado o microclima local, com acréscimo significativo da temperatura (ARAÚJO, 2014; DUARTE & FARIAS FILHO, 2020).

A Cidade Universitária Dom Delgado da UFMA contava com uma área de 241 hectares, porém após o processo de ocupação irregular de parte do seu território que se processou nos últimos anos, a área original foi reduzida, para aproximadamente, 101 hectares. A vegetação contém peculiaridades do Cerrado e da Amazônia, com predominância de palmeiras babaçu (*Orbignya speciosa*), tucum (*Bactris setosa*) e outras (DUARTE & FARIAS FILHO, 2020), onde pode ser encontrada uma grande abundância de líquens devido à grande disponibilidade de espécies vegetais cujos troncos são importantes substratos para o crescimento de diferentes espécies liquenicas. Apesar das espécies fixas sobre o córtex das árvores serem vistas mais frequentemente, foram selecionadas também, para este estudo, espécies fixas sobre rochas.

A coleta dos líquens foi realizada em dois pontos em fragmentos de vegetação característica da Amazônia brasileira do Campus Bacanga – UFMA. Onde o ponto 1 está localizado em uma área de reserva atrás do prédio do Pavilhão Tecnológico e ponto 2 atrás do prédio do Ensino Integrado I – CCBS (Figura 1). As áreas foram escolhidas usando como critério a visualização de locais com maior incidência de árvores e rochas cobertas por fungos liquenizados e quanto a menor distância percorrida entre o local de coleta e o Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFMA, onde foi realizado a parte experimental do estudo.

**Figura 1.** Delimitação do campus Bacanga - Cidade Universitária Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, São Luís, MA, Brasil e os locais de coletas. **1** – área posterior ao Pavilhão Tecnológico, **2** – área posterior ao prédio do ensino integrado I



Fonte: COSTA & ALMEIDA JR., 2020. Organização: COSTA, L. B. S. 2019, modificado.

### **Coleta, processamento e identificação dos espécimes**

No presente estudo os talos líquênicos foram coletados, de forma aleatória, em substratos (galho ou tronco - liso ou rugoso) de arbustos ou árvores a uma altura em torno de um 1,30m de comprimento e em rochas (granítica, arenítica ou basáltica), com parte do substrato (casca ou pedaço da rocha), para os líquens crostosos. Foram amostrados um total de 26 espécimes (19 na primeira área de estudo e 7 na segunda área).

A coleta do material líquênico consistiu na obtenção do talo inteiro ou não, com o auxílio de faca, bisturi e estilete e acondicionamento em sacos de papel pardo devidamente identificados com os dados da coleta (data, local etc.) ainda em campo e levados ao LabGeM para os procedimentos experimentais. Em laboratório, as amostras foram limpas com água destilada, secas a temperatura ambiente e divididas em três fragmentos com o auxílio de pinças cirúrgicas e bisturi. Parte do material foi utilizado para a identificação taxonômica,

outra parte para o cultivo dos microrganismos fotossintetizantes e o restante foi armazenado em tubos eppendorf e congelados em freezer para a extração do DNA.

A identificação morfológica dos espécimes foi realizada através de observações de características importantes para a taxonomia, como: o tipo de talo liquênico, hábito, cor, forma, superfície do talo e presença ou ausência de lobos. Cortes à mão livre do talo liquênico com o auxílio de lâminas (*gillettes*) foram realizados para a análise microscópica. Os cortes foram colocados entre lâmina e lamínula em água destilada e analisados em microscópio óptico.

Complementando os dados morfológicos os espécimes são comumente submetidos a testes de coloração (testes de spot) que têm como finalidade analisar a presença (+) ou ausência (-) de determinadas substâncias liquênica sobre as hifas em diferentes regiões do talo. Os reagentes padrão usados nesses testes são soluções de hidróxido de potássio, iodo, hipoclorito de cálcio e p-fenilenodiamina, que indicam cores específicas de acordo com os metabolitos presentes no espécime (por exemplo, uma medula que reaja positivo (+) com hidróxido de potássio, passando de amarelo para vermelho deve possuir ácido salazínico ou ácido norstíctico, ou apresenta cor laranja a purpura apresenta possível presença de antraquinonas) (JUNGBLUTH, 2006; RODRIGUES, 2017). No presente estudo, foi aplicado duas gotas de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 40% - K, solução de Lugol (I<sub>3</sub>K) – I, solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO) – C e, KOH (40%) seguido de NaClO - KC sobre o córtex e a medula.

### **Critérios de inclusão e exclusão para seleção dos líquens estudados**

Como critério de inclusão para a identificação dos espécimes coletados, foram incluídas as amostras cujos microrganismos fotobiontes cresceram e se desenvolveram, após a inoculação em meios de culturas. Como critérios de exclusão, foram excluídas as amostras, cujos microrganismos cresceram, mas não se desenvolveram; ou não cresceram. Portanto, a identificação das espécies coletadas foi feita somente após o crescimento e análise da cultura dos fotobiontes fotossintéticos.

### **Isolamento, cultivo e identificação morfológica dos fotobiontes**

Para o isolamento dos microrganismos fotobiontes das amostras de líquens, utilizou-se a técnica descrita por YAMAMOTO et al (1985) com poucas modificações, onde um pequeno fragmento do líquen recém-coletado foi fixado em solução de etanol/ácido acético (proporção 3:1), conforme CELIE et al. (2005) e CHAO & ZHANG (2011). E posteriormente, inoculado

em meios de cultura BG-11 com e sem nitrogênio (Tabelas 1 e 2, respectivamente) e ASM-1 (Tabela 3). As amostras foram distribuídas em tubos de ensaio e erlenmeyers contendo os três meios de cultura, separadamente. Totalizando 78 tubos e 78 erlenmeyers para as amostras testadas.

