

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANDREA CAROLINE RUTHES**

**FICOBIONTES DE FUNGOS LIQUENIZADOS E DE VIDA LIVRE: CULTIVO,  
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE UM POLÍMERO CONTENDO ÁCIDO NOSTURÔNICO**

**CURITIBA**

**2010**

**ANDREA CAROLINE RUTHES**

**FICOBIONTES DE FUNGOS LIQUENIZADOS E DE VIDA LIVRE: CULTIVO,  
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE UM POLÍMERO CONTENDO ÁCIDO NOSTURÔNICO**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini**

**Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Rosechrer Carbonero**

**CURITIBA**

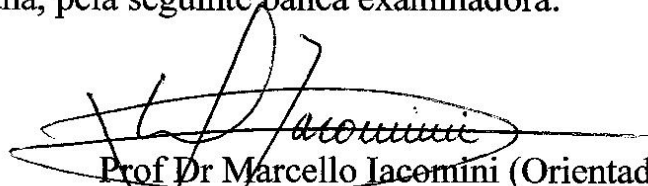
**2010**

TERMO DE APROVAÇÃO

ANDREA CAROLINE RUTHES


**Ficobiontes de fungos liquenizados e de vida livre: cultivo, caracterização estrutural de polissacarídeos e atividade biológica de um polímero contendo ácido nosturônico**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof Dr Marcello Jacomini (Orientador)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



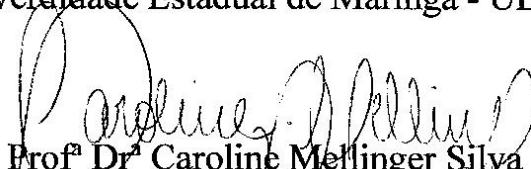
Profª Drª Joana Lea Meira Silveira

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof Dr Fábio Rogério Rosado

Univerdidade Estadual de Maringá - UEM



Profª Drª Caroline Mellinger Silva

Faculdades Pequeno Príncipe



Profª Drª Clarice Aoki Osaku

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

Curitiba, 30 de março de 2010.

**Aos meus pais João Adir e Elisabeth.**

**Ao meu irmão João Ricardo.**

**Ao meu namorado Anderson.**

**Por todo amor, carinho, apoio,  
compreensão, mas acima de tudo por  
estarem sempre presentes em minha vida.**

**Amo muito vocês!**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela confiança, apoio e incentivo à pesquisa científica, sobretudo por ter acreditado em mim, por seus ensinamentos, lições, orientação e amizade.

À minha co-orientadora e acima de tudo amiga Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine R. Carbonero, que mesmo distante se tornava presente, acompanhando o desenvolvimento deste trabalho, orientando, sugerindo, questionando... Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos e acima de tudo pela confiança.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joana Lea Meira Silveira pelas correções do projeto, dos relatórios e desta tese na banca interna.

À amiga Dr<sup>a</sup>. Fernanda Simas-Tosin, pelas correções criteriosas desta tese na banca interna.

Ao Prof. Dr. Philip A. J. Gorin, pelos ensinamentos científicos, e pelo exemplo de uma vida dedicada à pesquisa.

Aos meus pais João Adir e Elisabeth, pelo apoio incondicional, incentivo, e por acreditarem na realização dos meus objetivos. Vocês são meu exemplo de força, dedicação, determinação, de vida...

Ao meu irmão João Ricardo, meu companheiro, durante algum tempo, de luta longe de casa, obrigada pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao meu namorado Anderson, pela imensa compreensão, apoio incondicional, incentivo, paciência, amor, carinho, amizade... Obrigada por dividir seus sonhos e realizações comigo. Te amo muito!

À minha companheira inseparável, Karol (minha filhinha) pelos momentos de alegria, pelos olhares compreensivos, ou não, que no decorrer da redação deste trabalho não se afastou em nenhum momento do meu lado, me deixando rodeada por seus brinquedos, sempre querendo um pouquinho de atenção, e a sua irmãzinha sempre alegre e bem disposta, até de mais, Amy.

À Dirce pela amizade, companheirismo, disposição em ajudar a qualquer momento, pelos trabalhos que fizemos juntas, pelas horas de

descontração e acima de tudo pelo exemplo de determinação. Não importa aonde nossos caminhos nos levarem, quero levar nossa amizade para sempre.

As amigas, Ana Helena, Fernanda, Fer Simas e Giovana pela amizade e companheirismos nestes anos de laboratório, nos momentos alegres e naqueles nem tão alegres assim, mas que sempre tinham uma palavra de conforto e carinho. Desejo o melhor a todas, e que nossa amizade permaneça.

À Caroline Mellinger, Thales, Ricardo, grandes exemplos de pessoas e pesquisadores que percorreram os mesmos caminhos que estou trilhando agora.

À aluna de iniciação científica Natália, que aceitou realizar um trabalho em conjunto, comigo e com a Dirce, pela dedicação, esforço, por estar sempre atenta aos nossos ensinamentos e pelas conversas amigas.

Ao Daniel pelo companheirismo nos momentos críticos (coluna) até tarde no laboratório, junto com a Dirce, não me deixando desistir. Graças a vocês consegui um grande resultado deste trabalho.

Ao Arquimedes pela companhia sempre alegre e prestativa, RONALDO, pelas idéias e incentivo.

À querida amiga Nicole, pelo apoio técnico, amizade, pelos bons momentos de descontração.

A todos os amigos do laboratório E1, 247, 252 e laboratórios anexos, pela amizade, pelas brincadeiras e palavras de conforto.

Ao Prof. Dr. Guilherme Sassaki, Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine R. Carbonero pelo auxílio e disponibilidade em realizar as análises de RMN.

À Rosane em especial pela amizade e pela disponibilidade em realizar as inúmeras e incontáveis análises de GC-MS.

À Andréia e a Elizangela pelas análises de HPSEC-MALLS.

Ao Dr. Lauro pelas análises de ESI-MS.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Adair Roberto S. Santos, do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos ensaios biológicos realizados.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, representada pelo Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e a todos os professores do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo estímulo.

À Dona Marilza Lamour, secretária do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, pelos auxílios prestados.

Ao CNPq, ao PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

À todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização desta tese e para meu desenvolvimento científico, o meu muito obrigada!

Grandes realizações não são feitas por impulso,  
mas pela soma de pequenas realizações.

Vincent Van Gogh



## RESUMO

As estruturas de polissacarídeos obtidas de fotobiontes liquênicos representantes das algas verdes (*Trebouxia* sp.) e das cianobactérias (*Nostoc muscorum*; UTEX - 2493), além de cianobactérias de vida livre (*Nostoc muscorum*; UTEX - 2209 e *Nostoc* sp.) foram estudadas. O fotobionte *Trebouxia* sp. e as espécies de *Nostoc muscorum* (cianobionte e de vida livre) foram cultivados em meio líquido TM e BG-11, respectivamente, e tanto os polissacarídeos da biomassa como os exopolissacarídeos presentes no meio de cultivo foram analisados. Para o fotobionte *Trebouxia* sp. foram purificadas três frações, todas compostas por  $\beta$ -D-galactofurananas (1 $\rightarrow$ 5)-ligadas, podendo ser linear, substituída em O-6 por unidades de  $\beta$ -D-Galf, ou por cadeias laterais mais complexas de unidades de D-Manp 4-O- (12,6%), 2,4-di-O- (2,0%), 2,3-di-O- (3,7%) e 2,6-di-O-substituídas (4,5%), além de terminais não redutores de D-Rha, D-Araf, D-Galf, e D-Manp como terminais não redutores. Para o cianobionte *Nostoc muscorum* foram caracterizadas uma  $\beta$ -D-xilana linear (1 $\rightarrow$ 4)-ligada, obtida a partir da fração exopolissacarídica, e um heteropolissacarídeo, principalmente formado por unidades de  $\beta$ -L-Arap- e  $\beta$ -D-Xylp- ambas (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas, parcialmente substituídas em O-3 por unidades de  $\alpha$ -D-Manp, as quais por sua vez são também substituídas em O-3 ou O-2 por terminais não redutores  $\alpha$ -D-Manp ou  $\alpha$ -L-Fucp. Uma vez que não foi possível purificar frações polissacarídicas a partir de *Nostoc muscorum* de vida livre, devido à grande heterogeneidade das frações obtidas e ao baixo rendimento das mesmas, *Nostoc* sp de vida livre foi submetida à subseqüentes extrações aquosas à quente e alcalinas (KOH 1%), a partir das quais foram obtidas três frações que apresentaram perfis de eluição homogêneos quando analisadas por HPSEC-MALLS, além de composições monossacarídicas similares, apresentando altos teores de ribose, além de xilose, galactose e glucose. Todas as frações derivadas de *Nostoc* sp. apresentaram sinais de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  181,8, 175,3, 84,2 e 18,8 caracterizados como sendo referentes a presença de 3-O-lactil D-ácido glucurônico, denominado de ácido nosturônico (NosA), um monossacarídeo incomum formado por um ácido glucurônico substituído em O-3 por um grupo lactil. O conjunto dos resultados obtidos indica que este heteropolissacarídeo isolado da biomassa de *Nostoc* sp. de vida livre é principalmente formado por unidades de  $\beta$ -D-Xylp-,  $\alpha$ -D-Galp- e  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas. As unidades de  $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas estão substituídas em O-3 por terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Ribf, enquanto que as unidades de  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas apresentam-se substituídas em O-6 por terminais não redutores de  $\beta$ -D-NosA. Este heteropolissacarídeo, contendo ácido nosturônico, isolado da biomassa de *Nostoc* sp. de vida livre apresentou um efeito analgésico dose dependente, com  $\text{ID}_{50}$  de 7,0 (3,5 - 14,0) mg/kg, inibindo  $86 \pm 8$  % o número de contorções abdominais, na dose de 30 mg/kg, quando suas propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória foram avaliadas *in vivo*.

Palavras-chave: *Trebouxia* sp. *Nostoc* spp. Caracterização estrutural de polissacarídeos. Ácido nosturônico. Atividade antinociceptiva.

## ABSTRACT

The structures of polysaccharides obtained from lichen phycobionts considered representatives of green algae (*Trebouxia* sp.) and cyanobacteria (*Nostoc muscorum*; UTEX - 2493), and free-living cyanobacteria (*Nostoc muscorum*; UTEX - 2209 and *Nostoc* sp.) were studied. The photobiont *Trebouxia* sp. and species of *Nostoc muscorum* (cyanobiont and free-living) were cultured in liquid TM and BG-11 media, respectively, and both, the polysaccharides of the biomass such as exopolysaccharides present in the culture medium were analyzed. For the photobiont *Trebouxia* sp., three fractions were purified, all composed of  $\beta$ -D-galactofurannan (1 $\rightarrow$ 5)-linked which should be linear, substituted at O-6 by  $\beta$ -D-Galf units, or by complex side chains, composed of Man $\beta$  4-O- (12.6%), 2,4-di-O-(2.0%), 2,3-di-O- (3.7%) and 2,6-di-O-substituted (4.5%) units, having also  $\alpha$ -D-Rhap,  $\beta$ -D-Araf,  $\beta$ -D-Galf, and  $\alpha$ -D-Man $\beta$  as non-reducing end units. For *Nostoc muscorum* cyanobiont a linear  $\beta$ -D-xylan (1 $\rightarrow$ 4)-linked was obtained from the exopolysaccharide fraction, and a heteropolysaccharide, mainly composed of units of  $\beta$ -L-Arap and  $\beta$ -D-Xyl $\beta$  - both (1 $\rightarrow$ 4)-linked, partially substituted at O-3 by  $\alpha$ -D-Man $\beta$  units, which in turn are also substituted at O-3 or O-2 by  $\alpha$ -D-Man $\beta$ , or  $\alpha$ -L-Fuc $\beta$  as non-reducing end units, were characterized. Since it was not possible to purify polysaccharidic fractions from free-living *Nostoc muscorum*, due to its heterogeneity and the low income, free-living *Nostoc* sp. was submitted to subsequent aqueous and alkaline (KOH 1 %) extractions, from which three fractions were obtained, showing homogeneous elution profiles when analyzed by HPSEC-MALLS, and similar monosaccharide compositions, showing high levels of ribose, and xylose, galactose and glucose were observed. All fractions derived from *Nostoc* sp. showed signs of  $^{13}\text{C}$  at  $\delta$  181.8, 175.3, 84.2 and 18.8 characterized as being related to the presence of 3-O-lactyl D-glucuronic acid, named nosturonic acid (NosA), an unusual monosaccharide composed of a glucuronic acid substituted at O-3 by a lactyl group. The set of results indicates that this heteropolysaccharide isolated from free-living *Nostoc* sp. biomass is mostly made up of  $\beta$ -D-Xyl $\beta$ -,  $\alpha$ -D-Gal $\beta$ - and  $\beta$ -D-Glc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked units.  $\beta$ -D-Xyl $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked units are substituted by non-reducing end  $\alpha$ -D-Rib $\beta$  units at O-3, while  $\beta$ -D-Glc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked units presents substitution at O-6 by non-reducing end units of  $\beta$ -D-NosA. This heteropolysaccharide with nosturonic acid isolated from the biomass of free-living *Nostoc* sp. showed a marked and dose-dependent inhibition of the acetic acid-induced nociception, with  $\text{ID}_{50}$  of 7.0 (3.5-14.0) mg/kg and inhibition of  $86 \pm 8$  % at a dose of 30 mg/kg, when antinociceptive and anti-inflammatory properties were evaluated in vivo.

Key words: *Trebouxia* sp. *Nostoc* spp. Estructural characterization of polysaccharides. Nosturonic acid. Antinociceptive response.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- MICROGRAFIA DE DIFERENTES LINHAGENS DE <i>Asterochloris</i> (ANTES <i>Trebouxia</i> sp.): CLOROPLASTO PARIETAL NÃO LOBADO (CAUP H1011) -GRUPO II (A); CLOROPLASTO LOBADO (CAUP H1010) -GRUPO I (B).....	40
FIGURA 2	- PRINCIPAIS FRAGMENTOS REPRESENTATIVOS DAS ESTRUTURAS OBSERVADAS EM GALACTOMANANAS OBTIDAS DE LIQUENS.....	45
FIGURA 3	- ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	57
FIGURA 4	- ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS A PARTIR DA BIOMASSA DE <i>Nostoc muscorum</i> -CIANOBIONTE (NmC) E DE VIDA LIVRE (NmL).....	58
FIGURA 5	- ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO (TW) DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	74
FIGURA 6	- PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO TW-10E, OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> , POR HPSEC-MALLS.....	75
FIGURA 7	- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA GALACTOFURANANA (TW-10E), OBTIDA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	75
FIGURA 8	- ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO ALCALINA (KOH 2%) DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	77
FIGURA 9	- PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO TK2-SG, OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> , POR HPSEC-MALLS.....	77

FIGURA 10	- ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DERIVADOS DO SOBRENADANTE DE GELO E DEGELO (TK2-SG) PROVENIENTE DO EXTRATO ALCALINO (KOH 2%) DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	78
FIGURA 11	- PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES: TK2-ME (—), TK2-CE (—), TK2-TE (—) e TK2-DR (—) (A), e EM DETALHE A FRAÇÃO TK2-DR (B), OBTIDAS A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	80
FIGURA 12	- ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES TK2-SG (A), TK2-ME (B), TK2-MR (C), TK2-DR (D); DETALHE DA REGIÃO DE -CH <sub>2</sub> DO ESPECTRO DE <sup>13</sup> C-DEPT (D'), OBTIDAS DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	82
FIGURA 13	- ESTRUTURA PROPOSTA PARA A GALACTOFURANANA PRESENTE NA FRAÇÃO TK2-DR OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADA DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	83
FIGURA 14	- ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO ALCALINA (KOH 10%) DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	84
FIGURA 15	- PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS das frações TK10-SG (—), TK10-QR (—), TK10-TR (—) E TK10-CR (—) (A); DETALHE DA FRAÇÃO TK10-CR (B), OBTIDAS A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	85
FIGURA 16	- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO TK10-CR; DETALHE DA REGIÃO DE -CH <sub>2</sub> DO ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C-DEPT, OBTIDA DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	86

FIGURA 17	- <i>Nostoc muscorum</i> – CIANOBIONTE (NmC: <b>A,B,C</b> ) E VIDA LIVRE (NmL: <b>A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub></b> ), CULTIVADA EM DIFERENTES MEIOS. MEIO BRISTOL'S ( <b>A</b> ); ES ( <b>B</b> ); BG-11 ( <b>C</b> ).....	90
FIGURA 18	- IMAGENS DE <i>Nostoc muscorum</i> DE VIDA LIVRE (NmL - <b>A e B</b> ) E DO CIANOBIONTE (NmC - <b>C e D</b> ).....	91
FIGURA 19	- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Nostoc muscorum</i> – VIDA LIVRE (NmL), CULTIVADA NO MEIO BG-11.....	92
FIGURA 20	- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA XILANA LINEAR (IE-NmC); DETALHE DA REGIÃO DE - <u>C</u> H <sub>2</sub> DO ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C-DEPT, OBTIDA A PARTIR DA FRAÇÃO EXOPOLISSACARÍDICA DE <i>Nostoc muscorum</i> - CIANOBIONTE (NmC).....	94
FIGURA 21	- PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO 16R-NmC, OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE <i>Nostoc muscorum</i> - CIANOBIONTE (NmC), POR HPSEC-MALLS.....	97
FIGURA 22	- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C-NMR DA FRAÇÃO 16R-NmC OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE <i>Nostoc muscorum</i> - CIANOBIONTE (NmC).....	98
FIGURA 23	- ESPECTRO DE <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HMQC DA FRAÇÃO HP3, PRODUTO DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO 16R-NmC, OBTIDA DE <i>Nostoc muscorum</i> – CIANOBIONTE (NmC).....	100
FIGURA 24	- PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO SE-NmL, DERIVADA DO EPS DE <i>Nostoc muscorum</i> - VIDA LIVRE (NmL), POR HPSEC-MALLS.....	104
FIGURA 25	- ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA BIOMASSA DE <i>Nostoc muscorum</i> - VIDA LIVRE (NmL).....	105
FIGURA 26	- PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES CE-NmL (—) e CR-NmL (—), DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc muscorum</i> - VIDA LIVRE (NmL), POR HPSEC.....	106

FIGURA 27	- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C-NMR DA FRAÇÃO CE-NmL, OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE <i>Nostoc muscorum</i> - VIDA LIVRE (NmL).....	107
FIGURA 28	- IMAGEM DA CIANOBACTÉRIA <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE COLETADA NO SOLO ( <b>A</b> ) E EM SECÇÃO TRANSVERSAL DA BIOMASSA ( <b>B</b> ).....	108
FIGURA 29	- ESQUEMA GERAL DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Nostoc</i> sp DE VIDA LIVRE.....	109
FIGURA 30	- ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO (HW-N) DERIVADO DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	110
FIGURA 31	- PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO SHW-N, DERIVADA DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE, POR HPSEC-MALLS.....	111
FIGURA 32	- PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES SFHW-N (—) E PFHW-N (—), DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE, POR HPSEC-MALLS.....	112
FIGURA 33	- PERFIL DE ELUIÇÃO DE 16RHW-N, DERIVADA DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE, POR HPSEC-MALLS.....	113
FIGURA 34	- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO 16RHW-N ( <b>A</b> ), DERIVADA DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE; DETALHE DA REGIÃO DE -CH <sub>2</sub> DO ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C-DEPT ( <b>B</b> ).....	114
FIGURA 35	- ESPECTRO DE <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HSQC DA FRAÇÃO 16RHW-N ( <b>A</b> ), DETALHE DA REGIÃO DE ppm MAIS BAIXO (δ 18,9) ( <b>A'</b> ), E DO HSQC ACOPLADO DA REGIÃO ANOMÉRICA ( <b>B</b> ), DERIVADA DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	116
FIGURA 36	- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO 16RHW-NCR DERIVADA DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	119

FIGURA 37	-	ESTRUTURA DO ÁCIDO NOSTURÔNICO (NosA).....	120
FIGURA 38	-	ESPECTROS DE ESI-MS/MS DE UM DISSACARÍDEO ( <b>A</b> ) E DE TRISSACARÍDEOS ( <b>B</b> e <b>C</b> ) OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO 16RHW-N DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	122
FIGURA 39	-	TLC DOS PRODUTOS DE METANÓLISE DA FRAÇÃO 16RHW-N DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE, SEPARADOS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SILICA GEL-60.....	123
FIGURA 40	-	ESPECTRO DE ESI-MS/MS DO ÁCIDO NOSTURÔNICO (modo +) ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADA DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	124
FIGURA 41	-	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES 16RHW-N ( <b>A</b> ), DSHW-N ( <b>B</b> ), DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	128
FIGURA 42	-	FRAGMENTOS REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA RESISTENTE APÓS DEGRADAÇÃO DE SMITH DA FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	129
FIGURA 43	-	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES 16RHW-N ( <b>A</b> ), 30HW-N ( <b>B</b> ), 60HW-N ( <b>C</b> ) E 90HW-N ( <b>D</b> ), DERIVADAS DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	131
FIGURA 44	-	ESPECTRO DE <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HSQC DA FRAÇÃO 90HW-N ( <b>A</b> ), EM DETALHE REGIÃO DE ppm MAIS BAIXO (δ 18,9) ( <b>A'</b> ), DERIVADA DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	133
FIGURA 45	-	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES 16RHW-N ( <b>A</b> ) E 16RHW-NLi ( <b>B</b> ) DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	136
FIGURA 46	-	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES 90HW-N ( <b>A</b> ) E 90HW-NLi ( <b>B</b> ), DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	138

FIGURA 47	- FRAGMENTOS REPRESENTATIVOS DA ESTRUTURA PROPOSTA PARA O HETEROPOLISSACARÍDEO PRESENTE NA FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADA DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	140
FIGURA 48	- PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES 50RHW-N (SF) (—) E 16RK1-N (—), DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE, POR HPSEC.....	141
FIGURA 49	- ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES 16RHW-N ( <b>A</b> ), 50RHW-N ( <b>B</b> ) E 16RK1-N ( <b>C</b> ), DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	143
FIGURA 50	- EFEITO DE 16RHW-N (3-30 mg/kg, i.p.) NO NÚMERO DE CONTRAÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO ( <b>A</b> ), INFILTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS ( <b>B</b> ) E EXTRAVASAMENTO DO CORANTE EVANS BLUE ( <b>C</b> ) EM CAMUNDONGOS.....	145



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- MEIO PARA CIANOBACTÉRIA BG-11.....	53
TABELA 2	- SAIS ADICIONADOS AO MEIO BG-11.....	54
TABELA 3	- MEIO DE BRISTOL.....	54
TABELA 4	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DO SOBRENADANTE DE CONGELAMENTO E DEGELO (TK2-SG) PROVENIENTE DO EXTRATO ALCALINO (KOH 2%) DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	79
TABELA 5	- ANÁLISE DE METILAÇÃO DA GALACTOFURANANA (TK2- DR), OBTIDA DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	80
TABELA 6	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DO SOBRENADANTE DE CONGELAMENTO E DEGELO (TK10-SG) PROVENIENTE DO EXTRATO ALCALINO (KOH 10%), DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	85
TABELA 7	- ANÁLISE DE METILAÇÃO DA HETEROGALACTOFURANANA (TK10-CR), OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE <i>Trebouxia</i> sp. ISOLADO DE <i>Teloschistes flavicans</i> .....	87
TABELA 8	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES EXOPOLISSACARÍDICAS PROVENIENTES DO CULTIVO DE <i>Nostoc muscorum</i> - CIANOBIONTE (NmC).....	93
TABELA 9	- DADOS DE RMN- <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H DA FRAÇÃO IE-NmC <sup>a</sup> (XILANA) OBTIDA A PARTIR DA FRAÇÃO EXOPOLISSACARÍDICA DE <i>Nostoc muscorum</i> - CINOBIONTE (NmC).....	95
TABELA 10	- ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO 16R-NmC OBTIDA DE <i>Nostoc muscorum</i> – CIANOBIONTE (NmC) E DE SEU PRODUTO DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HP3).....	99

TABELA 11	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES EXOPOLISSACARÍDICAS, NmC E NmL, OBTIDAS A PARTIR DO CULTIVO DE <i>Nostoc muscorum</i> - CIANOBIONTE E DE VIDA LIVRE, RESPECTIVAMENTE.....	103
TABELA 12	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DO EXTRATO AQUOSO (HW-N) DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	110
TABELA 13	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS TRATAMENTO DA FRAÇÃO SHW-N, DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE, COM SOLUÇÃO DE FEHLING.....	112
TABELA 14	- ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO 16RHW-N DERIVADA DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	117
TABELA 15	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES 16RHW-N e 16RHW-NCR DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	118
TABELA 16	- DADOS DE RMN- <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H DO ÁCIDO NOSTURÔNICO PRODUZIDO POR METANÓLISE DA FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	125
TABELA 17	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES 16RHW-N E DSHW-N, DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	127
TABELA 18	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO 16RHW-N E DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL, DERIVADOS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	130
TABELA 19	- ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO 90HW-N, EM COMPARAÇÃO COM A FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	132
TABELA 20	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES 16RHW-N, 16RHW-NLi, 90HW-N, E 90HW-NLi, DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	135

TABELA 21	- ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO 16RHW-NLi2, EM COMPARAÇÃO COM A FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	137
TABELA 22	- ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO 90HW-NLi, EM COMPARAÇÃO COM A FRAÇÃO 90HW-N, DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	139
TABELA 23	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES 50RHW-N E 16RK1-N, DERIVADAS DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE.....	142

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS

$\delta$	- Deslocamento químico
$^{13}\text{C}$	- Carbono treze
$^{14}\text{C}$	- Carbono quatorze
$^1\text{H}$	- Próton
16E-NmC	- Fração eluída na membrana de 16 kDa após diálise fechada da fração solúvel em água fria, fracionada a partir do extrato aquoso de <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
16EHW-N	- Fração eluída na membrana de 16 kDa após diálise fechada da fração precipitado de Fehling, fracionada a partir do extrato aquoso de <i>Nostoc</i> sp.
16R-NmC	- Fração retida na membrana de 16 kDa após diálise fechada da fração solúvel em água fria, fracionada a partir do extrato aquoso de <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
16RHW-N	- Fração retida na membrana de 16 kDa após diálise fechada da fração precipitado de Fehling, fracionada a partir do extrato aquoso de <i>Nostoc</i> sp.
16RHW-NLi	- Fração obtida após tratamento da fração 16RHW-N, com lítio metálico em etilenodiamina
16RK1-N	- Fração retida na membrana de 16 kDa após diálise fechada da fração precipitado de Fehling, fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 1%) de <i>Nostoc</i> sp.
30HW-N	- Fração obtida após hidrólise ácida parcial da fração 16RHW-N, por 30 minutos, com TFA até atingir pH 2,0
50RHW-N	- Fração retida na membrana de 50 kDa após diálise fechada da fração sobrenadante de Fehling, fracionada a partir do extrato aquoso de <i>Nostoc</i> sp.

60HW-N	-	Fração obtida após hidrólise ácida parcial da fração 16RHW-N, por 60 minutos, com TFA até atingir pH 2,0
90HW-N	-	Fração obtida após hidrólise ácida parcial da fração 16RHW-N, por 90 minutos, com TFA até atingir pH 2,0
90HW-NLi	-	Fração obtida após tratamento da fração 90HW-N, com lítio metálico em etilenodiamina
Ac <sub>2</sub> O	-	Anidrido acético
Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	Carbonato de prata
AgNO <sub>3</sub>	-	Nitrato de prata
BaCO <sub>3</sub>	-	Carbonato de bário
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	-	Cloreto de cálcio di-hidratado
CaCO <sub>3</sub>	-	Carbonato de cálcio
CE-NmC	-	Fração eluída na membrana de 100 kDa após diálise fechada da fração sobrenadante de congelamento e degelo de <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
CHCl <sub>3</sub>	-	Clorofórmio
CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Ácido fórmico
CH <sub>3</sub> I	-	Iodeto de metila
CO <sub>2</sub>	-	Dióxido de carbono
COSY	-	<i>Correlation spectroscopy</i>
CE-NmL	-	Fração eluída na membrana de 100 kDa após diálise fechada da fração sobrenadante de congelamento e degelo de <i>Nostoc muscorum</i> – vida livre
CR-NmC	-	Fração retida na membrana de 100 kDa após diálise fechada da fração sobrenadante de congelamento e degelo de <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte

CR-NmL	-	Fração retida na membrana de 100 kDa após diálise fechada da fração sobrenadante de congelamento e degelo de <i>Nostoc muscorum</i> – vida livre
CRHW-N	-	Fração retida na membrana de 100 kDa após diálise fechada da fração precipitado de Fehling, fracionada a partir do extrato aquoso de <i>Nostoc</i> sp.
CuSO <sub>4</sub>	-	Sulfato de cobre
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	-	Sulfato de cobre penta-hidratado
d.i.	-	Diâmetro interno
D <sub>2</sub> O	-	Óxido de deutério
DEPT	-	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DSHW-N	-	Fração resistente após degradação controlada de Smith sobre a fração 16RHW-N
E-NmC	-	Fração exopolissacarídica de <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
E-NmL	-	Fração exopolissacarídica de <i>Nostoc muscorum</i> - vida livre
EPS	-	Exopolissacarídeo
ES	-	Extrato de Solo
ESI-MS	-	Ionização por Spray de Elétrons Acoplada a Espectrometria de Massa
EtOH	-	Etanol
<i>f</i>	-	Furanosídico
GC-MS	-	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	Ácido bórico
H <sub>2</sub> O	-	Água
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	Ácido sulfúrico

HCl	-	Ácido clorídrico
HK1-N	-	Extrato alcalino (KOH 1%) obtido após extração de <i>Nostoc</i> sp.
HMQC	-	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy</i>
HOAc	-	Ácido acético glacial
HP1	-	Fração obtida após hidrólise ácida parcial da fração RFS-NmC, por 1 hora, <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
HP2	-	Fração obtida após hidrólise ácida parcial da fração RFS-NmC, por 2 horas, <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
HP3	-	Fração obtida após hidrólise ácida parcial da fração RFS-NmC, por 3 horas, <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
HPLC	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPSEC-MALLS	-	Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração e Espalhamento de Luz
HSQC	-	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy</i>
HW-N	-	Extrato aquoso obtido após extração a quente de <i>Nostoc</i> sp.
HW-NmC	-	Extrato aquoso obtido após extração a quente de <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
HW-NmL	-	Extrato aquoso obtido após extração a quente de <i>Nostoc muscorum</i> - vida livre
Hz	-	Hertz
IHW-N	-	Fração insolúvel em água fria obtida após congelamento e degelo do extrato aquoso de <i>Nostoc</i> sp.
IR	-	Índice de refração
<i>J</i>	-	Constante de acoplamento
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	-	Fosfato de potássio tri-hidratado

kDa	-	Kilodaltons
KOH	-	Hidróxido de potássio
Li	-	Lítio
LiOH	-	Hidróxido de lítio
LS	-	Espalhamento de luz
I-NmL	-	Fração insolúvel em água fria obtida após congelamento e degelo do extrato aquoso de <i>Nostoc muscorum</i> - vida livre
ID <sub>50</sub>	-	Dose efetiva 50
IE-NmC	-	Fração insolúvel em água fria obtida após congelamento e degelo da fração exopolissacarídica <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
IE-NmL	-	Fração insolúvel em água fria obtida após congelamento e degelo da fração exopolissacarídica <i>Nostoc muscorum</i> - vida livre
Me <sub>2</sub> SO	-	Dimetilsulfóxido
Me <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	Dimetilsulfato
Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub>	-	Dimetilsulfóxido deuterado
MeOH	-	Metanol
MES	-	[ácido 2-( <i>N</i> -morfolina)-etanosulfônico]
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	-	Sulfato de magnésio hepta-hidratado
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	-	Sulfato de manganês hidratado
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	Carbonato de sódio
NaB <sup>2</sup> H <sub>4</sub>	-	Boridreto de sódio deuterado
NaBH <sub>4</sub>	-	Boridreto de sódio
NaCl	-	Cloreto de sódio
NaIO <sub>4</sub>	-	Periodato de sódio



NaN <sub>3</sub>	-	Azida de sódio
NaNO <sub>2</sub>	-	Nitrito de sódio
NaNO <sub>3</sub>	-	Nitrato de sódio
NaOAc	-	Acetato de sódio
NaOH	-	Hidróxido de sódio
NH <sub>4</sub> OH	-	Hidróxido de amônio
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	-	Molibidato de amônio tetra-hidratado
NmC	-	<i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
NmL	-	<i>Nostoc muscorum</i> - vida livre
NosA	-	Ácido Nosturônico
<i>p</i>	-	Piranosídico
p/v	-	Peso/volume
PFHW-N	-	Fração precipitado de Fehling obtida após tratamento do extrato aquoso de <i>Nostoc</i> sp.
ppm	-	Partes por milhão
PSI	-	Fotossistema I
PSII	-	Fotossistema II
rDNA	-	DNA ribossomal
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	-	<i>Rotational Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
rpm	-	Rotações por minuto
S-NmC	-	Fração solúvel em água fria após congelamento e degelo do extrato aquoso de <i>Nostoc muscorum</i> - cianobionte
S-NmL	-	Fração solúvel em água fria após congelamento e degelo do extrato aquoso de <i>Nostoc muscorum</i> - vida livre

- SE-NmC - Fração solúvel em água fria após congelamento e degelo da fração exopolissacarídica de *Nostoc muscorum* - cianobionte
- SE-NmL - Fração solúvel em água fria após congelamento e degelo da fração exopolissacarídica de *Nostoc muscorum* - vida livre
- SF-NmL - Fração sobrenadante de Fehling obtida após tratamento da fração S-NmC, *Nostoc muscorum* - vida livre
- SFHW-N - Fração sobrenadante de Fehling obtida após tratamento da fração SHW-N, do extrato aquoso de *Nostoc* sp.
- SHW-N - Fração solúvel em água fria após congelamento e degelo do extrato aquoso de *Nostoc* sp.
- TCA - Ácido tricloroacético
- TFA - Ácido trifluoracético
- TK2 - Extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK2-CE - Fração eluída em 100 kDa após diálise fechada da fração TK2-ME fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK2-CR - Fração retida em 100 kDa após diálise fechada da fração TK2-ME fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK2-DE - Fração eluída em 10 kDa após diálise fechada da fração TK2-TE fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK2-DR - Fração retida em 10 kDa após diálise fechada da fração TK2-TE fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK2-ME - Fração eluída em 1000 kDa após diálise fechada da fração TK2-SG fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.

- TK2-MR - Fração retida em 1000 kDa após diálise fechada da fração TK2-SG fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK2-PE - Fração referente ao precipitado etanólico do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK2-PG - Fração isolável em água fria obtida após congelamento e degelo do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK2-SG - Fração solúvel em água fria obtida após congelamento e degelo do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK2-TE - Fração eluída em 30 kDa após diálise fechada da fração TK2-CE fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK2-TR - Fração retida em 30 kDa após diálise fechada da fração TK2-CE fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 2%) de *Trebouxia* sp.
- TK10 - Extrato alcalino KOH 10% de *Trebouxia* sp.
- TK10-CE - Fração eluída em 100 kDa após diálise fechada da fração TK10-TE fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 10%) de *Trebouxia* sp.
- TK10-CR - Fração retida em 100 kDa após diálise fechada da fração TK10-TE fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 10%) de *Trebouxia* sp.
- TK10-PE - Fração referente ao precipitado etanólico do extrato alcalino (KOH 10%) de *Trebouxia* sp.
- TK10-QE - Fração eluída em 500 kDa após diálise fechada da fração TK10-SG fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 10%) de *Trebouxia* sp.
- TK10-QR - Fração retida em 500 kDa após diálise fechada da fração TK10-SG fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 10%) de *Trebouxia* sp.

TK10-SG	-	Fração solúvel em água fria obtida após congelamento e degelo do extrato alcalino (KOH 10%) de <i>Trebouxia</i> sp.
TK10-TE	-	Fração eluída em 300 kDa após diálise fechada da fração TK10-QE fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 10%) de <i>Trebouxia</i> sp.
TK10-TR	-	Fração retida em 300 kDa após diálise fechada da fração TK10-QE fracionada a partir do extrato alcalino (KOH 10%) de <i>Trebouxia</i> sp.
TLC	-	Cromatografia em Camada Delgada
TOCSY	-	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TW-T	-	Extrato aquoso obtido de <i>Trebouxia</i> sp.
TW-PG	-	Fração insolúvel em água fria após congelamento e degelo do extrato aquoso de <i>Trebouxia</i> sp.
TW-S	-	Fração solúvel após tratamento do extrato aquoso de <i>Trebouxia</i> sp. com TCA
TW-SG	-	Fração sobrenadante de congelamento e degelo do extrato aquoso de <i>Trebouxia</i> sp.
TW-TE	-	Precipitado etanólico do extrato aquoso de <i>Trebouxia</i> sp.
v/v	-	Volume/volume
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	-	Sulfato de zinco hepta-hidratado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	31
1.1 OBJETIVOS GERAIS .....	33
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	34
2.1 FUNGOS LIQUENIZADOS .....	34
2.1.1 Cultivo dos Biontes Liquênicos .....	35
2.2 FICOBIONTES DE FUNGOS LIQUENIZADOS .....	37
2.2.1 <i>Trebouxia</i> sp. ....	38
2.2.2 <i>Nostoc</i> spp. ....	42
2.3 POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS LIQUENIZADOS. ....	43
2.4 POLISSACARÍDEOS DE SIMBIONTES LIQUÊNICOS. ....	46
2.5 POLISSACARÍDEOS EM CIANOBACTÉRIAS .....	48
2.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE FUNGOS LIQUENIZADOS OU DE SEUS SIMBIONTES. ....	50
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	52
3.1 MATERIAIS DE ESTUDO .....	52
3.2 CULTIVO DOS BIONTES LIQUÊNICOS .....	52
3.2.1 Meios de Cultura .....	53
3.3 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS .....	55
3.3.1 Otenção dos Exopolissacarídeos .....	56
3.3.2 Obtenção dos Polissacarídeos Obtidos a Partir da Biomassa de Algas.....	56
3.3.2.1 Extração com solventes orgânicos .....	56
3.3.2.2 Extração aquosa .....	58
3.3.2.3 Extrações alcalinas.....	59
3.4 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	59
3.4.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo .....	59
3.4.2 Separação dos Polissacarídeos Solúveis em Água por Precipitação com Solução de Fehling .....	60
3.4.3 Purificação dos Polissacarídeos por Ultrafiltração e por Diálise em Membranas .....	60
3.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS .....	61

3.5.1 Hidrólise Ácida Total.....	61
3.5.2 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise Ácida Total.....	61
3.5.3 Metilação das Frações Polissacarídicas.....	62
3.5.3.1 Hidrólise ácida total das frações polissacarídicas após metilação .....	63
3.5.4 Hidrólise Ácida Parcial da Fração 16R-NmC de <i>Nostoc muscorum</i> - Cianobionte (NmC) .....	63
3.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	64
3.6.1 Cromatografia Gasos Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS).....	64
3.6.2 Determinação da Homogeniade e Massa Molar ( $M_w$ ).....	64
3.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	65
3.8 MÉTODOS ADICIONAIS UTILIZADOS NA ANALISE ESTRUTURAL DA FRAÇÃO 16RHW-N OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE <i>Nostoc</i> sp. DE VIDA LIVRE .....	65
3.8.1 Hidrólise Ácida Parcial.....	66
3.8.2 Metanólise .....	66
3.8.3 Cromatografia em Coluna .....	66
3.8.4 Cromatografia em Camada Delgada (TLC).....	67
3.8.5 Ionização por Spray de Elétrons Acoplada a Espectrometria de Massa (ESI- MS).....	67
3.8.6 Dosagem de Ácidos Urônicos .....	68
3.8.7 Carboxi-redução .....	68
3.8.8 Oxidação com Periodato de Sódio .....	69
3.8.9 Remoção de Grupos Lactil com Lítio em Etilenodiamina .....	69
3.8.10 Ensaio Biológicos: Atividade Antinociceptiva e Antiinflamatória <i>in vivo</i> .....	70
3.8.10.1 Constrição abdominal, permeabilidade capilar peritoneal e infiltração de leucócitos causada por injeção de solução de ácido acético 0,6%.....	71
3.8.10.2 Análises estatísticas .....	72
3.9 MÉTODOS COMPLEMENTARES .....	72
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>73</b>
4.1 <i>Trebouxia</i> sp.....	73
4.1.1 Obtenção e Caracterização das Frações Polissacarídicas .....	73
4.2 CULTIVO DE <i>Nostoc muscorum</i> (CIANOBACTÉRIA).....	89
4.2.1 <i>Nostoc muscorum</i> - Cianobionte (NmC): Obtenção e Caracterização dos Exopolissacarídeos .....	93

4.2.2 <i>Nostoc muscorum</i> - Cianobionte (NmC): Obtenção e Caracterização dos Heteropolissacarídeos Obtidos a Partir da Biomassa de Células .....	96
4.2.3 <i>Nostoc muscorum</i> - Livre (NmL): Obtenção e Caracterização dos Exopolissacarídeos .....	102
4.2.4 <i>Nostoc muscorum</i> - Livre (NmL): Obtenção e Caracterização das Frações Polissacarídicas Obtidas a Partir da Biomassa de Células .....	104
4.3 <i>Nostoc</i> sp. - CIANOBACTÉRIA DE VIDA LIVRE: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS .....	108
4.4 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ATI-INFLAMATÓRIA DO HETEROPOLISSACARÍDEO CONTENDO ÁCIDO NOSTURÔNICO (FRAÇÃO 16RHW-N) ISOLADO DE <i>Nostoc</i> sp. ....	144
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	147
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	151
<b>ANEXOS</b> .....	172

## 1 INTRODUÇÃO

Fungos liquenizados ou líquens são definidos como organismos simbióticos compostos por um fungo, o micobionte, e um ou mais parceiros fotossintéticos, o ficobionte, que pode ser uma alga verde (fotobionte) ou uma cianobactéria (cianobionte) (NASH III, 1996).

Os fungos, como organismos heterótrofos, desenvolveram várias estratégias nutricionais para adquirir carbono fixado através de uma população de microalgas verdes e/ou cianobactérias (HONEGGER, 1996). Uma destas formas é a liquenização, que se apresenta como uma estratégia evolucionária bem sucedida, pela qual o micobionte supre suas necessidades de carboidratos a partir do fotobionte, resultando em uma rica diversidade de espécies.

Das 13.500 a 17.000 espécies de fungos liquenizados conhecidas (FARR *et al.*, 2004), pouco mais de 100 foram investigadas quanto aos seus polissacarídeos. Dentre as estruturas descritas estão as  $\alpha$ - e  $\beta$ -glucanas e os heteropolissacarídeos contendo principalmente galactose, manose e/ou glucose, como por exemplo, as galactomananas, galactoglucomananas e glucomanogalactanas (GORIN *et al.*, 1993). Estes polímeros por serem isolados em quantidades consideráveis são geralmente sugeridos como tendo origem a partir do micobionte (GORIN; BARON; IACOMINI, 1988; GORIN *et al.*, 1993).

Desde o reconhecimento da natureza dualística dos fungos liquenizados (SCHWENDENER, 1869), apenas um número limitado de estudos foram realizados sobre os simbiontes líquênicos, principalmente, devido à dificuldade de isolamento e crescimento de culturas axênicas de seus componentes (STOCKER-WÖRGÖTTER, 1995).

As tentativas de separar os componentes simbiontes dos fungos liquenizados, são em sua maioria, direcionadas para a ressíntese e desenvolvimento do talo em condições de laboratório. Ao longo do tempo foram desenvolvidas diversas técnicas de isolamento de biontes líquênicos, seja por meio de estruturas reprodutivas (AHMADJIAN; JACOBS, 1981; AHMADJIAN, 1993; CULBERSON; CULBERSON; JOHNSON, 1992; STOCKER-WÖRGÖTTER, 1998) ou de fragmentos do talo (YAMAMOTO; MIZUGUCHI; YAMADA, 1985). O avanço nas técnicas de isolamento proporcionou a abertura de novas perspectivas para o uso de



fungos liquenizados, principalmente de seus biontes, foto- e micobionte, na biotecnologia e na farmacologia, uma vez que representam uma importante fonte de compostos secundários e polissacarídeos (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2001).

Inúmeros trabalhos relacionados com a caracterização estrutural de polissacarídeos de fungos liquenizados vêm sendo desenvolvidos (CARBONERO *et al.*, 2002; 2003; 2005; 2006; CORDEIRO *et al.*, 2003; 2004; OLAFSDOTTIR e INGÓLFSOTTIR, 2001), e diversos polímeros foram descritos. Outras moléculas, como glicolipídeos e ácidos graxos, também passaram a ser avaliadas (SASSAKI *et al.*, 2001).