Após a inoculação, as amostras foram incubadas em estufa de fotoperíodo (SOLAB, Câmara para germinação com fotoperíodo SL-224) sob iluminação de  $3-15\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  até a obtenção da quantidade de biomassa microbiana de interesse. Uma vez crescidas as colônias foram repicadas trimestralmente, constituindo assim estoques de culturas. As culturas foram analisadas constantemente em microscopia ótica para o acompanhamento do crescimento e morfologia.

Para a identificação morfológica foram preparadas lâminas para visualização em microscópio óptico equipado com o sistema digital de imagem AxioVisionLE. Foram analisadas as características como o diâmetro, células vegetativas, presença ou ausência de acinetos e heterócitos, presença ou ausência de ramificações, células dispostas em colônias ou isoladas etc. As identificações das espécies foram realizadas utilizando como base as chaves de identificação de BICUDO E MENEZES (2006) e os trabalhos de KOMARÉK et al. (2014) e MUGGIA et al. (2020).

**Tabela 1.** Solução de preparo para meio de cultivo BG-11

Componentes	Concentração Final (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,075
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,036
Ácido cítrico	0,006
Citrato de amônio férrico	0,006
Na <sub>2</sub> EDTA	0,001
Micronutrientes	-
Carbonato de sódio	0,02

**Tabela 2.** Solução de preparo para meio de cultivo BG-11 sem nitrogênio

Componentes	Concentração Final (g/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04

*Tabela 2. Continuação*

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,075
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,036
Ácido cítrico	0,006
Citrato de amônio férrico	0,006
Na <sub>2</sub> EDTA	0,001
Micronutrientes	-
Carbonato de sódio	0,02

**Tabela 3.** Solução de preparo para meio de cultivo ASM-1

Soluções Estoque	Componentes	Concentração Final (g/L)
Solução A	NaNO <sub>3</sub>	1,70
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,41
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,49
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,29
Solução B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,14
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1,33
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4,96
Solução C	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2,78
	FeCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2,16
	ZnCl <sub>2</sub>	0,67
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,038
Solução D	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0028
	EDTA·Na <sub>2</sub>	1,86

### **Extração de DNA, Sequenciamento e Identificação Molecular**

Para a identificação molecular das linhagens, o DNA genômico (gDNA) foi extraído utilizando o kit PowerSoil (MoBio, California, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi amplificado, através de reações de PCR, tendo como alvo regiões ITS, rbcL, incluindo o gene 18S rRNA. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 4.

Após a amplificação por PCR das sequências de DNA, as sequências obtidas neste estudo foram enviadas para um serviço de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger e posteriormente analisadas no programa BioEdit (HALL, 2011) para verificação de qualidade e alinhamento. Outrossim, foram submetidas ao banco de dados do GenBank utilizando a ferramenta BLASTN objetivando a identificação por homologia, e obtenção das sequências mais próximas visando a construção de árvores filogenéticas e gênicas.

**Tabela 4.** Iniciadores utilizados nas análises filogenéticas

<b>Gene</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Amplicon</b>	<b>Referências</b>
<b>ITS Ciano</b>	ITSCYA236F	CTGGTTCRAGTCCAGGAT	1260pb	(VALÉRIO et al., 2009)
<b>ITS Ciano</b>	ITSCYA225R	TGCAGTTKTCAAGGTTCT		
<b>ITS micobionte</b>	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	595pb	(WHITE et al., 1990; ZARRIN; GANJ & FARAMARZI, 2016)
<b>ITS micobionte</b>	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
<b>rbcL Chlorophyta</b>	rbcL_192	GGTACTTGGACAACWGTWTGGAC	500pb	(Tavares-Carreón et al., 2020)
<b>rbcL Chlorophyta</b>	rbcL_657	GAAACGGTCTCKCCARCGCAT		
<b>rbcL Ciano</b>	CW	CGTAGCTTCCGGTGGTATCCACGT		(KAMPA et al., 2013)
<b>rbcL Ciano</b>	CX	GGGGCAGGTAAGAAAGGGTTTCGTA		
<b>ITS micobionte</b>	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG		(RUDI et al., 1998)
<b>ITS micobionte</b>	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
<b>16S rRNA Ciano</b>	CYA106 F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA		(NÜBEL et al., 1997)
	CYA781 R	GACTACWGGGGTATCTAATCCCWT		

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostragem nos pontos 1 e 2, foi realizada do dia 11 de novembro 2020. O ponto 1, localizado em uma área de reserva atrás do Pavilhão Tecnológico (Figura 2a) é uma área bastante arborizada, com árvores e arbustos de grande e médio porte (Figura 2b). E há grande

deposição de resíduos sólidos (garrafas pets, latas de alumínio, sacos plásticos não biodegradáveis etc.) em vários pontos no local, bem como grande quantidade de matéria orgânica (folhas secas, restos de animais etc.) (Figura 2c). O ponto 2, localizado atrás do prédio do Ensino Integrado I é via de acesso para os prédios do CCBS (Figura 2d), e contém árvores de grande porte, mas possui uma área mais aberta e conseqüentemente a dissipação de particulados atmosféricos é maior em comparação ao ponto 1. Não foi observado deposição de resíduos neste ponto.

**Figura 2.** Pontos de coleta. **a** – Ponto 1; **b** – árvores e arbustos do ponto 1; **c** – deposição de resíduos sólidos presente no ponto 1; **d** – ponto de coleta 2.



Fonte: **a, d** - Google Maps (2021); **b, c** - arquivo pessoal (2020).

Nos dois pontos de coletas foram predominantes nas árvores e rochas amostradas líquen de hábitos foliosos e crostosos. Os líquens de hábito fruticoso e gelatinoso, quando presentes, apresentavam-se em sua maioria talos pouco desenvolvidos, evidenciando, aparentemente, talos jovens ou com dificuldades de crescimento. Talvez pelo fato destes

apresentarem uma sensibilidade maior aos poluentes ambientais e atmosféricos em relação aos líquens dos grupos folioso e crostoso que são mais resistentes (FUGA et al., 2005; KÄFFER, 2011). Vários trabalhos como o de COSTA et al. (2020); KRICKE & LOPPI (2002); MARTINS-MAZZITELLI et al. (2006) entre outros, indicam que a presença de líquens fruticoso em um local sugere um melhor grau da qualidade ambiental e do ar, não obstante a abundância de líquens de talos gelatinosos, sobretudo os que possuem cianobactérias como fotobionte que são ainda mais sensíveis aos poluentes ambientais, sugere um ambiente com qualidade do ar salutar (GEISER et al., 2019). Portanto, a menor disponibilidade desses grupos de líquen nesses locais demonstra que essas áreas podem não estar em condições muito boas em termos de qualidade ambiental atmosférica.

Devido às atividades desenvolvidas no contexto urbano onde o campus da UFMA está inserido, constatou-se que vários fatores contribuem para a poluição atmosférica e ambiental do local, tais como: poluição veicular, áreas sem lixeiras seletivas possibilitando a deposição de resíduos no ambiente e outras possíveis contaminações, considerando que ao entorno do campus há bairros residenciais, nos quais os moradores possuem fácil acesso ao campus. Portanto, as áreas amostradas caracterizam-se por apresentarem influência antrópica direta exibindo condições não muito favoráveis para o estabelecimento e desenvolvimento da comunidade líquênica.

Foram coletados no total 26 espécimes nos dois pontos de coletas. Desse total, 4 espécimes foram utilizados neste estudo para análise, identificação e sequenciamento genético, sendo elas nomeadas: P5A1, P3A1, P3A2, P4 e P1 sendo selecionados com base na biomassa microbiana. Portanto, dentre os 26 espécimes inoculados e distribuídos nos três meios de culturas, que totalizou um total de 78 tubos de ensaios e 78 erlenmeyers, somente 4 das amostras testadas inoculadas com o meio BG-11 sem nistatina, armazenadas em erlenmeyers, obtiveram a biomassa microbiana significativa para este estudo. No trabalho de RUTHES (2010) fotobiontes líquênico foram testados em diferentes meios e, também foi observado um melhor crescimento das cepas no meio BG-11.

Quanto as amostras inoculadas em tubos de ensaios, os microrganismos fotossintetizantes não se desenvolveram como era esperado, todavia supõe-se que a forma líquênica tenha crescido (Figura 3), e das outras 74 amostras que foram inoculadas nos outros meios de culturas e em erlenmeyers os fotobiontes ou não se desenvolveram; ou se desenvolveram, mas em seguida houve perda da biomassa.

Em relação ao crescimento das cepas, as biomassas foram obtidas em um período de aproximadamente 3 meses, onde foram observadas em microscopia e repicadas para manutenção das colônias. Em contrapartida, RUTHES (2010) obteve biomassa do cianobionte *Nostoc muscorum* em um período de 15 dias após o inoculo.

**Figura 3.** Inóculo no tubo de ensaio como meio de cultura. A seta mostra, provavelmente, o talo liquênico se desenvolvendo



Fonte: arquivo pessoal (2020).

Os espécimes nomeados P5A1, P1, P3A1 e P3A2 foram coletados no ponto 1, e P4 foi coletado no ponto 2. Abaixo, descrição detalhada dos quatro espécimes.

#### **P5A1**

Descrição: talo de hábito gelatinoso/crostoso, coloração verde oliva amarronzado, lobos lobados: curtos, bem pequenos e arredondados, talo bem aderido ao substrato, superfície superior mais ou menos lisa (Figura 4a). Testes de coloração: córtex superior (K-, C-, KC-, I-); medula (K+ Orange, C-, KC-, I-, KC-). O fotobionte isolado em meio de cultura é uma cianobactéria.

#### **P1**

Descrição: talo de hábito crostoso – saxícola, coloração verde, bem aderido ao substrato, superfície lisa (Figura 4d). Testes de coloração: córtex superior (K-, C-, KC-, I-); medula (K-, C-, KC-, I-, KC-). O fotobionte isolado em meio de cultura é uma clorófito.

### **P3A1**

Descrição: talo de hábito crostoso – saxícola, coloração verde oliva, bem aderido ao substrato, superfície lisa (Figura 4b). Testes de coloração: córtex superior (K-, C-, KC-, I-); medula (K-, C-, KC-, I-, KC-). Possui clorófitas como fotobionte. O fotobionte isolado em meio de cultura é uma clorófitas.