No intuito de ampliar os conhecimentos a respeito da simbiose liquênica iniciou-se o isolamento e cultivo dos micobiontes e fotobiontes de fungos liquenizados, e a análise comparativa de seus polissacarídeos com aqueles do talo liquênico. Os primeiros resultados, obtidos para fungos liquenizados do gênero *Ramalina* e *Teloschistes*, demonstraram que os polissacarídeos produzidos pelo micobionte são similares àqueles sintetizados pelo talo liquênico. Em contrapartida, os polissacarídeos obtidos a partir do fotobionte não haviam sido anteriormente observados na associação (CORDEIRO, *et al.*, 2004; 2005; RUTHES, *et al.*, 2008).

Com relação aos fotobiontes presentes em associações liquênicas, são encontrados aproximadamente 47 gêneros de algas, incluindo as clorófitas (algas verdes) e as cianobactérias. Quando comparados ao seu parceiro micobionte, os fotobiontes de líquens são pouco conhecidos e analisados. Desta maneira, o isolamento e o cultivo da alga tornam-se necessários para determinar a sua posição sistemática.

Recentemente, foram observadas diferenças estruturais significativas em polissacarídeos de fungos liquenizados associados à fotobiontes pouco explorados do ponto de vista científico, como *Scytonema*, *Trentepohlia* e *Nostoc* sp., quando comparadas com àquelas mais comuns, como *Trebouxia* e *Asterochloris* sp. (CARBONERO, *et al.*, 2002; 2003; 2005; 2006). A influência do fotobionte sobre os polissacarídeos presentes nos talos liquênicos ainda não é conhecida. Portanto estudos adicionais com fungos liquenizados contendo fotobiontes não usuais, isolados de líquens foram realizados neste trabalho, com a finalidade de determinar a estrutura dos polissacarídeos, e de proporcionar um melhor entendimento da associação micobionte-fotobionte.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Cultivar o fotobionte liquênico *Trebouxia* sp., o cianobionte *Nostoc muscorum*, e o representante de vida livre *Nostoc muscorum*, a fim de purificar as frações polissacarídicas provenientes do meio de cultura, exopolissacarídeos, e da biomassa, para caracterizar a estrutura química fina dos polissacarídeos isolados, além de purificar e caracterizar estruturalmente os polissacarídeos isolados a partir da biomassa de células da cianobactéria de vida livre *Nostoc* sp., e avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do heteropolissacarídeo ácido.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral acima descrito, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Cultivar diferentes biontes liquênicos;
- Extrair, purificar e caracterizar estruturalmente os polissacarídeos obtidos através do cultivo dos mesmos, tanto a partir da biomassa quanto do meio de cultivo, na forma de exopolissacarídeos;
- Verificar a existência de diferenças estruturais significativas em polissacarídeos de fungos liquenizados associados à fotobiontes pouco explorados, como *Nostoc* sp., e aqueles associados à fotobiontes mais estudados, como *Trebouxia* sp.;
- Avaliar a influência do meio de cultivo sobre a produção destes polímeros;
- Extrair, purificar e caracterizar estruturalmente os polissacarídeos obtidos a partir de espécies do gênero *Nostoc* de vida livre;
- Verificar se há diferenças estruturais entre os polissacarídeos do fotobionte *Trebouxia* sp., do cianobionte *Nostoc muscorum* e de representantes de vida livre *N. muscorum* e *Nostoc* sp.;
- Testar as propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória da fração polissacarídica obtida em maior rendimento.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 FUNGOS LIQUENIZADOS

A natureza dualista de líquens foi notada por DeBary em 1866, que inicialmente aplicou este conceito apenas para líquens gelatinosos. Pouco depois, em 1869, Schwendener reconheceu a verdadeira natureza dos líquens, demonstrando tratar-se, não de um organismo vegetal, mas de uma simbiose complexa entre alga (ficobionte) e fungo (micobionte). Em geral, os líquens existem como talos pouco aparentes e implicitamente são tratados como indivíduos em alguns estudos (FAHSELT, 1996), embora possam ser uma entidade simbiótica envolvendo três reinos (NASH III, 1996).

Apesar dos fungos liquenizados serem constituídos por dois ou mais organismos, seus nomes científicos referem-se apenas ao fungo que participa da simbiose; a alga tem sua taxonomia própria dentro dos grupos comuns de algas (PURVIS, 2000).

Recentemente as investigações revelaram que a integração de fungos e algas ou cianobactérias em associações simbióticas evoluíram várias vezes de forma independente, resultando em uma diversidade excepcionalmente elevada de formas de vida formadas por uma estrutura específica, denominada talo liquênico (GARGAS *et al.* 1995; LUTZONI; PAGEL; REEB, 2001). Tal estrutura é morfologicamente diferente da forma adquirida pela alga ou fungo quando em vida livre (HALE, 1979).

A relação entre o micobionte e o ficobionte é na maioria das vezes definida como uma simbiose mutualística, onde o desempenho ecológico é aumentado para ambos os parceiros (micobionte e fotobionte) no estado simbiótico, de maneira independente ao consumo de carbono fixado pelo organismo heterotrófico (SMITH; DOUGLAS, 1987). Entretanto, evidências, inclusive experimentais, apontam para o que se chama de um “parasitismo controlado” por parte do micobionte, que “cultiva” o fotobionte para obter alimento (AHMADJIAN, 1993). Além destas, numerosas teorias foram propostas e as explicações se sucederam através dos tempos.

A principal conclusão que se tem é que existe um equilíbrio muito delicado

nesta associação, e que qualquer distúrbio que altere a taxa de crescimento e/ou mortalidade dos componentes envolvidos, pode levar à morte da associação. Desta maneira, a simbiose líquênica é uma estratégia evolucionária bem sucedida, capaz de resultar em uma rica diversidade de espécies fúngicas (GRUBE; KROKEN, 2000).

A formação de uma associação líquênica é o resultado da adaptação mútua dos biontes, micobionte e fotobionte, para suprir suas necessidades combinadas (GALUN; BUBRICK, 1984). Nesta associação, a alga contribui com a produção de açúcares por meio da fotossíntese e, no caso das cianobactérias pode ocorrer à produção de aminoácidos a partir de gás carbônico e nitrogênio atmosféricos. Já a contribuição do micobionte é aparentemente secundária, ele possui uma camada onde as células do fotobionte ficam alojadas, promovendo proteção contra o excesso de luz e ressecamento, podendo ainda facilitar a troca de gases (AHMADJIAN, 1993). Desta maneira, as células da camada algal encontram-se arranjadas de modo a obter uma quantidade ótima de luz solar para a realização da fotossíntese. As diferentes camadas e a forma como estão posicionadas no talo são resultados de diversas pressões adaptativas sofridas ao longo da evolução (AHMADJIAN, 1993).

### 2.1.1 Cultivo dos Biontes Líquênicos

As tentativas de separar os componentes simbiotes dos fungos liquenizados tem o objetivo de verificar se tais organismos (liquens) poderiam ser considerados como individuais ou compostos, ou seja, se seriam capazes de sobreviver isoladamente ou não.

À dificuldade de isolamento, e crescimento de culturas puras dos simbiotes líquênicos, tornou importante o cultivo destes organismos. As lentas taxas de crescimento têm se apresentado como o maior obstáculo fisiológico dos estados axênicos<sup>1</sup> (STOCKER-WÖRGÖTTER, 1995), caracterizando uma grande dificuldade no trabalho experimental (AHMADJIAN, 1967).

---

<sup>1</sup> Axênico - cultivo sob condições estéreis.

Os estudos de isolamento de biontes de fungos liquenizados são, em sua maioria, direcionados para a ressíntese e desenvolvimento do talo em condições de laboratório. Em conjunto estão as avaliações de culturas do fotobionte e micobionte isolados, os quais podem apresentar compostos específicos, sendo observada uma grande similaridade com aqueles obtidos a partir do líquen intacto (CRITTENDEN *et al.*, 1995). O isolamento de biontes é de grande importância para o estabelecimento de sistemas experimentais para líquens. Tais sistemas experimentais são necessários para solucionar questões associadas à simbiose e a quimiotaxonomia (STOCKER-WÖRGÖTTER, 1998; YOSHIMURA *et al.*, 2002).

O isolamento de micobiontes por meio do isolamento de esporos tem sido utilizado, influenciando assim, a liquenologia experimental. Estabelecida esta metodologia, buscou-se sucesso no isolamento a partir de um único esporo (AHMADJIAN; JACOBS, 1981; AHMADJIAN, 1993; CULBERSON; CULBERSON; JOHNSON, 1992; STOCKER-WÖRGÖTTER, 1997), visando uma menor taxa de contaminação das colônias obtidas.

Outra técnica muito utilizada tanto para o isolamento de micobiontes, quanto de fotobiontes é a de fragmentação de talo, também chamada de técnica de Yamamoto (YAMAMOTO; MIZUGUCHI; YAMADA, 1985), que tem como vantagem o desenvolvimento rápido dos fragmentos do talo em relação às culturas derivadas de esporos (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2001; YAMAMOTO; MIZUGUCHI; YAMADA, 1985; YAMAMOTO *et al.*, 1998). Este método está sendo muito útil com o advento de novas técnicas de inoculação e do uso do fluxo laminar, que proporciona uma grande diminuição da contaminação por outros microorganismos. A principal desvantagem desta metodologia é a impossibilidade de definir se a colônia isolada faz parte do líquen, ou de algum contaminante. Desta maneira, o uso de outros métodos para a identificação torna-se necessário.

Com o isolamento e o cultivo dos simbiontes, novas perspectivas tornaram-se possíveis para a utilização de fungos liquenizados na biotecnologia e na farmacologia, uma vez que estes representam uma importante fonte de compostos secundários e carboidratos (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2001). O interesse sobre organismos como os fungos de vida livre e os fungos liquenizados, que se apresentam como fontes de novas moléculas farmacologicamente ativas, têm aumentado gradativamente (PORTER; FOX, 1993). Fungos liquenizados apresentam inúmeros compostos secundários (VICENTE, 1991), muitos dos quais

são exclusivos destes organismos (MATEOS *et al.*, 1993).

Os compostos secundários, bem como os polissacarídeos dos líquens podem apresentar ação antimicrobiana (XAVIER FILHO; LEITE; LIMA, 1990; YAMAMOTO *et al.*, 1993; ESIMONE; ADIKWU, 1999), antifúngica (YAMAMOTO *et al.*, 1993), anti-inflamatória (HIGUCHI *et al.*, 1993; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2000), anti-tumoral, antiviral e imunomoduladora (HIRABAYASHI *et al.*, 1989; CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997; STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002), mostrando uma potencial aplicabilidade. Muitas destas substâncias derivadas dos fungos liquenizados podem ser obtidas de culturas axênicas de micobiontes (HAMADA e MIYAGAWA, 1995; HAMADA *et al.*, 1996).

## 2.2 FICOBIONTES DE FUNGOS LIQUENIZADOS

Vários estudos mostram que os fungos formadores de líquens (micobiontes) são capazes de se associar com diferentes ficobiontes (WANG-YANG; AHMADJIAN, 1972; TSCHERMAK-WOESS, 1988; FRIEDL, 1987; 1989b; AHMADJIAN 1993; BECK; KASALICKY; RAMBOLD, 2002), os quais variam grandemente em suas propriedades fisiológicas (MARTI, 1985; PALMQVIST; SAMUELSSON; BADGER, 1994).

Até o momento, 100 espécies de algas, incluindo algas verdes e cianobactérias, pertencentes a 40 gêneros foram descritas como fotobiontes e cianobiontes liquênicos, respectivamente (FRIEDL; BÜDEL, 2008; TSCHERMAK-WOESS, 1988). Dentre estes, os fotobiontes eucarióticos, representados pelas algas verdes, são classificados em 25-28 gêneros (DePRIEST, 2004), e correspondem a 85% das associações. As cianobactérias são encontradas em 10%, e 3 a 4% dos líquens apresentam simbiose com ambos, algas verdes e cianobactérias, simultaneamente (HONNEGER, 1991).

Quando comparados ao seu parceiro micobionte, os fotobiontes de líquens são pouco conhecidos e estudados, uma vez que menos de 2% das espécies são identificadas (HONNEGER, 1991; HELMS, 2003). Este fato se deve principalmente à dificuldade de reconhecimento da espécie da alga ou cianobactéria em questão. Principalmente, porque em associação, o fotobionte não apresenta caracteres

essenciais para a determinação de sua espécie, como por exemplo, ciclo de vida completo e forma de cloroplasto constante, características estas observadas somente em culturas (FRIEDL, 1989a).

O principal fotobionte de líquens é a microalga verde do gênero *Trebouxia*, que, segundo DePriest (2004), está presente em 20% das associações líquênicas. Este fato faz com que este seja também o fotobionte mais estudado. Dentre os denominados cianobiontes, cujo fotobionte é uma cianobactéria, *Nostoc* é o gênero mais frequente nas associações líquênicas.

Uma das maiores dificuldades no estudo de ficobiontes é a necessidade do seu isolamento e cultivo em condições axênicas, que permite o desenvolvimento de estudos comparativos, através de métodos morfológicos, ciclo de vida e até mesmo moleculares, que permitam sua identificação. No entanto, essa necessidade de isolamento e cultivo de ficobiontes tem resultado em uma escassez de dados descritos na literatura.

### 2.2.1 *Trebouxia* sp.

O gênero *Trebouxia* é caracterizado como o mais comum entre os fotobiontes presentes em associações líquênicas, e tem como principais caracteres para sua identificação: a forma do cloroplasto, ciclo de vida e ultra-estrutura dos pirenóides<sup>2</sup> (FRIEDL, 1989a; Ettl; GÄRTNER, 1995). Esta última é a única característica possível de ser determinada em associação, porém sua observação só é possível através de microscopia eletrônica (FRIEDL, 1989a, 1989b).

A classificação do gênero *Trebouxia* é um assunto que vem sendo amplamente discutido. Dados morfológicos, referentes ou ciclo de vida e moleculares sugerem que o gênero *Trebouxia* é um grupo parafilético<sup>3</sup> (ARCHIBALD, 1975; HILDRET; AHMADJIAN, 1981; TSCHERMAK-WOES, 1989;

---

<sup>2</sup> Pirenóide - massa fundamentalmente protéica, que serve de reservatório da Ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase-oxigenase, RUBISCO, responsável pela fixação de dióxido de carbono durante a fotossíntese.

<sup>3</sup> Grupo parafilético - grupo formado pelo agrupamento de apenas alguns táxons descendentes de um mesmo ancestral.

FRIEDL; ZELTNER, 1994; FRIEDL; ROKITTA, 1997; PIERCEY-NORMORE; DEPRIEST, 2001; HELMS, 2003).

Desde o início dos estudos envolvendo a alga do gênero *Trebouxia*, alguns pesquisadores sugeriram tratar-se de um gênero heterogêneo, sendo em seguida reconhecida a existência de dois grupos de espécies. Inicialmente, Waren (1920) estabeleceu dois subgêneros, *Eucystococcus* e *Eleuterococcus* baseando-se nas diferenças na reprodução assexuada. Ahmadjian (1959, 1960) dividiu o gênero *Trebouxia* em dois grupos principais (I e II), de acordo com a posição do cloroplasto antes da formação dos esporos e a forma da célula. O grupo I foi caracterizado por apresentar células ovais, com cloroplasto em uma posição parietal, com lobos alcançando a periferia celular antes da divisão celular (Figura 1B). Enquanto o grupo II foi definido por apresentar células esféricas, com cloroplastos de superfície lisa e centrais, antes da divisão celular (Figura 1A). Essa diferenciação foi confirmada por Jacobs e Ahmadjian (1968) e Peveling (1968), quando tomaram como base a comparação da ultra-estrutura do pirenóide. As diferenças consistem na presença de tilacóides<sup>4</sup> um pouco arqueados (grupo I), ou inchados (grupo II), penetrando na matriz do pirenóide (SKALOUD; PEKSA, 2010).

Após alguns anos, Archibald (1975) distinguiu os gêneros *Pseudotrebouxia* e *Trebouxia*, baseado nas diferenças de caracteres da parede celular durante a reprodução assexuada (GROOVER; BOLD, 1969). No entanto, o estabelecimento do gênero *Pseudotrebouxia*, e por consequência, a divisão do gênero *Trebouxia* foi rejeitada por Gärtner (1985a e 1985b). Segundo o autor, não existiam diferenças ontogênicas na formação dos diferentes tipos de células reprodutivas que justificariam a divisão dos gêneros em diferentes ordens, como havia sido proposto por Archibald (1975). Recentemente, estudos moleculares confirmaram a rejeição do gênero *Pseudotrebouxia* proposta por Gärtner (KROKEN; TAYLOR, 2000).

Em 1980, Tschermak-Woess descreveu um novo gênero e espécie, *Asterochloris phycobiontica*, baseada em observações do fotobionte do líquen *Anzina carneonivea* (TSCHERMAK-WOESS, 1980; como *Varicellaria carneonivea*). Apesar de algumas características morfológicas serem semelhantes para as espécies de *Trebouxia*, a autora delimitou o gênero como tendo um cloroplasto parietal, radialmente lobado, com um, ou até sete pirenóides. Posteriormente,

---

<sup>4</sup> Tilacóides - sistemas de membranas internas do cloroplasto, onde se localiza a clorofila e onde ocorrem as reações de luz da fotossíntese.



revisando a taxonomia de *Trebouxia*, Tschermak-Woess (1989) dividiu o gênero em dois subgêneros, *Trebouxia* (produz autósporos<sup>5</sup>, aplanósporos<sup>6</sup> e zoósporos<sup>7</sup>; cloroplasto central durante divisão) e *Eleutherococcus* (apenas aplanósporos e zoósporos; cloroplasto parietal durante a divisão). Na opinião da autora, *Eleutherococcus* foi definido pela ausência estrita de autósporos, que ocorrem no subgênero *Trebouxia*. Ao mesmo tempo, ela transferiu *A. phycobiontica* para o gênero *Trebouxia*, subgênero *Eleutherococcus* sob a designação de *Trebouxia phycobiontica*. Além disso, Tschermak-Woess não excluiu a possibilidade de uma reclassificação futura do subgênero *Trebouxia* (*Trebouxia* e *Eleutherococcus*) em dois gêneros distintos e, nesse caso, sugeriu usar o nome genérico *Asterochloris* para as espécies não produtoras de autósporos (TSCHERMAK-WOESS, 1989).

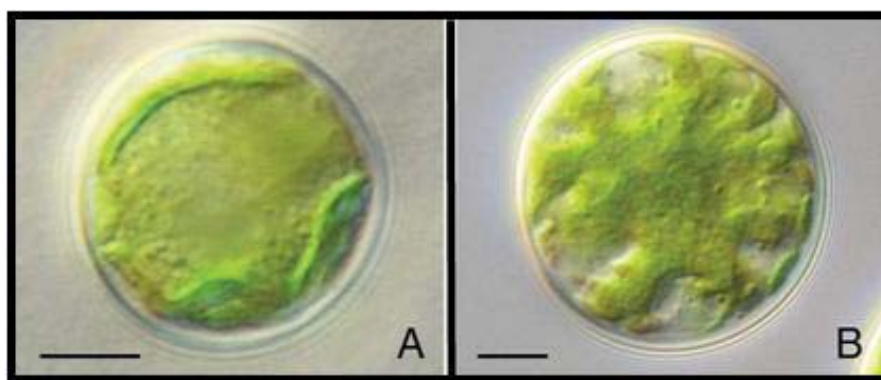


FIGURA 1 - MICROGRAFIA DE DIFERENTES LINHAGENS DE *Asterochloris* (antes *Trebouxia* sp.): CLOROPLASTO PARIETAL NÃO LOBADO (CAUP H1011) – grupo II (A); CLOROPLASTO LOBADO (CAUP H1010) – grupo I (B)

FONTE: SKALLOUD; PEKSA, 2010

Barra de escala: 5  $\mu$ m.

A partir de 1994, com a aplicação de análises moleculares, a taxonomia de *Trebouxia* mudou novamente. Friedl e Zeltner (1994) através de comparações de

<sup>5</sup> Autósporo - aplanósporo que toma a formada respectiva célula mãe.

<sup>6</sup> Aplanósporo - espora assexual não móvel.

<sup>7</sup> Zoósporo - espora assexual móvel, com um ou mais flagelos.

seqüências rDNA 18S (subunidade menor do RNA ribossomal) confirmaram dados ultra-estruturais (MELKONIAN; PEVELING, 1988) que agrupavam três espécies da classe Chlorophyceae: *Trebouxia* sp. (ordem Chlorococcales), *Microthamnion kuetzingianum* (ordem Chaetophorales) e *Pleusrastum terrestre* (ordem Chlorosarcinales) em um grupo distinto dentro das algas verdes, denominado ordem Microthamniales (Classe Pleurostrophyceae). Estes mesmos autores também observaram uma linhagem independente dentro da ordem Microthamniales, denominada “grupo de algas liquênicas” composta por espécies de *Trebouxia*, *Myrmecia* e *Friedmannia*.

Friedl e Rokitta (1997), utilizando análises de rDNA 26S (subunidade maior do RNA ribossomal), confirmaram os dados anteriores referentes a rDNA 18S (FRIEDL; ZELTNER, 1994). Além disto, este trabalho indicou que *Trebouxia magna* e *Trebouxia erici* estão mais próximas de *Myrmecia biatorellae* do que de outras espécies de *Trebouxia*. Estes dados confirmaram a origem parafilética do gênero *Trebouxia*. Os autores sugerem ainda a morfologia do cloroplasto e a ultra-estrutura de pirenóides como caracteres importantes para a distinção intra-específica em *Trebouxia*, e afirmam que caracteres como: a ausência de uma matriz distinta nos pirenóides e o cloroplasto assumindo uma posição parietal em alguns estágios do ciclo de vida podem ser utilizados em uma possível e futura segregação de *Trebouxia* em dois gêneros. Em contrapartida, afirmam que a formação de autósporos, não se apresenta como um marcador confiável na classificação de *Trebouxia*, colocando em dúvida as teorias que utilizavam este critério para separação deste em dois gêneros (ARCHIBALD, 1975; HILDRETH; AHMADJIAN, 1981) ou em dois subgêneros (TSCHERMACK-WOESS, 1989).

Finalmente em 1998, Rambold, Friedl e Beck propõem a divisão de *Trebouxia* nos gêneros *Trebouxia* e *Asterochloris*, fundamentados em uma compilação de dados, incluindo a morfologia, análises moleculares e a especificidade de relacionamento entre os fotobiontes e seus respectivos micobiontes. Os autores verificaram que, enquanto *Trebouxia* é encontrada associada com espécies de líquens incluídas na subordem Lecanoriinea, a subordem Cladoniineae apresenta-se liquenizada basicamente por *Asterochloris* (AHMADJIAN; JACOBS, 1981; RAMBOLD; FRIEDL; BECK, 1998). Outros estudos mais recentes têm demonstrado que o taxa *Asterochloris* ocorre como fotobionte em uma variedade de espécies de fungos formadores de líquens (BEIGGI; PIRCEY-

NORMORE, 2007; CORDEIRO *et al*, 2005; NELSEN; GARGAS, 2008; PIERCEY-NORMORE, 2004; PIERCEY-NORMORE; DePRIEST 2001; YAHR *et al.*, 2004 e 2006). Apesar disto, a classificação taxonômica de *Asterochloris*, bem como a atribuição das espécies deste gênero ainda não foram realizadas.

### 2.2.2 *Nostoc* spp.

*Nostoc* é um gênero de cianobactéria, ou seja, um organismo fotoautotrófico, gram-negativo, que contém clorofila *a* e fotossistemas (PSII e PSI), caracterizado por um ciclo de vida complexo, ecologicamente bem sucedido, que pode ser encontrado em um grande número de ambientes, dos trópicos ao ártico (CASTENHOLZ, 2001). É comumente encontrado em solos úmidos, na água doce, em ambientes sazonalmente inundados, mas praticamente ausente em ambientes marinhos (DODDS; GUDDER; MOLLENHAUER; 1995).

A morfologia das colônias das cianobactérias é freqüentemente alterada quando em cultura (RIPPKA *et al.*, 1979) e reflete mais as condições de crescimento do que o genótipo. Além disso, diversidades fisiológicas e metabólicas também podem ser observadas.

Em adição ao crescimento autotrófico, muitas espécies crescem bem quimio-organotroficamente no escuro com uma gama de fontes de carbono, tais como sacarose, frutose e glucose, outras podem fermentar açúcares em condições anóxicas (STAHL; MOEZELAR, 1997).

Espécies de *Nostoc* são cultivadas geralmente em meios contendo macro- e micro-nutrientes. O crescimento é lento, e freqüentemente há competição por pequenas quantidades de nutrientes disponíveis.

*Nostoc* spp. formam associações simbióticas com um grande número de organismos de diferentes grupos taxonômicos. Associações simbióticas endofíticas são observadas com representantes de briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (ADAMS, 2000; MEEKS, 1998; RAI; SODERBACK; BERGMAN, 2000).

Dentre as 13.500 a 17.000 espécies de fungos liquenizados, estima-se que aproximadamente 10-15% contenham cianobactérias como simbionte (HILL, 1994;

NASH III, 1996; RICHARDSON, 1999). O gênero mais freqüente nas associações líquênicas é *Nostoc*, mas gêneros como *Scytonema* e *Calothrix* (FRIEDL, 1996; TCHERMAK-WOESS, 1988), *Fischerella* (incluindo: *Hyphomorpha*, *Stigonema* e *Mastigocladus*) também podem ser observados. Muitas formas unicelulares também são reportadas, incluindo *Gloeocapsa* (= *Chroococcus*), *Gloeotheca* e *Synechocystis* (= *Aphanocapsa*) (RAI; BERGMAN, 2002).

O simbionte *Nostoc* em líquens fornece ao parceiro simbiótico tanto produtos sintetizados durante a fotossíntese, quanto nitrogênio fixado, gerando uma grande diversidade e complexidade na organização estrutural aos diferentes tipos de simbiose líquênica (líquens bipartidos<sup>8</sup> e tripartidos<sup>9</sup>).

### 2.3 POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS LIQUENIZADOS

Os polissacarídeos mais comuns dos fungos liquenizados são os heteropolissacarídeos contendo manose e as  $\alpha$ - ou  $\beta$ -glucanas. Devido às suas concentrações relativamente altas, presume-se que estes polissacarídeos sejam originados a partir do micobionte (GORIN *et al.*, 1993). Outros polissacarídeos presentes em líquens são as xilanas, entretanto, por serem encontradas em baixas quantidades, sugere-se que sejam originárias do fotobionte (CARBONERO *et al.*, 2002; CORDEIRO, *et al.*, 2003; CORRADI da SILVA, 1992; GORIN *et al.*, 1993;).

As glucanas são divididas conforme o tipo de ligação e sua relação molar. Os principais homopolissacarídeos contendo glucose observados em líquens são as liquenanas [ $\beta$ -D-glucana linear, com ligações (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) encontrada nas proporções de 1:2, 1:3, 3:1 e 3:7] (GORIN; IACOMINI, 1984; GORSHKOVA *et al.*, 1997; INGOLFSDOTTIR *et al.*, 1994; MEYER; GUTLER, 1947a, 1947b; OLAFSDOTTIR *et al.*, 1999; TAKEDA *et al.*, 1972), isoliquenanas [ $\alpha$ -D-glucana linear, com ligações (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) nas proporções de 2:1, 3:1, 3:2; 4:1 e 6:1] (CARBONERO *et al.*, 2001; CORDEIRO *et al.*, 2004; CORRADI da SILVA, 1993; GORIN; IACOMINI, 1984; GORSHKOVA *et al.*, 1997; INGOLFSDOTTIR *et al.*, 1994;

---

<sup>8</sup> Líquens bipartidos - líquens formados pela associação de dois componentes, ou seja, de um micobionte e um ficobionte, seja ele fotobionte ou cianobionte.

<sup>9</sup> Líquens tripartidos - líquens formados pela associação de três componentes, ou seja, de um micobionte, um fotobionte e um cianobionte.

MEYER; GUTLER, 1947a, 1947b; OLAFSDOTTIR *et al.*, 1999; TAKEDA *et al.*, 1972; TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992; WORANOVICZ-BARREIRA *et al.*, 1999a; 1999b; YOKOTA; SHIBATA; SAITO, 1979), pustulanas [ $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 6)] (GORIN; IACOMINI, 1985; IACOMINI; SCHNEIDER; GORIN, 1985; IACOMINI *et al.*, 1988; NISHIKAWA *et al.*, 1970; 1974; PEREYRA *et al.*, 2003; SHIBATA *et al.*, 1968), nigeranas [ $\alpha$ -D-glucana linear, com ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4), encontrada nas proporções de 1:1 e 1,2:1] (CARBONERO *et al.*, 2001; IACOMINI; SCHNEIDER; GORIN, 1985; NISHIKAWA *et al.*, 1974; SHIBATA, 1973; WORANOVICZ-BARREIRA *et al.*, 1999a, 1999b) e laminaranas [ $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)] (CARBONERO *et al.*, 2001; CORDEIRO *et al.*, 2003; SHIBATA, 1973; WORANOVICZ-BARREIRA *et al.*, 1999b, 1999c).

Os primeiros estudos datam de 1815, relatando a presença de polissacarídeos em fungos liquenizados (BERZELIUS citado por GORIN *et al.*, 1993) em *Cetraria islandica*, de onde foram isolados os polissacarídeos liquenana e isoliquenana. Muitos outros trabalhos sucederam com o objetivo de obtenção de polissacarídeos de diferentes espécies de líquens.

Além da intensiva pesquisa com as glucanas, houve também um grande interesse em analisar os heteropolissacarídeos presentes nos fungos liquenizados. Os primeiros estudos foram realizados em 1906 (Ulander e Tollens, citado por Gorin *et al.* 1993) no líquen *Cetraria islandica*, onde foi detectado manose, galactose e glucose, indicando a presença de um heteropolissacarídeo principalmente constituído por manose e galactose.

Apenas em 1984, com os trabalhos de Gorin, Iacomini e colaboradores, integrantes do grupo de Química de Carboidratos da Universidade Federal do Paraná, que as estruturas químicas de galactomananas isoladas de líquens foram devidamente elucidadas, através de procedimentos de purificação mais adequados e principalmente de técnicas analíticas mais modernas, por exemplo, espectroscopia de ressonância nuclear magnética de carbono treze (RMN- $^{13}\text{C}$ ) e a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (GORIN; IACOMINI, 1984 e 1985; IACOMINI; SCHNEIDER; GORIN, 1985). O heteropolímero de *Cetraria islandica* foi o primeiro heteropolissacarídeo estudado por estes autores, e foi caracterizado como uma galactomanana constituída por uma cadeia principal composta de unidades de  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas, com cadeias laterais de  $\alpha$ -D-

Galp e de  $\beta$ -D-Galp (1→2) e (1→4) ligadas, respectivamente (GORIN; IACOMINI, 1984).

Os dados encontrados na literatura referentes aos heteropolissacarídeos isolados de fungos liquenizados relatam diferentes tipos de estruturas, sendo as galactomananas e as galactoglucomananas as mais comumente encontradas. Tais estruturas apresentam uma cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -D-Manp (1→6) as quais se encontram parcialmente substituídas em O-2, O-4 e/ou O-2,4 por unidades de  $\alpha$ - ou  $\beta$ -D-Galp ou  $\alpha$ -D-Manp ou D-Glcp e, mais raramente, por  $\beta$ -D-Galf, conforme representado na figura 2.

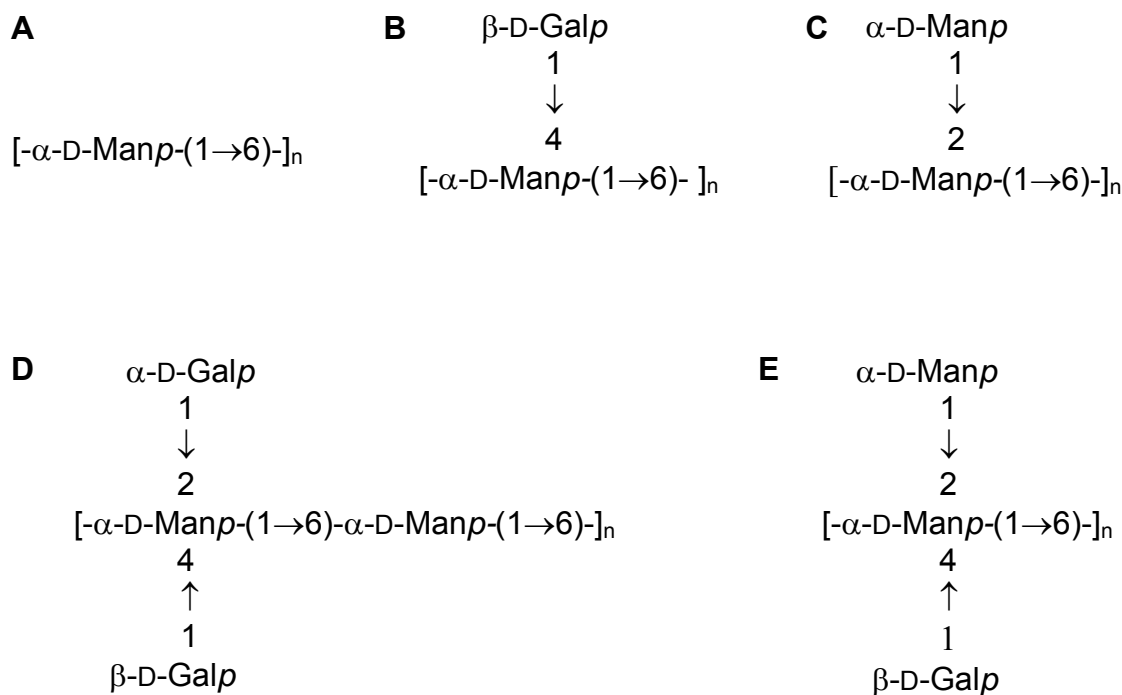


FIGURA 2 - PRINCIPAIS FRAGMENTOS REPRESENTATIVOS DAS ESTRUTURAS OBSERVADAS EM GALACTOMANANAS OBTIDAS DE LIQUENS

As unidades de  $[-\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{6)-}]_n$  representam unidades da cadeia principal.

O fungo liquenizado *Leptogium* sp. (= *L. denticulatum*) produz galactomananas com cadeia principal composta por unidades  $\alpha$ -D-Manp contendo

ligações glicosídicas do tipo (1→6), as quais se encontram quase totalmente substituídas, preferencialmente, em O-2 por terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Manp e/ou  $\beta$ -D-Galp (CARBONERO, *et al.*, 2003). Uma estrutura semelhante, altamente substituída e com elevado teor de manose foi anteriormente descrita para o cianolíquen *Collema leptosporum* (PRADO *et al.*, 1999), que pertence a mesma família de *Leptogium denticulatum*, sugerindo que este tipo de estrutura pode ser típica de fungos liquenizados da família Collemataceae. Galactomananas com cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -D-Manp-(1→4) foram descritas para o líquen *Roccella decipiens* (CARBONERO *et al.*, 2005).

Heteropolissacarídeos apresentando cadeias principais formadas por unidades de  $\alpha$ -D-Manp-(1→2)-ligadas, substituídas por unidades de  $\beta$ -D-Galf em O-6 foram descritos para *Cladonia amaurocraea* (IACOMINI; SCHNEIDER; GORIN, 1985). Uma galactomanana com cadeia principal de  $\alpha$ -D-Manp-(1→3), 4-O (10%) e 2,4-di-O-substituídas (10%) por unidades de  $\beta$ -D-Xylp foi descrita para o líquen *Dictyonema glabratum* (= *Cora pavonia*, IACOMINI *et al.*, 1987).

## 2.4 POLISSACARÍDEOS DE SIMBIONTES LIQUÊNICOS

Os polissacarídeos presentes na parede celular dos biontes são tidos como a chave para o processo de reconhecimento da simbiose líquênica, onde a especificidade e o seu reconhecimento por proteínas específicas (como as lectinas) poderiam ser o primeiro passo para o estabelecimento da simbiose (AHMADJIAN; JACOBS, 1981; KÖNING; PEVELING, 1984; CORDEIRO *et al.*, 2005).

Embora alguns autores atentem para a importância dos polissacarídeos na relação simbiótica, muito pouco se conhece sobre a estrutura e a função destas macromoléculas.

O primeiro estudo da estrutura química dos polissacarídeos de simbiontes líquênicos foi desenvolvido por Takahashi, Takeda e Shibata em 1979. Estes autores compararam os polissacarídeos solúveis em água extraídos dos mico- e fotobiontes de líquens cultivados em laboratório com o objetivo de verificar se os polissacarídeos presentes no líquen eram produzidos por algum componente específico da simbiose,

ou por ambos. Os resultados de composição monossacarídica, rotação ótica específica, espectroscopia de infravermelho e solubilidade, mostraram que os polissacarídeos solúveis isolados dos líquens eram muito similares ou idênticos àqueles obtidos para o micobionte. A principal justificativa encontrada para este fato é a predominância de tecido originado do micobionte no talo líquênico, que pode chegar a mais de 90% da massa total do líquen (TAKAHASHI; TAKEDA; SHIBATA, 1979).

A maioria dos trabalhos envolvendo carboidratos de fotobiontes está relacionada à fixação de CO<sub>2</sub> do meio (GOLDSMITH; THOMAS; GRIES, 1997; PALMQVIST, 2000) e ao movimento de carboidratos de baixa massa molar e polióis da alga para o fungo.

Estudos utilizando bicarbonato de sódio, marcado com <sup>14</sup>C, mostraram que vários fotobiontes transferem diferentes tipos de moléculas para o micobionte. Quando a cianobactéria *Nostoc* está presente na associação, a molécula de transferência é a glucose, que é transformada em manitol pelo micobionte e é utilizada no seu metabolismo. Em líquens que apresentam como fotobionte as microalgas verdes dos gêneros *Trebouxia*, *Coccomyxa* e *Myrmecia*, o ribitol produzido pelo fotobionte é transferido ao micobionte e então convertido a arabinitol e manitol. Outros polióis também são utilizados como moléculas de transferência, como o sorbitol em associações com o fotobionte *Hyalococcus* e eritritol no caso de *Trentepohlia* (RICHARDSON; SMITH; LEWIS, 1967; NASH III, 1996).

Cordeiro e colaboradores, integrantes do grupo de Química de Carboidratos da Universidade Federal do Paraná, isolaram o fotobionte *Trebouxia* sp. do fungo liquenizado *Ramalina celastri*. A partir do cultivo deste fotobionte foram isoladas uma β-D-xilana linear (1→4)-ligada, amilose e um heteropolímero insolúvel contendo principalmente manose (CORDEIRO *et al.*, 2003). A partir do fotobionte *Trebouxia* sp. isolado do líquen *Ramalina gracilis* foram caracterizadas estruturas de β-D-galactofurananas com cadeias principais formadas por unidades de β-D-Galf (1→5)-ligadas, sendo parcialmente substituída em O-6 por terminais não redutores de açúcares por adeias laterais complexas (CORDEIRO *et al.*, 2008).

Além de estudos relacionados ao fotobionte *Trebouxia* sp. isolado a partir de diferentes fungos liquenizados, Cordeiro e colaboradores também realizaram estudos em relação ao fotobionte *Asterochloris* sp. isolado do líquen *Cladina*



confusa, a partir do qual foram isoladas e caracterizadas uma  $\beta$ -D-xilana linear (1 $\rightarrow$ 4)-ligada, amilose e uma xiloramnogalactofuranana, cuja cadeia principal é formada por unidades de  $\beta$ -D-Galf (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas, sendo parcialmente substituída em O-6 por cadeias laterais de Rhap as quais tem unidades de Xylp como terminais não redutores (CORDEIRO *et al.*, 2007)

Em relação aos polissacarídeos de cianobiontes, os relatos na literatura são praticamente inexistentes, principalmente devido à dificuldade de isolamento, identificação e cultivos destes organismos em culturas axênicas. Sasaki e colaboradores (2005), também colaboradores integrantes do grupo de Química de Carboidratos da Universidade Federal do Paraná isolaram e cultivaram o cianobionte *Scytonema* sp. a partir do fungo liquenizado *Dictyonema glabratum*. As frações polissacarídicas obtidas mostraram-se compostas principalmente por galactose, glucose e manose, com pequenas quantidades de unidades de ramnose e xilose naturalmente metiladas: 3-O-metil-ramnose e 2-O-metil-xilose, respectivamente.

## 2.5 POLISSACARÍDEOS EM CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias incluem uma grande variedade de espécies amplamente distribuídas, com morfologia, fisiologia e propriedades bioquímicas diversas. Muitas são conhecidas por serem capazes de sintetizar e liberar polissacarídeos no meio de cultivo, durante o crescimento celular. Estes exopolissacarídeos (EPSs) são facilmente recuperados a partir do meio de cultivo e tem atraído muito interesse, devido principalmente a uma possível aplicação industrial (DePHILIPPIS; VICENZINI, 1998). Análises reológicas de EPSs de cianobactérias demonstraram que eles possuem um comportamento pseudoplástico (DePHILIPPIS; VICENZINI, 1998).

Em geral, os EPSs de cianobactérias são caracterizados por uma grande variedade em número e em tipo de monossacarídeos (de 2 a 10 monossacarídeos, incluindo arranjos de açúcares neutros e ácidos). Muitos destes polímeros mostram uma natureza aniônica devido à presença de ácidos urônicos e/ou outros grupos carregados, tais como, piruvato e sulfato, além de apresentarem um ou dois tipos de

pentoses, açúcares geralmente ausentes em outros polissacarídeos de origem procariótica (SUTHERLAND, 1994).

As cianobactérias caracterizam-se como uma fonte abundante de polissacarídeos, alguns dos quais, devido às suas propriedades únicas são passíveis de aplicações biotecnológicas e industriais, ainda não preenchidas pelos polímeros até então caracterizados (DePHILIPPIS; VICENZINI, 1998). No entanto, muitos estudos ainda se fazem necessários para o entendimento da biologia das espécies produtoras de EPS e para a obtenção de informações no âmbito tecnológico e de outras propriedades úteis destes polímeros (DePHILIPPIS; VICENZINI, 1998).

Em conjunto com sua diversidade ecológica e bioquímica, as cianobactérias, são tidas como candidatas para várias aplicações biotecnológicas devido ao seu potencial na conversão de energia luminosa em formas renováveis dos constituintes químicos para a indústria alimentícia e farmacêutica, entre outras (DePHILIPPIS; VICENZINI, 1998).

Aproximadamente 70 espécies de cianobactérias já foram estudadas com relação à produção de EPSs, muitos dos estudos foram direcionados à determinação da composição de açúcares dos polímeros (DePHILIPPIS; VICENZINI, 1998). Poucos estudos foram desenvolvidos para verificar se os EPSs liberados apresentam uma composição química estável, ou seja, não sofrem alterações quando em cultivo, e se não são afetados pelas condições de crescimento, o que caracteriza uma característica fundamental para que os polímeros destas espécies possam ser direcionados para aplicações industriais. Além disso, muitos dos polissacarídeos de cianobactérias já estudados ainda não foram explorados com relação às suas propriedades físicas, estruturais ou reológicas. Sendo assim, a avaliação de seu potencial uso industrial, ou para aplicações específicas, ainda necessita de estudos adicionais, a serem iniciados pela caracterização química dos mesmos.

## 2.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE FUNGOS LIQUENIZADOS OU DE SEUS SIMBIONTES

Algumas espécies de líquens têm sido utilizadas na medicina tradicional, como *Cetraria islandica* e *Lobaria pulmonaria*, para tratar vários tipos de doenças (VARTIA, 1973).

Vários trabalhos têm demonstrado que muitos polissacarídeos obtidos de fungos liquenizados, assim como das mais diversas fontes estudadas, atuam como modificadores de resposta biológica, apresentando efeitos antitumorais, antivirais, estimuladores do sistema imune inespecífico e da memória, além de outros tipos de atividade biológica, ao mesmo tempo, que apresentam baixos níveis de toxicidade (OLAFSDOTTIR; INGOLFSDOTTIR, 2001). Em alguns casos a atividade pode ser promovida pela modificação química da estrutura dos polissacarídeos.

Os polissacarídeos liquênicos com melhor atividade antitumoral foram as  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas. Resultados similares têm sido observados com estruturas equivalentes obtidas de outras fontes, como por exemplo, de basidiomicetos. Efeitos imunomoduladores podem ser observados para as  $\alpha$ -glucanas, galactomananas e ramnogalactanas de fungos liquenizados (OLAFSDOTTIR; INGOLFSDOTTIR, 2001).