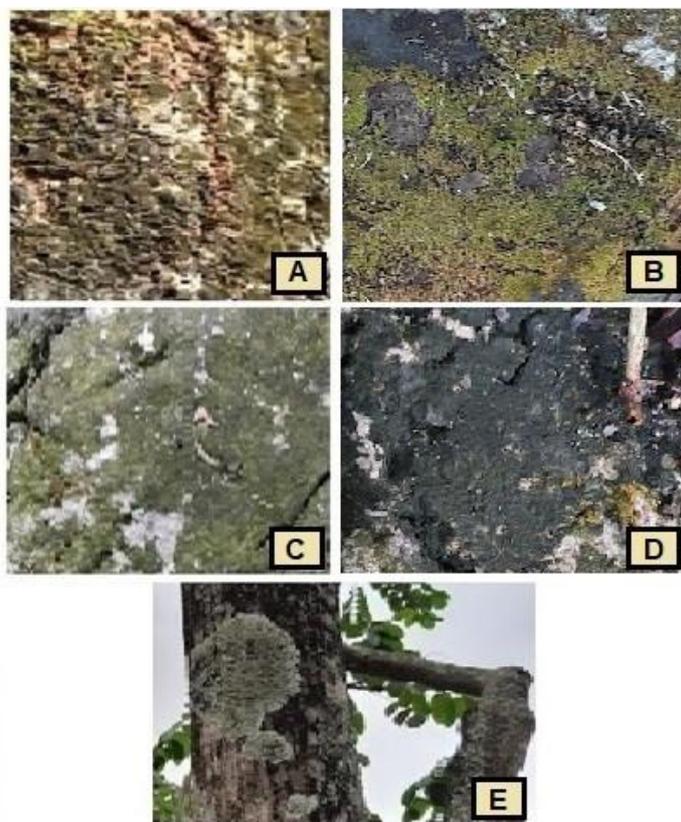
### **P3A2**

Descrição: talo de hábito crostoso – saxícola, coloração verde oliva, bem aderido ao substrato, superfície lisa (Figura 4c). Testes de coloração: córtex superior (K-, C-, KC-, I-); medula (K-, C-, KC-, I-, KC-). O fotobionte isolado em meio de cultura é uma clorófitas.

### **P4**

Descrição: talo de hábito folioso – corticícola, coloração verde com tonalidade esbranquiçada nas bordas e verde fraca no centro, lobos lobados: curtos, e arredondados, pouco aderido ao substrato, superfície escamosa (Figura 4d). Testes de coloração: córtex superior (K-, C-, KC-, I-); medula (K-, C-, KC-, I-, KC-). O fotobionte isolado em meio de cultura é uma clorófitas.

**Figura 4.** Espécimes coletados na Cidade Universitária Dom Delgado da UFMA, São Luís, MA, Brasil. **A** – P5A1, **B** – P1, **C** – P3A1; **D** – P3A2; **E** – P4



Fonte: autoria própria.

## Fotobiontes isolados

### Morfologia e comportamento em cultura

Os fotobiontes, foram isolados pelo método de fragmentos do talo liquênico conforme descrito por YAMAMOTO et al. (1985) com poucas modificações. Cinco amostras obtiveram sucesso quanto ao isolamento do fotobionte e foram fator determinante para seleção dos talos liquênico utilizados neste estudo. As culturas destes simbiossomas encontram-se depositadas no LabGeM da UFMA. De acordo com REIS (2005) os insucessos obtidos nas tentativas de isolar o fotobionte, principalmente pelo método de fragmentos de talo, muitas vezes devem-se aos altos teores de contaminação encontrados no talo.

Dos fotobiontes isolados, uma amostra obteve biomassa cianobacteriana (P5A1), e o restante obteve biomassa composta por microalgas clorófitas (P3A1, P3A2 e P4). A cianobactéria isolada apresenta estrutura filamentosa ramificada e heterocitada, e as clorófitas apresentam forma unicelulares e esféricas. A análise morfológica permitiu a identificação das mesmas como pertencente as ordens Nostocales e Trebouxiales (Tabela 5).

**Tabela 5.** Fotobiontes isolados de líquens do campus da UFMA, São Luís, Brasil

<b>Ponto de amostragem</b>	<b>Amostra</b>	<b>Ordem</b>	<b>Espécie</b>	<b>Cultura</b>
P1	P5A1	Nostocales	<i>Nostochopsis lobatus</i>	BG-11
P1	P3A1		<i>Trebouxia</i> sp <sub>1</sub>	BG-11
P1	P3A2	Trebouxiales		BG-11
P2	P4		<i>Trebouxia</i> sp <sub>2</sub>	BG-11

#### *Nostochopsis lobatus* – H. C. Wood ex Bornet & Flahault (1886) - **Cepa P5A1**

Descrição: A cultura é formada por biomassa colonial de filamentos emaranhados de tom verde claro, compostos por tricomas com células arredondadas, cilíndricas ou alongadas (dependendo da região observada) e heterocitadas com disposição intercalar. Possuem filamentos dispostos em arranjos com ramificações verdadeiras, longas ou curtas, do tipo T e V. Os ramos longos apresentam muitas células e possuem ápice afilados, enquanto os ramos curtos apresentam poucas células e por vezes apresentam heterocisto na célula terminal.

#### *Trebouxia* sp<sub>1</sub> – De Puymaly (1924) – **Cepa P3A1**

Descrição: Na cultura as colônias são formadas por células de formato esférico, coloração de tom verde claro. Possuem cloroplasto com invaginações ocupando quase todo o citoplasma com um ou dois pirenídes em cada célula esféricas e margeados por uma bainha não contínua de grãos escuros, provavelmente de amido.

***Trebouxia* sp2** – De Puymaly (1924) – Cepas **P3A2** e **P4**

Descrição: Na cultura as colônias são formadas por células de formato esférico e ovoide, coloração de tom verde brilhante. Possuem cloroplasto ocupando quase todo o citoplasma, irregularmente lobado; e central durante a divisão, com um ou dois pirenoides margeados por uma bainha escura (provavelmente de amido).

**Figura 5.** Espécies de cianobactéria e clorófitas isoladas de líquens coletados no campus da UFMA, São Luís, Brasil. **1** - Cepas P5A1, **2** - Cepas P3A1, **3** - Cepas P3A2 e **4** - P4



Fonte: autoria própria.

Apesar de ainda serem poucos estudados, o cultivo e o sequenciamento têm confirmado a identidade de muitos fotobiontes liquênico. Destes, acredita-se que quatro gêneros ocorram com mais frequência na grande maioria dos líquens: as clorófitas *Trebouxia* e *Trentepohlia* e as cianobactérias *Nostoc* e *Scytonema* (AHMADJIAN 1967; BÜDEL, 1992). Contudo, segundo LÜCKING et al. (2009) para as diversas formas de cianomatóides, principalmente para os cianolíquens que habitam regiões tropicais, essa confirmação ainda continua incompreendida. Dessa forma, alguns fotobiontes liquenizados que supostamente representam *Scytonema* podem na verdade não pertencer a esse gênero e, em vez disso, formam uma nova linhagem ainda não reconhecida dentro das cianobactérias liquenizadas

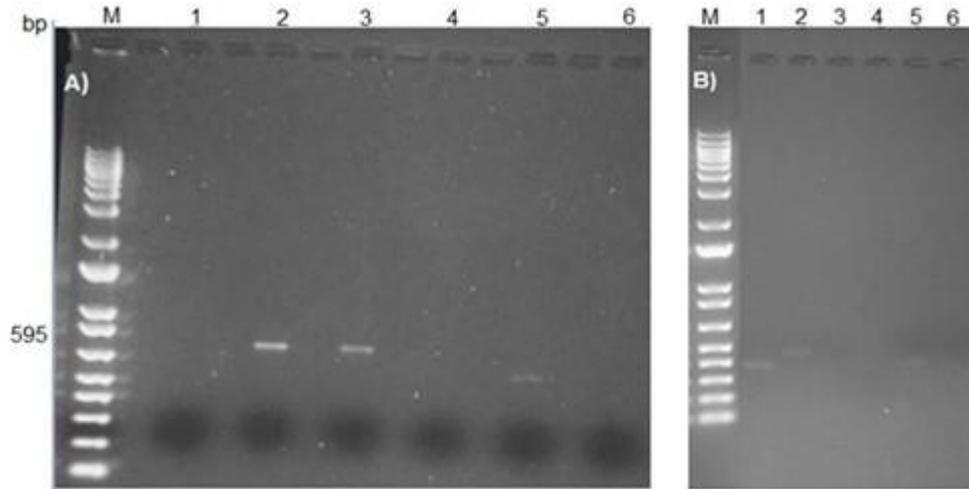
filamentosas com heterócitos (LÜCKING et al., 2009). Isto pode explicar, por suposto, a cepa isolada no presente trabalho como pertencente ao gênero *Nostochopsis*, até então não identificado e relatado em nenhum trabalho como fotobionte de líquen. A ausência de dados sobre regiões reconhecidamente ricas em biodiversidade, existentes atualmente, nos leva a uma subestimação da real diversidade de fotobiontes liquênicos (REIS, 2005).

Ainda, de acordo LÜCKING et al. (2009) as abordagens filogenéticas, em combinação com inventários de organismos pouco estudados em regiões pouco exploradas, fornecem oportunidades para descobrir novas comunidades microbianas, reconstruir histórias evolutivas e explorar novas ecologias e papéis funcionais de microrganismos no ambiente. As cianobactérias representam um dos grupos de microrganismos mais antigos e ecologicamente diversos, e a descoberta de uma nova e diversa linhagem de cianobactérias liquenizadas nos lembra que o mundo microbiano ainda se constitui uma incógnita (CURTIS & SLOAN, 2005).

Quanto a microalga verde do gênero *Trebouxia*, é caracterizada como o mais comum entre os fotobiontes presentes em pelo menos metade dos líquens que ocorrem na natureza (MARCELLI, 2006). E grande parte dos trabalhos encontrados na literatura, como por exemplo, MOLINS et al., 2018a, b; MOYA et al., 2015, 2018; ŠKALOUD et al., 2018; MUGGIA, 2020 etc., são voltados para o estudo de *Trebouxia* como simbionte liquênico.

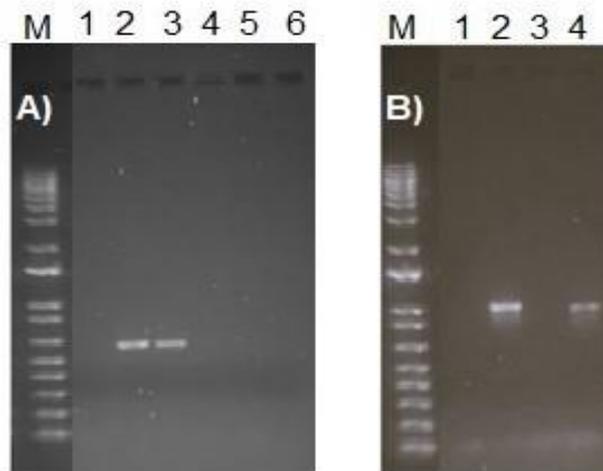
Obtivemos sucesso na obtenção dos marcadores ITS (micobionte) nas amostras P3A1, P4 e P5A1 (repique) e ITS (ciano) nas amostras P5A1, P3A1 e P1 (Figura 6); 18S (chlorophyta) nas amostras P3A1 e P4 e para o rbcL (ciano) nas amostras P5A1 e P1 (Figura 7).

**Figura 6:** Produtos de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose usando os primers ITS 1 e ITS 4 (**A** - ITS - Micobionte) e ITSCYA (**B** - ITS - Cianobactérias).



**A)** M: marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; 1: P1; 2: P3A1; 3: P4; 4: P5A1 Cultivado; 5: P5A1 repique; 6 – controle negativo. **B)** M: marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; 1: P1; 2:P3A1; 3: P5A1S; 4: P4 Cultivado; 5: P5A1 repique; 6 – controle negativo.

**Figura 7:** Produtos de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose usando os primers SSU – 18S de Chlorophyta - A; CW e CX – rbcL de cianobactérias- B



**A)** M: marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; 1: controle negativo; 2: P3A1; 3: P4; 4: P1; 5: P5A1 repique; 6: P5A1 Cultivado. ~-bp de fragmento. **B)** M: marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; 1: controle negativo; 2: P5A1; 3: P3A1; 4: P1. ~843 - 909 - bp de fragmento.