Diversos trabalhos relacionam principalmente a estrutura do polissacarídeo com a sua atividade antitumoral, antiviral, entre outras. Ainda, alguns estudos têm mostrado que os polissacarídeos, dentre estes aqueles extraídos de basidiomicetos podem apresentar outros efeitos, tais como atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Estudos com polissacarídeos de basidiomicetos mostraram resultados promissores quanto aos efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios. Dentre os polissacarídeos que apresentam tais atividades estão a  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada e a manogalactana 3-O-metilada de *Pleurotus pulmonarius* (SMIDERLE *et al.*, 2008a, 2008b), a heterogalactana de *Lentinus edodes* (CARBONERO *et al.*, 2008), as fucogalactanas de *Agaricus* spp. (KOMURA *et al.*, 2010) e as glucanas de *Carpinia montagnei* (QUEIROZ *et al.*, 2009) foram testados. Pereira e colaboradores<sup>10</sup> observaram que a glucomanana obtida do fungo

---

<sup>10</sup> Pereira *et al.*, Chemical structure and biological properties of a glucomanann from the lichenized fungus *Heterodermia obscurata*, submetido para publicação em março de 2010.

liquenizado *Heterodermia obscurata* apresentou propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias promissoras, iniciando os estudos relacionados a estas atividades biológicas para polissacarídeos de fungos liquenizados. Todos estes polissacarídeos estudados quanto suas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória tem em comum a baixa massa molar dos polissacarídeos avaliados, a qual é de aproximadamente 16.000 a 17.000 g.mol<sup>-1</sup> (KOMURA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, submetido para publicação<sup>10</sup>). No entanto, nem todos os polímeros estudados tiveram suas massas molares definidas, como por exemplo, para *Caripia montagnei*, onde apenas extratos de glucanas foram estudados (QUEIROZ *et al.*, 2009)

No entanto, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos biológicos promovidos pelos polissacarídeos isolados de simbiontes liquênicos. Um heteropolissacarídeo obtido a partir do fotobionte *Trebouxia* sp., isolado do fungo liquenizado *Ramalina gracillis* ativou macrófagos peritoneais *in vitro* em diferentes concentrações testadas (1-150 µg/ml) (CORDEIRO *et al.*, 2008).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS DE ESTUDO

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram cultivados biontes liquênicos previamente isolados no Laboratório de Química de Carboidratos - UFPR, como a alga verde *Trebouxia* sp. (isolada a partir do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*) ou adquiridos de coleções de algas em cultivo, da UTEX-*Culture Collection of Algae* da Universidade do Texas em Austin, como:

- *Nostoc muscorum* Ag. (UTEX - 2493): isolada do fungo liquenizado *Peltigera canina* (KORIEM; AHMADJIAN, 1986);
- *Nostoc muscorum* Ag. (UTEX - 2209): isolada do solo, depositado em 23/08/1979 por N. Lazaroff (LAZAROFF, 1973);

Uma terceira espécie de *Nostoc* sp. de vida livre foi selecionada no decorrer do trabalho, devido à sua abundância e fácil coleta no Centro Politécnico, local de desenvolvimento desta pesquisa.

#### 3.2 CULTIVO DOS BIONTES LIQUÊNICOS

Para o cultivo dos biontes liquênicos foram utilizados meios de cultura com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, de acordo com os relatos observados na literatura e sugestão da UTEX, no caso das cianobactérias adquiridas da coleção em questão.

Os biontes liquênicos foram mantidos em câmara de cultivo, sob condições controladas pré-estabelecidas no Laboratório de Química de Carboidratos, temperatura de  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h e com luz incidente de  $45\text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Para a multiplicação das culturas e obtenção de biomassa, as

colônias foram sub-cultivadas.

### 3.2.1 Meios de Cultivo

Para o cultivo das cianobactérias da espécie *Nostoc muscorum*, UTEX - 2493 e 2209 cianobionte e de vida livre, respectivamente. O meio de cultivo BG-11 (Tabela 1) foi selecionado, uma vez que, baseado em dados de literatura ele é o mais utilizado, pois apresenta melhores resultados para cianobactérias.

TABELA 1 - MEIO PARA CIANOACTÉRIA BG-11

<b>COMPONENTES</b>	<b>Solução estoque [g.100 ml<sup>-1</sup>]</b>	<b>Quantidade para completar 1000 ml de meio [ml]</b>
NaNO <sub>3</sub>	15,0	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O	0,4	10
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,75	10
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,36	10
Ácido cítrico	0,06	10
Citrato de ferro e amônio	0,06	10
EDTA	0,01	10
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,2	10
Água destilada	—	920

FONTE: RIPPKA; HERDMAN 1993

Ainda, para 1000 ml do meio BG-11 descrito acima na tabela 1 adicionar os sais como apresentado na tabela 2.

TABELA 2 - SAIS ADICIONADOS AO MEIO BG-11

Sal	Quantidade (mg)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,0 mg
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	169,0 mg
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	287,0 mg
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	2,5 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 4H <sub>2</sub> O	12,5 mg

FONTE: RIPPKA; HERDMAN 1993

Além do meio BG-11, o meio Bristol (Tabela 3) e Extrato de solo (ES), também foram utilizados para os cultivos de *Nostoc muscorum*, UTEX - 2493 e 2209, cianobionte e de vida livre, respectivamente, conforme sugestão do banco de algas UTEX.

TABELA 3 - MEIO DE BRISTOL

COMPONENTES	Solução estoque [g.400 ml <sup>-1</sup> ]	Quantidade para completar 1000 ml de meio [ml]
NaNO <sub>3</sub>	10,0	10
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,0	10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,0	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0	10
NaCl	1,0	10
Água destilada	—	940

FONTE: BOLD, 1949.

- Meio Extrato de solo (ES- modificado a partir do meio Bristol) ([www.utex.org](http://www.utex.org))

Para 960 ml do meio de Bristol (Tabela 3), adicionar 40 ml do sobrenadante do extrato de solo.

Para o preparo do extrato de solo, combinar: 1 g de solo seco, 1 mg de CaCO<sub>3</sub> em 200 ml de água destilada em um recipiente, que é coberto com papel alumínio e autoclavado por 2 h (este procedimento foi repetido por 2 dias consecutivos), sendo em seguida mantido sob refrigeração (10 °C) por 24 h. Decorrido este tempo, este foi deixado em temperatura ambiente por 12 h antes de ser utilizado. O sobrenadante obtido após decantação foi adicionado ao meio.

Para o cultivo da microalga verde *Trebouxia* sp. foi utilizado um meio diferente daqueles usados para o cultivo das cianobactérias, utilizando como base o meio de Bristol. Este meio de cultivo é denominado meio TM, ou meio rico.

- Meio TM – Meio para *Trebouxia* (AHMADJIAN, 1993)

Para o cultivo do fotobionte *Trebouxia* sp., o meio TM foi utilizado, e para sua confecção utiliza-se 1000 ml do meio de Bristol (Tabela 3), adicionado de:

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

Para preparar o meio TM no estado sólido, adiciona-se, 20 g de agar para cada 1000 ml de meio.

### 3.3 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

As culturas do fotobionte, *Trebouxia* sp. foram obtidas a partir de fragmentos do talo líquênico de *Teloschistes flavicans*, utilizando cultura de tecidos, como descrito pelo método de Yamamoto (YAMAMOTO; MIZUGUCHI; YAMADA, 1985). Para obtenção de biomassa, o fotobionte foi cultivado em meio TM. As culturas foram crescidas em câmara de cultivo, a temperatura de 21 °C ± 2 °C, e fotoperíodo de 12 h. Após 30 dias, as células algais foram removidas por centrifugação, lavadas com água destilada, congeladas e liofilizadas, para obtenção da biomassa (53 g).

As cianobactérias da espécie *Nostoc muscorum* foram separados do meio de cultivo por filtração em papel filtro, com auxílio de bomba de vácuo. Uma vez separados, os polissacarídeos foram obtidos a partir do meio de cultivo, na forma de



exopolissacarídeos (EPS), e a partir da biomassa de células.

### 3.3.1 Obtenção dos Exopolissacarídeos

Para a obtenção dos exopolissacarídeos (EPS) de *Nostoc muscorum*, o meio de cultivo foi concentrado, dialisado contra água corrente em membrana Spectrapor® com poro de 8 kDa de limite de exclusão. Após diálise em água corrente (~ 24 h), o material retido foi liofilizado, originando assim, as frações EPS.

### 3.3.2 Obtenção dos Polissacarídeos da Biomassa de Algas

Após a separação das células do meio de cultivo, estas foram liofilizadas para obtenção de seu rendimento na forma de peso seco.

De maneira geral, a biomassa seca dos diferentes biontes cultivados foi primeiramente tratada com solventes orgânicos para a remoção dos componentes lipídicos. Posteriormente, o material deslipidificado foi submetido a extrações aquosas e alcalinas com a finalidade de obter os carboidratos de alta massa molar.

#### 3.3.2.1 Extração com solventes orgânicos

A biomassa do fotobionte *Trebouxia* sp. (53 g) isolado do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*, foi primeiramente submetida à extração com solventes orgânicos (CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 2:1, v/v, 60 °C por 3 h, 3x, 100 ml cada, e CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O 1:1, v/v, 80 °C por 2 h, 3x, 100 ml cada), dando origem a um material solúvel nos meios extratores (29%). O resíduo deslipidificado (resíduo II) foi submetido a subseqüentes extrações aquosas e alcalinas (KOH 2 e 10%), como apresentado na figura 3.

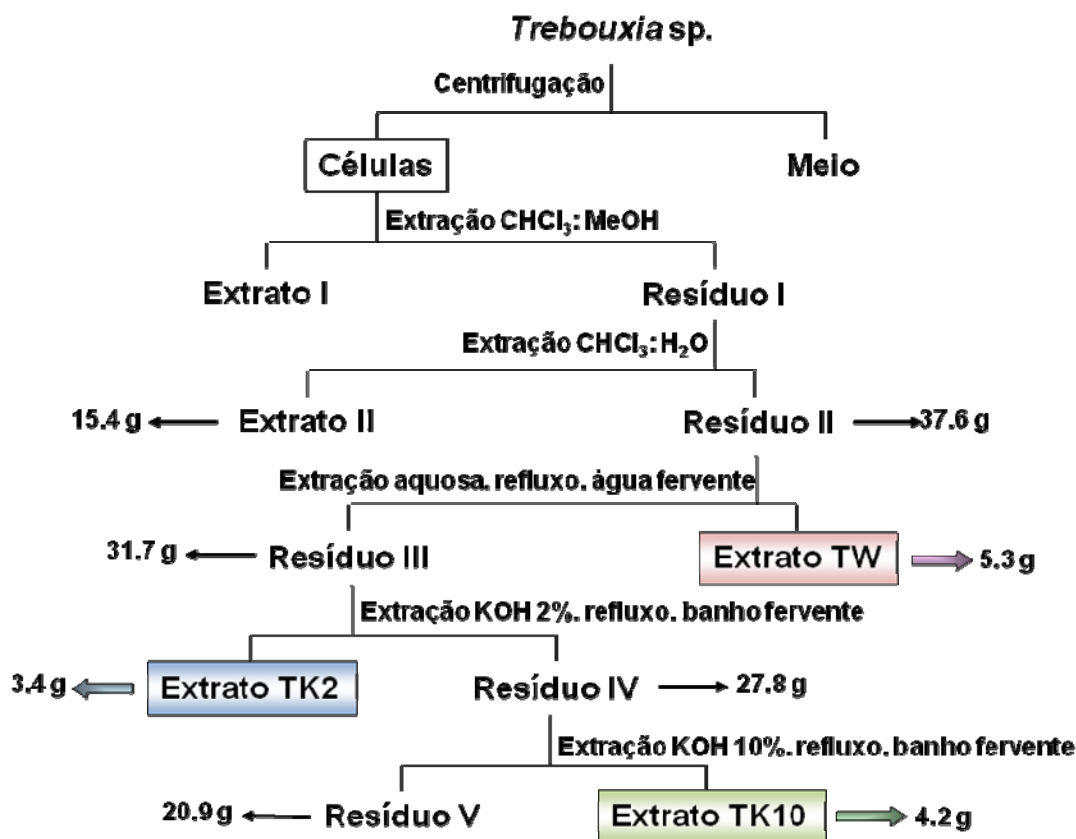


FIGURA 3 - ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

Após cada extração, os materiais foram filtrados em algodão e os extratos obtidos foram evaporados até secura em temperatura ambiente para cálculo do rendimento. O material residual foi então submetido ao próximo processo extrativo.

Para as cianobactérias da espécie *Nostoc muscorum*, a biomassa (3 g, cianobionte e 5 g, vida livre) foi submetida à deslipidificação utilizando éter de petróleo como solvente orgânico, em conjunto extrator de soxhlet, sob refluxo a 60 °C, durante 6 horas (Figura 4). Este processo foi repetido por três vezes. O extrato etéreo obtido, constituído por lipídeos, carotenóides e clorofila, além de outros compostos que possam ter sido extraídos nestas condições de análise, não foi analisado, sendo reservado para pesquisas futuras.



### 3.3.2.3 Extrações alcalinas

As extrações alcalinas foram realizadas com soluções aquosas contendo diferentes concentrações de hidróxido de potássio (KOH 1%, 2% e 10% p/v), na presença de boridreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), sob refluxo, em banho com água destilada fervente, por 3 h. Os materiais foram filtrados ainda quentes, o resíduo obtido foi submetido a mais dois ciclos consecutivos de extração. Em seguida, os extratos foram neutralizados com HOAc, dialisados contra água corrente, rota-evaporados, congelados e liofilizados.

## 3.4 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos obtidos, a partir das extrações aquosas e alcalinas, foram submetidos a processos sequenciais de purificação, de acordo com as metodologias descritas a seguir.

### 3.4.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

As frações polissacarídicas obtidas foram primeiramente submetidas ao processo de purificação, descrito por Gorin e Iacomini (1984) de congelamento e degelo. Neste processo as frações foram congeladas e em seguida, submetidas ao degelo à temperatura ambiente. O precipitado foi separado dos demais componentes solúveis por centrifugação (9000 rpm, 15 min. a 4 °C).

Este processo foi repetido por diversas vezes, em todas as frações, até que os sobrenadantes não formassem mais precipitados. Os precipitados também foram novamente submetidos ao processo de congelamento e degelo, com a finalidade de retirar completamente os compostos solúveis em água fria. As frações solúveis e insolúveis em água fria originadas foram então liofilizadas.

### 3.4.2 Separação dos Polissacarídeos Solúveis em Água por Precipitação com Solução de Fehling

As frações solúveis em água fria, originadas a partir do processo de congelamento e degelo foram submetidas ao tratamento com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução consiste da combinação de duas soluções (A e B). A solução A é composta por tartarato de potássio e KOH (173 g + 125 g / H<sub>2</sub>O q.s.p. 500 ml, respectivamente), enquanto a solução B consiste de CuSO<sub>4</sub> 5.H<sub>2</sub>O (55,7 g / H<sub>2</sub>O q.s.p 500 ml).

As frações polissacarídicas foram solubilizadas primeiramente na solução A, na quantidade suficiente para solubilizar cada fração. Após a solubilização das amostras foi adicionado o mesmo volume da solução B, sendo em seguida mantidas sob agitação magnética (~ 12 h), e posteriormente deixadas a 4 °C, *overnight*.

As frações solúveis e os complexos cúpricos insolúveis foram separados por centrifugação, neutralizados com ácido acético e dialisados contra água corrente (~ 48 h). Após diálise, ambos foram deionizados com resina catiônica fortemente ácida, filtrados em algodão para remoção da resina e novamente dialisados contra água corrente (~ 24 h).

Posteriormente, os materiais foram concentrados sob pressão reduzida, congelados e liofilizados, para cálculo dos rendimentos.

### 3.4.3 Purificação dos Polissacarídeos por Ultrafiltração e por Diálise em Membranas

As frações que se mostraram heterogêneas após precipitação por solução de Fehling foram submetidas à ultrafiltração em membranas de celulose regenerada ou polietersulfona, com diferentes limites de exclusão (10, 30, 100, 300 kDa), selecionadas dependendo do perfil de eluição apresentado pelas frações após análise em HPSEC-MALLS. As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração (modelo 16249, Sartorius), acoplado a um cilindro de ar comprimido (CARBONERO, 2005).

Outro procedimento de purificação adotado, dependendo do perfil de eluição

apresentado pelas frações após análise, em HPSEC-MALLS, foi através de diálise fechada, contra água destilada, utilizando membranas Spectrapor<sup>®</sup> com diferentes limites de exclusão (16, 50, 100, 1000 kDa). Durante a diálise, o material foi mantido sob agitação magnética, e o processo foi interrompido quando a água de diálise apresentava reação negativa para a presença de carboidratos, por meio do método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

### 3.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

#### 3.5.1 Hidrólise Ácida Total

As frações (1-2 mg) obtidas a partir de *Trebouxia* sp. foram hidrolisadas em vials com 1 ml de solução aquosa de TFA 2M, durante 8 horas à 100 °C. As amostras (1-2 mg) de *Nostoc* sp. foram hidrolisadas em vials com 1 ml de solução aquosa de ácido fórmico 45% (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), durante 14 horas à 100 °C. Posteriormente, o TFA e o CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remanescentes nas soluções hidrolisadas foram removidos por evaporação.

#### 3.5.2 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise Ácida Total

Aos produtos de hidrólise foram adicionados 100 µl de H<sub>2</sub>O e 200 µl de NH<sub>4</sub>OH 0,5 M. Os vials contendo as amostras foram mantidos a temperatura ambiente por 10 min., em seguida o material foi reduzido com 1 mg de NaBH<sub>4</sub> (pH 8,0-9,0, 10 min., 100 °C). Para interromper a reação foi adicionado 20 µl de HOAc até pH 5,0-7,0 e as amostras foram então secas com jatos de ar emitidos por bomba de vácuo (SASSAKI *et al.*, 2008). O ácido bórico formado foi eliminado na forma de borato de trimetila, através de co-evaporação pela adição de MeOH (1 ml, 3x consecutivas). Os alditois formados foram acetilados com anidrido acético:piridina (1:1, v/v) em estufa 100 °C, por 30 min (SASSAKI *et al.*, 2008). Os acetatos de alditol

foram extraídos com  $\text{CHCl}_3$  (1 ml), e a piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por complexação com sulfato de cobre 5%. Após a completa remoção da piridina, o  $\text{CHCl}_3$  foi evaporado e os derivados acetilados foram analisados GC-MS (Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa).

### 3.5.3 Metilação das Frações Polissacarídicas

As frações polissacarídicas homogêneas foram metiladas pelo método de Ciucanu e Kerek (1984) e/ou Haworth (1915).

No método de Haworth (1915), 10-20 mg de material foram solubilizados em água destilada, tratados com boroidreto de sódio (pH 9,0) e dialisados contra água corrente. Em seguida, foram liofilizados e solubilizados em 3 ml de uma solução de NaOH 40% (p/v). Ao material, mantido sob agitação magnética constante, foram adicionadas cinco alíquotas de 0,5 ml de  $\text{Me}_2\text{SO}_4$ . O material permaneceu sob agitação, *overnight*. Decorrido o tempo, o processo foi repetido, sendo adicionados 3 ml da solução de NaOH 40% e 2,5 ml de  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  em alíquotas de 0,5 ml, e o material permaneceu sob agitação *overnight*. Na sequência o material foi neutralizado com HOAc, dialisado contra água corrente (~ 24 h) e liofilizado. O material liofilizado foi então submetido a um ciclo de metilação pelo método de Ciucanu.

No método de Ciucanu e Kerek (1984), os polissacarídeos (5-10 mg) foram solubilizados em  $\text{Me}_2\text{SO}$  (1 ml). Após solubilização, foi adicionado NaOH seco e triturado (~ 1 mg). A solução foi mantida sob agitação e, então, foi adicionado  $\text{CH}_3\text{I}$  (1 ml). Após 24 horas, as amostras foram neutralizadas com HOAc, dialisadas exaustivamente contra água corrente e liofilizadas, sendo o processo novamente repetido no material liofilizado. Terminado o segundo ciclo de metilação, foi realizada a extração dos produtos per-O-metilados com  $\text{CHCl}_3$ , que, após evaporação do  $\text{CHCl}_3$ , foram submetidos à hidrólise ácida total (item 3.5.3.1).

### 3.5.3.1 Hidrólise ácida total das frações polissacarídicas após metilação

A hidrólise ácida total em uma alíquota (~2 mg) das frações polissacarídicas obtidas do fotobionte *Trebouxia* sp. após metilação foi realizada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50% (v/v; 0,5 ml) por 1 hora a 0 °C. Seguida de diluição até 5,5% (v/v; adição de 4,0 ml de água destilada), sendo então, mantida a 100 °C por um período de 14 horas. Após hidrólise, as soluções foram neutralizadas com BaCO<sub>3</sub>, reduzidas com NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> e acetiladas (SAEMAN *et al.*, 1954). Os alditóis acetatos parcialmente metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa (SASSAKI *et al.*, 2005).

Alíquotas das frações polissacarídicas obtidas a partir das espécies de *Nostoc* spp. (~ 2 mg) após metilação foram hidrolisadas com solução aquosa de CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (45% v/v) durante 14 horas à 100 °C. Posteriormente, o CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remanescente nas soluções hidrolisadas foi removido por evaporação, e o material foi reduzido e acetilado como descrito no item 3.5.2 (p. 60).

### 3.5.4 Hidrólise Ácida Parcial da Fração 16R-NmC de *Nostoc muscorum* - Cianobionte (NmC)

A fração 16R-NmC (100 mg) foi solubilizada em 5 ml de água destilada e o pH ajustado até 2,0 por adição de TFA 2M. A mistura foi deixada em estufa a 100 °C por 1 h. Passado este tempo, o material foi resfriado a temperatura ambiente e dialisado, em sistema fechado, e membrana Spectrapor<sup>®</sup> com limite de exclusão de 8 kDa (~ 24 h), originando a fração denominada HP1. Após liofilização, o material residual HP1 foi submetido a um novo ciclo de hidrólise ácida parcial por mais 1 h, gerando a fração HP2, que por fim deu origem a fração HP3, após nova hidrólise ácida parcial.



## 3.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

### 3.6.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3.300, acoplado a um espectrômetro de massa da marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) DB-225. As injeções foram feitas a 50 °C (temperatura mantida por 1 min.), seguindo-se um aumento gradual de 40 °C.min<sup>-1</sup>, até 215 °C, sendo mantida isotermicamente até o final da análise. O gás de arraste utilizado foi hélio ultrapuro, com fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>.

### 3.6.2 Determinação da Homogeneidade e Massa Molar ( $M_w$ )

A análise de homogeneidade e a determinação da massa molar das amostras foram realizadas em HPSEC-MALLS, que utiliza um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), modelo WATERS 2410, acoplado a um detector de índice de refração conectado em série com um detector de espalhamento de luz (modelo 64 DAWN DSP, Wyatt Technologies Corporation, EUA). Foram utilizadas quatro colunas WATERS Ultrahydrogel dispostas de forma seqüencial e apresentando diferentes limites de exclusão:  $7 \times 10^6$  (coluna 2000);  $4 \times 10^5$  (coluna 500);  $8 \times 10^4$  (coluna 250) e  $5 \times 10^3$  (coluna 120). O solvente, NaNO<sub>2</sub> 0,1 M com NaN<sub>3</sub> a 0,02 % (m/v), foi eluído na coluna através de uma bomba peristáltica WATERS 515.

As amostras foram solubilizadas em NaNO<sub>2</sub> 0,1 M e filtradas em unidades filtrantes GV Millex com membrana Durapore de 0,22 µm. Para o cálculo da massa molar, cada amostra teve seu valor de  $dn/dc$  (taxa de variação do índice de refração com relação à concentração) determinado, já que este valor é específico para cada uma. Para esta análise cada fração foi solubilizada em cinco diferentes concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg.ml<sup>-1</sup>) e cada uma das soluções foi analisada pelo detector de índice de refração. O cálculo do  $dn/dc$  e da massa molar

foi feito através do software ASTRA 4.70.07 (Wyatt Technology).

### 3.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os espectros mono- (RMN- $^{13}\text{C}$ ,  $^{-1}\text{H}$ , e DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), e bidimensionais (HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy), COSY (Correlation Spectroscopy), e TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance-DRX-400.

As análises foram realizadas a 30 °C, 50 °C ou 70 °C, com as amostras sendo solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}$  (óxido de deutério) ou  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ , dependendo da sua solubilidade. Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em  $\text{D}_2\text{O}$  foram expressos em  $\delta$  (ppm) relativos aos sinais de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da acetona em  $\delta$  30.20 e 2.22, respectivamente, e aos sinais do  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  em  $\delta$  39.70 ( $^{13}\text{C}$ ) e 2.40 ( $^1\text{H}$ ), para as amostras solúveis no mesmo.

### 3.8 MÉTODOS ADICIONAIS UTILIZADOS NA ANALISE ESTRUTURAL DA FRAÇÃO 16RHW-N OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados apenas para a caracterização estrutural do heteropolissacarídeo ácido, presente na fração 16RHW-N, obtida a partir do fracionamento do extrato aquoso, originado a partir da biomassa de *Nostoc* sp. de vida livre.

### 3.8.1 Hidrólise Ácida Parcial

A fração heteropolissacarídica 16RHW-N foi submetida a dois processos de hidrólise ácida parcial diferentes.

No primeiro, uma alíquota do material (50 mg) foi hidrolisado com HCl 0,5 M, em estufa a 80 °C por 24 h. O ácido remanescente foi removido por evaporação, e os produtos de hidrólise (50 µg) foram solubilizados em MeOH (1 ml) para posterior análise por ESI-MS.

No segundo método de hidrólise parcial adotado, uma alíquota da fração 16RHW-N (150 mg) foi solubilizada em 10 ml de água destilada e o pH ajustado até 2,0 por adição de TFA 2M. A mistura foi deixada sob refluxo em banho-maria com água fervente por 30 min. Passado este tempo, o material foi resfriado a temperatura ambiente e dialisado, em sistema fechado, e membrana Spectrapor<sup>®</sup> com limite de exclusão de 8 kDa (~ 24 h), originando a fração denominada 30HW-N, que pós liofilização foi submetida a um novo ciclo de hidrólise ácida parcial por mais 30 min. gerando a fração 60HW-N que por fim deu origem a fração 90HW-N, após nova hidrólise ácida parcial.

### 3.8.2 Metanólise

A amostra 16RHW-N (100 mg) foi solubilizada em 2 ml de MeOH:HCl 0,5 M e mantida em estufa 80 °C por 24h. Passado este período o material foi neutralizado com NaBH<sub>4</sub>, e aplicado em coluna de sílica gel 60.

### 3.8.3 Cromatografia em Coluna

A coluna cromatográfica (30 cm x 2 cm) foi montada com sílica gel-60, cujas partículas possuem em tamanho entre 0.2-0.5 mm (Merck). A amostra, após metanólise (item 3.8.2), foi aplicada à coluna misturada à sílica e inicialmente eluída

com o solvente CH<sub>3</sub>Cl-MeOH (99:1 v/v), aumentando a concentração de MeOH de 1 até 20%. A eluição ocorreu a um fluxo de ~ 1 ml.min<sup>-1</sup> e frações de 10 ml foram coletadas em tubos de ensaio, as quais foram analisadas em TLC.

#### 3.8.4 Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

As análises foram realizadas em placas de sílica gel-60 (Merck alufolien 20 x 20, 0.2 mm, N. 1.05553, utilizando como fase móvel os solventes acetato de etila:ácido acético:propanol:água (4:2:2:1 v/v/v/v) ou CH<sub>3</sub>Cl:EtOH (90:10 ou 80:20 v/v). As bandas foram visualizadas através do uso do revelador específico para carboidratos, orcinol (200 mg) em EtOH (95 ml) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 ml) (SKIPSKI, 1975), após aquecimento em estufa a 100 °C.

#### 3.8.5 Ionização por Spray de Elétrons Acoplada a Espectrometria de Massa (ESI-MS)

Os experimentos de ESI-MS foram realizados em espectrômetro de massas Quattro LC, triplo quadrupólo (Waters). Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação e argônio como gás de colisão, para realização de fragmentações por CID. A detecção foi feita em modo positivo e negativo de ionização em pressão atmosférica (API). As amostras foram aplicadas por injeção direta utilizando uma bomba de infusão (KD-Scientific) a um fluxo de 10 µL/min, ou então em modo de LC-MS.

Aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx 3.5, e as análises foram obtidas em modo de *scan* contínuo.

### 3.8.6 Dosagem de Ácidos Urônicos

O método colorimétrico do sulfamato/*m*-hidroxibifenila (sensibilidade de 2-38,8 µg de ácido urônico em 0,4 ml de amostra) foi utilizado para as determinações do conteúdo de ácido urônico das amostras, conforme descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). A 0,4 ml de amostra (16RHW-N) adicionaram-se 40 µl de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio (4 M, pH 1,6) e 2,4 ml de solução de tetraborato de sódio 75 mM em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Após aquecimento em banho com H<sub>2</sub>O fervente, por 20 min, foram adicionados 80 µl de *m*-hidroxibifenila. O cromógeno obtido, cuja coloração é estável por 1 h, foi avaliado em espectrofotômetro a 525 nm. A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido glucurônico (Sigma) dentro da sensibilidade do método.

### 3.8.7 Carboxi-redução

O processo de carboxi-redução foi realizado segundo Taylor e Conrad (1972). O polissacarídeo, fração 16RHW-N (100 mg) foi dissolvido em 10 ml de tampão MES [ácido 2-(*N*-morfolina)-etanosulfônico] (0,2 M, pH 4,75) e a este foi adicionado 360 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida], pouco a pouco, sob agitação. A mistura de reação ficou sob agitação por duas horas. Decorrido este tempo, o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de tampão TRIS/HCl (2 M, pH 7,0; 3 ml). A amostra foi então reduzida com NaBH<sub>4</sub>, adicionado de maneira a perfazer uma concentração final de 2 M. Após 2 h a reação foi interrompida pela adição de HOAc até pH 5,0. Finalmente, o material foi dialisado em membrana Spectrapor<sup>®</sup>, com limite de exclusão de 8 kDa, durante 48 horas, concentrado e liofilizado.

### 3.8.8 Oxidação com Periodato de Sódio

O polissacarídeo 16RHW-N (150 mg) foi dissolvido em água (10 ml) e acrescido de  $\text{NaIO}_4$  até atingir uma concentração final de 0,05 M. A solução foi mantida sob agitação em agitador magnético, por 72 sob ausência de luz a temperatura ambiente. O processo de oxidação foi interrompido pela adição de etilenoglicol e diálise exaustiva contra água corrente. A solução foi reduzida com  $\text{NaBH}_4$  (pH 9-10) por 24 horas (ABDEL-AKHER *et al.*, 1952; DYER, 1956; HAY; LEWIS; SMITH, 1965). Em seguida, a amostra foi neutralizada com ácido acético (pH 7,0), dialisada por 48 horas e liofilizada.

### 3.8.9 Remoção de Grupos Lactil com Lítio em Etilenodiamina

O método para a fragmentação de polissacarídeos complexos pelo tratamento com lítio em etilenodiamina utilizando pequenas quantidades de carboidratos (1-5 mg) (LAU *et al.*, 1987; MORT; BAUER, 1982) foi adaptado, para o uso em quantidades maiores de amostra, com a finalidade de obter maior rendimento após o tratamento.

As frações polissacarídicas contendo monossacarídeos ácidos substituídos por grupos lactil (16RHW-N e 90HW-N - 50 mg) foi colocada em um tubo de hidrólise (13 x 100 mm) com tampa. A amostra foi solubilizada em metanol, e seca sob jatos de ar, a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C). Na sequência, foi adicionada etilenodiamina (7 ml) desidratada por utilização de peneira molecular 4A, sendo mantida sob agitação até a total solubilização da amostra. Após a dissolução, foram adicionados pequenos fragmentos de lítio metálico (2-5 mm), mantendo sempre a mistura sob agitação. Passados aproximadamente 20 min., a solução tornou-se azul, e esta coloração foi mantida pela adição de pequenos fragmentos de lítio metálico, necessários para manter a reação por 1 hora (~ 45 mg de lítio metálico no total).

A amostra tratada com lítio foi resfriada em banho de gelo, e a mistura foi solidificada. Água destilada (35 ml) foi adicionada lentamente para interromper a reação e a mistura foi agitada em vortex, com intermitente resfriamento em banho de

gelo, até a sua completa solubilização. A solução resultante foi transferida para um balão de fundo redondo, e tolueno (65 ml) foi adicionado, para formar um azeótropo com a etilenodiamina e a H<sub>2</sub>O. Esta mistura foi submetida à rotoevaporação até secura, tolueno (65 ml) foi adicionado, e a mistura rotoevaporada até secura por mais duas vezes. O resíduo branco (LiOH e carboidrato) foi resfriado em banho de gelo, e solubilizado pela adição de H<sub>2</sub>O (10 ml). A solução foi mantida em banho de gelo e ácido acético glacial foi adicionado até a mistura atingir pH 4,5, sendo então submetida a diálise contra água corrente (~ 48 h), em membrana Spectrapor<sup>®</sup>, com limite de exclusão de 2 kDa. Após diálise, a solução foi tratada com resina catiônica fortemente ácida, para remoção dos íons de lítio, a amostra foi filtrada e liofilizada.

#### 3.8.10 Ensaio Biológico: Atividade Antinociceptiva e Anti-Inflamatória *in vivo*

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com o professor Adair Roberto Soares dos Santos e colaboradores, no Departamento de Ciências Fisiológicas, situado no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os camundongos machos Swiss (25-35 g) foram mantidos em sala climatizada (23 ± 2 °C) em ciclos de claro-escuro de 12 h, com água e ração *ad libidum*. Os animais foram acondicionados no laboratório por, no mínimo, 2 h antes dos testes e utilizados uma única vez para os experimentos. Os ensaios tiveram aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina e foram desenvolvidos de acordo com as normas vigentes sobre cuidados com animais utilizados em laboratório e sobre ética em experimentos relacionados à dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e intensidade dos estímulos dolorosos utilizados foram o mínimo necessário para demonstrar efeitos consistentes dos tratamentos testados.

### 3.8.10.1 Constrição abdominal, permeabilidade capilar peritoneal e infiltração de leucócitos causada por injeção de solução de ácido acético 0,6%

As contorções abdominais foram induzidas de acordo com procedimentos previamente descritos (LUCENA *et al.*, 2007), em que a resposta à injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,6% resulta na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores.

Inicialmente, foi administrada nos animais, por via intravenosa, uma solução do corante Evans Blue 2,5% (10 ml/kg), a qual é utilizada como marcador da permeabilidade capilar peritoneal. Após uma hora, foi administrada a amostra (3-100 mg/kg, i.p.), salina (10 ml/kg, i.p.) nos animais controle negativo e iodometacina (10 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2,0 mg/kg, i.p.) nos animais grupo controle positivo. Trinta minutos depois, foi administrada a solução de ácido acético 0,6% e apenas para animais tratados com iodometacina a administração ocorreu após quatro horas. Em seguida, os animais foram mantidos individualmente em cilindros de vidro e o número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 minutos. A atividade antinociceptiva foi determinada pela redução do número de contorções abdominais (diferença entre o controle negativo e animais pré-tratados com amostra, dexametasona ou iodometacina). Imediatamente após os testes, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi exposta e lavada com 1 ml de salina estéril contendo heparina (25 UI/ml) e o fluido peritoneal coletado para análise de número de leucócitos. A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio óptico, após diluição do fluido peritoneal com solução de Türk (1:20). Uma alíquota do material coletado (700 µl) foi centrifugada (1000 rpm por 10 min) e a absorbância do sobrenadante foi lida a 610 nm com analisador de ELISA. A permeabilidade capilar peritoneal induzida por ácido acético foi expressa em relação ao extravasamento do corante Evan's Blue (µg/ml), de acordo com a curva padrão obtida por Lucena *et al.* (2007).



### 3.8.10.2 Análises estatísticas

Os resultados do experimento biológico foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média, exceto os valores de ID<sub>50</sub> (dose de amostra que reduziu a contorção abdominal, permeabilidade capilar peritoneal ou a infiltração de leucócitos em 50% em relação grupo controle negativo), que estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. Os valores de ID<sub>50</sub> foram obtidos através do método de regressão linear utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA). As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância.

## 3.9 MÉTODOS COMPLEMENTARES

As pesagens de precisão foram realizadas em balança analítica Mettler, modelo AB 204. Outras pesagens foram realizadas em balança Acculab, modelo V-1200.

As frações polissacarídicas foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório Fisatom, modelo 802, em banho-maria, em temperaturas próximas ou inferiores a 40°C.

As liofilizações foram realizadas em aparelho Edwards.

As medidas de pH foram determinadas em potenciômetro Micronal, modelo B222, em temperatura ambiente, ou com fitas reativas Merck.

As centrifugações foram realizadas nas centrífugas Beckman, modelo GS-15 (9000 rpm), Hitachi Himac CR 21E, e na microcentrífuga eppendorf 5417c.

Etanol com grau de pureza comercial foi utilizado para a precipitação dos polissacarídeos, sendo os demais solventes e reagentes utilizados com grau de pureza PA.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na presente pesquisa foram estudadas 1 espécie de microalga verde *Trebouxia* sp. e duas espécies de cianobactéria, *Nostoc* sp. e *Nostoc muscorum*, sendo a última dividida em 2 grupos de acordo com a sua origem (vida livre ou simbiote liquênico).

Conforme descrito anteriormente (Material e Métodos), cada material estudado sofreu em geral o mesmo processo de extração e purificação, exposto nos esquemas descritos a seguir, sendo a biomassa de algas, fotobionte e cianobiontes, primeiramente, deslipidificada e então submetida aos procedimentos de extrações e purificações de carboidratos de alta massa molar.

Com a finalidade de melhor entendimento, os resultados obtidos para cada espécie ou grupo serão discutidos separadamente.

### 4.1 *Trebouxia* sp.

#### 4.1.1 Obtenção e Caracterização das Frações Polissacarídicas

A biomassa do fotobionte *Trebouxia* sp. (53 g) após deslipidificação foi submetida a sucessivas extrações aquosas sob refluxo em banho com água destilada fervente, durante 3 h (3x, 500 ml cada), sendo os extratos obtidos concentrados e precipitados com excesso de etanol (3 vol.) (Figura 5). Os precipitados polissacarídicos resultantes foram solubilizados em água e dialisados em água corrente.

Em seguida o precipitado etanólico (TW-TE: 1,7 g) foi submetido a uma precipitação com TCA (10 %) para remover as proteínas presentes (52%), que pudessem interferir nas análises de caracterização estrutural dos polissacarídeos. Após a precipitação das proteínas, a fração resultante, TW-S (880 mg) foi submetida ao processo de congelamento e degelo, resultando em uma fração insolúvel (TW-PG: 150 mg) e outra solúvel (TW-SG: 630 mg) em água fria (Figura 5). A fração

TW-SG foi submetida à ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 10 kDa, originando a fração TW-10E (eluída; 120 mg) composta majoritariamente por galactose (98%).

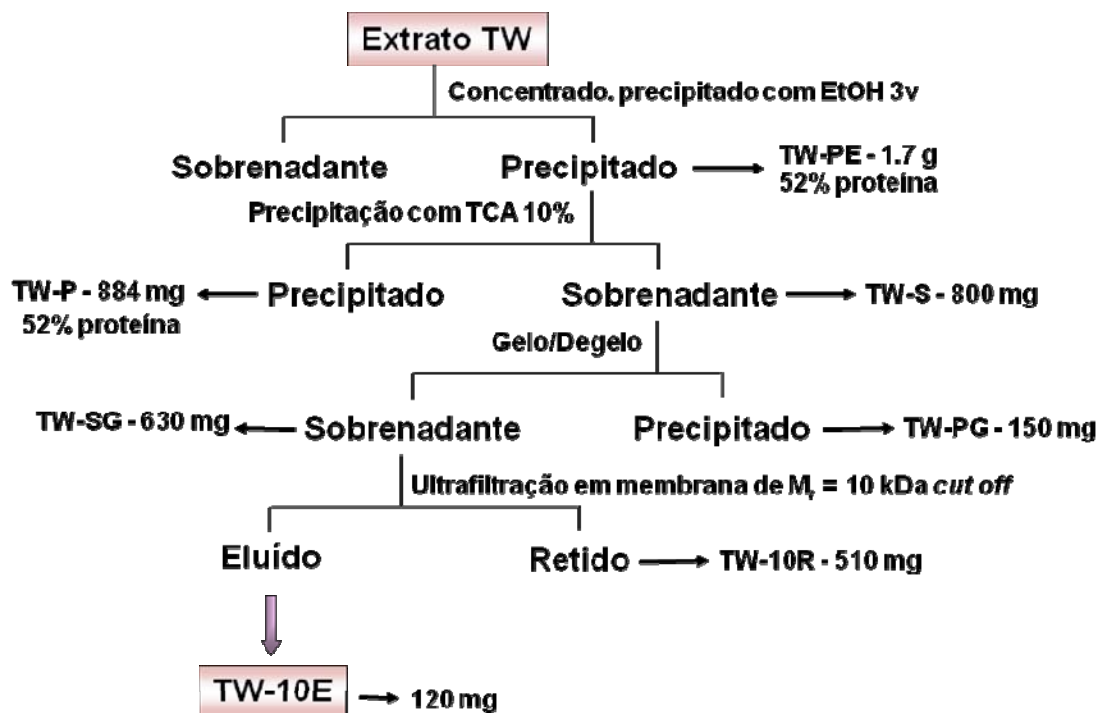


FIGURA 5 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO (TW) DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

A fração TW-10E apresentou um perfil de eluição homogêneo quando analisada por HPSEC-MALLS (Figura 6), com  $M_w = 57.480$  g/mol ( $dn/dc = 0,135$ ).

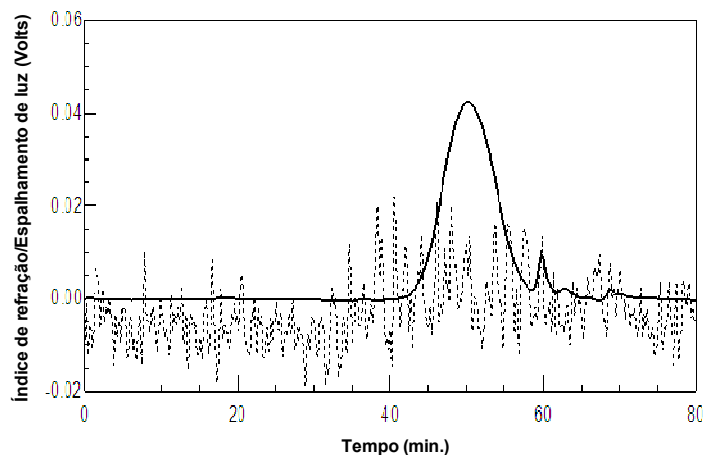


FIGURA 6 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO TW-10E, OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*, POR HPSEC-MALLS

Amostra analisada pelo detector de índice de refração (—) e espalhamento de luz, 90° (---).

Quando analisada por RMN-<sup>13</sup>C (Figura 7), a fração TW-10E apresentou seis sinais principais, os quais também puderam ser observados no espectro de HSQC (dado não mostrado).

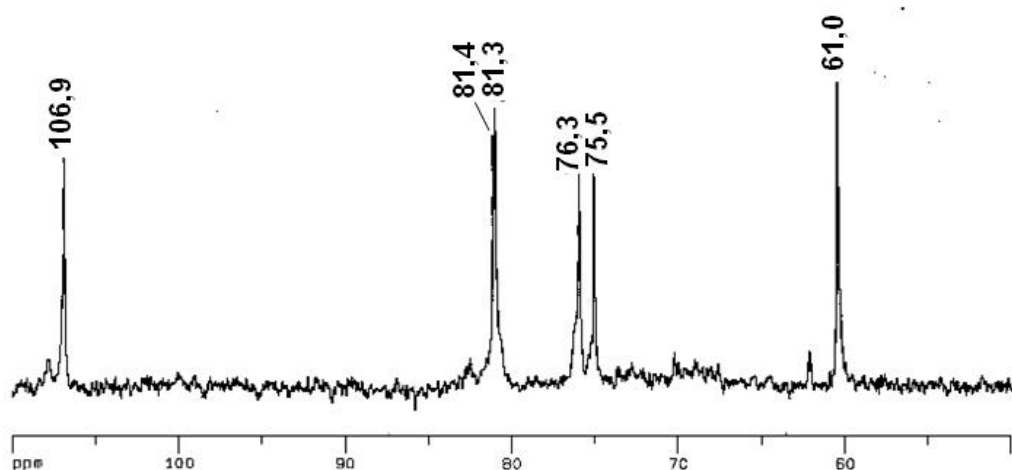


FIGURA 7 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA GALACTOFURANANA (TW-10E), OBTIDA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

Amostra solubilizada em D<sub>2</sub>O (40 mg/0,4 ml), analisada a 30 °C. Deslocamentos químicos expressos em δ (ppm).