Apesar da grande importância das algas associadas em simbioses líquênicas, os processos específicos que estruturam as interações entre os simbiontes ainda são atualmente

limitados devido a uma perspectiva incompleta da diversidade, incapacidade de identificar com precisão os parceiros microbianos e os recursos humanos ainda limitados. Elucidar e identificar as espécies envolvidas em interações simbióticas são muito importantes para a compreensão de associações altamente integradas que podem ser os principais fatores determinantes na dinâmica ecológica e evolutiva (DARWELL et al., 2014).

## **CONCLUSÃO**

Com base no que foi apresentado é possível concluir que o campus da UFMA, Bacanga, São Luís, Maranhão possui uma grande diversidade inexplorada de líquens de hábitos crostoso e folioso. Sendo a ausência ou pouca observação de talos de hábitos fruticoso e gelatinoso um índice de que o local pode não estar em ótimas condições em termos de qualidade ambiental, já que os mesmos são extremamente sensíveis aos níveis mínimos de poluição do ambiente. Dessa forma, sugere-se mais estudos com foco na diversidade, composição e riqueza de espécies com potenciais para uso como biomonitores uma importante alternativa para confirmar às condições ambientais na Cidade Universitária Dom Delgado da UFMA.

O método utilizado para o isolamento e cultivo dos fotobiontes se mostrou eficiente, tornando possível a identificação morfológica dos gêneros descritos no presente trabalho. Quanto aos testes de coloração, somente o espécime P5A1 mostrou-se sensível ao KOH quando foi aplicado na medula passando de um tom de laranja neutro para um tom forte de laranja avermelhado, indicando possível presença de antraquinonas.

A análise molecular fornecerá características importantes para uma melhor precisão na identificação e melhor caracterização dos líquens e dos microrganismos fotossintetizantes isolados. Portanto, as amostras P5A1, P3A1, P3A2 e P4 ainda passarão por testes moleculares utilizando iniciadores específicos para um resultado mais preciso e para confirmação do morfológico.

## REFERÊNCIAS

- AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. New York: John Wiley & Sons, p. 250, 1993.
- AHMADJIAN, V. A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology, and identification. **Phycologia** 6: 127–160, 1967.
- AL-TEBRINEH, J., MIHALI, T.K., POMATI, F., NEILAN, B.A. Detection of saxitoxin producing cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in environmental water blooms by quantitative PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, 76(23), 7836-7842, 2010.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00174-10>.
- ARAÚJO, R. R. **Clima e Vulnerabilidade Socioespacial: uma avaliação dos fatores de risco na saúde da população urbana do município de São Luís (MA)**. Tese (Doutorado em Geografia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente (SP), 2014.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. Rima, 2006.
- BOZELLI, R.L.; HUSZAR, V.L.M. Comunidades fito e zooplantônicas continentais em tempo de avaliação. **Limnotemas 3. Sociedade Brasileira de Limnologia**. 2003.
- BÜDEL, B. Taxonomy of lichenized procaryotic blue-green algae. In Reisser W. [ed.], **Algae and symbioses**, 301–324. Biopress, Bristol, UK, 1992.
- CARLILE, M.J., WATKINSON, C.S., GOODAY, G.W. The fungi. 2nd edition. **Academs Press**. 2001.
- CELIE, J. W. A. M.; BEELEN, R. H. J.; VAN DEN BORN, J. Effect of fixation protocols on in situ detection of L-selectin ligands. **Journal of Immunological Methods**, v. 298, n. 1–2, p. 155–159, 2005.
- CHAO, Y.; ZHANG, T. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 381–392, 2011.
- COSTA, L. B. S; ALMEIDA JR, E. B. de. Checklist da Flora Fanerogâmica e Mapeamento das Áreas de Fragmentos Florestais Urbanos em São Luís, Maranhão. **Revista Equador (UFPI)**, Vol. 9, Nº 3, p. 26 – 39, 2020.
- COSTA, A. D. M. M.; SILVA, T. F.; ALVARENGA, C. A.; COSTA, A. M. G. M. Indicadores de qualidade do ar mediante o uso dos líquens na área urbana do município minerador de Itabira/MG Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, e38891211310, 2020.
- CRESPO, A., BLANCO, O., HAWKSWORTH, D. L. The potential of mitochondrial DNA for establishing phylogeny and stabilizing generic concepts in the parmelioid lichens. **Taxon** 50: 807—819, 2001.

- CRESPO, A., GAVILÁN, R., ELIX, J. A., GUTIÉRREZ, G. A comparison of morphological, chemical and molecular characters in some parmelioid genera. **Lichenologist** 31: 451-460, 1999.
- CRITTENDEN, P. D., DAVID, J. C. HAWKSWORTH, D. L., CAMPBELL, F. S., Attempted Isolation and success in the culturing of broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. **New Phytologist**, 130 (2), p. 267-297, 1995.
- CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Exploring microbial diversity - A vast below. **Science** 309: 1331–1333, 2005.
- DARWELL, C. T.; AL-BEIDH, S.; COOK, J. M. Molecular species delimitation of a symbiotic fig-pollinating wasp species complex reveals extreme deviation from reciprocal partner specificity. **BMC Evol. Biol.** 14, 1–10, 2014.
- DUARTE, A. C.; FARIAS FILHO, M. 6S. Impactos da adequação de infraestrutura e problemas ambientais da Cidade Universitária Dom Delgado, Universidade Federal do Maranhão, em São Luís – MA. Revista Geografia em Atos (**Geo Atos online**), v. 2, n. 17, p. 80-99, abr, 2020. DOI: 10.35416/geoatos.v2i17.6553.
- EBENEZER, V.; MEDLIN, L. K.; KI, J.-S. Molecular Detection, Quantification, and Diversity Evaluation of Microalgae. **Mar. Biotechnol.**, 2011.
- FASTNER, J., HEINZE, R., HUMPAGE, A.R., MISCHKE, U., EAGLESHAM, G.K., CHORUS, I. *Cylindrospermopsis* occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. **Toxicon** 42, 313-321, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(03\)00150-8](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00150-8).
- FRIEDL, T. Comparative ultrastructure of pyrenoids in *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta). **Plant. Systematics and Evolution**. v. 164, p. 145-159, 1989.
- FUGA, A.; SAIKI, M.; MARCELLI, M. P. Análise de líquens por ativação neutrônica para o estudo da espécie atmosférica da cidade de São Paulo. **INAC**. 2005.
- GEISER, L. H.; NELSON, PETER, R.; JOVAN, S. E.; ROOT, H. T.; CLARK, C. M. Avaliando riscos ecológicos de deposição atmosférica de nitrogênio e enxofre em florestas dos EUA usando macrolíquens epifíticos. **Diversity**, 11(6), 87, 2019; <https://doi.org/10.3390/d11060087>.
- GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (lyng) de Breb. **Verh. Int. Verein. Limnol.**, 15:796-804, 1964.
- GONZÁLEZ, I.; AYUSO-SACIDO, A.; ANDERSON, A.; GENILLOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS, Microbiol Ecol** 54:401-415. Madrid, Spain (2005).
- HALL, T. Biosciences, I., Carlsbad, C., BioEdit: an important software for molecular biology. **GERF Bull. Of Biosci.**, 2(1), 60-61, 2011.

HELMS, G. **Taxonomy and symbiosis in associations of Physciaceae and Trebouxia**. 2003. PhD thesis, Fakultät der Georg-August Universität Göttingen, Germany. Disponível em: <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2003/helms/>. Acesso em 14/01/2020.

HONEGGER, R. Functional aspects of the lichen symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 42: 553-578, 1991.

JUNGBLUT, A.D., NEILAN, B.A. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. **Arch. Microbiol.**, 185(2), 107-114, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0073-5>.

KAMPA, A; GAGUNASHVILI, A. N.; GULDER, T. A. M.; MORINAKA, B. I.; DAOLIO, C.; GODEJOHANN, M.; MIAO, V. P. W.; PIEL, J.; ANDRÉSSON, O. S. Metagenomic natural product discovery in lichen provides evidence for a family of biosynthetic pathways in diverse symbioses. **PNAS** 110 (33) E3129-E3137, 2013.

KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MAREŠ, J.; JOHANSEN, J. R., 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using to the polyphasic approach. **Preslia**, 86(4), 295-335, 2014.

KRICKE, R. & LOPPI, S. Bioindication: The I.A.P. approach. In: P.L Nimis, C. Scheidegger & P.A. Wolseley (eds.). *Monitoring with lichens—Monitoring lichens*. **Kluwer Academic Publishers**. Dordrecht, pp. 21-38, 2002.

KROKEN, S.; TAYLOR, J. W. Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. **The Bryologist**, v.103, p. 645-660, 2000.

JUNGBLUTH, P. A família Parmeliaceae (fungos liquenizados) em fragmentos de cerrados do Estado de São Paulo. 2006. 334f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente) – Instituto de Botânica, São Paulo, 2006.

LEGRAND, B., LESOBRE, J., COLOMBET, J., LATOUR, D., SABART, M. Molecular tools to detect anatoxin-a genes in aquatic ecosystems: Toward a new nested PCR-based method. **Harmful Algae**, 58, 16-22, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.07.002>.

LOPES, V.R., RAMOS, V., MARTINS, A., SOUSA, M., WELKER, M., ANTUNES, A., VASCONCELOS, V.M. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. **Mar. Environ. Res.**, 73, 7-16, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.10.005>.

LÜCKING, R.; LAWREY, J. D.; SIKAROODI, M.; GILLEVET, P. M.; CHAVES, J. L.; SIPMAN, H. J. M.; BUNGARTZ, F. Do lichens domesticate photobionts like farmers domesticate crops? Evidence from a previously unrecognized lineage of filamentous cyanobacteria. *Bryology and Lichenology*, **American Journal of Botany**, v. 96, 8ed, 2009.

MARCELLI, M. P. Fungos Liquenizados. In: XAVIER FILHO, L. et al. (ed.). **Biologia de Liqueus**. Âmbito Cultural Edições Ltda.: Rio de Janeiro. p. 503-520. 2006

MARTINS-MAZZITELLI, S.M. A., MOTA FILHO, F.O., PEREIRA, E.C. & FIGUEIRA, R. Utilização de liquens no biomonitoramento da qualidade do ar. In: L. Xavier Filho, M.E.

Legaz, C.V. Córdoba & Pereira, E.C. (eds.). **Biologia de Liqueus**. v. 3, 4 ed. Âmbito Cultural, Rio de Janeiro, pp. 101-133, 2006.

MOLINS, A.; MOYA, P.; GARCÍA-BREIJO, F. J.; REIG-ARMIÑANA, J.; BARRENO, E. Molecular and morphological diversity of *Trebouxia* microalgae in sphaerothalloid *Circinaria* spp. lichens1. **Journal of Phycology**, 54(4), 494-504, 2018a.

MOLINS, A.; MOYA, P.; GARCÍA-BREIJO, F.; REIG-ARMIÑANA, J.; BARRENO, E. Assessing lichen microalgal diversity by a multi-tool approach: Isolation, Sanger sequencing, HTS and ultrastructural correlations. **The Lichenologist**, 50, 123-138, 2018b.