O sinal de C-1 pode ser observado em campo baixo,  $\delta$  106,9 (H-1 em  $\delta$  5,19), sugerindo uma configuração do tipo  $\beta$  (JENNINGS; SMITH, 1973), e uma conformação furanosídica (GORIN; MAZUREK, 1975). Os demais sinais presentes nos espectros de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 7) e HSQC puderam ser atribuídos aos outros carbonos e hidrogênios: em  $\delta$  81,4/4,14 (C-4/H-4),  $\delta$  81,3/4,13 (C-2/H-2),  $\delta$  76,3/4,10 (C-3/H-3),  $\delta$  75,5/3,93 (C-5/H-5) e  $\delta$  61,0/3,80 (C-6/H-6). Os sinais observados são típicos de unidades de  $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 5)-ligadas.

A análise de metilação da galactofuranana mostrou-se condizente com os sinais observados no espectro de RMN-<sup>13</sup>C, devido a presença dos derivados 2,3,5,6-Me<sub>4</sub>-Gal (2%), referentes aos terminais não redutores de  $\beta$ -D-Galf, e 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Gal (98%), referente as unidades de  $\beta$ -D-Galf 5-O-substituídas.

Este polissacarídeo não foi detectado no talo liquênico do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*, a partir do qual o fotobionte *Trebouxia* sp. em estudo foi isolado, provavelmente devido à seu baixo rendimento.

A fração insolúvel em água fria (TW-PG: 150 mg; Figura 5, p. 74), ao contrário da fração solúvel que apresentou apenas galactose em sua composição monossacarídica, mostrou-se composta por galactose (39%), manose (23%), glucose (14%), ramnose (13%) e arabinose (11%). Devido ao baixo rendimento e a insolubilidade desta fração, ela não foi caracterizada.

O material residual resultante da extração aquosa (Figura 3, p. 57) foi submetido a extrações alcalinas em solução aquosa de KOH 2% (6 h, 3x, 1000 ml cada). Os extratos obtidos foram neutralizados, dialisados em água corrente, concentrados e precipitados por adição de excesso de etanol (3 vol.) (Figura 8). Os precipitados etanólicos resultantes foram solubilizados em água, dialisados e liofilizados, dando origem a fração TK2-PE (1,75 g; Figura 8). Esta foi submetida ao processo de congelamento e degelo, originando uma fração insolúvel (TK2-PG: 250 mg) e outra solúvel em água fria (TK2-SG: 1,32 g). A fração TK2-SG apresentou como principais monossacarídeos galactose (53%) e ramnose (20%), além de menores proporções de glucose (8%), arabinose (8%), manose (7%) e xilose (4%).

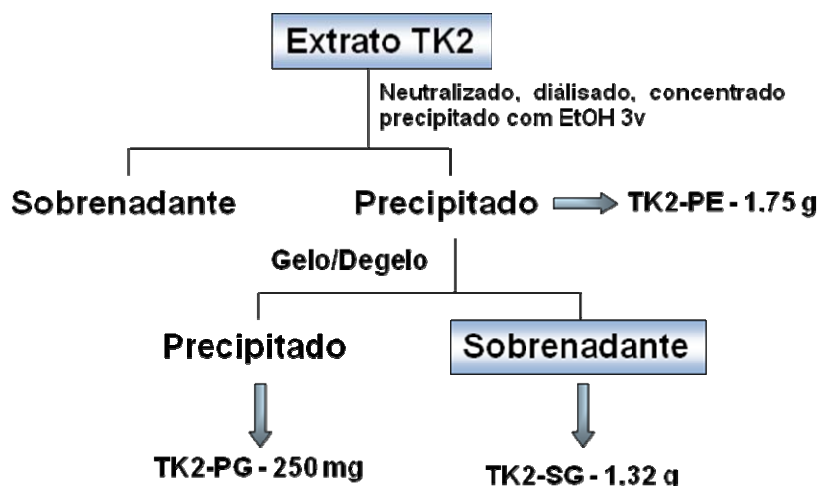


FIGURA 8 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO ALCALINA (KOH 2%) DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

Quando analisada por HPSEC-MALLS, utilizando o detector de índice de refração (—) e espalhamento de luz (---), a fração TK2-SG mostrou um perfil de eluição heterogêneo (Figura 9). Observando o perfil de eluição heterogêneo de TK2-SG por HPSEC-MALLS (Figura 9) foi possível delimitar os próximos passos de purificação.

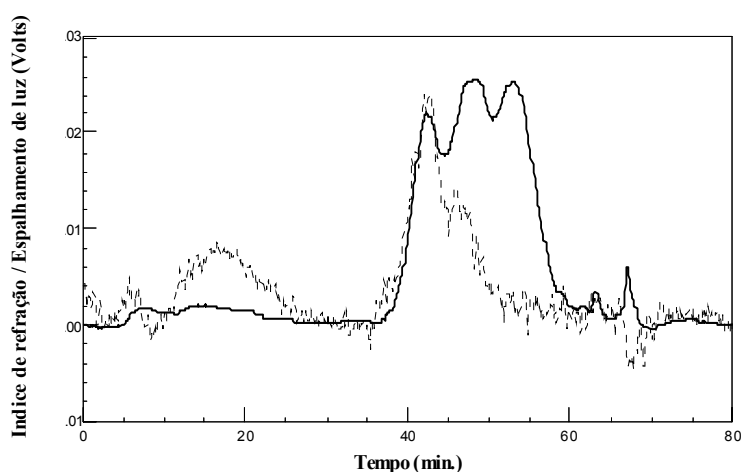


FIGURA 9 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO TK2-SG, OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*, POR HPSEC-MALLS

Amostra analisada pelo detector de índice de refração (—) e espalhamento de luz, 90° (---).

A fração TK2-SG foi primeiramente submetida à diálise fechada em membrana com limite de exclusão de 1.000 kDa (Figura 10), originando uma fração retida (TK2-MR: 110 mg) e outra eluída (TK2-ME: 650 mg).

A fração TK2-ME, por sua vez, foi submetida a sucessivas ultrafiltrações em membranas com diferentes limites de exclusão, de 100 (C), 30 (T) e 10 (D) kDa. Cada ultrafiltração originou uma fração retida (R) e outra eluída (E), onde sempre a fração eluída foi submetida ao próximo passo de purificação (Figura 10).

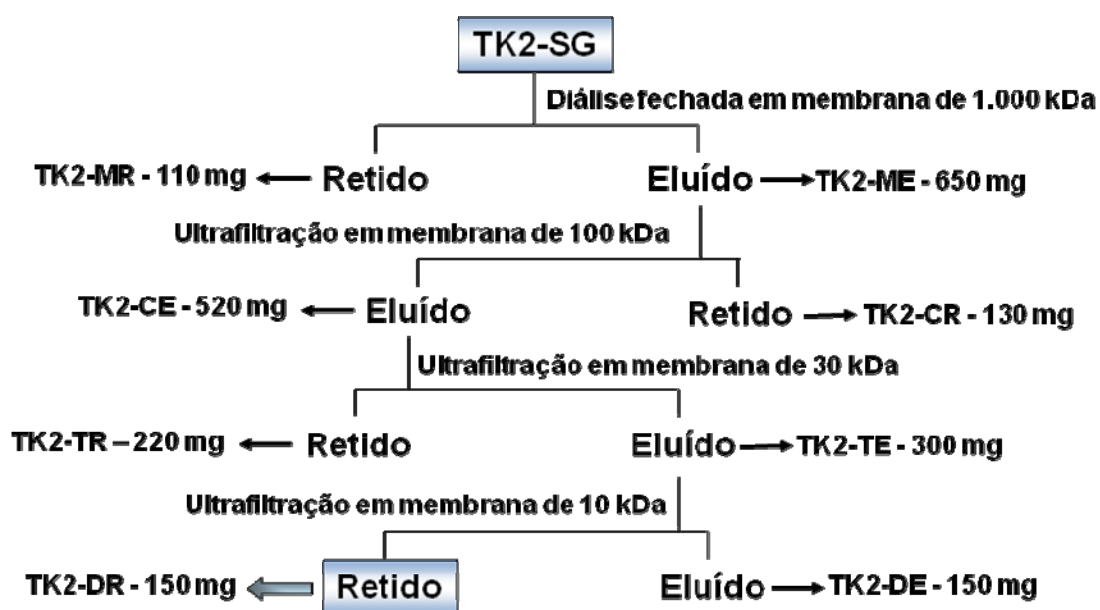


FIGURA 10 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DERIVADOS DO SOBRENADANTE DE GELO E DEGELO (TK2-SG) PROVENIENTE DO EXTRATO ALCALINO (KOH 2%) DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

Todo o processo de purificação realizado a partir da fração TK2-SG foi acompanhado por análise de composição monossacarídica (Tabela 4), onde pode-se observar que as frações derivadas de TK2-SG são principalmente compostas por galactose (49-98%).

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DO SOBRENADANTE DE CONGELAMENTO E DEGELO (TK2-SG) PROVENIENTE DO EXTRATO ALCALINO (KOH 2%) DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (% <sup>b</sup> )						
FRAÇÃO	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
TK2-SG	20	8	4	7	53	8
TK2-MR	23	6	6	7	51	7
TK2-ME	18	8	4	8	56	6
TK2-CR	30	4	7	5	48	6
TK2-CE	16	7	6	8	58	5
TK2-TR	8	5	5	5	75	2
TK2-TE	9	6	5	4	73	3
TK2-DR	Tr <sup>c</sup>	-	-	-	98	Tr

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (TFA 2M a 100 °C por 6 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo as áreas de todos os picos.

<sup>c</sup> Tr – Traços (≤ 1%).

A eficácia de cada passo de purificação realizado foi observada através das análises de HPSEC-MALLS (Figura 11A) realizadas no decorrer do fracionamento. A fração TK2-DR, quando analisada quanto a sua composição monossacarídica, mostrou-se composta principalmente por galactose (98%) e apresentou um perfil de eluição homogêneo, quando analisada por HPSEC-MALLS (Figura 11B), com  $M_w = 21.480$  g/mol ( $dn/dc = 0,185$ ).



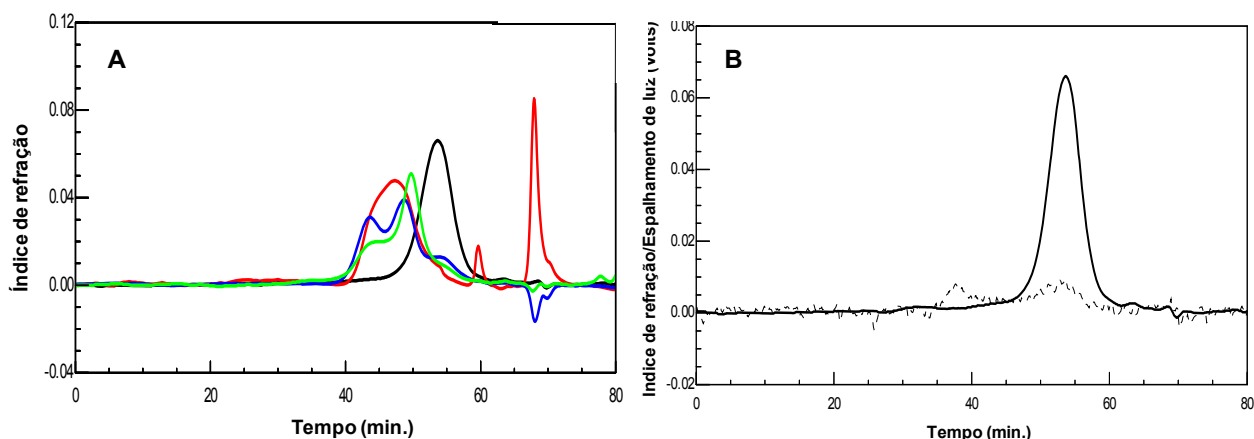


FIGURA 11 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES: TK2-ME (—), TK2-CE (—), TK2-TE (—) e TK2-DR (—) (A), E POR HPSEC-MALLS DA FRAÇÃO TK2-DR (B), OBTIDAS A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

Amostras analisadas pelo detector de índice de refração (—) e espalhamento de luz, 90° (---).

A fração TK2-DR foi submetida à análise de metilação (Tabela 5), indica a presença de uma  $\beta$ -D-Galf-(1→5)-ligada, devido a presença do derivado per-O-metilado 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Galf (74,6%), com substituição em O-6, em aproximadamente uma a cada sete unidades  $\beta$ -D-Galf da cadeia principal (2,3-Me<sub>2</sub>-Galf, 12,9%), as quais apresentam-se substituídas por terminais não redutores de  $\beta$ -D-Galf (2,3,5,6-Me<sub>4</sub>-Galf, 12,5%).

TABELA 5 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA GALACTOFURANANA (TK2-DR), OBTIDA DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados <sup>a</sup>	$t_R$ <sup>b</sup>	Fração (% <sup>c</sup> )	Tipo de Ligação <sup>d</sup>
		TK2-DR	
2,3,5,6-Me <sub>4</sub> -Gal	9,082	12,5	Galf-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	18,275	74,6	→5)-Galf-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Gal	22,12	12,9	→5,6)-Galf-(1→

<sup>a</sup> Alditol acetatos O-Me- obtidos por metilação, seguida de hidrólise ácida total, redução com NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> e acetilação, analisados por GC-MS (coluna DB-225).

<sup>b</sup> Tempo de retenção em minutos.

<sup>c</sup> % da área do pico relativa à área total do pico.

<sup>d</sup> Baseada no derivado O-metilalditol acetato.

As frações TK2-SG, TK2-ME, TK2-MR e TK2-DR foram analisadas por RMN-<sup>13</sup>C (Figura 12A, B, C e D, respectivamente).

Os espectros das frações TK2-SG, TK2-ME (eluída em 1.000 kDa) e TK2-MR (retida em 1.000 kDa) apresentaram-se similares, contendo vários sinais na região de carbono anomérico, indicando uma possível mistura de polímeros, ou a presença de polímeros similares, mas com diferentes massas molares, uma vez que análises de homogeneidade realizadas por HPSEC-MALLS apresentaram perfis de eluição heterogêneos.

Nos três espectros (Figura 12A, B e C) podem ser observados sinais na região de C-1 em  $\delta$  107,9 a 106,6, provavelmente correspondentes às unidades de galactose presentes na conformação furanosídica, podendo também estar sobrepondo os sinais referentes às unidades de Araf, presentes em menores proporções, cujos assinalamentos seriam observados na mesma região. Outros sinais de C-1 observados entre  $\delta$  102,2 e 99,6 são correspondentes aos demais monossacarídeos presentes nestas frações. A presença de ramnose, indicada pelas análises de composição monossacarídica, é evidenciada pela presença do sinal correspondente ao  $\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$  (C-6) em  $\delta$  16,5.

Quando analisada por RMN-<sup>13</sup>C (Figura 12D) a fração TK2-DR apresentou seis sinais principais. O sinal em campo mais baixo, em  $\delta$  106,9, sugere que as unidades de Gal estão na configuração  $\beta$  e na conformação furanosídica (GORIN; MAZUREK, 1975). Os demais sinais de maior intensidade puderam ser atribuídos aos seus respectivos carbonos,  $\delta$  81,6 (C-4), 81,2 (C-2), 76,5 (C-3), 75,6 (C-5 O-substituído) e 61,0 (C-6), e são característicos da presença de uma estrutura composta por unidades de  $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 5)-ligadas (CORDEIRO *et al.*, 2005; GORIN; MAZUREK, 1975; GORIN, 1981; OXLEY; WILKINSON, 1989; LEAL *et al.*, 1993a). Os sinais de menor intensidade podem ser atribuídos as unidades 5,6-di-O-substituídas e a terminais não redutores de  $\beta$ -D-Galf, detectados em  $\delta$  107,9 (C-1), 83,3 (C-4), 70,7 (C-6 O-substituído) e 62,7 (C-6), os demais sinais referentes a estas unidades apresentam-se sobrepostos aos sinais de maior intensidade.

No experimento de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (Figura 12D') foi possível observar a inversão dos sinais em  $\delta$  70,7, referente ao C-6 O-substituído das unidades de  $\beta$ -D-Galf e em  $\delta$  62,7 e 61,0 referentes a C-6 livre dos terminais não redutores e das unidades de  $\beta$ -D-Galf 5-O-substituídas, respectivamente.

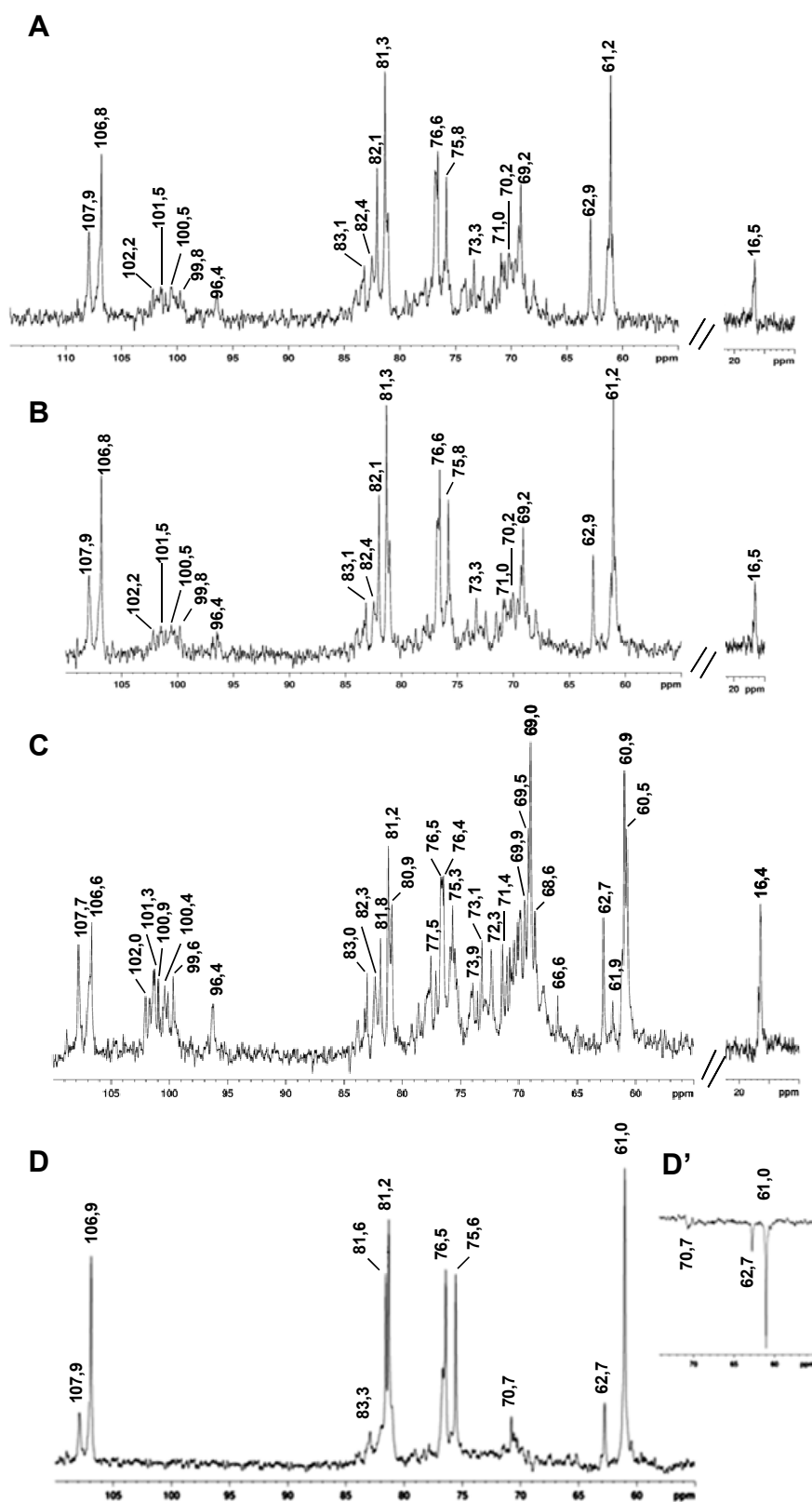


FIGURA 12 - ESPECTROS DE RMN-<sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES TK2-SG (A), TK2-ME (B), TK2-MR (C), TK2-DR (D); DETALHE DA REGIÃO DE -CH<sub>2</sub> DO ESPECTRO DE <sup>13</sup>C-DEPT (D'), OBTIDAS DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans* Solvente: D<sub>2</sub>O (40 mg/0,4 ml), análise a 50 °C; deslocamentos químicos expressos em δ(ppm).

Os dados de metilação (Tabela 5, p. 80), em conjunto com os dados de RMN-<sup>13</sup>C indicam que a fração TK2-DR é composta por uma galactofuranana com cadeia principal de unidades de (1→5)-ligadas, as quais podem estar substituídas em O-6, por terminais não redutores de β-D-Galf (Figura 13).

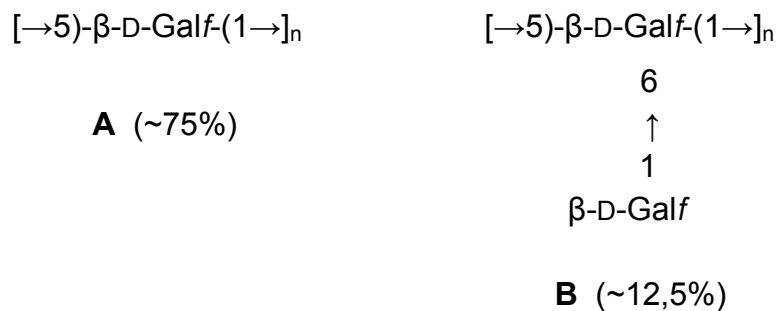


FIGURA 13 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A GALACTOFURANANA PRESENTE NA FRAÇÃO TK2-DR OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE *Trebouxia* sp. ISOLADA DE *Teloschistes flavicans*

A fração TK10, obtida após extração alcalina (KOH 10%) foi inicialmente submetida ao processo de congelamento e degelo, que originou apenas uma fração solúvel em água fria (TK10-SG: 1,05 g; Figura 14), indicando que este processo não foi eficiente para fracionar os polissacarídeos do extrato TK10, como havia sido para o extrato TK2.

A fração TK10-SG quando analisada por GC-MS apresentou-se composta principalmente por galactose (58%), além de menores proporções de manose (18%), ramnose (9%), arabinose (7%), glucose (4%) e xilose (4%) (Tabela 6).

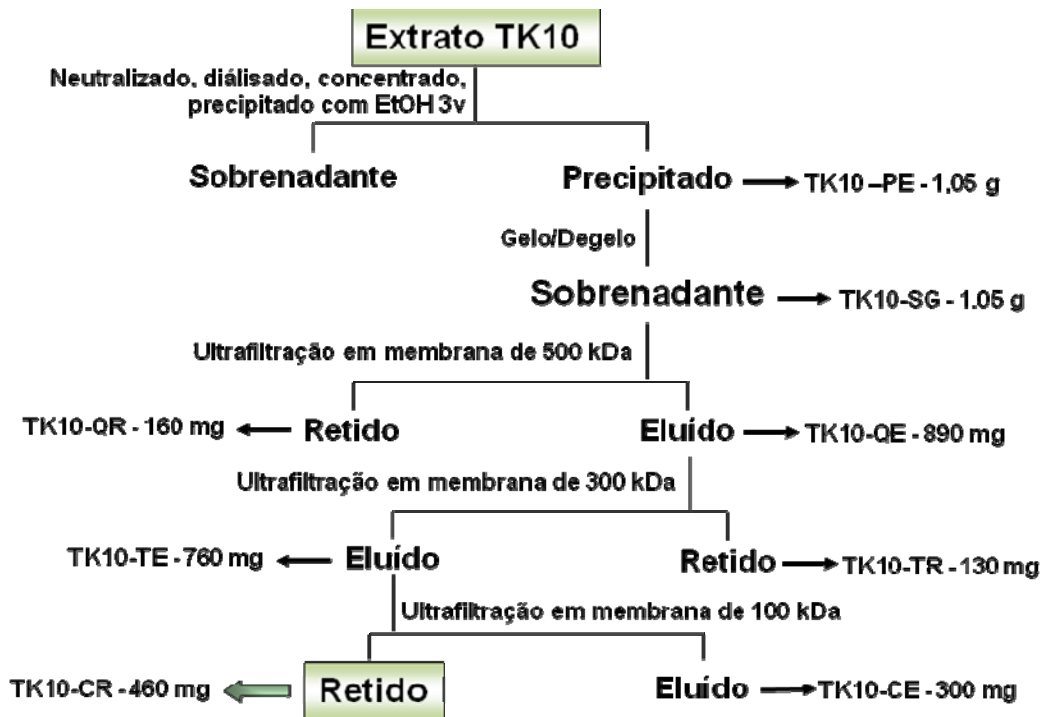


FIGURA 14 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO ALCALINA (KOH 10%) DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

Quando analisada quanto a sua homogeneidade, por HPSEC-MALLS, a fração TK10-SG apresentou um perfil heterogêneo (Figura 15). A partir desta fração foram realizadas sucessivas ultrafiltrações em membranas com diferentes limites de exclusão 500 (Q) 300 (T) e 100 (C) kDa, originando frações eluídas (E) e retidas (R) (Figura 14), as quais foram acompanhadas por análises de composição monossacarídica (Tabela 6) e perfil de eluição (Figura 15).

Analisando as composições das frações monossacarídicas resultantes dos processos de purificação realizados, pode-se observar a predominância de galactose, assim como observado para as demais frações, originadas a partir das extrações aquosa e alcalina KOH 2%.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DO SOBRENADANTE DE CONGELAMENTO E DEGELÓ (TK10-SG) PROVENIENTE DO EXTRATO ALCALINO (KOH 10%), DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>					
FRAÇÃO	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal
TK10-SG	27	9	2	9	53
TK10-QE	4	29	5	11	51
TK10-TE	4	9	3	21	63
TK10-CR	8	7	-	17	68

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (TFA 2M a 100 °C por 6 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo à área de todos os picos.

Nas análises de HPSEC (Figura 15A) realizadas no decorrer do processo de purificação, pode-se observar que através dos procedimentos adotados obteve-se uma fração homogênea (TK10-CR; Figura 15B), com  $M_w = 41.580$  g/mol ( $dn/dc = 0,187$ ).

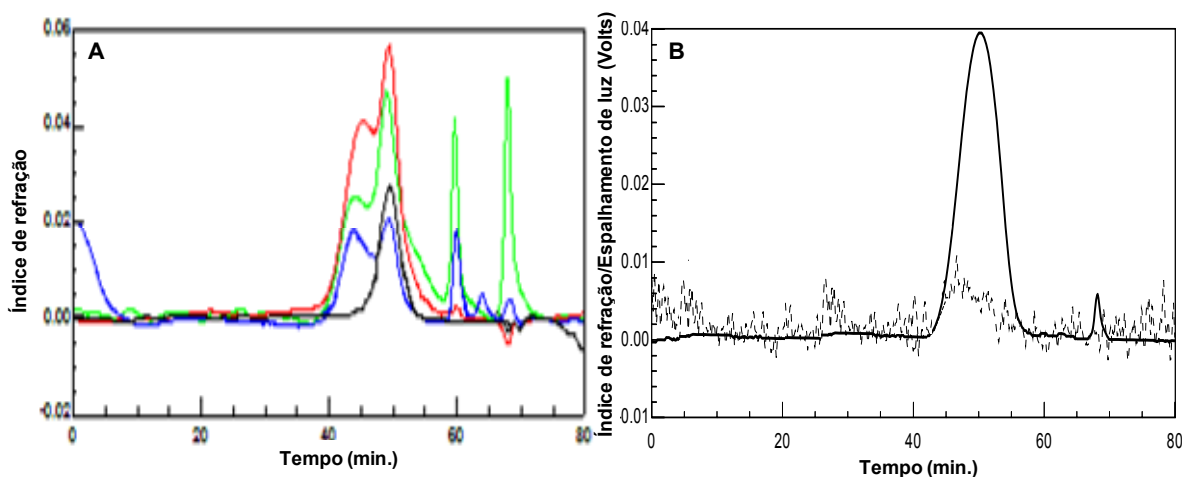


FIGURA 15 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES TK10-SG (—), TK10-QR (—), TK10-TR (—) E TK10-CR (—) (A); DETALHE DA FRAÇÃO TK10-CR (B), OBTIDAS A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

Amostras analisadas pelo detector de índice de refração (—) e espalhamento de luz, 90° (---).

A fração TK10-CR mostrou-se composta por ramnose (8%), arabinose (7%), manose (17%) e galactose (68%), quando analisada quanto a sua composição monossacarídica (Tabela 6). Esta composição sugere a presença de uma heterogalactofuranana.

No espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração TK10-CR (Figura 16) pode-se observar sinais em  $\delta$  106,9 e 107,9, provavelmente correspondentes ao C-1 das unidades de  $\beta$ -D-galactofuranose 5-O e 5,6-di-O-substituídas, respectivamente. Outros sinais em  $\delta$  82,1 (C-4), 81,4 (C-2), 76,7 (C-3), 75,9 (C-5 O-substituído) e 61,2 (C-6) são característicos da presença de unidades de  $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 5)-ligadas (AHRAZEM *et al.*, 2007; CORDEIRO *et al.*, 2005; 2008; GORIN; MAZUREK, 1975; LEAL *et al.*, 1993).

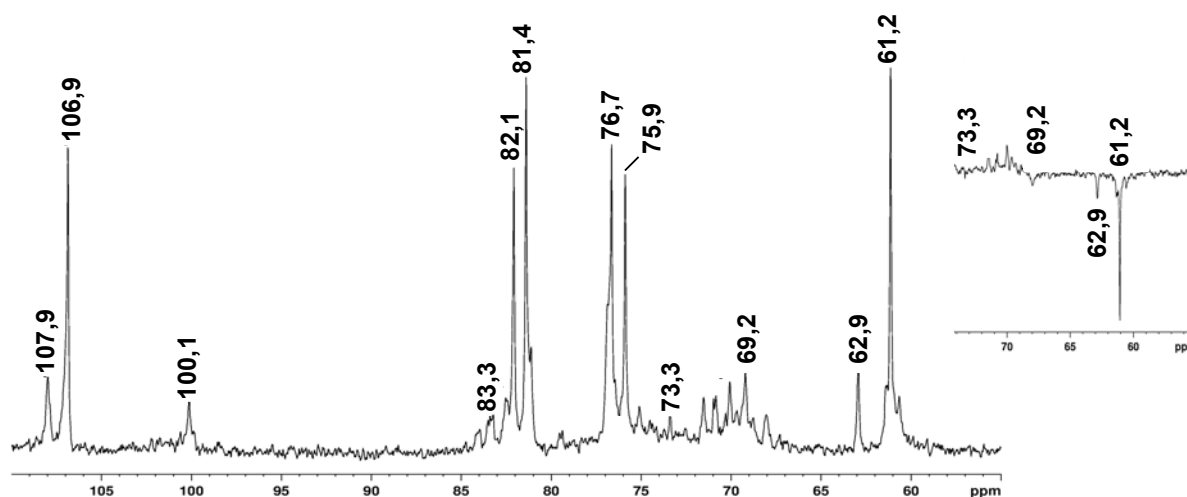


FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO TK10-CR; DETALHE DA REGIÃO DE -CH<sub>2</sub> DO ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C-DEPT, OBTIDA DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

Amostras solubilizada em D<sub>2</sub>O (40 mg/0,4 ml), analisada a 50 °C; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Um terceiro sinal na região anomérica em  $\delta$  100,1 possivelmente corresponde a unidades de  $\alpha$ -D-Manp. Os sinais correspondentes ao C-6 das unidades de  $\beta$ -D-Galf e  $\alpha$ -D-Manp foram assinalados no experimento de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (Figura 16). Os sinais invertidos em  $\delta$  73,3 e 69,2 correspondem ao C-6

substituído de  $\beta$ -D-Galf e  $\alpha$ -D-Manp, respectivamente (CORDEIRO *et al.*, 2008). O sinal em  $\delta$  62,7 pode ser atribuído ao C-6 livre dos terminais não redutores de  $\beta$ -D-Galf, enquanto que o sinal em  $\delta$  61,2 pode ser atribuído a sobreposição de sinais de C-6 livre das unidades de  $\beta$ -D-Galf 5-O-substituídas e de  $\alpha$ -D-Manp (GORIN; MAZUREK, 1975).

A análise de metilação da fração TK10-CR (Tabela 7) indica que este polímero trata-se de uma heterogalactofuranana, formada por uma cadeia principal de unidades de Galf-(1 $\rightarrow$ 5)-ligadas, com aproximadamente 13 % de suas unidades 6-O-substituídas (2,3-Me<sub>2</sub>-Gal) e 2% 3,6-di-O-substituídas (2-Me-Gal). As cadeias laterais possuem estruturas ramificadas complexas, compostas principalmente por unidades de Manp 4-O- (12,6%), 2,4-di-O- (2,0%), 2,3-di-O- (3,7%) e 2,6-di-O-substituídas (4,5%), e por unidades de Araf 3,5-di-O-substituídas (6,2%). Os terminais não redutores são compostos por Rha (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Rhap, 2,3%), Araf (2,3,5-Me<sub>3</sub>-Araf, 6,0%), Galf (2,3,5,6-Me<sub>4</sub>-Galp, 24,6%) Manp (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Manp, 1,8%).

TABELA 7 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA HETEROGALACTOFURANANA (TK10-CR), OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DO FOTOBIONTE *Trebouxia* sp. ISOLADO DE *Teloschistes flavicans*

Alditol acetatos parcialmente O-metilados <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> <sup>b</sup>	Fração (% <sup>c</sup> ) TK10-CR	Tipo de Ligação <sup>d</sup>
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	6,99	6,0	Araf-(1 $\rightarrow$
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Rha	7,146	2,3	Rhap-(1 $\rightarrow$
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	8,851	1,8	Manp-(1 $\rightarrow$
2,3,5,6-Me <sub>4</sub> -Gal	9,082	24,6	Galf-(1 $\rightarrow$
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Man	11,655	12,6	4 $\rightarrow$ )-Manp-(1 $\rightarrow$
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	12,093	20,4	$\rightarrow$ 5)-Galf-(1 $\rightarrow$
4,6-Me <sub>2</sub> -Man	14,13	3,7	$\rightarrow$ 2,3)-Manp-(1 $\rightarrow$
3,6-Me <sub>2</sub> -Man	15,968	2,0	$\rightarrow$ 2,4)-Manp-(1 $\rightarrow$
2,3-Me <sub>2</sub> -Gal	16,48	13,7	$\rightarrow$ 5,6)-Galf-(1 $\rightarrow$
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	17,633	4,5	$\rightarrow$ 2,6)-Manp-(1 $\rightarrow$
2-Me-Ara	18,275	6,2	$\rightarrow$ 3,5)-Araf-(1 $\rightarrow$
2-Me-Gal	22,12	2,2	$\rightarrow$ 3,5,6)-Galf-(1 $\rightarrow$

<sup>a</sup> Alditol acetatos O-Me- obtidos por metilação, seguida de hidrólise ácida total, redução com NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> e acetilação, analisados por GC-MS (coluna DB-225).

<sup>b</sup> Tempo de Retenção em minutos.

<sup>c</sup> Percentual relativo a área de todos os picos.

<sup>d</sup> Baseada no derivado O-metilalditol acetato.



Em resumo, para o fotobionte *Trebouxia* sp., isolado a partir do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*, foram purificadas três frações (TW-SG, TK2-DR e TK10-CR). Todas as estruturas apresentam o mesmo tipo de cadeia principal, formada por unidades de  $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 5)-ligadas. Para a fração TW-SG, esta estrutura apresenta-se de forma linear, ou seja, sem ramificações, já nas outras duas frações, esta cadeia principal apresenta-se ramificada em O-6, seja por unidades de  $\beta$ -D-Galf (TK2-DR) ou por cadeias laterais mais complexas (TK10-CR).

Para *Trebouxia* sp., isolada de *Ramalina gracilis*, foram caracterizadas duas estruturas com mesma cadeia principal, formada por unidades de  $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 5)-ligadas, substituídas em O-6. Em uma das estruturas são observadas substituições em O-6 por unidades de  $\beta$ -D-Galf (CORDEIRO *et al.*, 2005), estrutura similar à encontrada para a fração TK2-DR, caracterizada no presente trabalho. Cordeiro e colaboradores (2005) sugerem que estas estruturas possam desempenhar um papel importante no processo de reconhecimento dos biontes na simbiose.

O outro polímero caracterizado para o fotobionte de *R. gracilis*, uma manogalactofuranana, apresentou cadeias laterais complexas (CORDEIRO *et al.*, 2008) formadas por unidades de Man $\alpha$ , tendo como terminais não redutores, Rha $\alpha$  e Ara $\alpha$ , além de Galf e Man $\alpha$ , estrutura esta, semelhante à que foi caracterizada no presente estudo, para a fração TK10-CR (obtida a partir da extração alcalina KOH 10%). A manogalactofuranana, isolada do fotobionte *Trebouxia* sp. de *R. gracilis* mostrou atividade ativadora de macrófagos em todas as concentrações testadas (1-150  $\mu$ g/ml), e na concentração de 150  $\mu$ g/ml estimulou em 60% a ativação de macrófagos peritoneais, em comparação com o grupo controle (CORDEIRO *et al.*, 2008).

Comparando com dados da literatura, no que diz respeito a polissacarídeos obtidos a partir de fotobiontes isolados de fungos liquenizados, existem relatos da presença de  $\beta$ -D-manopirranana-(1 $\rightarrow$ 6)-ligada,  $\beta$ -D-xilana-(1 $\rightarrow$ 4)-ligada e amilose obtidos do fotobionte *Trebouxia* sp., isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri* (CORDEIRO *et al.*, 2003). Investigações recentes têm demonstrado que este fotobionte apresenta uma seqüência de ITS rDNA diferente das seqüências originais de *Trebouxia* sp. disponíveis no GenBank. Isto indica que a alga verde isolada para *R. celastri* corresponda provavelmente a uma alga epífita e não ao fotobionte deste líquen (dados não publicados, CORDEIRO *et al.*).

Estruturas de galactofurananas já haviam sido extraídas da parede celular

de algumas espécies de fungos, como *Penicillium expansum* (PARRA *et al.*, 1994), *Eupenicillium crustaceum* (LEAL *et al.*, 1993a, 1993b), *Neosartorya* sp. (LEAL *et al.*, 1995), *Aspergillus* sp. (LEAL *et al.*, 1992) e *Guignardia citricarpa* (SASSAKI *et al.*, 2002). No entanto, polímeros compostos por Galf não são comuns em algas, sugerindo tratar-se de estruturas características de fotobiontes liquênicos.

Os fotobiontes *Trebouxia* sp., isolados dos fungos liquenizados *Ramalina gracilis* e *Teloschistes flavicans* foram cultivados no mesmo meio de cultivo e foi verificada a presença de estruturas similares em ambos (CORDEIRO *et al.*, 2005; 2008). Desta maneira, pode-se inferir que, independente da origem do fotobionte, ou seja, independente do fungo liquenizado a partir do qual o fotobionte é isolado, polissacarídeos com estruturas similares podem ser produzidos. Esta produção pode ou não ser influenciada pela composição do meio de cultivo, uma vez que estruturas semelhantes não foram observadas ao estudar os polissacarídeos extraídos destes fungos liquenizados.

#### 4.2 CULTIVO DE *Nostoc muscorum* (CIANOBACTÉRIA)

A espécie de cianobactéria selecionada, *Nostoc muscorum*, foi adquirida da UTEX-Culture Collection of Algae da Universidade do Texas (EUA). Desta mesma espécie foram adquiridos exemplares com origens diferentes, isolado como cianobionte do fungo liquenizado *Peltigera canina* (NmC), e de vida livre (NmL).

Durante o período determinado para a adaptação das células em meio líquido (~ 10 dias) foi possível observar diferenças em relação ao crescimento das células, tanto comparando os organismos de diferentes origens, denominadas NmC (*Nostoc muscorum* - cianobionte) e NmL (*N. muscorum* - vida livre), quanto os diferentes meios testados.

Na figura 17 pode-se verificar o crescimento de *N. muscorum*, NmC (cianobionte) e NmL (vida livre), nos diferentes meios testados. Ao analisar as imagens do cultivo de NmC nos diferentes meios, observa-se um melhor crescimento no meio BG-11(Figura 17C).

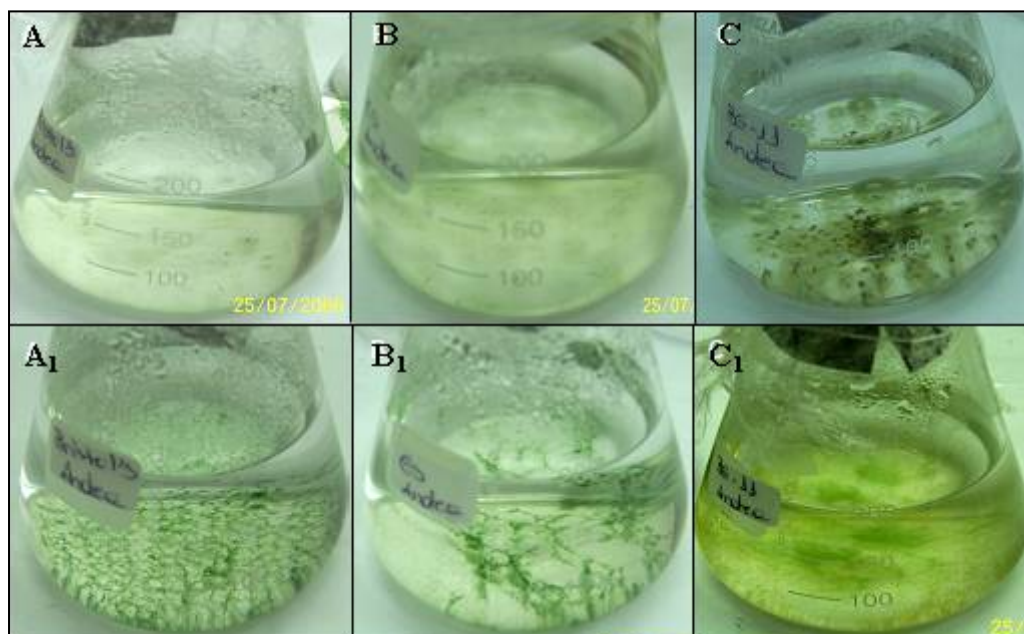


FIGURA 17 - *Nostoc muscorum* – CIANOBIONTE (NmC: **A,B,C**) E VIDA LIVRE (NmL: **A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>**), CULTIVADA EM DIFERENTES MEIOS. MEIO BRISTOL'S (**A**); ES (**B**); BG-11 (**C**)

Observando o crescimento da cianobactéria NmL, nos meios Bristol's (A<sub>1</sub>), ES (B<sub>1</sub>) e BG-11 (C<sub>1</sub>) pode-se verificar que em todos os meios houve um melhor desenvolvimento das células quando comparado ao de NmC. Além disto, visualmente e através a análise dos rendimentos, o meio Bristol's apresentou um melhor crescimento (Figura 17A<sub>1</sub>).

Também foi possível observar que NmL cresce formando uma espécie de "teia" suspensa no meio de cultivo, já NmC cresce aderida ao fundo do frasco. Para verificar se havia realmente uma diferença morfológica entre estes dois representantes da espécie *N. muscorum*, estas foram analisadas em microscópio óptico (Figura 18). Com as imagens de microscopia óptica foi possível observar que, além de uma diferença na forma de crescimento, NmC e NmL apresentam características morfológicas diferentes.

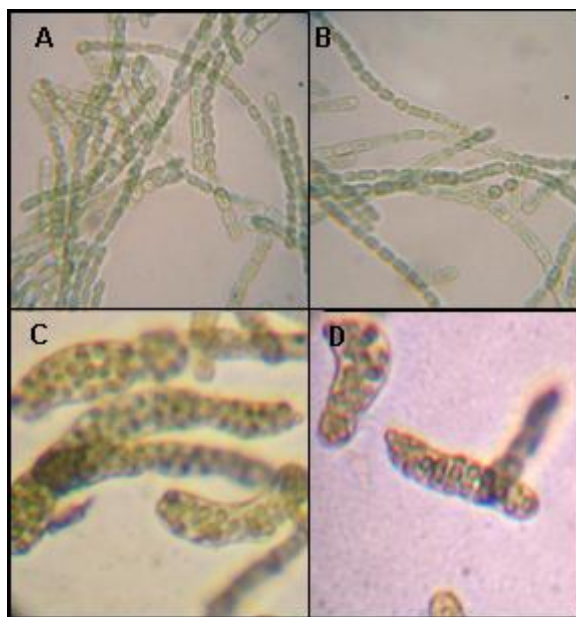


FIGURA 18 - IMAGENS DE *Nostoc muscorum* DE VIDA LIVRE (NmL - **A** e **B**) E DO CIANOBIOTE (NmC - **C** e **D**)

Microscopia óptica, usando um aumento de 400 x.