MOYA, P.; ŠKALOUD, P.; CHIVA, S.; GARCÍA-BREIJO, F. J.; REIG-ARMINANA, J.; VANČUROVÁ, L.; BARRENO, E. Molecular phylogeny and ultrastructure of the lichen microalga *Asterochloris mediterranea* sp. nov. from Mediterranean and Canary Islands ecosystems. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 65(6), 1838-1854., 2015.

MOYA, P.; CHIVA, S.; MOLINS, A.; JADRŇÁ, I.; ŠKALOUD, P.; BARRENO, E.; ONDŘEJ, P. *Myrmecia israeliensis* as the primary symbiotic microalga in squamulose lichens growing in european and Canary Island terricolous communities. **Fottea**, 18(1), 72-85, 2018.

MUGGIA, L.; NELSEN, M. P.; KIRIKA, P. M.; BARRENO, E.; BECK, A.; LINDGREN, H.; LUMBSCH, H. T.; LEAVITT, S. D. and *Trebouxia* working group. Formally described species woefully underrepresent phylogenetic diversity in the common lichen photobiont genus *Trebouxia* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta): an impetus for developing an integrated taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 149, 106821, 2020.

NASCIMENTO, R. C. **Cultivo de Microalgas em Fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma**. 2016.55f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Gurupi, 2016.

NASH III, T. H., **Lichen biology**, 2<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge, 2008.

NÜBEL, U., GARCIA-PICHEL, F., MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Environ. Microbiol.*, 63(8), 3327-3332, 1997. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.8.3327-3332.1997>.

O'BRIEN, H.; MIADLIKOWSKA, J.; LUTZONI, F. Assessing host specialization in symbiotic Cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. **European Journal of Phycology** 40: 363-378, 2005.

PAULSRUD, P.; LINDBLAD, P. Sequence variation of the tRNA (Leu) intron as a marker for genetic diversity and specificity of symbiotic cyanobacteria in some lichens. **Applied & Environmental Microbiology** 64: 310–315, 1998.

RAMÍREZ, Á.; CANO, A. Líquenes de Pueblo Libre, una localidad andina en la Cordillera Negra (Huaylas, Ancash, Perú). **Rev. Peru. biol, Lima, Faculdade de Ciências Biológicas**, v. 12 (3), p. 383-396, novembro, 2005.

RANTALA-YLINEN, A., A., KÄNÄ, S., WANG, H., ROUHIAINEN, L., WAHLSTEN, M., RIZZI, E., SIVONEN, K. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium

*Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(20), 7271-7278, 2011. <https://doi.org/10.1128/AEM.06022-11>.

REIS, R. A. Estudo filogenético de fotobiontes de líquens; Isolamento e cultivo de simbiontes líquênicos; Estudo comparativo de polissacarídeos e ácidos graxos do Líquen *teloschistes flavicans* e seus simbiontes. 183f. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Curitiba, 2005.

RIKKINEN, J. **Symbiotic Cyanobacteria in Lichens**. [s.l.] University of Helsinki, 2016.

RIKKINEN, J. Cyanobacteria in terrestrial symbiotic systems. **Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes**. Springer, Cham., p. 243–294, 2017.

RODRIGUES, J. Spot tests para a identificação de líquenes / laboratório on-line. Disponível em: <https://www.fciencias.com/2017/06/01/spot-tests-identificacao-liquenes-laboratorio-online/#:~:text=Os%20spot%20tests%20constituem%20uma,os%20metabolitos%20secund%C3%A1rios%20que%20produzem>. Acesso em: 22 de agosto de 2022.

RUTHES, A. C. Ficobiontes de Fungos Liqueenizados e de Vida Livre: **cultivo, caracterização estrutural de polissacarídeos e atividade biológica de um polímero contendo ácido nosturônico**. 188f. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, 2010.

ŠKALOUD, P.; MOYA, P.; MOLINS, A.; PEKSA, O.; SANTOS-GUERRA, A.; BARRENO, E. Untangling the hidden intrathalline microalgal diversity in *Parmotrema pseudotinctorum*: *Trebouxia crespoana* sp. nov. *The Lichenologist*, 50(3), 357-369, 2018.

SPIELMANN, A. A. & MARCELLI, M. P. **Fungos liquenizados (líquens)**. 1. ed. São Paulo: IBt, 2006.

VALÉRIO, E.; CHAMBEL, L.; PAULINO, S.; FARIA, N.; PEREIRA, P.; TENREIRO, R. Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology Society* 155(2), 2009.

VASAS, G., SURÁNYI, G., BÁCSI, I., MÁRTA, M., MÁTHÉ, C., GONDA, S., BORBELY, G. Alteration of cylindrospermopsin content of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria, Nostocales) due to step-down from combined nitrogen to dinitrogen. *Adv. Microbiol.*, 3(08), 557-564, 2013. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.38075>.

WATANABE, M. M.; TANABE, Y. Biology and Industrial Potential of *Botryococcus braunii*. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, Reino Unido: John Wiley & Sons Ltda, 2013. p. 369–387.

WEBSTER, J.; WEBER, R.W.S. Introduction to Fungi. 3rd. ed. Cambridge, **Cambridge University Press**, 2007.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR – Protocols: A Guide to Methods and Applications. Ed. **Academic Press**. p. 315-322. 1990.

YAMAMOTO, Y.; MIZUGUCHI, R.; YAMADA, Y. Tissue cultures of *Usnea rubescens* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their cultures. **Agric. Biol. Chem.**, v. 49, p. 3347-3348, 1985.

ZAGATTO, P.A. & ARAGÃO, M.A. **Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas**. São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório Técnico. 23p. 1992.

ZARRIN, M.; GANJ, FARZANEH.; FARAMARZI, S. Analysis of the rDNA internal transcribed spacer region of the *Fusarium* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Biomed Rep.** 4(4): 471–474, 2016.