Em relação à NmL, a morfologia observada é condizente com a descrição encontrada na literatura para *Nostoc* spp. de vida livre, que descreve que as células são elipsoidais, em geral de mesmo tamanho, com divisão perpendicular ao longo do eixo do tricoma, não havendo ramificação (TSCHERMAK-WOESS, 1989) (Figura 18A e B). Já em *Nostoc* spp. liquenizada, a bainha apresenta-se reduzida, os filamentos são mais convolutos e menores do que no estado de vida livre, as células vegetativas são maiores, com aquinetos<sup>11</sup> não observados usualmente (TSCHERMAK-WOESS, 1989), como pode ser observado na figura 18 (C e D).

Após observação, por microscopia óptica, de que realmente tratava-se de representantes de cianobactérias do gênero *Nostoc*, o meio de cultivo escolhido para a obtenção de biomassa foi o meio BG-11, uma vez que o cianobionte NmC, cujo crescimento é mais lento, apresentou um melhor desenvolvimento. Além disso, uma comparação dos polímeros obtidos, com aqueles já descritos na literatura tornaria-se possível, pois praticamente todos os relatos de cultivo de

<sup>11</sup> Aquinetos – são células diferenciadas e de maior tamanho, que possuem paredes espessadas e guardam, em seu interior, grânulos com substâncias de reserva; podem atuar como esporos de resistência, que em condições favoráveis podem originar uma nova alga idêntica à alga mãe.

cianobactérias foram realizados utilizando o meio BG-11.

Para determinar o tempo ideal de cultivo, foi realizada uma curva de crescimento (Figura 19), e a obtenção máxima de biomassa foi alcançada no 15º dia. No entanto, a produção máxima de EPS só é atingida quando é iniciado o decréscimo da biomassa (CHI; SU; LU, 2007). Desta maneira o 20º dia foi escolhido para o término do cultivo, conciliando assim, produção de biomassa e exopolissacarídeos, tanto para NmC quanto para NmL.

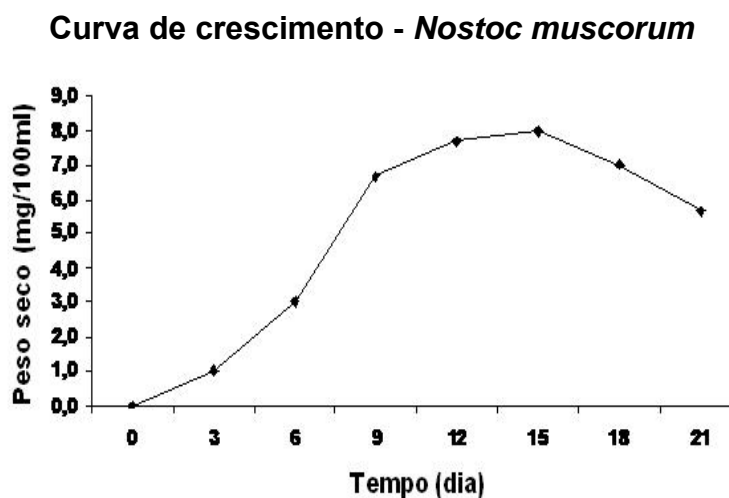


FIGURA 19 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *Nostoc muscorum* – VIDA LIVRE (NmL), CULTIVADA NO MEIO BG-11

Gráfico representando o peso seco da biomassa (mg/100 ml) x tempo (dia).

Sendo assim, a partir dos pré-inóculos foram realizados repiques tanto para placas contendo meio sólido (manutenção das colônias) quanto para frascos erlenmeyer de 2 L contendo 1 L de meio BG-11 (obtenção de biomassa).

O cultivo foi realizado em vários frascos, totalizando 27 litros de meio para NmC, onde foram obtidos 3,11 g (rendimento =  $0,115 \text{ g.L}^{-1}$ ) e 87 litros de meio para NmL, resultando em 5,043 g de biomassa (rendimento =  $0,058 \text{ g.L}^{-1}$ ). Não há relatos na literatura sobre rendimentos, tempo de cultivo e produção de EPS de *N. muscorum*, embora esta seja uma espécie de cianobactéria muito conhecida, tanto em vida livre, quanto isolada a partir do fungo liquenizado *Peltigera canina*. Os estudos encontrados na literatura sobre esta espécie de cianobactéria estão relacionados ao isolamento e síntese dos biontes do cianolíquen *P. canina*

(AHMADJIAN, 1989), diferenças morfológicas entre o cianobionte isolado e o de vida livre (TSCHERMAK-WOESS, 1989; WASTLHUBER; LOOS, 1996), exopolissacarídeos na agregação de partículas do solo (ZULPA De CAIRE *et al.*, 1997), crescimento e eficiência na remoção de metais pesados em efluentes industriais (EL-SHEEKH, *et al.*, 2005) e sobre a produção e caracterização de uma substância ativa antimicrobiana (EL-SHEEKH *et al.*, 2006).

#### 4.2.1 *Nostoc muscorum* – Cianobionte (NmC): Obtenção e Caracterização dos Exopolissacarídeos

No 20º dia de cultivo, as células (biomassa) foram separadas do meio de cultivo por filtração. O filtrado foi concentrado, dialisado em membrana com poro de limite de exclusão de 8 kDa para eliminação dos sais presentes no meio, e liofilizado, originando a fração exopolissacarídica (E) E-NmC, com rendimento de 0,037 g.L<sup>-1</sup> (~ 1 g). Quando analisada quanto à composição monossacarídica, E-NmC, apresentou ramnose (45,7%), arabinose (10,0%), xilose (10,0%), manose (8,3%), galactose (11,2%) e glucose (14,8%) (Tabela 8). Esta fração bruta foi submetida ao fracionamento por congelamento e degelo, originando uma fração solúvel (SE-NmC: 550 mg) e outra insolúvel em água fria (IE-NmC: 320 mg). A fração IE-NmC apresentou apenas xilose como componente monossacarídico (Tabela 8).

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES EXOPOLISSACARÍDICAS PROVENIENTES DO CULTIVO DE *Nostoc muscorum* - CIANOBIOTE (NmC)

COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (% <sup>b</sup> )						
FRAÇÃO	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
E-NmC	45,7	10,0	10,0	8,3	11,2	14,8
SE-NmC	44,5	34,0	9,0	4,7	4,5	3,3
IE-NmC	-	-	99,8	-	-	-

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 14 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo à área de todos os picos.

Analisando a fração IE-NmC por RMN-<sup>13</sup>C, puderam ser observados apenas cinco sinais de <sup>13</sup>C, indicando a presença de um homopolímero linear (Figura 20).

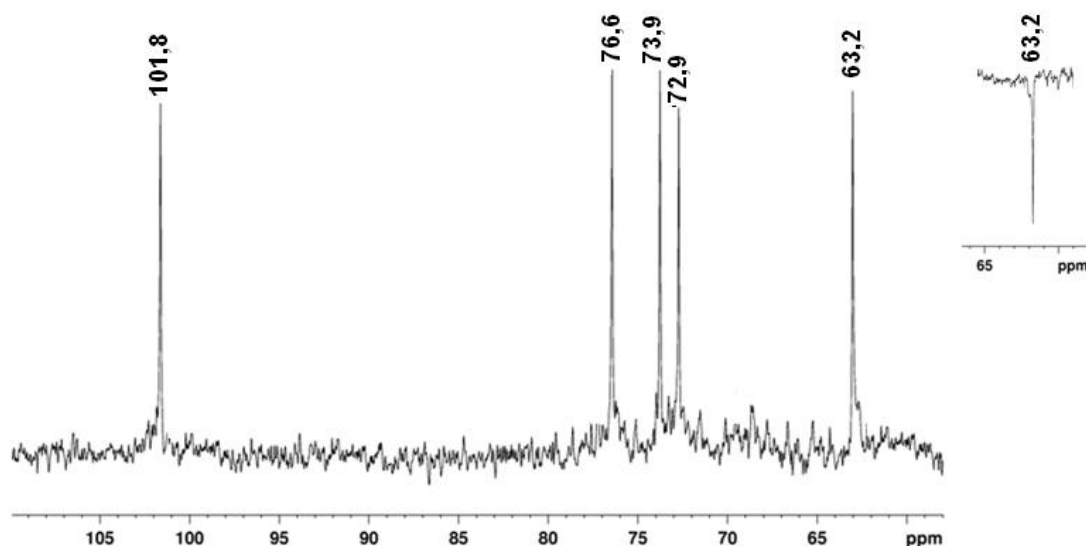


FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA XILANA LINEAR (IE-NmC); DETALHE DA REGIÃO DE -CH<sub>2</sub> DO ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C-DEPT, OBTIDA A PARTIR DA FRAÇÃO EXOPOLISSACARÍDICA DE *Nostoc muscorum* - CIANOBIONTE (NmC)

Amostra solubilizada em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (40 mg/0,4 ml), analisada a 70 °C; deslocamentos químicos expressos em δ (ppm).

O sinal em δ 101,8 na região de C-1 sugere que as unidades de D-Xylp estejam presentes na configuração β (GORIN e MAZUREK, 1975). A configuração glicosídica (β) foi confirmada pelos deslocamentos de <sup>1</sup>H no experimento de HSQC (Tabela 9) e pela constante de acoplamento ( $J_{C1,H1}$ ) (PERLIN e CASU, 1969) observada no espectro de RMN-<sup>13</sup>C acoplado (dado não mostrado). O sinal de H-1 em campo alto em δ 4,27 (δ 101,8) caracteriza configuração β (GORIN; SPENCER; BHATTACHARJEE, 1969), e está de acordo com o valor  $J_{C-1,H-1}$  de 163,7 Hz.

Para esta xilana linear (IE-NmC), a ligação do tipo (1→4) pode ser sugerida, devido a presença do sinal em δ 76,6 (Figura 20) característico de C-4 substituído (KOVAC; HIRSCH, 1980).

TABELA 9 - DADOS DE RMN-<sup>13</sup>C E <sup>1</sup>H DA FRAÇÃO IE-NmC<sup>a</sup> (XILANA) OBTIDA A PARTIR DA FRAÇÃO EXOPOLISSACARÍDICA DE *Nostoc muscorum* - CINOBIOTE (NmC)

<sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C	Deslocamentos químicos (ppm)	
	<sup>1</sup> H (δ)	<sup>13</sup> C (δ)
H-1/C-1	4,27	101,8
H-2/C-2	3,15	72,9
H-3/C-3	3,27	73,9
H-4/C-4	3,55	76,6
H-5 e H-5'/C-5	3,18;3,86	63,2

<sup>a</sup> Amostra solubilizada em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (30 mg/0,4 ml), analisada a 70 °C; deslocamentos químicos em δ (ppm).

Os demais sinais de <sup>13</sup>C em δ 73,9, 72,9 e 63,2 (invertido no experimento de DEPT) puderam ser atribuídos ao C-3, C-2 e C-5, respectivamente (Figura 20) (KOVAC; HIRSCH, 1980).

A análise de metilação da fração IE-NmC mostrou a presença de baixos teores de terminais não redutores de Xylp (0,3%), como é esperado para estruturas lineares. A presença majoritária do derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Xyl (99,7%), juntamente como os dados de RMN-<sup>13</sup>C confirma a estrutura como sendo uma β-D-Xilana linear (1→4)-ligada.

A maior parte dos EPS sintetizados por cianobactérias (aproximadamente 80% dos polímeros) são muito complexos, sendo compostos por seis ou mais monossacarídeos, o que difere daqueles polímeros produzidos por outras bactérias ou macroalgas, onde o número de monossacarídeos é usualmente menor que quatro (SUTHERLAND, 1990).

Grande parte dos estudos envolvendo exo- ou polissacarídeos de cianobactérias estão direcionados para a determinação da composição monossacarídica destes polímeros. O monossacarídeo mais comumente encontrado nos EPS é a glucose, encontrada em mais de 90% dos polímeros, seguida de galactose, manose e ramnose, presentes em 80-85% dos polímeros (DePHILIPPIS; VICENZINI, 1998). Em alguns EPS, arabinose, galactose ou fucose estão presentes em maiores concentrações em relação à glucose (DePHILIPPIS; VICENZINI, 1998).

Em contrapartida, um polissacarídeo contendo apenas xilose é uma



estrutura inédita para cianobactérias, tanto como polímero celular ou extracelular.

Xilanas lineares são comumente encontradas em plantas e em algumas algas (AHMADJIAN, 1993). Também foi descrita para o fotobionte *Trebouxia* sp. isolado do fungo liquenizado *Ramalina celastri* (CORDEIRO *et al.*, 2003) e foi detectada pela primeira vez no líquen intacto *Dyctionema glabratum* (CARBONERO *et al.*, 2002). Os autores sugeriram que este polímero poderia ser produzido pela cianobactéria *Scytonema* sp. encontrada como cianobionte do fungo liquenizado *D. glabratum* (CARBONERO *et al.*, 2002). Tal sugestão pode ser reforçada após a caracterização de uma  $\beta$ -D-xilana linear (1 $\rightarrow$ 4)-ligada como EPS do cianobionte *Nostoc muscorum* realizada no presente estudo, e pode-se propor que este polímero possa ser típico de ficobiontes (fotobiontes e cianobiontes) de fungos liquenizados.

#### 4.2.2 *Nostoc muscorum* – Cianobionte (NmC): Obtenção e Caracterização dos Heteropolissacarídeos Obtidos a Partir da Biomassa de Células

A biomassa de células (3,11 g) após deslipidificação foi submetida à extração aquosa a quente ( $\sim 100$  °C) (Figura 4, p. 58). Os polissacarídeos presentes no extrato aquoso resultante (HW-NmC) foram precipitados pela adição de excesso de EtOH (3:1; v/v), originando a fração HW-NmC (1,35 g), a qual foi submetida a fracionamento por congelamento e degelo. A fração solúvel em água fria (S-NmC: 980 mg) foi fracionada através de diálises fechadas com membranas com diferentes limites de exclusão, sendo utilizado primeiro uma membrana (Spectrapor<sup>®</sup>) com limite de exclusão de 100 kDa. Este processo originou uma fração eluída (CE-NmC: 230 mg) e uma retida (CR-NmC: 750 mg), que por sua vez foi submetida a uma nova diálise, agora em uma membrana (Spectrapor<sup>®</sup>) com limite de exclusão de 16 kDa, originando novamente uma fração eluída (16E-NmC: 170 mg) e outra retida (16R-NmC: 580 mg). A fração retida (16R-NmC) quando analisada por HPSEC-MALLS (Figura 21) apresentou um pico único em seu perfil de eluição, indicando tratar-se de uma fração homogênea, cuja massa molar ( $M_w$ ) foi de 59.000 g/mol ( $dn/dc = 0,143$ ). A fração contém arabinose (57%), manose (16%), xilose (14%) e fucose (13%) como constituintes monossacarídicos.

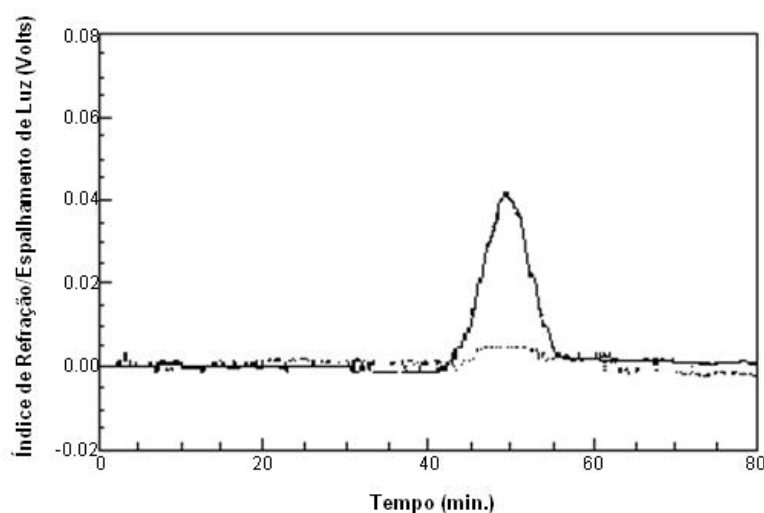


FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO 16R-NmC, OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE *Nostoc muscorum* - CIANOBIONTE (NmC), POR HPSEC-MALLS

Amostra analisada pelo detector de índice de refração (—) e espalhamento de luz, 90° (---).

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração 16R-NmC mostrou pelo menos cinco sinais de <sup>13</sup>C na região anomérica ( $\delta$  101,0, 100,9, 100,1, 99,0 e 98,5) (Figura 22). A ausência de sinais de <sup>13</sup>C em ppm mais alto que  $\delta$  101,0 sugere que as unidades de arabinose estejam presentes na forma piranosídica (GORIN; MAZUREK, 1975). A presença de fucose como indicado pela análise de composição monossacarídica pode ser reforçada pela presença de um sinal em  $\delta$  15,4, característico de grupo -CH<sub>3</sub>, e a configuração  $\alpha$  também pode ser sugerida às unidades de fucose, xilose e manose, devido à ausência de sinais de <sup>13</sup>C em ppm mais alto que  $\delta$  101,0 (GORIN; MAZUREK, 1975).

No espectro de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (dado não mostrado) pode-se observar a inversão de sinais referentes aos grupos -CH<sub>2</sub> em  $\delta$  62,6, 62,2, e 61,2, que podem ser atribuídos aos C-5 das unidades de Arap e Xylp (1→4)-ligadas (KOVAC; HIRSCH, 1980) e a C-6 livre das unidades de Map.

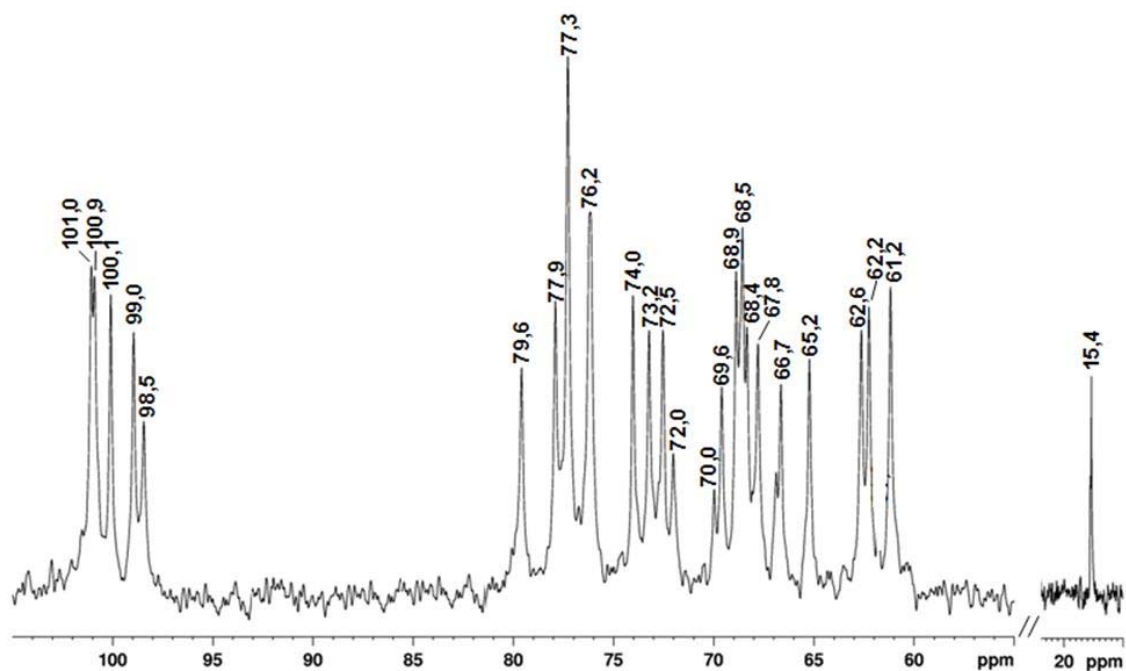


FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C-NMR DA FRAÇÃO 16R-NmC OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE *Nostoc muscorum* - CIANOBIONTE (NmC)

Amostra solubilizada em D<sub>2</sub>O (40 mg/0,4 ml), analisada a 70 °C; deslocamentos químicos expressos em δ (ppm).

Baseado na análise de metilação (Tabela 10) foi possível sugerir que o heteropolissacarídeo presente na fração 16R-NmC é principalmente formado por unidades de arabinose (2,3-Me<sub>2</sub>-Arap: 24,8 %) e xilose (2,3-Me<sub>2</sub>-Xylp: 10,6 %), ambas (1→4)-ligadas, podendo estar substituídas em O-3 (2-Me-Arap: 14,5% e 2-Me-Xylp: 6,5%). As unidades de α-L-Fucp participam principalmente como terminais não redutores (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Fucp: 23,8%), enquanto as unidades de manose encontram-se como terminais não redutores (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Manp: 2,3%) e 3-O- (2,4,6-Me<sub>3</sub>-Manp: 3,3%), 2-O- (3,4,6-Me<sub>3</sub>-Manp: 2,6%) e 4-O-substituídas (2,3,6-Me<sub>3</sub>-Manp: 8,5%).

TABELA 10 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO 16R-NmC OBTIDA DE *Nostoc muscorum* – CIANOBIOTE (NmC) E DE SEU PRODUTO DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HP3)

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados <sup>a</sup>	$t_R$ <sup>b</sup>	Fração (% <sup>c</sup> )		Tipo de Ligação <sup>d</sup>
		16R-NmC	HP3	
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Fuc	7,473	23,8	3,5	Fuc $\rho$ -(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	8,713	2,3	3,7	Man $\rho$ -(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	9,129	24,8	35,7	→4)-Ara $\rho$ -(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl	9,493	10,6	34,8	→4)-Xyl $\rho$ -(1→
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	11,363	3,3	6,4	→3)-Man $\rho$ -(1→
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	12,045	2,6	5,0	→2)-Man $\rho$ -(1→
2-Me-Ara	12,127	14,5	4,5	→3,4)-Ara $\rho$ -(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Man	12,270	8,5	—	→4)-Man $\rho$ -(1→
2-Me-Xyl	13,278	6,5	6,3	→3,4)-Xyl $\rho$ -(1→
3-Me-Man	17,649	3,1	—	→2,4,6)-Man $\rho$ -(1→

<sup>a</sup> Alditol acetatos O-Me- obtidos por metilação, seguida de hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 12 h), redução com NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> e acetilação, analisados por GC-MS (coluna DB-225).

<sup>b</sup> Tempo de Retenção em minutos.

<sup>c</sup> Percentual relativo a área de todos os picos.

<sup>d</sup> Baseada no derivado O-metilalditol acetato.

Na tentativa de elucidar a estrutura deste heteropolissacarídeo (fração 16R-NmC), foram realizadas hidrólises ácidas parciais sucessivas (1 h, cada; item 3.5.4, p. 63), originando as frações HP1, HP2 e HP3. Os produtos residuais das hidrólises (HP1, HP2 e HP3), quando analisados por GC-MS, mostraram um aumento gradual de arabinose, e decréscimo simultâneo de fucose e manose.

A análise de metilação do produto residual da hidrólise ácida parcial, HP3 (Tabela 6), mostrou uma diminuição substancial de terminais não redutores de Fuc $\rho$  (3,5%), e de unidades de Ara $\rho$  3,4-di-O-substituídas (de 14,5% para 4,5%), além da ausência de unidades de Man $\rho$  4-O-substituídas, com concomitante aumento de unidades de Ara $\rho$  e Xyl $\rho$  4-O-substituídas (de 24,8% para 35,7% e de 10,6% para 34,8%, respectivamente). Estas observações sugerem a remoção de grupos terminais não redutores de  $\alpha$ -L-Fuc $\rho$  e de unidades de  $\alpha$ -D-Man $\rho$  4-O-substituídas, as quais possivelmente estavam substituindo as unidades de L-Ara $\rho$  ou D-Xyl $\rho$ -(1→4)-ligadas em O-3.

Analisando o espectro de HSQC da fração HP3 (Figura 23), observam-se sinais na região anomérica, correspondentes a C-1/ H-1 das unidades de  $\beta$ -D-Xylp 4-O-substituídas ( $\delta$  101,0/4,56) e de  $\beta$ -L-Arap ( $\delta$  100,9/4,79), além de um sinal em campo mais alto ( $\delta$  99,2/5,42) que pode ser atribuído as unidades de  $\alpha$ -D-Manp ou  $\alpha$ -L-Fucp (GORIN; MAZUREK, 1975). Os valores das constantes de acoplamento ( $J_{C-1/H-1}$ ) para os sinais de L-Arap e D-Xylp foram  $J_{C-1,H-1} = 160,1$  Hz e  $161,7$  Hz, respectivamente, confirmando a configuração  $\beta$  (PERLIN; CASU, 1969). Em contrapartida, a constante de acoplamento  $J_{C-1,H-1}$ , referente ao sinal de D-Manp/L-Fucp foi de  $172,8$  Hz, confirmando a configuração  $\alpha$  (PERLIN; CASU, 1969).

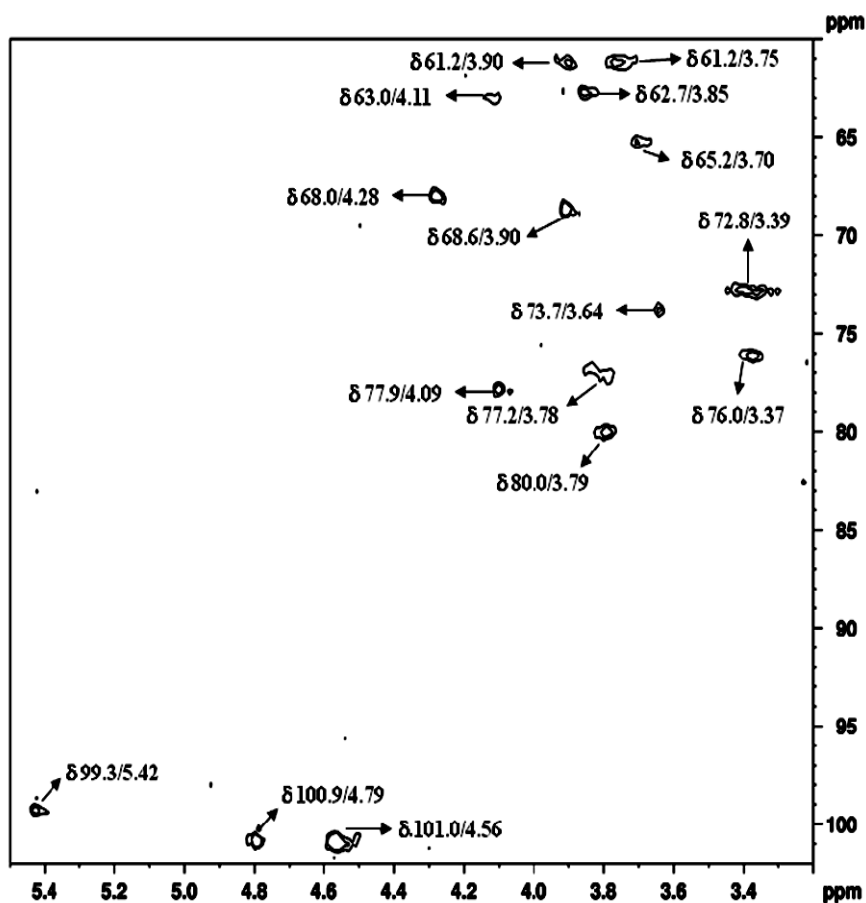


FIGURA 23 - ESPECTRO DE  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMQC DA FRAÇÃO HP3, PRODUTO DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO 16R-NmC, OBTIDA DE *Nostoc muscorum* – CIANOBIONTE (NmC)

Amostra solubilizada em  $\text{D}_2\text{O}$  (40 mg/0,4 ml), analisada a  $70^\circ\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Os dados de metilação da fração HP3 (Tabela 10, p. 99) sugerem que as unidades de  $\beta$ -L-Arap e  $\beta$ -D-Xylp estejam 4-O- e 3,4-di-O-substituídas. Os sinais de C-3 e C-4 substituídos das unidades de  $\beta$ -L-Arap e  $\beta$ -D-Xylp puderam ser observados em  $\delta$  77,9/77,2, e 80,0, respectivamente (Figura 23). O H-6 não substituído das unidades de  $\alpha$ -D-Manp aparece como um duplete em  $\delta$  3,90/3,75 ( $\delta$  61,2) (Figura 23).

No presente estudo foi descrita uma  $\beta$ -D-xilana linear produzida como EPS pelo cianobionte *Nostoc muscorum* isolado do fungo liquenizado *Peltigera canina*, quando este foi cultivado em meio BG-11, e a partir da biomassa de células foi caracterizado um heteropolissacarídeo complexo. A partir de análise de metilação e RMN-<sup>13</sup>C pode-se sugerir que este heteropolissacarídeo seja principalmente formado por unidades de  $\beta$ -L-Arap e  $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas, parcialmente substituídas em O-3 por unidades de  $\alpha$ -D-Manp, as quais encontram-se substituídas em O-2, O-3, O-4 ou O-6 por terminais não redutores  $\alpha$ -D-Manp ou  $\alpha$ -L-Fucp.

A presença de  $\beta$ -L-Arap é incomum em polímeros de cianobactérias e de ficobiontes liquênicos e poucos autores já mencionaram sua presença. A L-arabinose é um monossacarídeo predominantemente encontrado em polissacarídeos da parede celular de plantas (ISHII *et al.*, 2005), como por exemplo nas arabinoxilanas e arabinogalactanas. Também pode estar presente nas cadeias laterais de polissacarídeos pécticos como em ramnogalacturonanas I (RG-I) (RIDLEY *et al.*, 2001). Nestes polissacarídeos as unidades de arabinose são observadas principalmente na forma de  $\alpha$ -L-Araf (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Resíduos de  $\alpha$ -L-Arap são componentes quantitativamente menores quando em arabinanas de diversas plantas (ASPINALL; FAIRWEATHER; WOOD, 1968; CAPEK *et al.*, 1983; KIYOHARA; YAMADA; OTSUKA, 1987; SWAMY; SALIMATH, 1991). Unidades de 3-O- $\beta$ -L-Arabinopiranosil-L-arabinose foram isoladas a partir de hidrólises ácidas parciais de arabinogalactanas obtidas do tronco de *Larix dohurica* (ODONMAŽIG *et al.*, 1994)  $\beta$ -L-Arap (4-O- e 2,4-di-O-substituída) também foi descrita como parte de um polissacarídeo isolado da goma de exsudado produzida pelo tronco e pelo fruto de *P. persica*, e pelo tronco da nectarineira (*Prunus persica* var. *nucipersica* Schneid.) (ANDREWS; BALL; JONES, 1953; SIMAS *et al.*, 2008; SIMAS-TOSIN *et al.*, 2009), e em geral arabinopiranosose também é encontrada como terminal não redutor de galactanas pécticas (HUISMAN *et al.*, 2001).

Ambos os polímeros caracterizados para *Nostoc muscorum* – cianobionte são inéditos para *Nostoc* sp. e para cianobactérias em geral. Sendo assim, este estudo deverá contribuir para um melhor conhecimento dos polissacarídeos produzidos por cianobactérias, mais especificamente do gênero *Nostoc*. Principalmente, devido ao fato de que a estrutura e as propriedades dos polissacarídeos de cianobactérias são pouco estudadas, devido à grande diversidade estrutural e à complexidade destes polímeros.

#### 4.2.3 *Nostoc muscorum* - Vida Livre (NmL): Obtenção e Caracterização dos Exopolissacarídeos

Da mesma maneira que foi realizado para NmC, no 20º dia de cultivo os meios contendo NmL foram filtrados, separando as células do meio de cultivo, o qual foi concentrado, dialisado em membrana com poro de limite de exclusão de 8 kDa, para eliminação dos sais presentes no meio, e liofilizado. O rendimento dos EPS foi de 0,011 g.L<sup>-1</sup> (~ 1g), abaixo do rendimento observado para os EPS de NmC, que foi de 0,037 g.L<sup>-1</sup>. Desta maneira, para NmL foi realizado um cultivo maior (87 litros de meio) com a finalidade de obter uma maior quantidade de EPS. Esta diferença no crescimento de NmC e NmL pode ser explicada quando a figura 17 (p. 90) é analisada. No teste realizado com os três meios de cultivo, NmL apresentou um melhor desenvolvimento no meio Bristol's, porém o meio selecionado para o cultivo foi o BG-11, uma vez que o objetivo inicial do presente estudo foi cultivar diferentes biontes liquênicos, e comparar os polissacarídeos obtidos com aqueles descritos na literatura. Desta maneira pode-se concluir que a escolha do meio BG-11 para o cultivo de *Nostoc muscorum* - Livre, não foi tão eficiente para a produção de EPS.

A fração EPS obtida a partir do cultivo de NmL foi denominada E-NmL, e apresentou-se composta por ramnose (44,5%), arabinose (34,0%), xilose (9,0%), manose (4,7%), galactose (4,5%) e glucose (3,3%). Ao comparar as composições monossacarídicas dos EPS produzidos por *N. muscorum* cianobionte (E-NmC) e de vida livre (E-NmL), pode-se observar a presença dos mesmos monossacarídeos, com teores similares de ramnose e xilose, mas com diferentes teores de arabinose, manose, galactose e glucose (Tabela 11).

TABELA 11 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES EXOPOLISSACARÍDICAS, NmC e NmL, OBTIDAS A PARTIR DO CULTIVO DE *Nostoc muscorum* - CIANOBIONTE E DE VIDA LIVRE, RESPECTIVAMENTE

COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>						
FRAÇÃO	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
E-NmC	45,7	10,0	10,0	8,3	11,2	14,8
IE-NmC	-	-	99,8	-	-	-
E-NmL	44,5	34,0	9,0	4,7	4,5	3,3
SE-NmL	10,2	10,2	8,9	22,9	38,2	9,7
IE-NmL	9,9	10,1	9,2	13,8	19,3	37,7

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 14 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

A fração EPS bruta E-NmL (1 g) foi submetida a fracionamento por congelamento e degelo, originando uma fração solúvel (SE-NmL: 134 mg) e outra insolúvel em água fria (IE-NmL, 634 mg). SE-NmL mostrou-se composta de ramnose (10,2%), arabinose (10,2%), xilose (8,9%), manose (22,9%), galactose (38,2%) e glucose (9,7%). Já a fração IE-NmL mostrou ramnose (9,9%), arabinose (10,1%), xilose (9,2%), manose (13,8%), galactose (19,3%) e glucose (37,7%), como componentes monossacarídicos (Tabela 11), diferente da fração IE-NmC, obtida pelos mesmos processos de purificação, que apresentou apenas xilose em sua composição.

A fração SE-NmL quando analisada por HPSEC-MALLS quanto ao seu perfil de eluição (Figura 24), mostrou-se heterogênea.



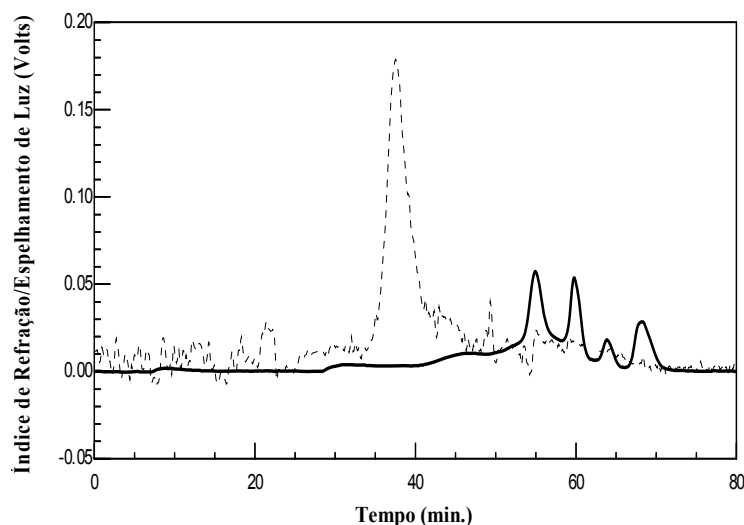


FIGURA 24 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO SE-NmL, DERIVADA DO EPS DE *Nostoc muscorum* - VIDA LIVRE (NmL), POR HPSEC-MALLS

Amostra analisada pelo detector de índice de refração (—) e espelhamento de luz, 90° (---).

Devido ao baixo rendimento da fração SE-NmL e ao seu perfil de eluição heterogêneo (Figura 24), e devido à grande insolubilidade da fração IE-NmL, não foi dada continuidade aos processos de fracionamento e purificação das frações exopolissacarídicas de *Nostoc muscorum* de vida livre (NmL), sendo o material reservado para análise futuras.

#### 4.2.4 *Nostoc muscorum* - Livre (NmL): Obtenção e Caracterização das Frações Polissacarídicas Obtidas a Partir da Biomassa de Células

A biomassa de células (5,05 g), após deslipidificação (Figura 4, p. 58) foi submetida à extração aquosa a quente (~100 °C). Os polissacarídeos presentes no extrato aquoso resultante foram precipitados pela adição de excesso de EtOH (3:1; v/v), originando a fração HW-NmL (2,8 g), a qual foi submetida a fracionamento por congelamento e degelo (Figura 25).

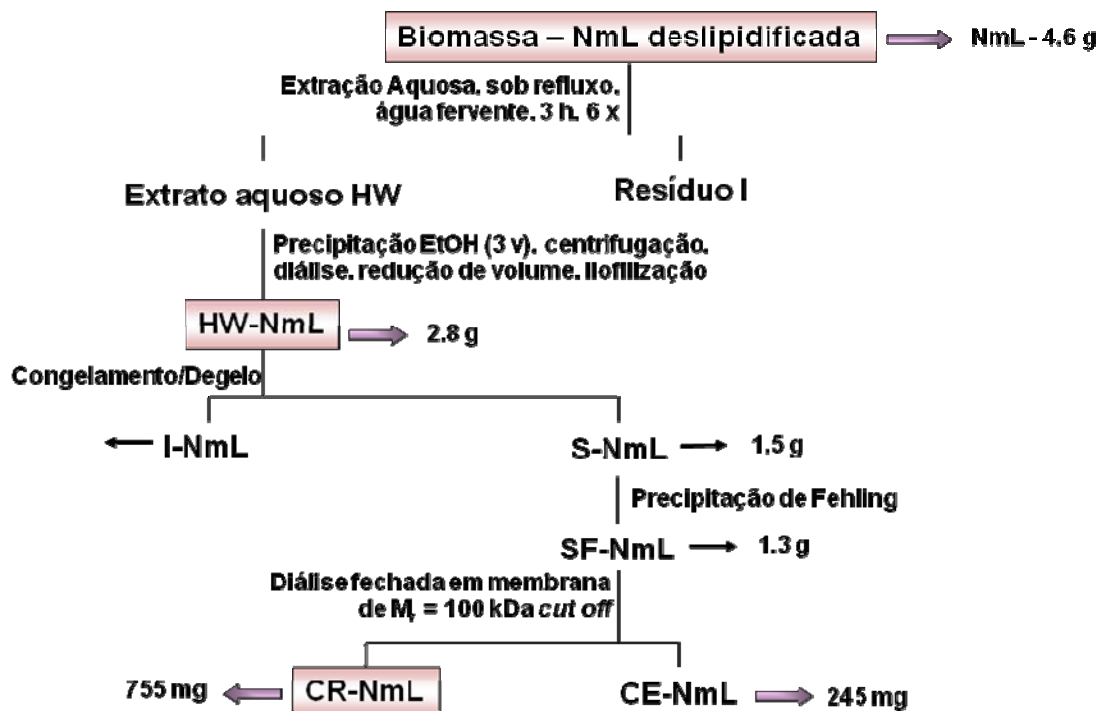


FIGURA 25 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA BIOMASSA DE *Nostoc muscorum* - VIDA LIVRE (NmL)

A fração solúvel em água fria (S-NmL: 1,5 g) foi tratada com solução de Fehling, como não houve formação de complexo cúprico insolúvel, a fração SF-NmL (1,3 g), foi fracionada por diálise fechada em membrana com limite de exclusão de 100 kDa, originando uma fração eluída (CE-NmL: 245 mg) e um material retido (CR-NmL: 755 mg). A fração CE-NmL tem como componentes monossacarídicos, ramnose (16,5%), fucose (5,4%), ribose (3,9%), arabinose (8,1%), xilose (6,2%), manose (18,3%), galactose (22,3%) e glucose (19,3%), enquanto que a fração CR-NmL apresentou os mesmos monossacarídeos, mas em proporções diferentes: ramnose (10,2%), fucose (10,1%), ribose (3,6%) arabinose (26,2%), xilose (5,2%), manose (17,8%), galactose (18,2%) e glucose (8,7%).

Quando estas frações foram analisadas por HPSEC-MALLS, ambas mostraram perfis de eluição heterogêneos (Figura 26).

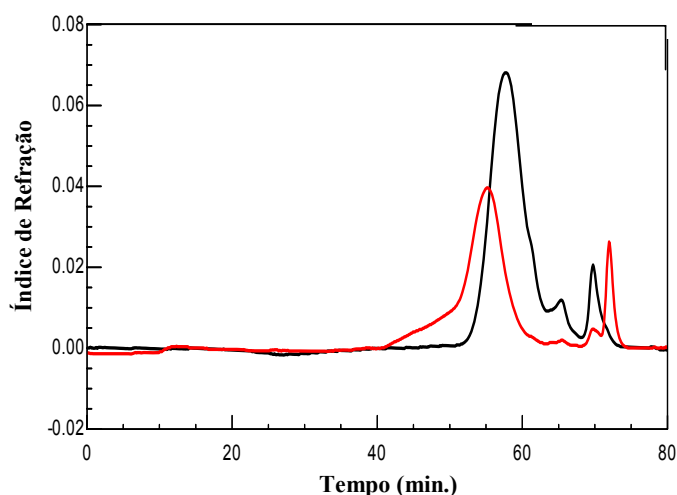


FIGURA 26 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES CE-NmL (—) e CR-NmL (—), DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc muscorum* - VIDA LIVRE (NmL), POR HPSEC.

Amostras analisadas pelo detector de índice de refração.

A fração CE-NmL por ter apresentado um perfil de eluição mais próximo ao considerado homogêneo, foi analisada por RMN-<sup>13</sup>C (Figura 27), e no seu espectro observa-se a presença de pelo menos 10 sinais na região anomérica, entre  $\delta$  102,6 - 98,4, sugerindo tratar-se de estruturas com grande complexidade estrutural.

Além dos sinais de C-1, também se observa sinais na região de  $\delta$  79,5 - 78,0, os quais podem indicar a presença de unidades substituídas em O-2, O-3 e/ou O-4. A presença de ramnose e fucose como indicado pela análise de composição monossacarídica pode ser corroborada pela presença dos sinais em  $\delta$  16,8 e 15,4, respectivamente, característicos de grupos  $\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$  (C-6) destas unidades (GORIN; MAZUREK, 1975).

No entanto, para elucidação das estruturas presentes nesta fração e nas demais polissacarídicas da biomassa de células de *N. muscorum* de vida livre, seria necessário um maior rendimento, uma vez que os dados obtidos sugerem a presença de diversos polímeros, estruturalmente complexos.

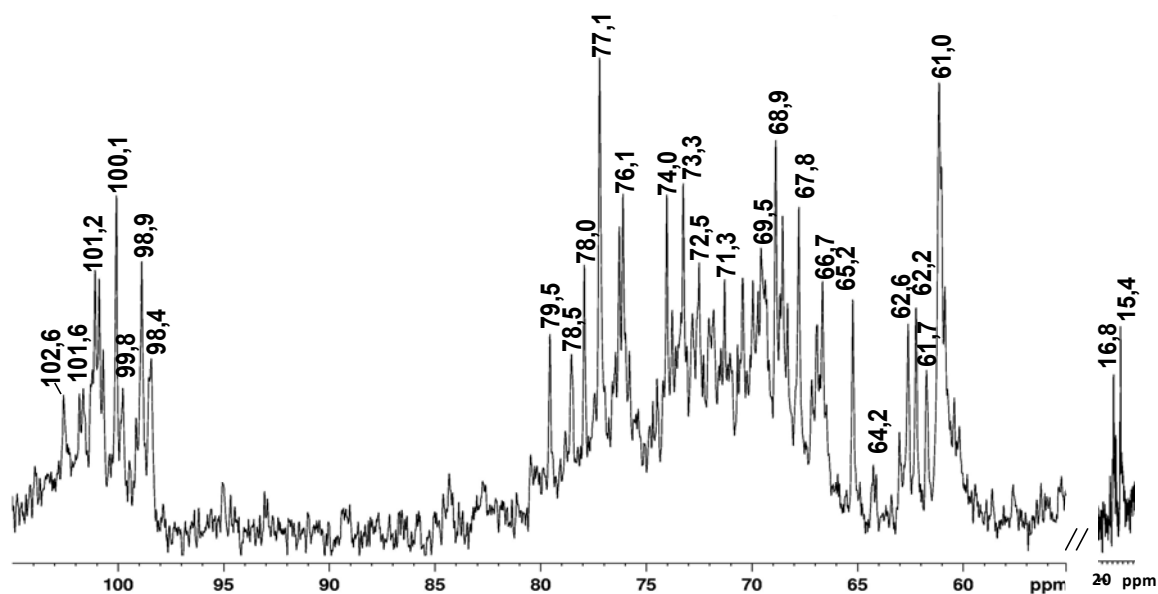


FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C-NMR DA FRAÇÃO CE-NmL, OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE *Nostoc muscorum* - VIDA LIVRE (NmL)

Amostra solubilizada em D<sub>2</sub>O (40 mg/0,4 ml), analisada a 70 °C; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

A espécie de cianobactéria *Nostoc muscorum* de vida livre, avaliada no presente trabalho, foi estudada quanto ao seu conteúdo de polissacarídeos, em 1957, por Biswas. Neste estudo, o autor determinou a composição monossacarídica de um polissacarídeo isolado a partir da parede celular das células, e descreveu o polímero como sendo constituído por glucose, galactose, arabinose, xilose, ribose, ramnose e dois açúcares não identificados (BISWAS, 1957). Composição monossacarídica semelhante foi encontrada no presente estudo ao avaliar os polissacarídeos extraídos da biomassa de células de *N. muscorum* de vida livre (NmL – UTEX 2493), exceto pela ausência de monossacarídeos que não pudessem ser identificados. Outro estudo descreve a purificação e as propriedades do glicogênio extraído de *N. muscorum* (CHAO; BOWEN, 1971).

No entanto, a caracterização da estrutura fina da maioria dos polissacarídeos de EPS e da biomassa de cianobactérias (tanto de vida livre, quanto isolada em cultivo) não é conhecida, e esta avaliação se torna fundamental para um melhor conhecimento das estruturas dos polímeros produzidos por estes

organismos. Desta maneira, estudos neste sentido são promissores e, por isso, análises futuras serão realizadas no intuito de caracterizar tais polímeros.

#### 4.3 *Nostoc* sp. - CIANOBACTÉRIA DE VIDA LIVRE: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

O terceiro material estudado no presente trabalho foi escolhido no decorrer da pesquisa, devido à sua abundância e fácil coleta no solo do Centro Politécnico - Universidade Federal do Paraná. Trata-se de uma cianobactéria, representante de *Nostoc* sp. de vida livre (Figura 28). Este material foi selecionado com o intuito de comparar seus polissacarídeos com aqueles obtidos a partir das outras espécies de *Nostoc* estudadas, que foram cultivadas em meio de cultivo BG-11.

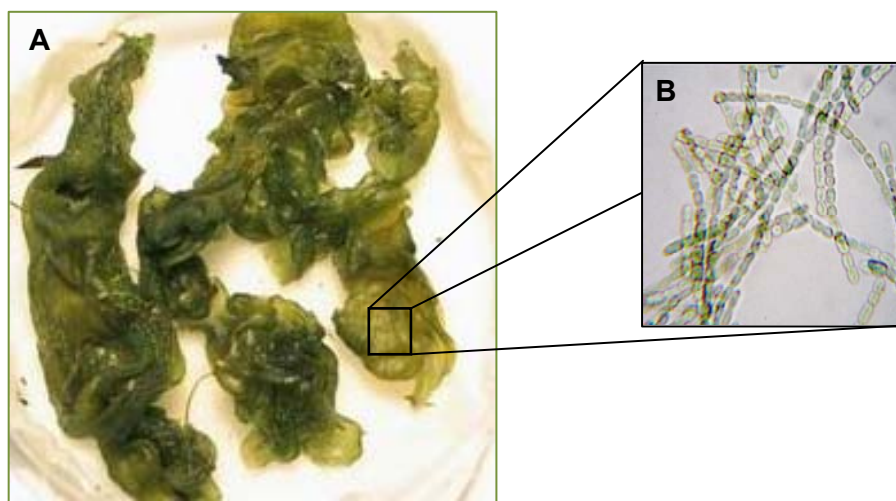


FIGURA 28 - IMAGEM DA CIANOBACTÉRIA *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE COLETADA NO SOLO (A) E EM SECÇÃO TRANSVERSAL DA BIOMASSA (B)

Microscopia óptica, aumento de 400 x.

Primeiramente a cianobactéria foi lavada por diversas vezes em água corrente, e posteriormente em solução contendo tween 80, a fim de retirar qualquer tipo de material que pudesse interferir nas análises realizadas. Em seguida, a biomassa foi liofilizada (60,2 g), moída e submetida a sucessivos processos para extração dos compostos de alta massa molecular (Figura 29).

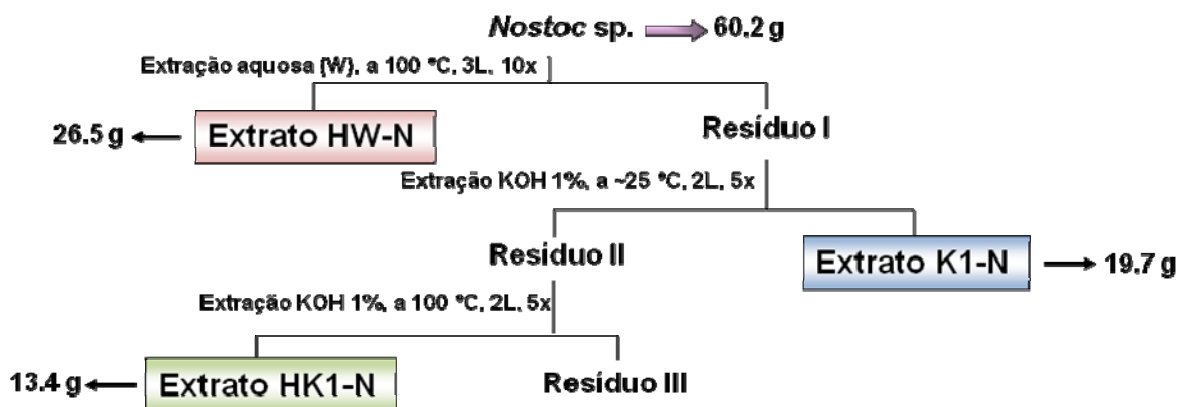


FIGURA 29 - ESQUEMA GERAL DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Nostoc sp* DE VIDA LIVRE

O extrato aquoso obtido (HW-N: 26,5 g) foi precipitado pela adição de excesso de EtOH (3 vol.; v/v). A fração polissacarídica precipitada foi resolubilizada em água destilada, dialisada contra água corrente (~ 24 h) e liofilizada (HW-N: 16,5 g). Foram observados ribose (40,2%), arabinose (2,1%), xilose (34,0%), manose (9,3%), galactose (8,2%) e glucose (6,2%), como componentes monossacarídicos (Tabela 12). O alto teor de ribose presente nesta fração chama atenção, por não ter sido observado anteriormente nas frações polissacarídicas obtidas a partir de *Nostoc muscorum* (NmC e NmL). No entanto, a ribose é bem conhecida como componente de lipo- e polissacarídeos capsulares de bactérias gram-negativas, classe em que se encontram as cianobactérias (LINDBERG, 1990; WOLUCKA; HOFFMANN, 1995; GIL-SERRANO *et al.*, 1998).

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DO EXTRATO AQUOSO (HW-N) DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>					
	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
HW-N	40,2	2,1	34,0	9,3	8,2	6,2
SHW-N	28,9	—	17,5	3,1	27,8	22,7
IHW-N	11,8	17,2	12,9	24,7	17,2	16,1

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 14 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

Em seguida, a fração HW-N foi submetida a fracionamento por congelamento e degelo (Figura 30), originando uma fração solúvel (SHW-N; 3,03 g), e outra insolúvel em água fria (IHW-N: 12,4 g). Esta última apresentou, em sua composição monossacarídica (Tabela 12), ribose (11,8%), arabinose (17,2%), xilose (12,9%), manose (24,7%), galactose (17,2%) e glucose (16,1%), mas devido à sua insolubilidade, não foi avaliada quanto à caracterização estrutural do(s) polissacarídeo(s) presentes.

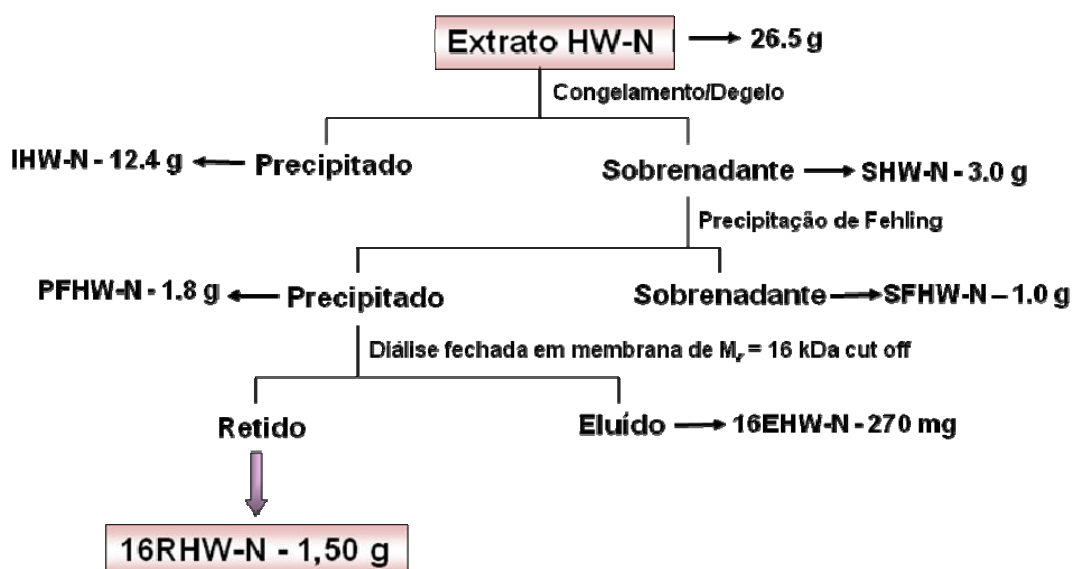


FIGURA 30 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO (HW-N) DERIVADO DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

A fração solúvel em água fria, SHW-N, quando analisada quanto a sua composição monossacarídica (Tabela 12), apresentou ribose (28,9%), xilose (17,5%), manose (3,1%) galactose (27,8%) e glucose (22,7%), e quando analisada por HPSEC-MALLS apresentou um perfil de eluição heterogêneo (Figura 31).

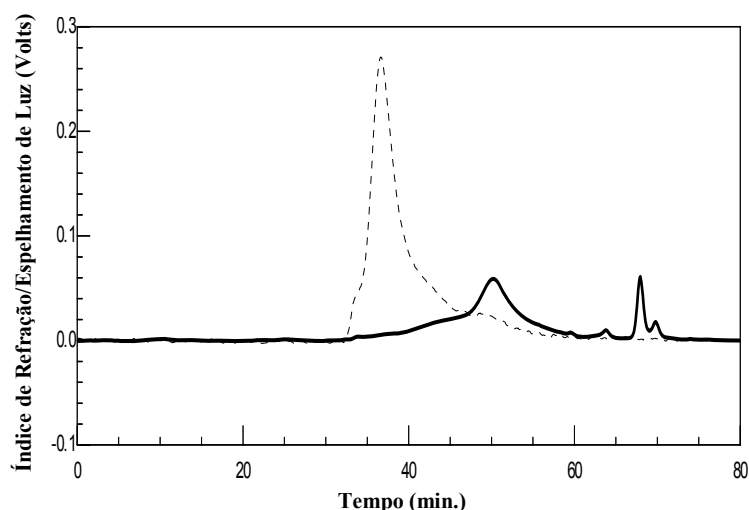


FIGURA 31 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO SHW-N, DERIVADA DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE, POR HPSEC-MALLS

Amostra analisada pelo detector de índice de refração (—) e espalhamento de luz, 90° (---).

Por apresentar uma mistura de polissacarídeos, a fração SHW-N foi submetida à precipitação com solução de Fehling, originando uma fração solúvel (SFHW-N; 1,0 g) e um complexo cúprico insolúvel (PFHW-N; 1,8 g) (Figura 30, p. 110). Ambas as frações foram analisadas quanto as suas composições monossacarídicas, as quais estão mostradas na tabela 13.

Comparando as composições monossacarídicas das duas frações, SFHW-N apresenta maiores teores de xilose (26,6%), galactose (26,6%) e glucose (29,7%), enquanto que PFHW-N tem ribose (48,6%) como principal componente, além da arabinose (16,7%), que não era observada na fração sobrenadante de Fehling (SFHW-N).



TABELA 13 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS TRATAMENTO DA FRAÇÃO SHW-N, DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE, COM SOLUÇÃO DE FEHLING

FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>					
	Rib	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác. Urônico <sup>c</sup>
SFHW-N	12,5	26,6	4,7	26,6	29,7	nd <sup>d</sup>
PFHW-N	48,6	15,3	3,3	14,2	18,6	nd <sup>d</sup>
16RHW-N	37,6	11,9	—	16,7	18,8	15,0

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 14 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

<sup>c</sup> Dosado pelo método de Filizetti-Cozzi e Carpita, 1991.

<sup>d</sup> não dosado

Ambas as frações (SFHW-N e PFHW-N) foram analisadas por HPSEC-MALLS quanto a sua homogeneidade, e apresentaram perfis de eluição heterogêneos demonstrado pelo detector de índice de refração (— e —) (Figura 32).

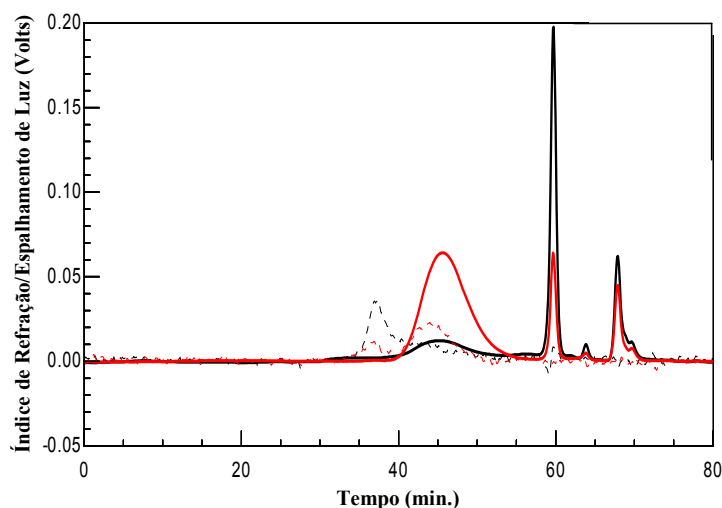


FIGURA 32 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES SFHW-N (—) e PFHW-N (—), DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE, POR HPSEC-MALLS

Analisadas pelo detector de índice de refração (—) e espalhamento de luz, 90° (---).

Analisando o perfil de eluição da fração PFHW-N, obtido por análise em HPSEC-MALLS (Figura 32), optou-se por realizar uma diálise fechada em membrana com limite de exclusão de 16 kDa (Figura 30, p. 110). Como resultado, foram obtidas uma fração eluída (16EHW-N; 270 mg) e outra retida (16RHW-N; 1,50 g) na membrana. Esta última, por sua vez, apresentou um perfil de eluição homogêneo quando analisada por HPSEC-MALLS com  $M_w = 118.700$  g/mol ( $dn/dc = 0,101$ ) (Figura 33).

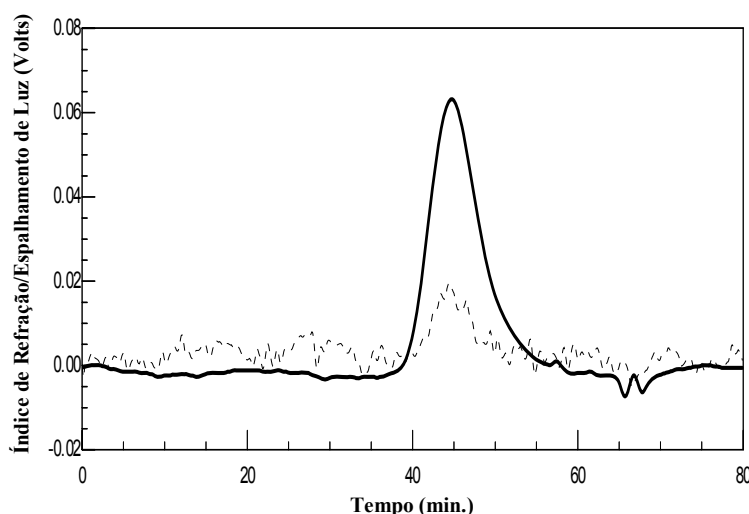


FIGURA 33 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE 16RHW-N, DERIVADA DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE, POR HPSEC-MALLS

Amostra analisada pelo detector de índice de refração (—) e espalhamento de luz, 90° (---).

A fração 16RHW-N possui ribose (37,6%), xilose (11,9%), galactose (16,7%), glucose (18,8%) e ácidos urônicos (15,0%), como componentes monossacarídicos (Tabela 13, p. 112).

Quando analisada por RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 34A), a fração 16RHW-N apresentou pelo menos 5 sinais de  $^{13}\text{C}$  na região anomérica, em  $\delta$  103,5, 103,1, 102,7, 101,1 e 99,9, os quais sugerem a presença tanto de unidades com configuração glicosídica  $\alpha$  (campo mais alto, em  $\delta$  101,1-99,9), quanto  $\beta$  (campo mais baixo, em  $\delta$  103,5-102,7).

Outros sinais observados no espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ , em  $\delta$  181,8 e 175,3 (Figura 34A), característicos de grupo  $-\text{CO}_2\text{H}$  sugerem a presença de

monossacarídeos ácidos nesta fração. Para confirmação foi realizada dosagem de ácidos urônicos (FILISSETTI-COZZI; CARPITA, 1991), que mostrou que esta fração possui, além dos monossacarídeos neutros, 15% de ácidos urônicos (Tabela 13, p. 112).

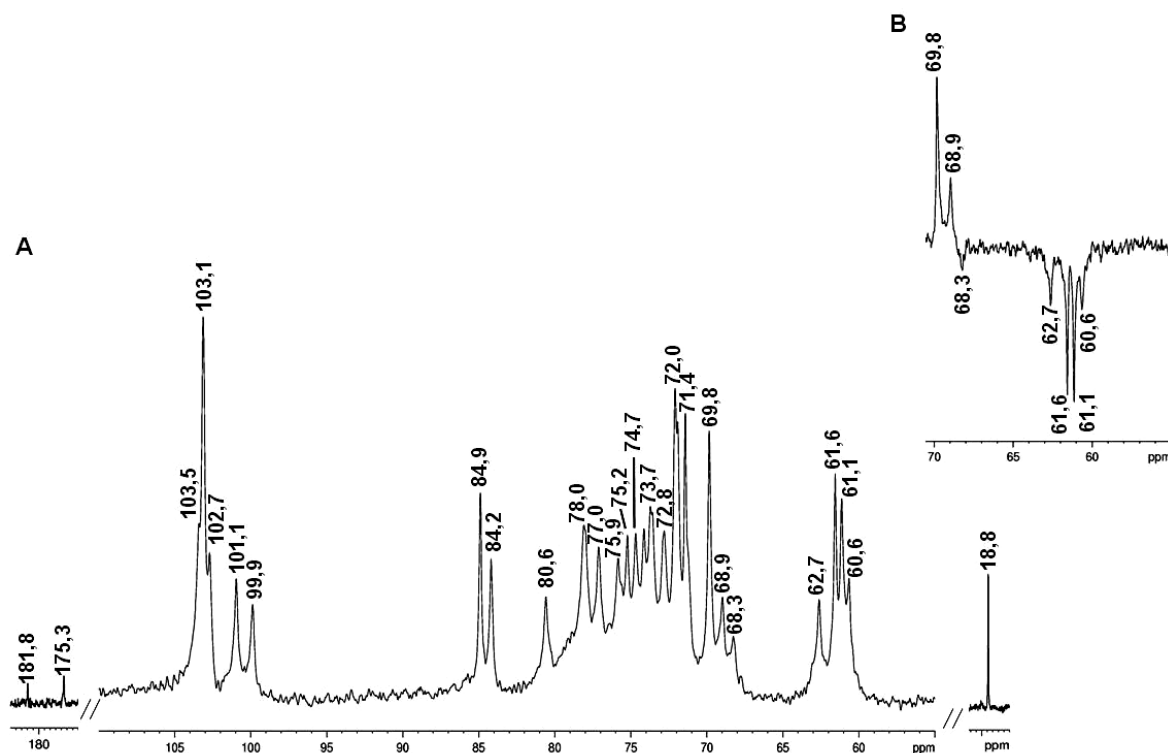


FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO 16RHW-N (A), DERIVADA DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE; DETALHE DA REGIÃO DE -CH<sub>2</sub> DO ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (B)

Amostra solubilizada em D<sub>2</sub>O (40 mg/0,4 ml), analisada a 70 °C. Deslocamentos químicos expressos em δ (ppm).

O sinal em δ 18,8 sugere a presença de grupamentos acetil (referente ao -CH<sub>3</sub>). Esta hipótese foi descartada devido à resistência do mesmo após o tratamento alcalino (KOH 1 M sob refluxo em banho com H<sub>2</sub>O fervente, por 2 h).

Os sinais em δ 84,9 e 84,2 (Figura 34A) podem ser atribuídos ao C-4 das unidades de Ribf ou de unidades com substituição em C-3. Como foi observado um teor de 37,6% na amostra (16RHW-N), o sinal em δ 84,9 pode ser atribuído ao C-4 destas unidades, devido à correlação de H-4 em δ 4,19, com um carbono em δ 84,9,

observado no experimento de HSQC (Figura 35), evidenciando assim a existência de anel furanosídico (HELM *et al.*, 2000). Devido à ausência de sinais em campo mais baixo que 103,5 ppm (Figura 34A), os quais indicariam a presença  $\beta$ -D-Rib (GORIN; MAZUREK, 1975; RITCHIE *et al.*, 1975; SERIANNI; BAKER, 1984), conclui-se que  $\alpha$ -D-Ribf é a única forma possível presente nesta fração (16RHW-N).

Desta maneira, diferente do comumente encontrado em lipo- e polissacarídeos capsulares de bactérias gram-negativas ( $\beta$ -D-Ribf) (LINDBERG, 1990; WOLUCKA; HOFFMANN, 1995; GIL-SERRANO *et al.*, 1998), na fração 16RHW-N, os resultados indicam a presença de unidades de  $\alpha$ -D-Ribf. Embora existam relatos anteriores na literatura descrevendo a presença de ribose em polissacarídeos extracelulares de cianobactérias (DePHILLIPIS; VINCENZINI, 1998), esta foi apenas comprovada quando caracterizada uma fração EPS de *Nostoc commune* (HELM *et al.*, 2000).

A análise do espectro de HSQC da fração 16RHW-N foi importante para determinar a configuração glicosídica das unidades monossacarídicas, especialmente pelos sinais referentes à H-1. Analisando a região anomérica deste espectro (Figura 35), observa-se a presença de sinais correspondentes a unidades na configuração  $\alpha$  ( $\delta$  102,9/5,44,  $\delta$  99,5/5,38) e na configuração  $\beta$  ( $\delta$  103,4/4,66,  $\delta$  103,0/4,53,  $\delta$  102,7/4,59 e  $\delta$  101,0/4,52). Os valores das constantes de acoplamento ( $J_{C-1,H-1}$ ), determinados através do experimento de HSQC acoplado (Figura 35B), confirmaram estes dados, uma vez que os sinais em  $\delta$  102,9/5,44 e  $\delta$  99,5/5,38 apresentam  $J_{C-1,H-1}$  de 177,3 e 172,4 Hz, respectivamente, indicando configuração  $\alpha$ . Em contrapartida, os sinais em  $\delta$  103,4/4,66,  $\delta$  103,0/4,53,  $\delta$  102,7/4,59 e  $\delta$  101,0/4,52 apresentam  $J_{C-1,H-1}$  = 162,4 Hz, respectivamente, indicando configuração  $\beta$  (PERLIN; CASU, 1969).

No experimento de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (Figura 34B, p. 114) foi possível observar a inversão de sinais em  $\delta$  68,3, referente à C-6 de Glcp O-substituído (Tabela 14), e em  $\delta$  62,7, referente ao C-5 das unidades de Xylp 3,4-di-O-substituídas (Tabela 14), os quais podem estar em sobreposição com os sinais de C-5 dos terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Ribf. Os sinais invertidos em  $\delta$  61,6, 61,1 e 60,6 (Figura 34B, p. 114), podem ser atribuídos aos C-6 livres das unidades de Glcp e Galp (GORIN; MAZUREK, 1975).

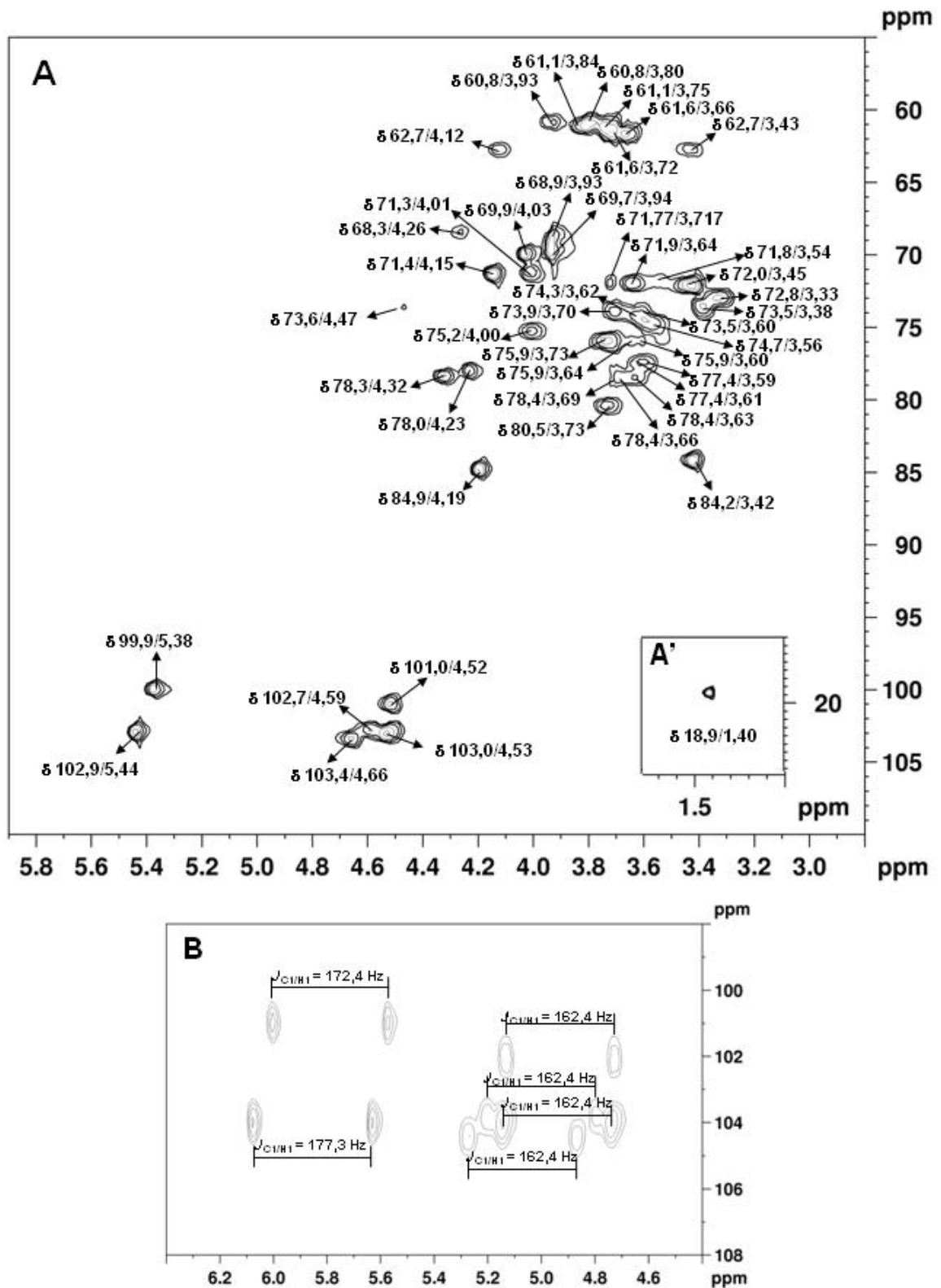


FIGURA 35 - ESPECTRO DE  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DA FRAÇÃO 16RHW-N (A), DETALHE DA REGIÃO DE ppm MAIS BAIXO ( $\delta$  18,9) (A'), E DO HSQC ACOPLADO DA REGIÃO ANOMÉRICA (B), DERIVADA DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Amostra solubilizada em  $\text{D}_2\text{O}$  (30 mg/0,4 ml), analisada em 30 °C. Deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

A análise de metilação da fração 16RHW-N (Tabela 14), sugere que este polissacarídeo é composto majoritariamente por unidades de *Glc*p-(1→4)-ligadas (2,3,6-Me<sub>3</sub>-*Glc*p, 43,6%), as quais podem apresentar substituição em O-6 (2,3-Me<sub>2</sub>-*Glc*, 8,7%). As unidades de  $\alpha$ -D-*Rib*f (2,3,5-Me<sub>3</sub>-*Rib*f, 14,1%), e em menores proporções *Glc*p (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-*Glc*p, 1,2%) e *Gal*p (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-*Gal*p, 0,7%) são observados como terminais não redutores (Tabela 14). Por outro lado, as unidades de *Xyl*p apresentam-se 3,4-di-O-substituídas (2-Me-*Xyl*p, 23,4%).

TABELA 14 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO 16RHW-N DERIVADA DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Alditol acetatos parcialmente O-metilados <sup>a</sup>	$t_R$ <sup>b</sup>	Fração (%) <sup>c</sup>	Tipo de Ligação <sup>d</sup>
		16RHW-N	
2,3,5-Me <sub>3</sub> - <i>Rib</i>	6,798	14,1	<i>Rib</i> f-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> - <i>Glc</i>	8,847	1,2	<i>Glc</i> p-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> - <i>Gal</i>	9,344	0,7	<i>Gal</i> p-(1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> - <i>Glc</i>	9,554	4,1	→6)- <i>Glc</i> p-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> - <i>Gal</i>	12,103	4,3	→4)- <i>Gal</i> p-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> - <i>Glc</i>	12,423	43,6	→4)- <i>Glc</i> p-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> - <i>Glc</i>	13,493	8,7	→4,6)- <i>Glc</i> p-(1→
2-Me- <i>Xyl</i>	17,711	23,4	→3,4)- <i>Xyl</i> p-(1→

<sup>a</sup> Alditol acetatos O-Me- obtidos por metilação, seguida de hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 14 h), redução com NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> e acetilação, analisados por GC-MS (coluna DB-225).

<sup>b</sup> Tempo de Retenção em minutos.

<sup>c</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

<sup>d</sup> Baseada no derivado O-metilalditol acetato.

Devido à existência de grupamentos ácidos (15%) na fração 16RHW-N, os dados de metilação não refletem a real estrutura do polissacarídeo, uma vez que a ligação entre monossacarídeos ácidos e neutros é bastante resistente à hidrólise ácida e, desta forma, tanto os açúcares ácidos, quanto os neutros ligados estas unidades não são detectadas na análise de GC-MS, por ficarem na forma de aldobiurônicos (BeMILLER, 1967, citado por TAYLOR; CONRAD, 1972).

Com a intenção de determinar a identidade dos ácidos urônicos presentes na fração 16RHW-N, foi realizado o processo de carboxi-redução (TAYLOR; CONRAD, 1972), originando a fração denominada 16RHW-NCR. Quando analisada quanto a sua composição monossacarídica (Tabela 15), a fração 16RHW-NCR apresentou um aumento de xilose, galactose e glucose, em relação à fração de origem, sugerindo a presença destes monossacarídeos ligados aos monossacarídeos ácidos. A fração 16RHW-NCR foi submetida à dosagem de ácidos urônicos (FILIZETTI-COZZI; CARPITA, 1991), sendo a dosagem negativa, quanto à presença de monossacarídeos ácidos nesta fração (Tabela 15).

TABELA 15 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES 16RHW-N e 16RHW-NCR DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>				
	Rib	Xyl	Gal	Glc	Ác. Urônico <sup>c</sup>
16RHW-N	37,6	11,9	16,8	18,8	15,0
16RHW-NCR	32,7	16,3	24,5	26,5	—

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 14 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

<sup>c</sup> Dosado pelo método de Filizetti-Cozzi e Carpita, 1991.

O RMN-<sup>13</sup>C (Figura 36) da fração carboxi-reduzida (16RHW-NCR), revelou a ausência do sinal de <sup>13</sup>C em δ 175,3, entretanto o sinal em δ 181,8 permaneceu. Além do desaparecimento do sinal em δ 175,3, pode-se observar a presença de um terceiro sinal na região de C-3 substituído, ou de C-4 de Ribf em δ 84,5 e de um segundo sinal característico de grupo -CH<sub>3</sub> em δ 16,6.

Uma vez que a dosagem de ácidos urônicos foi negativa para a fração 16RHW-NCR (Tabela 15), mas no espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 36) um sinal em δ 181,8, ainda podia ser observado, foi iniciada uma investigação, a fim de descobrir a

origem deste sinal, bem como a origem do sinal em  $\delta$  18,8 característico de grupo  $\text{-CH}_3$ .

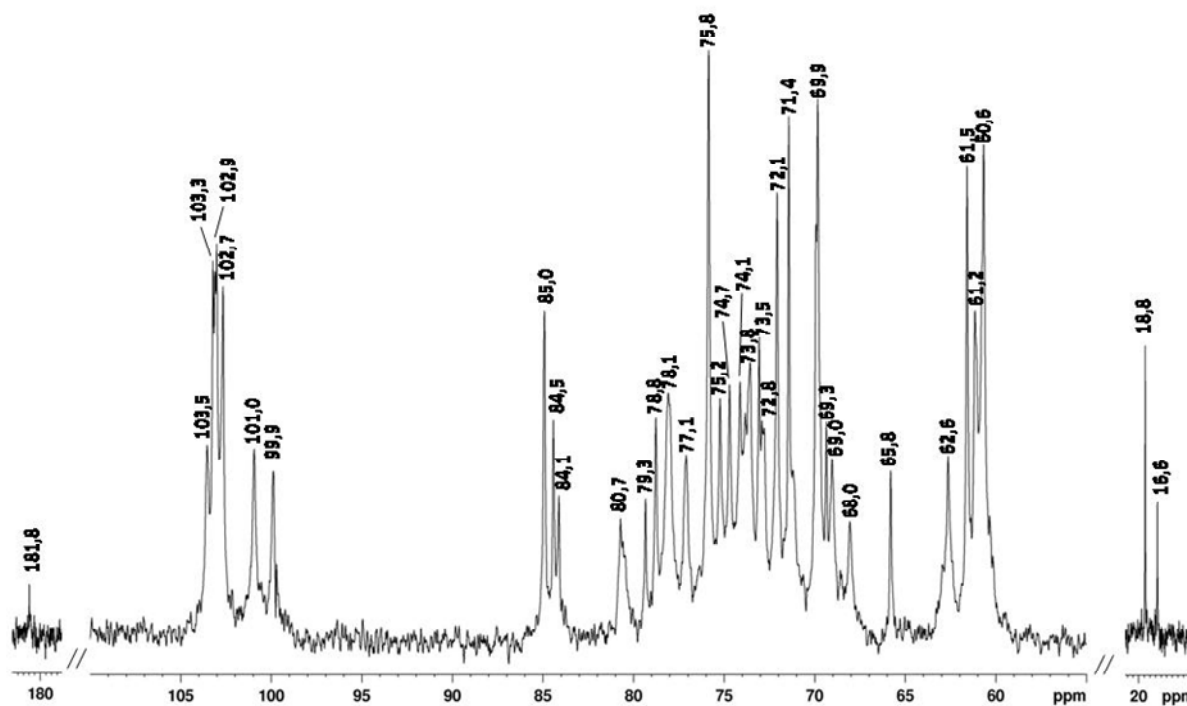


FIGURA 36 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO 16RHW-NCR DERIVADA DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Amostra solubilizada em D<sub>2</sub>O (40 mg/0,4 ml), analisada a 70 °C. Deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Tendo como base os assinalamentos de RMN-<sup>13</sup>C obtidos para uma estrutura isolada a partir de uma fração exopolissacarídica de *Nostoc commune* (HELM *et al.*, 2000), a presença de um monossacarídeo incomum denominado ácido nosturônico (NosA) (Figura 37) pode ser sugerida na fração 16RHW-N.

O ácido nosturônico (3-O-lactil D-ácido glucurônico), em sua estrutura é formado por uma hexose ácida, a qual se apresenta substituída em O-3 por um grupo lactil (Figura 37), podendo esta substituição ocorrer em outra posição (HELM *et al.*, 2000).



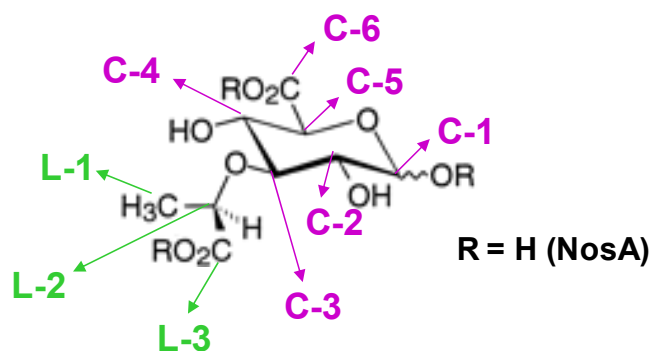


FIGURA 37 - ESTRUTURA DO ÁCIDO NOSTURÔNICO (NosA)

FONTE: HELM *et al.*, 2000.

C-1 a C-6 referem-se aos carbonos da unidade de ácido glucurônico; L-1 a L-3 referem-se aos carbonos do grupo lactil.

Desta maneira os sinais em  $\delta$  181,8, 175,3, 84,2 e 18,8 observados no espectro de 16RHW-N (Figura 34, p. 114) podem ser atribuídos ao L-3, C-6, C-3 e L-1, respectivamente do ácido nosturônico (NosA) (HELM *et al.*, 2000).

Para confirmar a presença do NosA na fração 16RHW-N, primeiramente foi realizada uma hidrólise ácida parcial com HCl 0,5 M. A partir do material parcialmente hidrolisado foi realizada análise de ESI-MS, e através dos fragmentos de massa obtidos foi possível sugerir a presença de algumas estruturas oligossacarídicas (Figura 38), que fazem parte do polissacarídeo presente na fração 16RHW-N.

Pela análise de ESI-MS, e conhecendo a composição desta fração (16RHW-N), pode-se observar que após a hidrólise ácida parcial houve a formação de um dissacarídeo (Figura 38A) e dois trissacarídeos (Figura 38B e C), evidenciada pela presença dos íons negativos com  $m/z$  427, 603 e 589, respectivamente (Figura 38).

Pela análise de MS-MS do íon molecular  $m/z$  427 observa-se a presença dos íons com  $m/z$  de 247 e 89 (Figura 38A). O íon  $m/z$  247 corresponde à  $m/z$  de uma hexose ácida ligada a um grupo lactil e o íon  $m/z$  89 é consistente com a presença do grupamento lactil. Desta maneira o íon molecular  $m/z$  427 representa a estrutura de um dissacarídeo formado por uma hexose neutra, ligada a uma hexose

ácida, a qual se apresenta substituída por um grupo lactil (Figura 38A).

O íon com  $m/z$  603 apresenta como íons filhos  $m/z$  531, 409, 356, 321, 247, 193, 89 (Figura 38B). O íon  $m/z$  247 corresponde à  $m/z$  de uma hexose ácida ligada a um grupo lactil e o íon  $m/z$  89 é consistente com a presença do grupamento lactil, enquanto o íon  $m/z$  193 refere-se a uma hexose ácida não substituída por grupo lactil. O íon  $m/z$  531 é consistente com a massa do trissacarídeo formado pelo açúcar ácido representado pela fragmentação  $m/z$  247 sem o grupo lactil, que estaria ligado a uma hexose neutra, que por sua vez estaria ligada a outra hexose ácida. O íon  $m/z$  409 corresponde à hexose ácida substituída pelo grupo lactil ligada a uma hexose neutra, enquanto que o íon  $m/z$  356 corresponde à massa desta hexose neutra ligada ao açúcar ácido não substituído por grupo lactil (Figura 38B). Desta maneira, o íon molecular  $m/z$  603 é consistente com a massa de um trissacarídeos composto por uma hexose ácida substituída por um grupo lactil, ligada a uma hexose neutra, que por sua vez estaria ligada a uma hexose ácida (Figura 38B).

O íon com  $m/z$  589 apresenta íons filhos com  $m/z$  427, 409, 247 e 89 (Figura 38C) atribuídos anteriormente a um dissacarídeo formado por uma hexose neutra, ligada a uma hexose ácida, a qual se apresenta substituída por um grupo lactil (Figura 38A), à hexose ácida substituída pelo grupo lactil ligada a uma hexose neutra, a uma hexose ácida ligada a um grupo lactil e ao grupamento lactil, respectivamente. Desta maneira o íon molecular  $m/z$  589 refere-se a um trissacarídeo composto por uma hexose neutra, ligada a uma hexose ácida substituída pelo grupo lactil, que por sua vez estaria ligada a outra hexose neutra (Figura 38C).

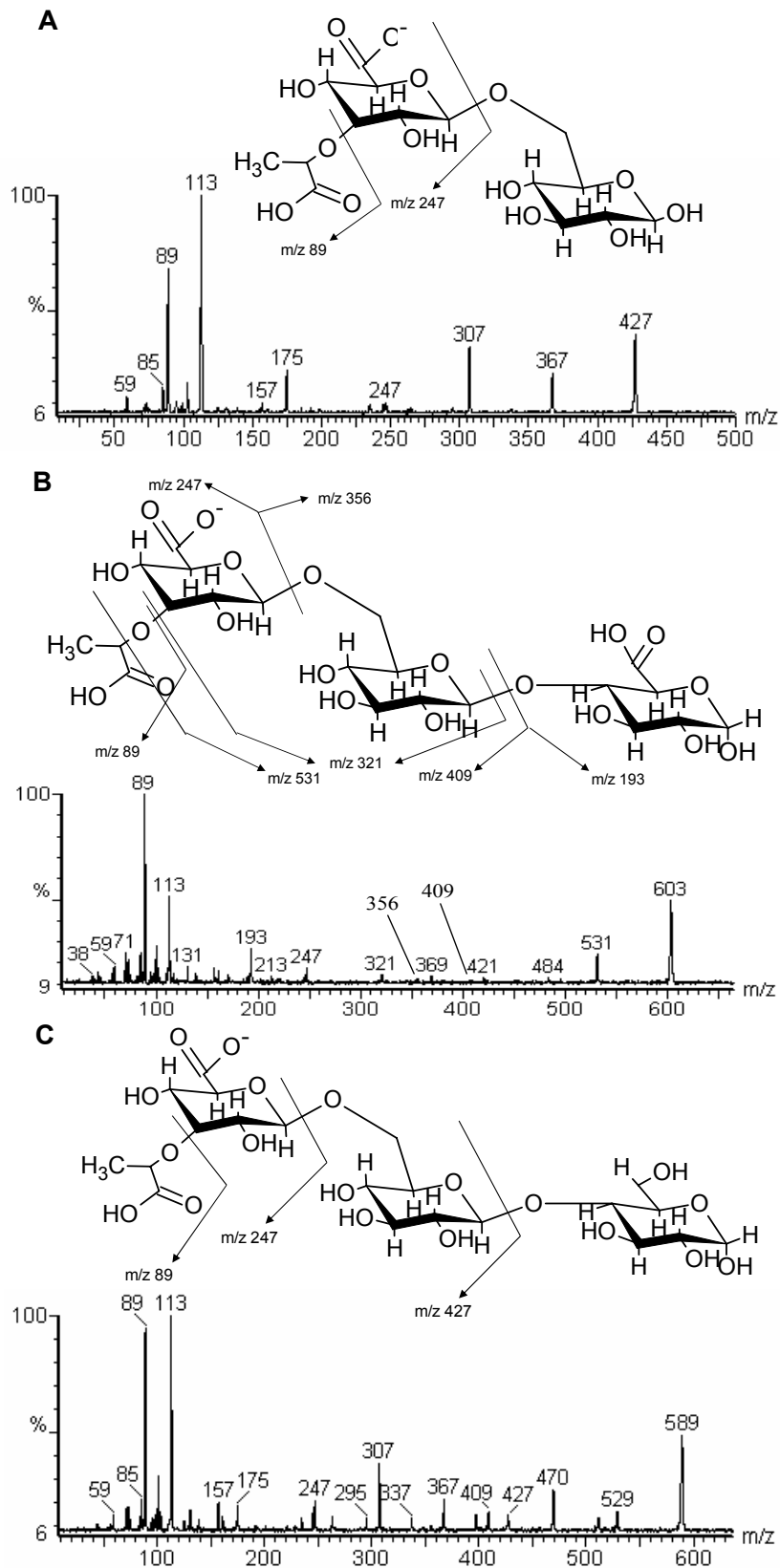


FIGURA 38 - ESPECTROS DE ESI-MS/MS DE UM DISSACARÍDEO (A) E DE TRISSACARÍDEOS (B e C) OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE ÀCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO 16RHW-N DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Adicionalmente, através da análise de uma fração obtida após metanólise de 16RHW-N a presença do NosA foi confirmada. Este procedimento foi realizado com o objetivo de isolar o NosA, uma vez que na forma de metil éster, o processo de purificação em sílica gel-60 torna-se mais eficiente.

Os produtos da metanólise foram aplicados na coluna de sílica gel 60 e eluídos com uma mistura de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (99:1 até 80:20 v/v). As frações eluídas foram coletadas em tubos de ensaio (10 ml cada), e analisadas por TLC (Figura 39).

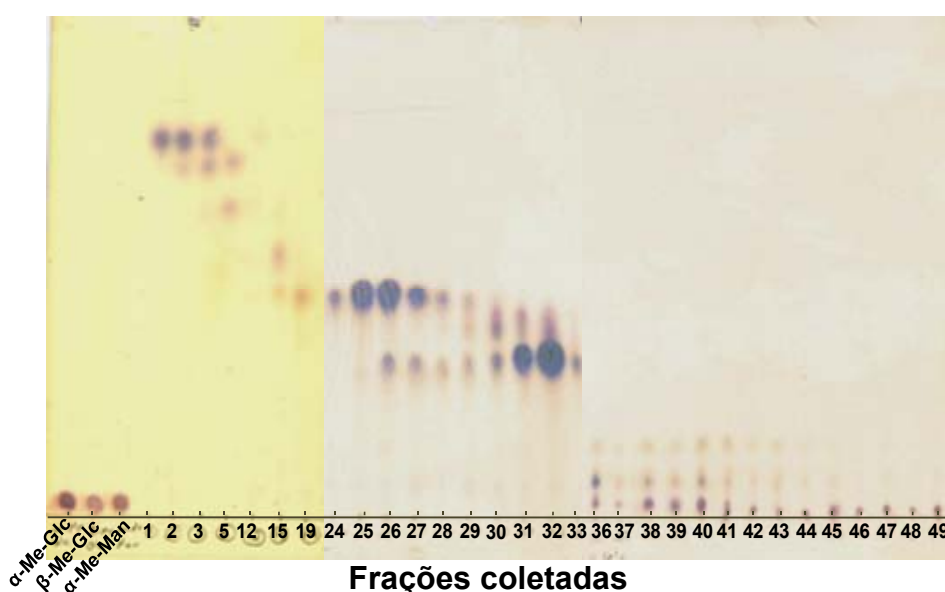


FIGURA 39 - TLC DOS PRODUTOS DE METANÓLISE DA FRAÇÃO 16RHW-N de *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE, SEPARADOS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SILICA GEL-60

Solvente:  $\text{CHCl}_3$ :EtOH (90:10, v/v); orcinol foi utilizado como revelador.

Após análise por TLC, a fração correspondente ao tubo 1 foi evidenciada por uma única banda (Figura 39), sugerindo a presença de um composto isolado, e foi selecionada por apresentar um maior deslocamento, quando a TLC foi eluída com  $\text{CHCl}_3$ :EtOH (90:10, v/v), como solvente, indicando a presença de um composto com maior número de grupamentos  $\text{CH}_3$ , introduzidos após a metanólise. Esta amostra foi analisada por ESI-MS (modo +) (Figura 40) e mostrou um perfil de fragmentação com um íon molecular de  $m/z$  315  $[\text{M}+\text{Li}]^+$  (Figura 40). Conhecendo a estrutura do

NosA, sugere-se que o íon pseudo-molecular com  $m/z$  315  $[M+Li]^+$  é referente ao derivado metil éster do ácido nosturônico (Figura 40). Além do íon molecular, pela análise de MS/MS se observa o fragmento com  $m/z$  283  $[M+Li]^+$ , referente ao derivado metil éster da hexose ácida e o fragmento  $m/z$  111  $[M+Li]^+$ , referente ao derivado metil éster do grupo lactil (Figura 40).

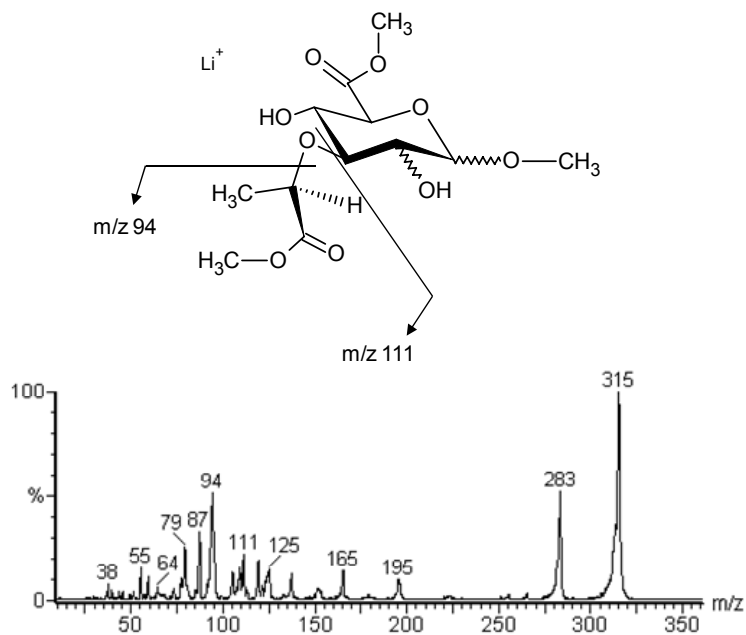


FIGURA 40 - ESPECTRO DE ESI-MS/MS DO ÁCIDO NOSTURÔNICO (modo +) ISOLADO A PARTIR DA FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADA DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

A fração contendo o ácido nosturônico isolado foi analisada por RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC (Tabela 16), e os assinalamentos de seus  $^1H$  e  $^{13}C$  estão mostrados em comparação com os assinalamentos obtidos por Helm e colaboradores (2000), quando estes autores fizeram a síntese do ácido nosturônico (anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ ) (Tabela 16).

Comparando os assinalamentos obtidos para o ácido nosturônico isolado a partir da fração 16RHW-N, com aqueles obtidos para os anômeros  $\alpha$ -NosA e  $\beta$ -NosA (Tabela 16) (HELM *et al.*, 2000), observa-se que o NosA isolado a partir da metanólise realizada sobre a fração 16RHW-N apresenta-se na configuração glicosídica  $\alpha$  (Tabela 16). A configuração  $\alpha$  também se mostrou predominante,

quando Helm e colaboradores (2000) sintetizaram este composto, sugerindo que este anômero possa ser a forma mais estável. Em contrapartida, ao analisar os espectros de RMN obtidos para a fração 16RHW-N, a configuração  $\beta$ , é a única possível para NosA, uma vez que não observa-se o sinal em  $\delta$  82,5 que caracteriza o C-3 das unidades do ácido glucurônico substituído por grupo lactil em O-3 na configuração  $\alpha$  (HELM *et al.*, 2000). Desta maneira, baseando-se nos sinais observados no espectro de HSQC da fração 16RHW-N (Figura 35, p. 116), os sinais em  $\delta$  103,0/4,53 e  $\delta$  84,2/3,48 podem ser atribuídos ao C-1/H-1 e C-3/H-3 substituído, respectivamente das unidades de  $\beta$ -D-NosA presentes na fração 16RHW-N (HELM *et al.*, 2000)

TABELA 16 - DADOS DE RMN-<sup>13</sup>C E <sup>1</sup>H DO ÁCIDO NOSTURÔNICO PRODUZIDO POR METANÓLISE DA FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

COMPOSTO	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	L-1	L-2	L-3
NosA <sup>a</sup>	100,48	71,45	82,41	71,57	71,45	172,33	18,9	77,81	177,0/176,31
$\alpha$ -NosA <sup>b</sup>	100,48	71,41	82,49	71,47	71,41	172,38	19,04	77,97	177,07
$\beta$ -NosA <sup>b</sup>	104,22	73,3	84,88	71,51	75,22	171,56	19,13	78,08	177,1
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	L1	L2	L3
NosA <sup>a</sup>	4,92	3,75	3,75	3,73	4,26	3,91	1,49	4,56	1,49/3,85
$\alpha$ -NosA <sup>b</sup>	4,838	3,612–3,695			4,217	–	1,419	4,466	–
$\beta$ -NosA <sup>b</sup>	4,412	3,374	3,511	3,687	4,072	–	1,425	4,479	–

<sup>a</sup> Solúvel em D<sub>2</sub>O (3 mg/0,4 ml), analisada a 50 °C, deslocamentos químicos em  $\delta$  (ppm).

<sup>b</sup> Solúvel em D<sub>2</sub>O, analisada a 27 °C, deslocamentos químicos em  $\delta$  (ppm) (HELM *et al.*, 2000).

O monossacarídeo 4-O-lactil-manurônico, semelhante ao ácido nosturônico, foi descrito anteriormente no exopolissacarídeo de *Cyanospira capsulata* (GAROZZO *et al.*, 1998), enquanto que o derivado 3-O-lactil-glucurônico foi descrito no EPS de uma estirpe de *Alteromonas* sp. (DUBREUCQ; DOMON; FOURNET, 1996) e de *Nostoc commune* (HELM *et al.*, 2000), passando a ser denominado ácido nosturônico (NosA).

Como ambos, *Alteromonas* sp. e *N. commune* são denominados organismos de ambientes extremos, acredita-se que o ácido nosturônico ou os ácidos urônicos

substituídos por grupamentos lactil, podem desempenhar papéis fundamentais na habilidade destes organismos em sobreviver sob condições drásticas (HELM *et al.*, 2000).

Sendo assim, Helm e colaboradores (2000) levantaram a questão, do porque um polissacarídeo envolvido na proteção de um organismo de ambiente extremo tem um monossacarídeo tão lábil como a ribose em sua estrutura. Existe a possibilidade, de que este açúcar possa proteger as unidades glicosídicas vizinhas das hidrolases mais comuns. Uma vez que polissacarídeos contendo ribose, não sofreram ação de hidrolases, enquanto polissacarídeos que tiveram as unidades de ribose previamente removidas sofreram ação das mesmas hidrolases (HUANG *et al.*, 2000). Outra possibilidade é que, *N. commune* esteja limitada à ambientes neutros e/ou alcalinos, onde a natureza ácido-lábil da ribose não se torna um fator importante.

Os sinais característicos da presença do ácido nosturônico ( $\delta$  181,8, 175,3, 84,2 e 18,8), também foram detectados em frações polissacarídicas isoladas a partir dos talos liquênicos de *Leptogium azureum* e *L. denticulatum* (CARBONERO, 2005), sendo que ambos contem, como simbiote liquênico, a cianobactéria do gênero *Nostoc*.

Uma vez identificada a presença de NosA, buscou-se elucidar a estrutura química fina do polissacarídeo presente na fração 16RHW-N. Para isso, ela foi submetida a oxidação com periodato de sódio, seguida por Degradação controlada de Smith, originando a fração degradada DSHW-N, composta majoritariamente por eritritol (Tabela 17), indicando que a maior parte do polissacarídeo, resultante do processo de degradação, apresenta-se (1→6) ligada.

TABELA 17 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES 16RHW-N E DSHW-N, DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>						
	Gly	Ery	Rib	Xyl	Gal	Glc	Ác. Urônico <sup>c</sup>
16RHW-N	—	—	37,6	11,9	16,7	18,8	15,0
DSHW-N	9,9	87,1	—	2,5	—	0,6	Nd <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 14 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

<sup>c</sup> Dosado pelo método de Filizetti-Cozzi e Carpita, 1991.

<sup>d</sup> nd – Não dosado.

Na figura 41 são comparados os espectros de RMN-<sup>13</sup>C das frações 16RHW-N (A) e DSHW-N (B).

O sinal de <sup>13</sup>C em δ 84,9, referente ao C-4 das unidades de α-D-Ribf não foi observado no espectro da fração DSHW-N (Figura 41B), concordando com os dados de composição monossacarídica (Tabela 17) e confirmando que as unidades de α-D-Ribf estão ligadas a cadeia do polissacarídeo (16RHW-N) como terminais não redutores. Os sinais em δ 101,0 e 99,0 ppm na região de carbono anomérico e em δ 71,4, 69,9 e 68,9, presentes na fração 16RHW-N estão ausentes na fração DSHW-N (Figura 41B).

O produto de degradação (DSHW-N) apresentou um espectro de RMN-<sup>13</sup>C com dezoito sinais de <sup>13</sup>C de maior intensidade, três destes sinais são referentes aos carbonos do tipo -C<sub>H</sub>2 (δ 61,3, 65,1 e 68,7). Como o produto de degradação DSHW-N possui altos teores de eritritol, o sinal em δ 61,3 pode ser atribuído ao C-1 deste, observado na forma de -C<sub>H</sub>2, além deste, os demais sinais das unidades de eritritol também puderam ser assinalados, C-2 em δ 80,5, C-3 em δ 68,7 e C-4 em δ 70,6 (HELM *et al.*, 2000).

A presença de xilose evidenciadas pela análise composição monossacarídica da fração DSHW-N (Tabela 17), é consistente, devido ao fato destas unidades se apresentarem, principalmente, 3,4-di-O-substituídas por terminais não redutores de α-D-Ribf confirmado pela presença do derivado per-O-metilado 2-Me-Xylp na fração 16RHW-N (Tabela 14, p. 117). Desta maneira, os



sinais referentes às unidades de xilose (Tabela 17) também puderam ser assinalados a partir do espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração DSHW-N (Figura 41B), em  $\delta$  102,7, 72,3, 73,3, 70,6 e 65,1, referentes à C-1, C-2, C-3, C-4 e C-5, respectivamente (KOVAC; HIRSCH, 1980; HELM *et al.*, 2000).

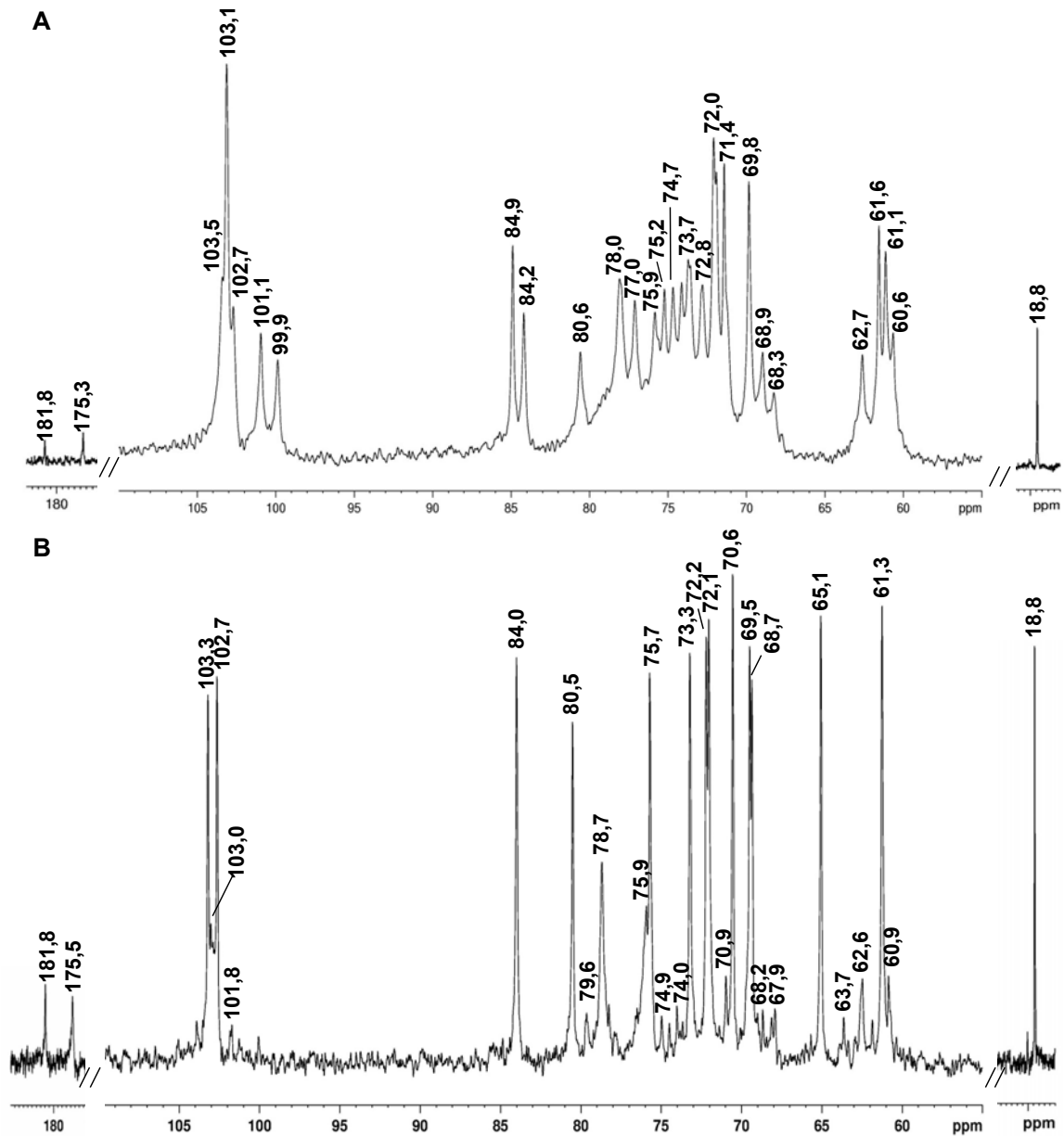


FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES 16RHW-N (A), DSHW-N (B), DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Amstras solubilizadas em D<sub>2</sub>O (40 mg/0,4 ml), analisadas a 70 °C. Deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Uma vez que o ácido nosturônico (NosA) não contém hidroxilas vicinais livres, ele é resistente a oxidação por periodato de sódio, sendo assim, sua presença é evidenciada, pelos seus sinais típicos em  $\delta$  181,8, 175,5, 84,0 e 18,8 (Figura 41B), referentes a L-3, C-6, C-3 e L-1, respectivamente. Ainda, comparando os assinalamentos obtidos no espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração DSHW-N com dados da literatura todos os sinais referentes ao ácido nosturônico puderam ser assinalados, sendo em  $\delta$  103,3 - C-1, 72,2 - C-2, 84,0 - C-3, 69,5 - C-4, 75,7 - C-5, 175,5 - C-6, 18,8 - L-1, 78,7 - L-2 e 181,8 - L-3 (HELM *et al.*, 2000).

Os dados de composição monossacarídica da fração DSHW-N (Tabela 17, p.127) em conjunto com os assinalamentos de RMN-<sup>13</sup>C (Figura41B) indicam a presença de uma estrutura composta por eritritol, xilose e ácido nosturônico, baseado em dados da literatura, pode-se sugerir que a estrutura resistente a degradação de Smith seja representada pelo fragmento representado na figura 42.

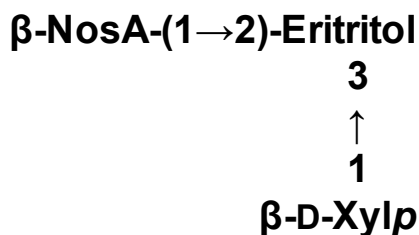


FIGURA 42 - FRAGMENTOS REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA RESISTENTE APÓS DEGRADAÇÃO DE SMITH DA FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Devido à presença de ácido nosturônico na fração 16RHW-N, sua composição monossacarídica, e seus dados de metilação não condizem com sua verdadeira composição, uma vez que este monossacarídeo não é detectado quando analisado por GC-MS (nas condições usadas neste trabalho). Desta maneira, os resultados apresentados representam apenas parte da estrutura polissacarídica, deixando parte desta ainda desconhecida.

Para melhor elucidar a estrutura do polissacarídeo 16RHW-N, sucessivas hidrólises ácidas parciais foram realizadas, como descrito no item 3.8.1 (Materiais e Métodos, p. 66).

Os produtos das sucessivas hidrólises ácidas parciais, 30HW-N, 60HW-N e 90HW-N foram analisadas quanto à composição monossacarídica, em comparação com a fração nativa 16RHW-N (Tabela 18). Os dados de composição monossacarídica mostram que com os processos de hidrólise adotados, as unidades de ribose foram removidas, principalmente por estarem presentes na fração 16RHW-N, como terminais não redutores (Tabela 18). Além disso, é possível observar um aumento de glucose em todos os produtos de hidrólise (Tabela 18).

TABELA 18 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO 16RHW-N E DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL, DERIVADOS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>				
	Rib	Xyl	Gal	Glc	Ác. Urônico <sup>c</sup>
16RHW-N	37,6	11,9	16,7	18,8	15,0
30HW-N	6,3	23,2	30,5	40,0	nd <sup>d</sup>
60HW-N	4,2	22,1	32,6	41,1	nd <sup>d</sup>
90HW-N	—	22,2	31,3	46,5	nd <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 14 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

<sup>c</sup> Dosado pelo método de Filizetti-Cozzi e Carpita, 1991.

<sup>d</sup> nd – Não dosado.

Assim como observado na tabela de composição monossacarídica (Tabela 18), nos espectros de RMN-<sup>13</sup>C das frações 30, 60 e 90HW-N pode-se observar a diminuição do sinal em  $\delta$  84,9 referente as unidades de  $\alpha$ -D-Ribf, até seu total desaparecimento (Figura 43B, C e D, respectivamente). A total remoção das unidades de  $\alpha$ -D-Ribf corrobora os dados de metilação que mostram que estas unidades estão ligadas à cadeia polissacarídica em uma posição mais externa, ou seja, como terminais não redutores.

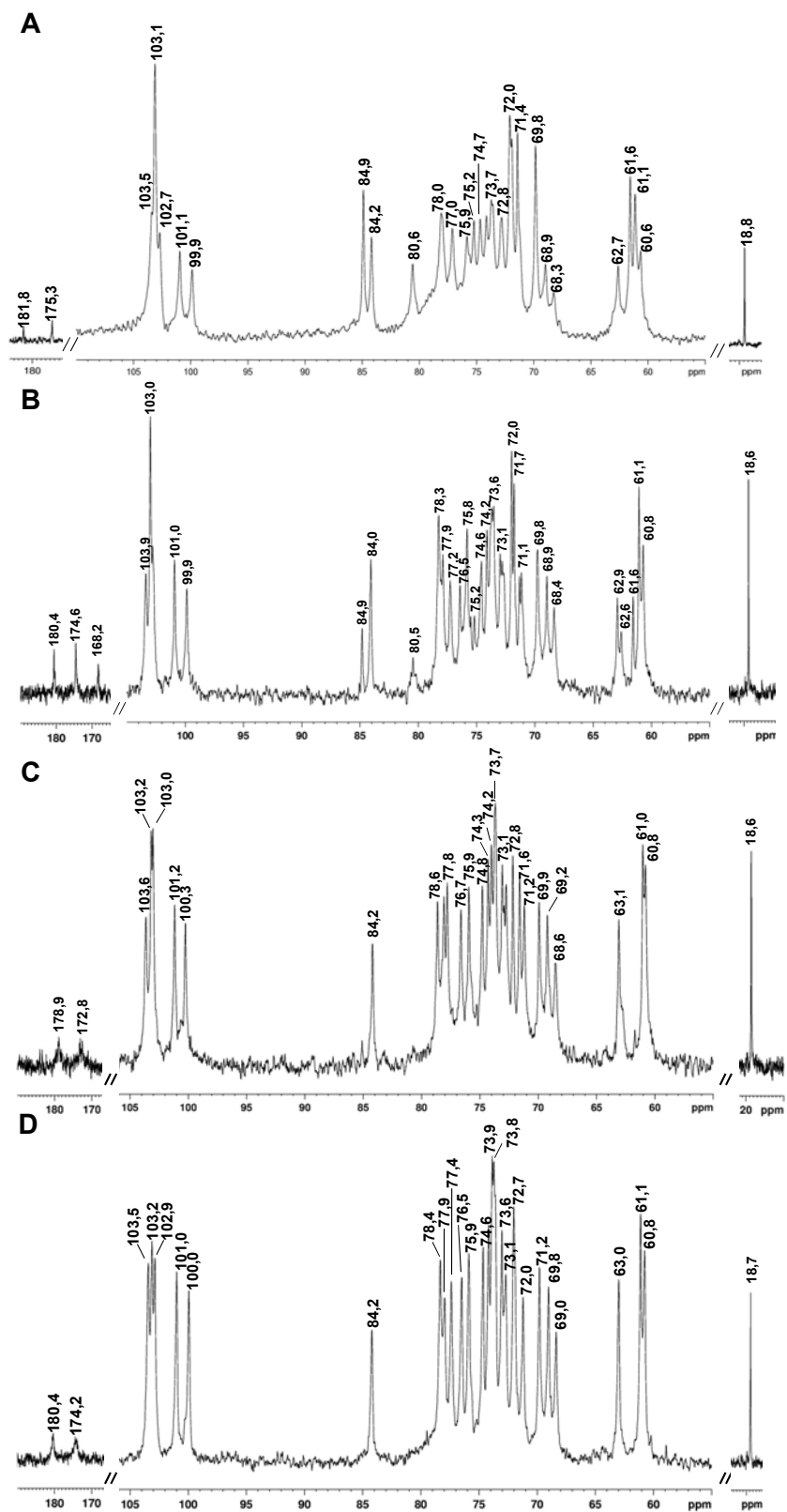


FIGURA 43 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES 16RHW-N (A), 30HW-N (B), 60HW-N (C) E 90HW-N (D), DERIVADAS DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Amostras solubilizadas em D<sub>2</sub>O (40mg/0,4ml), analisadas a 70°C. Deslocamentos químicos expressos em δ(ppm).

No espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração 90HW-N (Figura 43D), também foi possível observar a diminuição do número de sinais referentes aos grupos  $-\underline{\text{CH}}_2$  livres, entre  $\delta$  63,0 e 60,8, especificamente do sinal em  $\delta$  61,6, que pode ser atribuído ao C-5 das unidades de  $\alpha$ -D-Ribf. Em contrapartida, os sinais de <sup>13</sup>C referentes ao ácido nosturônico, em  $\delta$ 180,4, 174,2, 84,2 e 18,7 são mantidos na fração 90HW-N, mostrando tratar-se de uma estrutura bastante resistente ao processo de hidrólise.

Analisando os dados de metilação obtidos para a fração 90HW-N (Tabela 19), verifica-se a ausência de unidades de Xylp 3,4-di-O-substituídas (2-Me-Xylp) e o aumento de unidades de Xylp (1→4)-ligadas (2,3-Me<sub>2</sub>-Xylp, 25,6%), sugerindo que no polissacarídeo original, estas unidades eram substituídas em O-3 por de terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Ribf. As baixas proporções de terminais não redutores e a presença de 25,9% do derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Glc p sugerem que as unidades de NosA participem como terminais não redutores, substituindo em O-6 as unidades de Glc p.

TABELA 19 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO 90HW-N, EM COMPARAÇÃO COM A FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Alditol acetatos parcialmente O-metilados <sup>a</sup>	<i>t<sub>R</sub></i> <sup>b</sup>	Fração (% <sup>c</sup> )		Tipo de Ligação <sup>d</sup>
		16RHW-N	90HW-N	
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Rib	6,798	14,1	—	Ribf-(1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xyl	8,715	—	1,0	Xylp-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	8,847	1,2	2,5	Glc p-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	9,344	0,7	1,5	Galp-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl	11,165	—	25,6	→4)-Xylp-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	12,103	4,3	3,9	→4)-Galp-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	12,423	43,6	39,5	→4)-Glc p-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	13,493	8,7	25,9	→4,6)-Glc p-(1→
2-Me-Xyl	17,711	23,4	—	→3,4)-Xylp-(1→

<sup>a</sup> Alditol acetatos O-Me- obtidos por metilação, seguida de hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100°C por 14 h), redução com NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> e acetilação, analisados por GC-MS (coluna DB-225).

<sup>b</sup> Tempo de Retenção em minutos.

<sup>c</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

<sup>d</sup> Baseada no derivado O-metilalditol acetato.

Ao comparar os dados de RMN-<sup>13</sup>C e HSQC da fração 16RHW-N (Figuras 43D e Figura 35A, p. 118) e, os dados de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 42D) e de metilação (Tabela 19) da fração 90HW-N, com seus resultados obtidos pelo experimento de HSQC (Figura 44), foi possível atribuir todos os sinais referentes às unidades de α-D-Ribf, presentes no polissacarídeo original (16RHW-N), mas ausente na fração 90HW-N. Desta maneira, os sinais em δ 102,9/5,44 (C-1/H-1), δ 71,4/4,15 (C-2/H-2), δ 69,9/4,03 (C-3/H-3), δ 84,9/4,19 (C-4/H-4) e δ 61,6/3,72/3,66 (C-5/H-5) correspondem aos C/H dos terminais não redutores de α-D-Ribf (Figura 35A, p. 118).

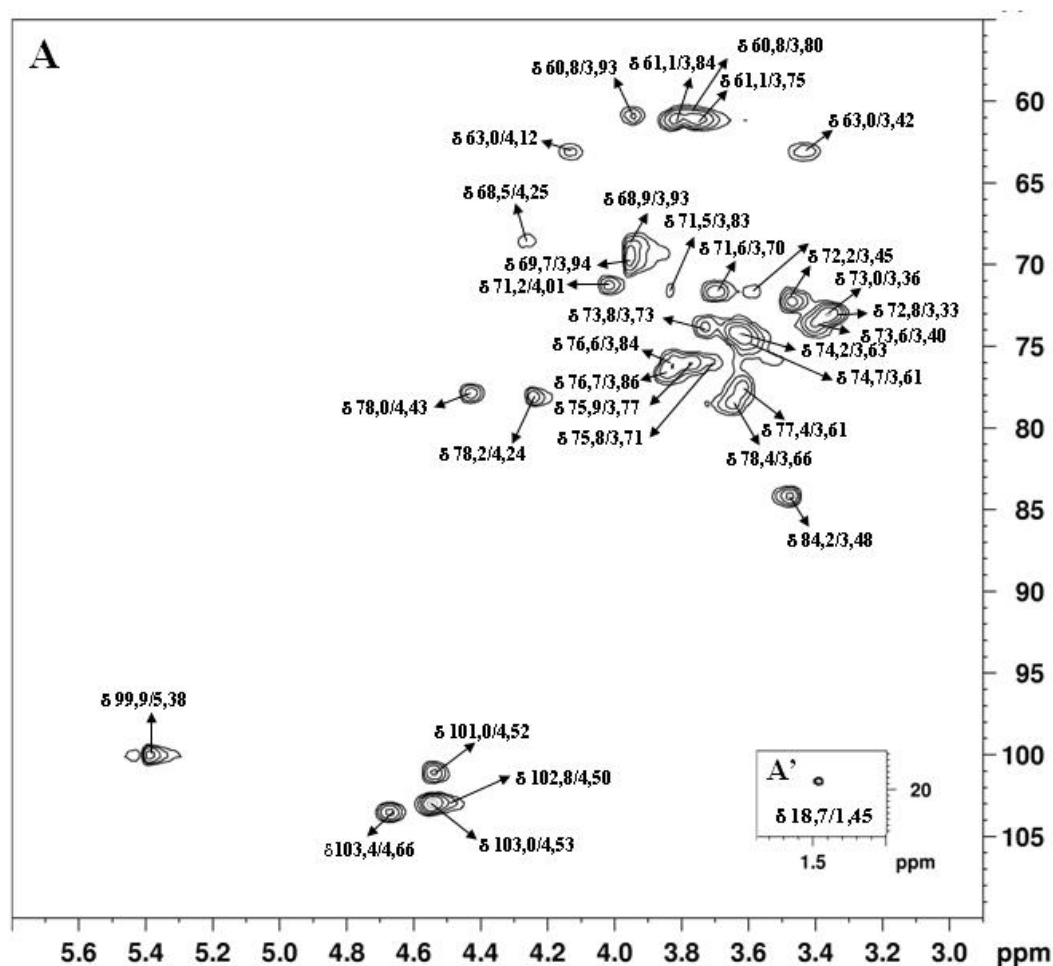


FIGURA 44 - ESPECTRO DE <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC DA FRAÇÃO 90HW-N (A), EM DETALHE REGIÃO DE ppm MAIS BAIXO (δ 18,9) (A'), DERIVADA DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Amostra solubilizada em D<sub>2</sub>O (30 mg/0,4 ml), analisada em 30 °C; deslocamentos químicos expressos em δ (ppm).

Com a remoção dos terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Ribf (Tabela 19, p. 132), que estavam substituindo as unidades de Xylp em O-3 foi possível fazer alguns assinalamentos. Os sinais em  $\delta$  102,8/4,50 podem ser atribuídos ao C-1/H-1 de Xylp indicando a configuração  $\beta$ . Em contrapartida, os sinais em  $\delta$  80,5/3,73 observados no espectro de HSQC da fração 16RHW-N (Figura 35A, p. 118), mas ausentes no espectro de HSQC da fração 90HW-N, indicam que sejam referentes ao C-3/H-3 das unidades de  $\beta$ -D-Xylp, antes substituídas em O-3 por terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Ribf, ainda os sinais em  $\delta$  63,0/4,12/3,42 (Figura 44) podem ser atribuídos ao C-5/H-5 das unidades de  $\beta$ -D-Xylp (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas.

Os sinais em  $\delta$  101,0/4,52 (C-1/H-1 das unidades 4-O-substituídas),  $\delta$  103,4/4,66 (C-1/H-1 das unidades 4,6-di-O-substituídas),  $\delta$  68,5/4,25 (C-6/H-6 das unidades substituídas em O-6) e  $\delta$  60,8/3,93/3,80 (C-6/H-6, livre) podem ser atribuídos as unidades de Glcp na configuração  $\beta$  (Figura 44).

Os sinais em  $\delta$  99,0/ 5,38 (C-1/H-1) puderam ser atribuídos as unidades de Galp 4-O-substituídas, as quais se apresentam na configuração  $\alpha$ , e os sinais em  $\delta$  103,0/ 4,53 (C-1/H-1) puderam ser atribuídos as unidades de ácido nosturônico na configuração  $\beta$  (HELM *et al.*, 2000).

Uma vez que a presença do ácido nosturônico dificulta a completa caracterização do polissacarídeo presente na fração 16RHW-N, buscou-se uma alternativa para removê-lo, tendo em vista que o processo de carboxi-redução não foi capaz de reduzir o grupo  $-\text{CO}_2\text{H}$  do grupo lactil. Sendo assim, as frações 16RHW-N (50 mg) e 90HW-N (40 mg) foram submetidas a remoção de grupos lactil com lítio metálico em etilenodiamina (LAU *et al.*, 1987). Este processo deu origem as frações 16RHW-Li e 90HW-NLi, respectivamente, as quais foram analisadas quanto aos seus componentes monossacarídeos (Tabela 20).

Após a remoção dos grupos lactil, observa-se o aumento dos teores de xilose para 16RHW-NLi e 90HW-NLi e de glucose apenas para 16RHW-NLi (Tabela 20), sugerindo que suas quantidades estavam sendo mascaradas, devido a presença do açúcar NosA.

TABELA 20 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES 16RHW-N, 16RHW-NLi, 90HW-N, E 90HW-NLi, DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>				
	Rib	Xyl	Gal	Glc	Ác. Urônico <sup>c</sup>
16RHW-N	37,6	11,9	16,8	18,8	14,9
16RHW-NLi	24,8	19,0	24,2	32,0	nd <sup>d</sup>
90HW-N	—	22,2	31,3	46,5	nd <sup>d</sup>
90HW-NLi	—	28,0	27,1	44,9	nd <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 14 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

<sup>c</sup> Dosado pelo método de Filizetti-Cozzi e Carpita, 1991.

<sup>d</sup> nd – Não dosado.

Ao comparar os espectros de RMN-<sup>13</sup>C da frações 16RHW-N e 16RHW-Li (Figura 45), pode-se observar a ausência dos sinais em  $\delta$  181,8, 175,3. No entanto o sinal referente ao L-1 do grupo lactil em  $\delta$  18,8 ainda pode ser observado, indicando que o a remoção dos grupos lactil através do tratamento com lítio metálico em etilenodiamina (LAU *et al.*, 1987) não foi completo, promovendo apenas a redução das carboxilas.

Um segundo processo para remoção de grupos lactil foi realizado sobre a fração 16RHW-NLi, originando a fração 16RHW-Li2, mas não foi possível obter um espectro de RMN-<sup>13</sup>C, devido a sua insolubilidade. Ainda pode-se observar a definição de sinais de <sup>13</sup>C na região anomérica, assim como o deslocamento destes para campo mais baixo (Figura 45B).



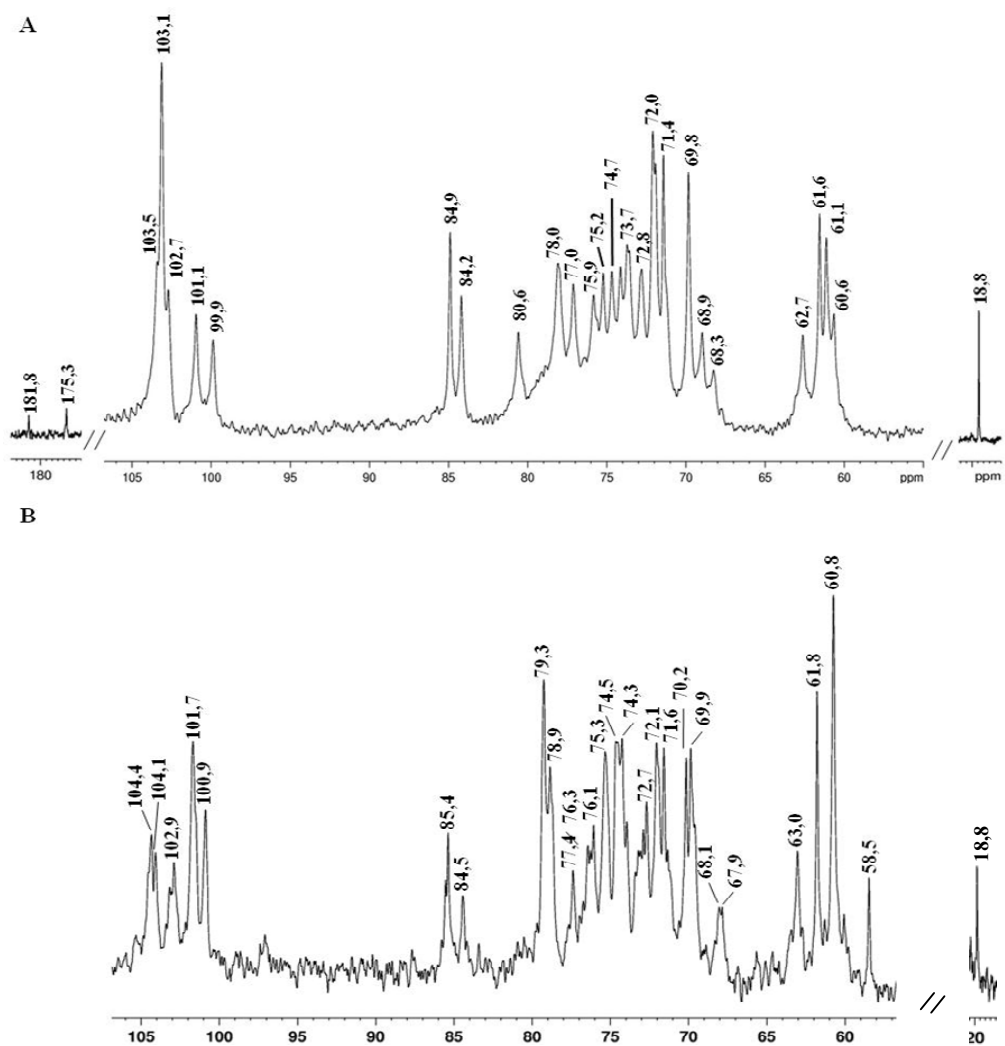


FIGURA 45 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES 16RHW-N (A) E 16RHW-NLi (B) DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

(A) Solubilizada em D<sub>2</sub>O (40 mg/0,4 ml); (B) Solubilizada em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (30 mg/0,4 ml), ambas analisadas a 70°C. Deslocamentos químicos expressos em δ(ppm).

A análise de metilação da fração 16RHW-NLi2 (Tabela 21) indica que houve a remoção dos grupos lactil, das unidades de NosA, devido ao aumento de unidades de Glcp (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glcp, 8,9%) como terminais não redutores, sugerindo que estas unidades apresentavam-se como monossacarídeos ácidos substituídos em O-3, por grupos lactil.

TABELA 21 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO 16RHW-NLi2, EM COMPARAÇÃO COM A FRAÇÃO 16RHW-N, DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Alditol acetatos parcialmente O-metilados <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> <sup>b</sup>	Fração (% <sup>c</sup> )		Tipo de Ligação <sup>d</sup>
		16RHW-N	16RHW-NLi2	
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Rib	6,798	14,1	12,6	Ribf-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	8,847	1,2	10,9	Glc $\rho$ -(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	9,344	0,7	1,0	Gal $\rho$ -(1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	9,453	—	4,7	→6)-Glc $\rho$ -(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	11,953	4,3	2,6	→4)-Gal $\rho$ -(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl	12,210	—	4,0	→4)-Xyl $\rho$ -(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	12,423	43,6	40,3	→4)-Glc $\rho$ -(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	13,493	8,7	8,6	→4,6)-Glc $\rho$ -(1→
2-Me-Xyl	17,711	23,4	13,3	→3,4)-Xyl $\rho$ -(1→
4-Me-Glc	22,047	—	2,0	→3,4,6)-Glc $\rho$ -(1→

<sup>a</sup> Alditol acetatos O-Me- obtidos por metilação, seguida de hidrólise ácida total, redução com NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> e acetilação, analisados por GC-MS (coluna DB-225).

<sup>b</sup> Tempo de Retenção em minutos.

<sup>c</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

<sup>d</sup> Baseada no derivado O-metilalditol acetato.

Devido à similaridade entre as proporções, pode-se sugerir que as unidades de Xyl $\rho$  apresentam ligação do tipo (1→4) e substituição em O-3 (2-Me-Xyl $\rho$ , 13,3%) por terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Ribf (2,3,5-Me<sub>3</sub>-Ribf, 12,6%). Esta sugestão também pode ser feita quando analisados os dados de metilação da fração 90HW-N (Tabela 19, p. 132). Pode-se destacar também o aparecimento de unidades 3-O-substituídas (Tabela 21), as quais podem ser atribuídas às unidades de glucose, presentes na forma de NosA, que puderam ser identificadas por metilação após a redução utilizando lítio metálico em etilenodiamina (LAU *et al.*, 1987).

Comparando os espectros de RMN-<sup>13</sup>C das frações 90HW-N e 90HW-NLi (Figura 46), observa-se a ausência dos sinais referentes ao grupo lactil, em  $\delta$  181,8 e 175,3 de -C=O<sub>2</sub>H (L-3 e C-6, respectivamente), em  $\delta$  18,7 (L-1) e em 84,2 de C-3 substituído das unidades de  $\beta$ -D-NosA, na fração 90HW-NLi (Figura 46B), indicando que houve total redução do NosA após tratamento da fração 90HW-N com lítio metálico em etilenodiamina.

Além disso, no espectro de 90HW-NLi (Figura 46B) também se observa uma maior definição dos sinais na região de C-1, e dos sinais em  $\delta$  79,2, 79,1 e 78,7, que sugerem a presença de unidades (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas, e podem ser atribuídos as unidades de Glcp, Galp e  $\beta$ -Xylp, respectivamente (GORIN; MAZUREK, 1975; KOVAC; HIRSCH, 1980).

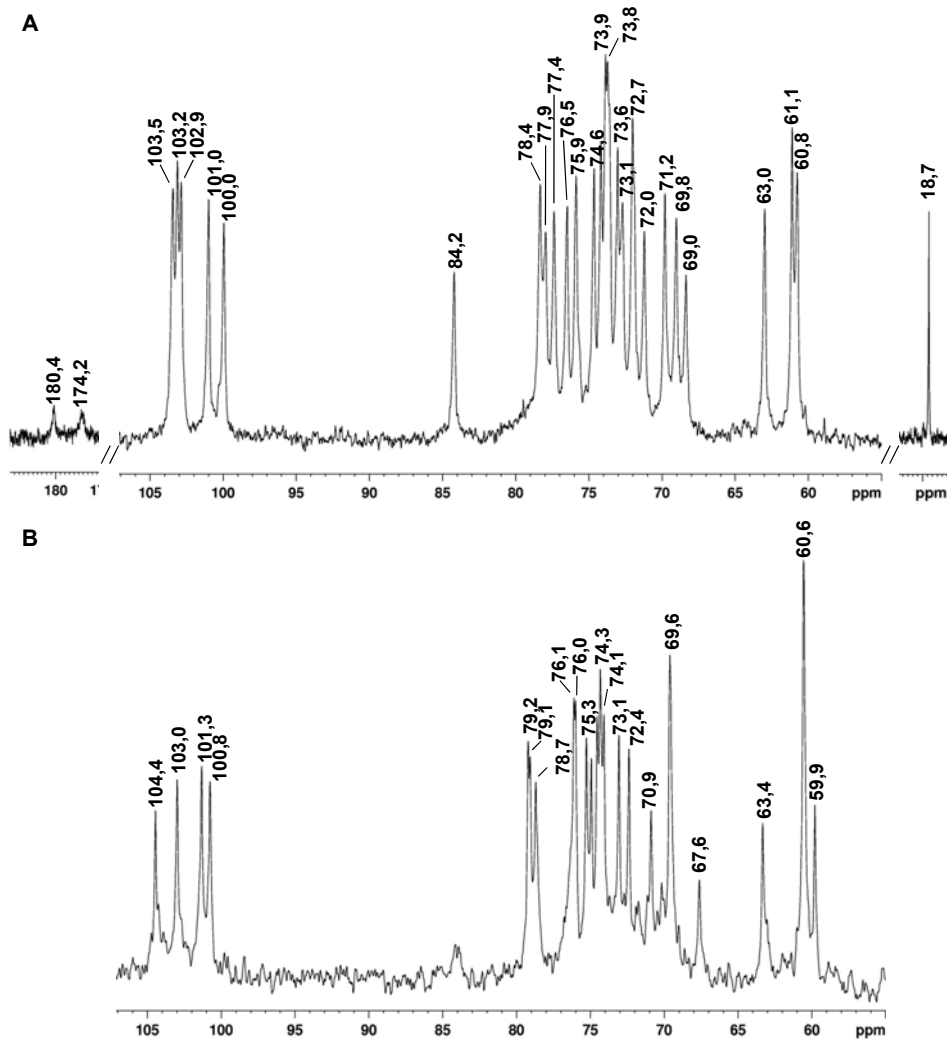


FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES 90HW-N (A) E 90HW-NLI (B), DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

(A) Solubilizada em D<sub>2</sub>O (40mg/0,4ml), analisada a 70 °C. Deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm); (B) Solubilizada em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (30 mg/0,4 ml), analisada a 70 °C. Deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

A presença de unidades (1→4)-ligadas foi confirmada pela análise de metilação, onde foram observados os derivados per-O-metilados 2,3-Me<sub>2</sub>-Xylp (15,9%), 2,3,6,-Me<sub>3</sub>-Galp (6,5%) e 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glc p (34,4%) (Tabela 22). A ausência de terminais não redutores de Ribf (2,3,5-Me<sub>3</sub>-Ribf) e de unidades de Xylp 3,4-di-O-substituídas (Tabela 22), mais uma vez confirma que no polissacarídeo original (16RHW-N), as unidades de Xylp estão 4-O-ligadas e substituídas em O-3 por unidades de α-D-Ribf. O aumento dos derivados referentes aos terminais não redutores de Glcp sugere que estavam presentes na estrutura como NosA, e após o tratamento com lítio em etilenodiamina (LAU *et al.*, 1987), e consequente remoção dos grupos lactil e redução dos grupos -CO<sub>2</sub>H, foram convertidas na forma de açúcar neutro (glucose).

TABELA 22 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO 90HW-NLi, EM COMPARAÇÃO COM A FRAÇÃO 90HW-N, DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Alditol acetatos parcialmente O-metilados <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> <sup>b</sup>	Fração (% <sup>c</sup> )		Tipo de Ligação <sup>d</sup>
		90HW-N	90HW-NLi	
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xyl	7,483	1,0	—	Xylp-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	8,785	2,5	9,7	Glc p-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	9,270	1,5	1,6	Galp-(1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	9,485	—	19,0	→6)-Glc p-(1→
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	11,079	—	1,1	→3)-Glc p-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl	11,772	25,6	15,9	→4)-Xylp-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	11,971	3,9	6,5	→4)-Galp-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	12,266	39,5	34,4	→4)-Glc p-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	16,278	25,9	11,9	→4,6)-Glc p-(1→

<sup>a</sup> Alditol acetatos O-Me- obtidos por metilação, seguida de hidrólise ácida total, redução com NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> e acetilação, analisados por GC-MS (coluna DB-225).

<sup>b</sup> Tempo de Retenção em minutos.

<sup>c</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

<sup>d</sup> Baseada no derivado O-metilalditol acetato.

Desta maneira pode-se sugerir que o polissacarídeo presente na fração 16RHW-N é principalmente formado por uma estrutura contendo unidades de D-



Outras frações apresentando ácido nosturônico em suas composições foram obtidas a partir da porção sobrenadante de Fehling (SFHW-N) obtida do extrato aquoso a quente, e a partir do precipitado de Fehling do extrato alcalino. Estas frações foram separadas através de diálise em membranas com diferentes limites de exclusão, 50 kDa e 16 kDa, respectivamente, até a obtenção das frações retidas, obtidas a partir do sobrenadante de Fehling (SF) e do precipitado de Fehling (PF), 50RHW-N (SF) e 16RK1-N (PF), que apresentaram perfis de eluição homogêneos, quando analisadas por HPSEC-MALLS (Figura 48).

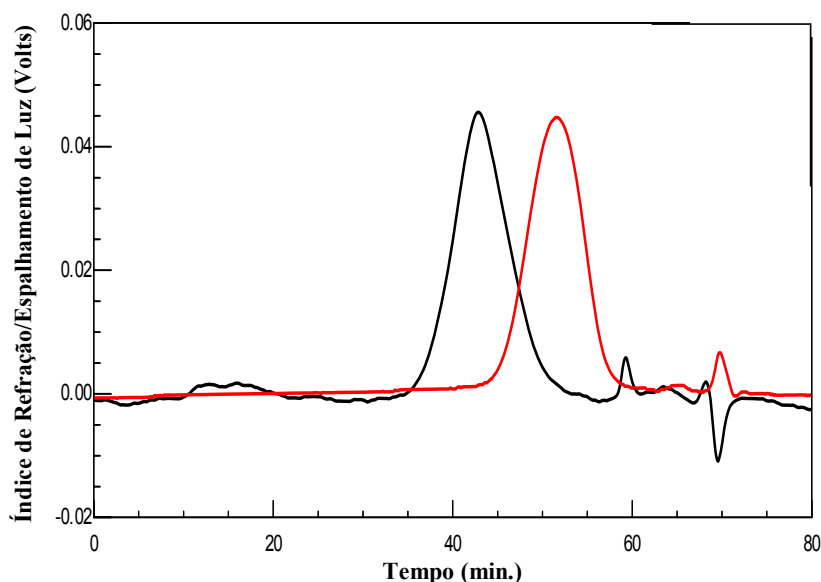


FIGURA 48 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES 50RHW-N (SF) (—) e 16RK1-N (—), DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE, POR HPSEC

Amostras analisadas pelo detector de índice de refração.

A fração 50RHW-N (SF) apresentou  $M_w = 49.620$  g/mol ( $dn/dc = 0,105$ ), enquanto que a fração 16RK1-N mostrou uma  $M_w = 168.100$  g/mol ( $dn/dc = 0,103$ ). Estas frações quando analisadas quanto à composição monossacarídica (Tabela 23), mostraram-se similares à fração 16RHW-N. A fração 16RK1-N obtida a partir do fracionamento do extrato alcalino KOH 1%, apresentou teores de ribose, xilose, galactose e glucose muito próximos àqueles obtidos para a fração 16RHW-N. Já a

fração 50RHW-N obtida a partir da porção sobrenadante de Fehling do extrato aquoso a quente apresentou menores teores de ribose, quando comparada a fração 16RHW-N e 16RK1-N.

TABELA 23 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES 50RHW-N E 16RK1-N, DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>				
	Rib	Xyl	Gal	Glc	Ác. Urônico <sup>c</sup>
16RHW-N (PF)	37,6	11,9	16,7	18,8	15,0
50RHW-N (SF)	11,2	15,5	18,9	28,4	nd <sup>d</sup>
16RK1-N (PF)	37,2	20,8	17,3	26,7	nd <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Analisado por GC-MS após hidrólise ácida total (Ácido fórmico 45%, 100 °C por 14 horas), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativos às áreas de todos os picos.

<sup>c</sup> Dosado pelo método de Filizetti-Cozzi e Carpita, 1991.

<sup>d</sup> n.d. – não dosado.

Quando as frações 50RHW-N (SF) (Figura 49B) e 16RK1-N (Figura 49C) foram analisadas por RMN-<sup>13</sup>C, em comparação com a fração 16RHW-N (Figura 49A) pode-se observar a similaridades dos assinalamentos obtidos. No entanto é possível verificar diferenças na região de C-1 e C-4, dos sinais nos espectros das frações 50RHW-N (Figura 49B) e 16RK1-N (Figura 49C), quando comparados ao espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração 16RHW-N (Figura 49A), indicando que apesar da grande similaridade das frações, podem existir diferenças estruturais, que fizeram com que fossem separadas, de acordo com os processos de fracionamento e purificação adotados. As diferenças observadas nas massas molares dos polissacrídeos presentes nas frações 16RHW-N, 50RHW-N e 16RK1-N, também podem justificar o fracionamento destas estruturas em processos de purificação distintos.

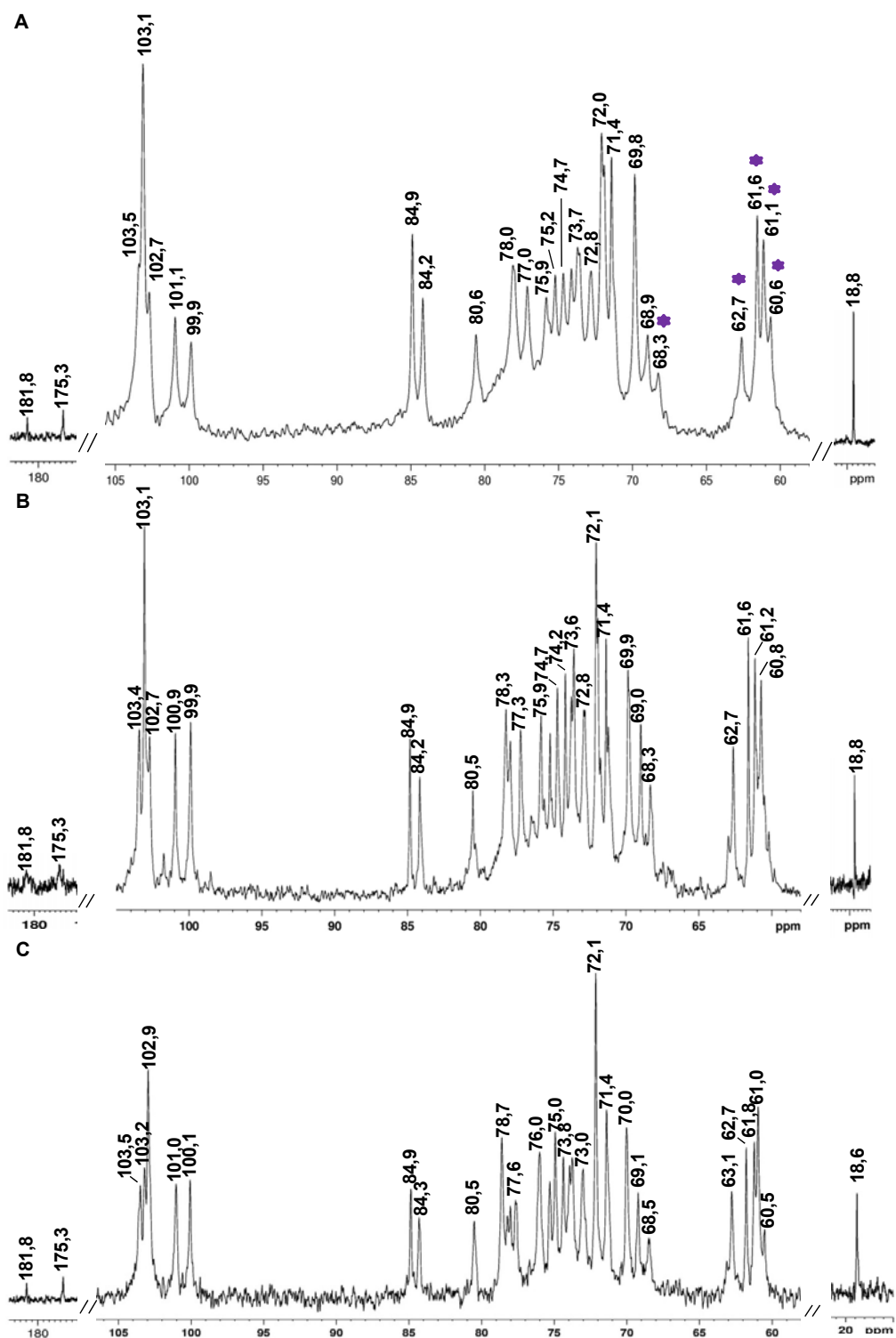


FIGURA 49 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES 16RHW-N (A), 50RHW-N (B) E 16RK1-N (C), DERIVADAS DA BIOMASSA DE *Nostoc* sp. DE VIDA LIVRE

Amostras solubilizadas em D<sub>2</sub>O (40mg/0,4ml), analisadas a 70 °C. Deslocamentos químicos expressos em δ(ppm).

■ Sinais invertidos no espectro de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT.



Devido à similaridade apresentada com a fração 16RHW-N, e por apresentarem um rendimento bem menor, em relação a ela, a caracterização da estrutura fina das amostras 50RHW-N e 16RK1-N não foram realizadas durante este trabalho, mas será alvo de investigações futuras.

#### 4.4 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO HETEROPOLISSACARÍDEO CONTENDO ÁCIDO NOSTURÔNICO (FRAÇÃO 16RHW-N) ISOLADO DE *Nostoc* sp.

As cianobactérias, bem como, muitas espécies de microalgas são tidas como boas candidatas para várias aplicações biotecnológicas, principalmente devido a sua vasta diversidade ecológica e bioquímica. Além disso, estes organismos apresentam um grande potencial de conversão de energia luminosa em formas renováveis, como por exemplo, na forma de constituintes químicos de interesse a indústria alimentícia, farmacêutica, entre outras (DePHILIPPIS; VICENZINI, 1998).

Atualmente, o interesse para o uso clínico de substâncias com atividades analgésicas, utilizadas principalmente para o tratamento de vários tipos de dor (tanto de origem neurogênica quanto inflamatória), vem aumentando significativamente. Vários modelos de nocicepção em animais de laboratório foram desenvolvidos para verificar a atividade de extratos e compostos. O teste realizado neste trabalho é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. Este método também avalia a ação anti-inflamatória tanto pelo aumento da permeabilidade capilar peritoneal, quanto pela migração de leucócitos à cavidade peritoneal (LUCENA *et al.*, 2007).

A fração polissacarídica 16RHW-N isolada a partir do extrato aquoso de *Nostoc* sp. de vida livre foi avaliada quanto as suas propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória. Para isso, foi utilizado o método de reação de contração muscular induzida por ácido acético, com o qual é possível avaliar ambos os efeitos. Este tipo de ensaio biológico, ainda não havia sido descrito para polissacarídeos de cianobactérias.

A amostra (16RHW-N) foi testada nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, trinta minutos antes da injeção de ácido acético. O polissacarídeo 16RHW-N promoveu uma inibição dose dependente, com ID<sub>50</sub> (Dose efetiva 50), ou seja, dose necessária para inibir 50% das contrações de 7,0 (3,5-14,0) mg/kg, e inibiu em 86 ± 8% a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético na dose de 30 mg/kg (Figura 50A).

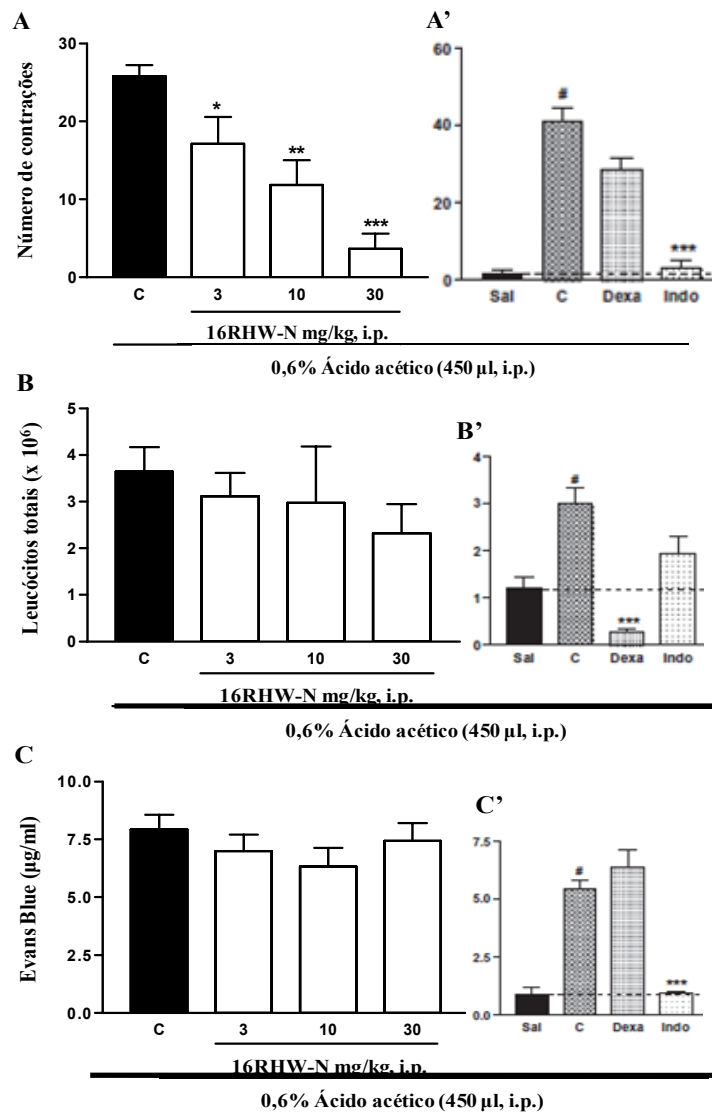


FIGURA 50 - EFEITO DE 16RHW-N (3-30 mg/kg, i.p.) NO NÚMERO DE CONTRAÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO (A), INFILTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS (B) E EXTRAVASAMENTO DO CORANTE EVANS BLUE (C) EM CAMUNDONGOS

Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média; n = 6-8 animais por grupo. As diferenças entre as médias foram analisadas por ANOVA seguido por Teste de Newman-Keuls, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 vs. controle (C).

Os controles positivos dexametasona (2 mg/kg, s.c.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) inibiram o número de contrações em  $30 \pm 8 \%$  e  $92 \pm 5 \%$ , respectivamente (Figura 50A').

Em relação à atividade anti-inflamatória, 16RHW-N (3-30 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) (Figura 50B e B') não inibiram a infiltração de leucócitos (migração de células totais) induzida pelo ácido administrado. No entanto, a dexametasona (2 mg/kg, s.c.), reduziu a migração em 92 % (Figura 49B'). Ainda, 16RHW-N (Figura 50C) e a dexametasona (Figura 50C') não reduziram a permeabilidade capilar peritoneal, expressa pelo extravasamento do corante Evans Blue, enquanto a indometacina a inibiu em 82 % (Figura 50C'). Esses resultados são coerentes, sabendo-se que a dexametasona inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias que podem atrair leucócitos para os tecidos (quimiotaxise) e, a indometacina inibe a produção de prostaglandinas, as quais aumentam a permeabilidade capilar (VINEGAR *et al.*, 1979).

Os resultados obtidos indicam que o tratamento intraperitoneal com o heteropolissacarídeo contendo NosA (fração 16RHW-N) isolado de *Nostoc* sp. promoveu inibição acentuada e dose-dependente da resposta nociceptiva induzida pela administração de ácido acético, ou seja, o polissacarídeo obtido apresentou efeito analgésico, porém não induziu resposta anti-inflamatória. Ainda não se sabe qual o mecanismo de ação do polissacarídeo testado, entretanto sugere-se que seja diferente dos mecanismos de ação da dexametasona e da indometacina, pois estas atuam sobre os mediadores pró-inflamatórios, o que não foi observado para o heteropolissacarídeo testado.

Como não existem relatos sobre a avaliação das propriedades anti-inflamatória e analgésica de polissacarídeos de cianobactérias, e considerando a diversidade de estruturas polissacarídicas existentes nestes organismos, muitas vezes não caracterizadas, pretende-se no futuro ampliar os estudos sobre as aplicações destas moléculas.

## 5 CONCLUSÕES

As conclusões serão apresentadas separadamente, levando em consideração os materiais estudados.

- *Trebouxia* sp.

Para a biomassa de células do fotobionte *Trebouxia* sp. isolado a partir do talo líquênico de *Teloschistes flavicans* foram isoladas e caracterizadas as estruturas sugeridas a seguir:

- ✓  $\beta$ -D-Galactofuranana linear (1 $\rightarrow$ 5)-ligada, obtida a partir da fração solúvel em água fria gerada do extrato aquoso.
- ✓  $\beta$ -D-Galactofuranana ramificada, com cadeia principal formada por unidades de  $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 5)-ligadas, as quais apresentam-se parcialmente substituídas em O-6 (12,5%) por terminais não redutores de  $\beta$ -D-Galf. Esta estrutura foi obtida a partir do fracionamento do extrato alcalino KOH 2%.
- ✓ Manogalactofuranana, formada por uma cadeia principal de unidades de  $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 5)-ligadas, a qual encontra-se parcialmente substituída em O-6 (13%) por cadeias laterais complexas compostas principalmente por unidades de  $\alpha$ -D-Manp 4-O- (12,6%), 2,4-di-O- (2,0%), 2,3-di-O- (3,7%) e 2,6-di-O-substituídas (4,5%), além de terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Rha,  $\beta$ -D-Araf,  $\beta$ -D-Galf, e  $\alpha$ -D-Manp como terminais não redutores.

- *Nostoc muscorum* – Cianobionte e de Vida livre

A espécie de cianobactéria, *Nostoc muscorum* - cianobionte, quando cultivada em meio BG-11, apresentou um melhor rendimento de EPS e biomassa, quando comparada a mesma espécie de cianobactéria de vida livre. Desta maneira a partir do cultivo de *Nostoc muscorum* - cianobionte foram caracterizadas as

seguintes estruturas:

- ✓  $\beta$ -D-Xilana linear (1 $\rightarrow$ 4)-ligada, isolada a partir da fração exopolissacarídica.
  - ✓ Heteropolissacarídeo, principalmente formado por unidades de  $\beta$ -L-Arap e  $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas, parcialmente substituídas em O-3 por unidades de  $\alpha$ -D-Manp, as quais por sua vez são também substituídas em O-3 ou O-2 por terminais não redutores  $\alpha$ -D-Manp ou  $\alpha$ -L-Fucp.
- *Nostoc* sp. – Vida livre

A partir de extrações aquosa e alcalina KOH 1% da biomassa de *Nostoc* sp. foram obtidas três frações que apresentaram perfis de eluição homogêneos quando analisadas por HPSEC-MALLS, sendo elas: 16RHW-N (PF), 50RHW-N (SF) e 16RK1-N (PF). As estruturas apresentaram composições monossacarídicas e espectros de RMN-<sup>13</sup>C similares, no entanto, devido ao maior rendimento, apenas a estrutura presente na fração 16RHW-N foi caracterizada estruturalmente.

Sobre a fração 16RHW-N pode-se sugerir:

- ✓ Foi detectada a presença de unidade de  $\alpha$ -D-Ribf na fração, a qual foi identificada como parte da estrutura do polissacarídeo, na forma de terminal não redutor.
- ✓ Foi identificada a presença de um monossacarídeo ácido incomum, isolado e caracterizado como sendo o ácido nosturônico (NosA), ou seja, uma estrutura formada por um ácido glucurônico, substituído em O-3 por um grupo lactil.
- ✓ O NosA foi isolado na forma  $\alpha$ -D-NosA (anômero predominante) a partir da fração 16RHW-N, no entanto, ao analisar os dados de RMN desta fração, observou-se que apenas a configuração glicosídica  $\beta$  é possível para o NosA.
- ✓ Um heteropolissacarídeo, principalmente formado por unidades de  $\beta$ -D-Xylp,  $\alpha$ -D-Galp e  $\beta$ -D-Glp (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas. As unidades de  $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas estão substituídas em O-3 por terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Ribf, enquanto que as unidades de  $\beta$ -D-Glp-(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas

apresentam-se substituídas em O-6 por terminais não redutores de  $\beta$ -D-NosA.

- Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do heteropolissacarídeo ácido contendo ácido nosturônico (NosA), presente na fração 16RHW-N, isolada a partir da biomassa de *Nostoc* sp. de vida livre

Foram avaliadas as propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória do heteropolissacarídeo isolado de *Nostoc* sp. Os resultados obtidos indicam que o tratamento intraperitoneal com o heteropolissacarídeo contendo NosA (fração 16RHW-N) isolado de *Nostoc* sp. promoveu inibição acentuada e dose-dependente da resposta nociceptiva induzida pela administração de ácido acético, ou seja, o polissacarídeo obtido apresentou efeito analgésico, inibindo a nocicepção em  $86 \pm 8\%$  na dose de 30 mg/kg, porém não induziu resposta anti-inflamatória.

- Conclusão geral

Como conclusão geral, pode-se dizer que os polissacarídeos obtidos a partir do fotobionte *Trebouxia* sp. são estruturalmente distintos daqueles obtidos para o cianobionte *Nostoc muscorum*, e estes por sua vez são diferentes dos obtidos para o representante de vida livre *Nostoc* sp.

Enquanto os polissacarídeos obtidos para o fotobionte *Trebouxia* sp. são majoritariamente compostos por unidades de  $\beta$ -D-Galf, os do cianobionte *Nostoc muscorum* são compostos principalmente por pentoses (Xylp e Arap), e os de *Nostoc* sp. apresentam uma maior variedade de monossacarídeos, incluído a presença de altos teores de Ribf e do ácido nosturônico, monossacarídeos incomuns. Além disso, estas estruturas apresentam diferenças significativas quando analisada a estrutura química fina das moléculas.

No presente estudo foram caracterizadas estruturas inéditas, sendo uma  $\beta$ -D-Galfuranana linear (1 $\rightarrow$ 5)-ligada para o fotobionte *Trebouxia* sp., uma  $\beta$ -D-Xilana linear (1 $\rightarrow$ 4)-ligada e um heteropolissacarídeo principalmente formado por unidades

de  $\beta$ -L-Arap e  $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas para o cianobionte *Nostoc muscorum*, quando este foi cultivado em meio BG-11. Além de um heteropolissacarídeo, principalmente formado por unidades de  $\beta$ -D-Xylp,  $\alpha$ -D-Galp e  $\beta$ -D-Glp (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas, sendo as unidades de  $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas substituídas em O-3 por terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Ribf, e as unidades de  $\beta$ -D-Glp-(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas substituídas em O-6 por terminais não redutores de  $\beta$ -D-NosA, para a biomassa de uma cianobactéria de vida livre da espécie *Nostoc* sp, o qual apresentou atividade antinociceptiva dose dependente nas doses testadas. Desta maneira, o presente trabalho vem contribuir para o conhecimento de novas estruturas polissacarídicas produzidas por uma classe de organismos, representada por fotobiontes, cianobiontes e cianobactérias de vida livres, pouco explorados neste sentido, mostrando que ainda há muito conhecimento a ser adquirido, no que diz respeito à caracterização da estrutura química de seus polissacarídeos.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J. K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 74, p. 4970-4971, 1952.
- ADAMS, D. G. Symbiotic Interactions. In: Whitton, B. A.; POTTS, M. eds. **The Ecology of Cyanobacteria**. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 2000; p.523-561.
- AHMADJIAN, V., 1959. **The taxonomy and physiology of lichen algae and problems of lichen synthesis**. Ph.D. Dissertation, Harvard University, Cambridge, USA.
- AHMADJIAN, V. Some new and interesting species of *Trebouxia*, a genus of lichenized algae. **American Journal of Botany**, St Louis, v. 47, p. 677-683, 1960.
- AHMADJIAN, V. A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology and identification. **Phycologia**, Lawrence, v. 6, p. 127-160, 1967.
- AHMADJIAN, V. Studies on the isolation and synthesis of bionts of the cyanolichen *Peltigera canina* (Peltigeraceae). **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 165, p. 29-38, 1989.
- AHMADJIAN, V. **The Lichen symbiosis**, New York, John Wiley and Sons, 2<sup>a</sup> ed. 1993.
- AHMADJIAN, V.; JACOBS, J. B. Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristate*. **Nature**, London, v. 289, p. 169-172, 1981.
- AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; GIMÉNEZ-ABIÁN, M. I.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Fungal cell wall polysaccharides isolated from *Discula destructiva* spp. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 342, p. 1138-1143, 2007.
- ANDREWS, P.; BALL, D. H.; JONES, J. K. N. The isolation of oligosaccharides from gums and mucilages. Part I. **Journal of the Chemical Society**, Washington, p. 4090-4095. 1953.



ARCHIBALD, P. A. *Trebouxia* de Puymaly (Chlorophyceae, Chlorococcales) and *Pseudotrebouxia* gen. Nov. (Chlorophyceae, Chlorosarcinales). **Phycologia**, Lawrence, v. 14, p. 125-137, 1975.

ASPINALL, G. O.; FAIRWEATHER, R. M.; WOOD, T. M. Arabinogalactan A from Japanese larch (*Larix leptolepis*). **Journal of the Chemical Society (C)**, United Kingdom, v. 17, p. 2174–2179, 1968.

BECK, A.; KASALICKY, T.; RAMBOLD, G. Myco-photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. **New Phytologist**, Malden, v. 153, p. 317-326, 2002.

BEIGGI, S.; PIERCEY-NORMORE, M. D. Evolution of ITS ribosomal RNA secondary structures in fungal and algal symbionts of selected species of *Cladonia* sect. *Cladonia* (Cladoniaceae, Ascomycotina). **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 64, p. 528–542, 2007.

BERZELIUS, J.J. Versuche über die Mischung des Isländischen Mosses und Seine Anwendung als Nahrungsmittel. **Journal of Chemical Physics**, Melville v. 7, p. 317-353, 1815.

BISWAS, B.B. A polysaccharide from *Nostoc muscorum*. **Science & Culture**, v. 22, p. 696-697. 1957.

BOLD, H. C. The Morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, Sp. Nov. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New Jersey, v. 76, p. 101-108, 1949.

CAPEK, P.; TOMAN, R.; KARDOSOVA, A.; ROSIK, J. Polysaccharides from the roots of the Marsh Mallow (*Althaea officinalis* L.): structure of an arabinan. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 117, p. 133–140, 1983.

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; STUELP, P.; GORIN, P. A. J.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 194, p. 65-69, 2001.

CARBONERO, E.R.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. A (1→6)-linked β-mannopyranan, pseudonigeran, and a (1→4)-linked β-xylan, isolated from the lichenised basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 206, p. 175-178, 2002.

CARBONERO, E. R.; TISCHER, C. A.; COSENTINO, C.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization of a galactomannan from the cyanolichen *Leptogium azureum*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 53, p. 469-473, 2003.

CARBONERO, E. R. **Polissacarídeos de fungos liquenizados contendo diferentes fotobiontes**. Curitiba, 2005. 119p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CARBONERO, R. C.; CORDEIRO, L. M. C.; MELLINGER, C. G.; SASSAKI, G. L. S.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Galactomannans with novel structures from the lichen *Rocella decipiens* DARB. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 340, p. 1699-1705, 2005.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; KOMURA, D. L.; MARCON, R.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, Oxford, v. 111, p. 531-537, 2008.

CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; FREITAS BUCHI, D.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**, Italy, v. 29, p. 503-509, 1997.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 1-30, 1993.

CASTENHOLZ, R. W. Phylum BX. cyanobacteria. In: Garrity, G. M., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Springer-Verlag, Berlin, 2001; v. 1, p. 473-599.

CHAO, L.; BOWEN, C. C. Purification and Properties of Glycogen Isolated from a Blue-Green Alga, *Nostoc muscorum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 105, p. 331-338, 1971.

CHI, Z.; SU, C. D.; LU, W. D. A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp. 113. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 98, p. 1329-1332, 2007.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 131, p. 209-217, 1984.

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

CORDEIRO, L. M. C.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides from species of the genus *Ramalina*-lichenized fungi-of three distinct habitats. **Phytochemistry**, Oxford, v. 63, p. 967-975, 2003a.

CORDEIRO, L. M. C.; REIS, R. A.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; FERREIRA, J. C.; IACOMINI, M. Linear  $\beta$ -mannose-containing polysaccharide,  $\beta$ -xylan, and amylose from the cultured photobiont *Trebouxia* sp. of the ascolichen *Ramalina celastri*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 220, p. 89-94, 2003b.

CORDEIRO, L. M. C.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; REIS, R. A.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A fungus-type beta-galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 244, p. 193-8, 2005.

CORDEIRO, L. M. C.; OLIVEIRA, S. M.; BUCHI, D. F.; IACOMINI, M. Galactofuranose-rich heteropolysaccharide from *Trebouxia* sp., photobiont of the lichen *Ramalina gracilis* and its effects on macrophage activation. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 42, p. 436-440, 2008.

CORRADI da SILVA, M. D. L. **Estudo de alguns carboidratos dos líquens *Sticta sp* e *Parmotrema cetratum* (Ach.) Hale**. Tese de Doutorado em Bioquímica- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 157p., 1992.

CORRADI da SILVA, M. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Unusual carbohydrates from the lichen, *Parmotrema cetratum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, n. 3, 715-717, 1993.

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**, Malden, v. 130, n. 2, p. 267-297, 1995.

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L.; JOHNSON, A. Characteristics lichen products in cultures of chemotypes of the *Ramalina siliquosa* complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 84, p. 705-714, 1992.

DeBARY, A. 1866. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. In: **Handbuch der physiologischen Botanik**. Ed. Wilh.Hofmeister. Leipzig: Engelmann, 1866 XII, 316 pp.

DePHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, v. 22, p. 151-175, 1998.

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

DODDS, W. K.; GUDDER, D. A.; MOLLENHAUER, D. The ecology of *Nostoc*. **Journal of Phycology**, Malden, v. 31, p. 2-18, 1995.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUBREUCQ, G.; DOMON, B.; FOURNET, B. Structure determination of a novel uronic acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep sea hydrothermal vents. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 290, p. 175-181, 1996.

DYER, J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. **Methods of Biochemical Analysis**, New York, v. 3, p. 112-149, 1956.

EL-SHEEKH, M. M.; EL-SHOUNY, W. A.; OSMAN, M. E. H.; EL-GAMMAL, E. W. E. Growth and heavy metals removal efficiency of *Nostoc muscorum* and *Anabaena subcylindrica* in sewage and industrial wastewater effluents. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 19, p. 357-365, 2005.

EL-SHEEK, M. M.; OSMAN, M. E. H.; DYAB, M. A.; AMER, M. S. Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 21, p. 42-50, 2006.

ESIMONE, C. O.; ADIKWU, M. U. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 70, p. 428-431, 1999.

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

FAHSELT, D. Individuals, populations and population ecology. In: Nash III TH (ed.), **Lichen Biology**. Cambridge University Press. 303 pp, 1996.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; McCRAY, E. B. **Fungal Databases**. Beltsville, USA: Systematic Botany & Mycology Laboratory, USDA-ARS [<http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>], 2004.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 197, p. 157-162, 1991.

FRIEDL, T. Thallus development and phycobionts of the parasitic lichen *Diploschistes muscorum*. **Lichenologist**, Cambridge, v. 19, p. 183-191, 1987.

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

FRIEDL, T. 1989b. **Systematik und Biologie von *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta) als Phycobiont der Parmeliaceae (lichenisierte Ascomyceten)**. Universität Bayreuth, Bayreuth. 218 pp.

FRIEDL, T. Photobionts. In: Nash, T. H. ed. **Lichen Biology**. University Press, Cambridge, 1996; p. 8-24.

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

FRIEDL, T., ROKITTA, C. Species relationships in the lichen alga *Trebouxia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): molecular phylogenetic analyses of nuclear-encoded large subunit rRNA gene sequences. **Symbiosis**, Rehovot, v. 23, p. 125-148, 1997.

FRIEDL, T.; ZELTNER, C. Assessing the relationships of some coccoid green lichen algae and the Microthamniales (Chlorophyta) with 18S ribosomal RNA gene sequence comparisons. **Journal of Phycology**, Malden, v. 30, p. 500-506, 1994.

GALUN, M.; BUBRICK, P. Physiological interactions between partners of the lichen symbiosis. In: **Encyclopedia of Plant Physiology**, New Series, 1984; v. 17, p. 362-401.

GARGAS, A.; DePRIEST, P. T.; GRUBE, M.; TEHLER, A. Multiple origins of lichen symbiosis in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. **Science**, Washington, v. 268, p. 1492-1495, 1995.

GAROZZO, D.; IMPALLOMENI, G.; SPINA, E.; STURIALE, L. The structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulata*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 307, p.113–124, 1998.

GÄRTNER, G. Taxonomische probleme bei den Flechtenalgengattungen *Trebouxia* und *Pseudotrebouxia* (Chlorophyceae, Chlorellales). **Phyton**, v. 25, p. 101-111. 1985a.

GÄRTNER, G. Die gattung *Trebouxia* Puymaly (Chlorellales, Chlorophyceae). **Archiv für Hydrobiologie - Supplement., Algol. Stud.**, Stuttgart, v. 41, p.495-548. 1985b.

GIL-SERRANO, A. M.; RODRIGUEZ-CARVAJAL, M. A.; TEJERO-MATEO, P.; ESPARTERO, J. L.; THOMAS-OATES, J.; RUIZ-SAINZ, J. E.; BUENDIA-CLAVERIA, A. M. Structural determination of a 5-O-methyl-deaminated neuramic acid (kdn)-containing polysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii*. **Biochemical Journal**, London, v. 334, p. 585-594, 1998.

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

GORIN, P. A. J. Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. **Canadian Journal of Chemistry**, London, v. 51, p. 2375-2383, 1973.

GORIN, P. A. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, San Diego, v. 38, p. 13–104, 1981.

GORIN, P. A. J.; BARON, M.; IACOMINI, M. Storage products of lichens. In **Handbook of Lichenology**, v. 3, p. 9-24. 1988.

GORIN, P. A. J.; BARON, M.; SILVA, M. L. C.; TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciencia e Cultura**, v.45, p.27-36. 1993.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 142, p. 119-132, 1984.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 142, p. 253-267, 1985.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in <sup>13</sup>C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, London, v. 53, p. 1212-1222, 1975.

GORIN, P. A. J., SPENCER, J. F. T.; BHATTACHARJEE, S. S. Structures of yeast mannans containing both alpha and beta-linked mannopyranose units. **Canadian Journal of Chemistry**, London, v. 47, p. 1499-1505, 1969.

GORSHKOVA, R. P.; NAZARENKO, E.L.; ZUBKOV, V. A.; STEPANENKO, L.S.; ISAKOV, V. V. Structural studies of polysaccharides from *Cetraria cucullata* and *Cetraria islandica* lichens. **Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 122-125, 1997.

GROOVER, R. D.; BOLD, H. C. Phycological studies VIII The taxonomy and comparative physiology of the Chlorosarcinales and certain edaphic algae. **University of Texas Publications**, Austin, v. 6907, p. 1-165, 1969.

GRUBE, M.; KROKEN, S. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. **Mycological Research**, oxford, v. 11, p. 1284-1294, 2000.

HALE, M. E. **How to know the lichens**. 2. ed., Iowa: Brown Company Publishers, 1979.

HAMADA, N.; MIYAGAWA, H. Secondary metabolites from isolated lichen mycobionts cultured under different osmotic conditions. **Lichenologist**, London, v. 27, p. 201-205, 1995.

HAMADA, N.; MYIAGAWA, H.; MIYAWAKI, H.; INOUE, M. Lichen substances in mycobionts of crustose lichens cultured on media with extra sucrose. **Bryologist**, Omaha, v. 99, p. 71-74, 1996.

HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. **Journal of Chemical Society**, United Kingdom, v. 107, p. 8-16, 1915.

HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 5, p. 357-360, 1965.

HELM, R. F.; HUANG, Z.; EDWARDS, D.; LEESON, H.; PEERY, W.; POTTS, M. Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 974-982, 2000.

HELMS, G. Taxonomy and symbiosis in associations of Physciaceae and *Trebouxia*. PhD thesis, Fakultät der Georg-August Universität Göttingen, Germany. Available on-line: <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2003/helms/>. 2003.

HIGUCHI, M.; MIURA, Y.; BOOHENE, J.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y.; YOSHIMURA, I.; YAMADA, Y. Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 59, p. 253-255, 1993.

HILDRETH, K. C.; AHMADJIAN, V. A study of *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* isolates from different lichens. **Lichenologist**, London, v 13, p. 65-86, 1981.

HILL D. J. **The nature of the symbiotic relationship in lichens**. Endeavour, New Series, v. 18, p. 96-103, 1994.

HIRABAYASHI, L.; IEHATA, S.; ITO, M.; SHIGETA, S.; NARUI, T.; SHIBATA, S. Inhibition effect of a lichen polysaccharide sulphate, GE-3-S, on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 37, p. 2410-2412, 1989.

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

HONEGGER, R. Mycobionts. In: Nash III, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge: University Press, p. 24-36, 1996.

HUANG, Z.; PRICKETT, T.; POTTS, M.; HELM, R. F. The use of the 2-aminobenzoic acid tag for oligosaccharide gel electrophoresis. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 328, p. 77-82, 2000



HUISMAN, M. M. H.; BRÜLL, L. P.; THOMAS-OATES, J. E.; HAVERKAMP, J.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. The occurrence of internal (1,5) linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectin substances. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 330, p. 103–114, 2001.

IACOMINI, M.; SCHNEIDER, C. L.; GORIN, P. A. J. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer moss), *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocraea*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 142, p. 237-251, 1985.

IACOMINI, M.; ZANIN, S. M. W.; FONTANA, J. D.; HOGGE, J.; GORIN, P. A. J. Isolation and characterization of 0  $\beta$ -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the lichen *Cora pavonia*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 168, p. 55-65, 1987.

IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; BARON, M.; TULLOCH, A. P.; MAZUREK, M. Novel D-glucans obtained by dimethyl sulfoxide extraction of the lichens *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbergii*, and an *Usnea* sp. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 176, p.117 - 126, 1988.

INGOLFSDOTTIR, K.; JURCIC, K.; FISCHER, B.; WAGNER, H. Immunologically active polysaccharide from *Cetraria islandica*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 60, p. 527-531, 1994.

INGÓLFSDOTTIR, K. Bioactive compounds in Iceland moss. In: Smestad-Paulsen, B., editor. **Bioactive Carbohydrate Polymers**, Proceedings Phytochemical Society of Europe. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2000: 25-36.

ISHII, T.; KONISHI, T.; ITO, Y.; ONO, H.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; MAEDA, I. A  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-arabinopyranosyltransferase that transfers a single arabinopyranose onto arabino-oligosaccharides in mung bean (*Vigna radiate*) hypocotyls. **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, p. 2418-2425, 2005.

JACOBS, J. B.; AHMADJIAN, V. Ultrastructure of the lichen alga *Trebouxia*. **American Journal of Botany**, St Louis, v. 55, p. 720, 1968.

JENNINGS, H. J.; SMITH, I. C. P. Determination of the composition and sequence of a glucan containing mixed linkages by carbon 13 nuclear magnetic resonance. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 92, p. 606-608, 1973.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 5, p. 36-38, 1965.

KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; OTSUKA, Y. Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. Unit structure of the anti-complementary arabinogalactan from *Angelica acutiloba*. Kitagawa. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 167, p. 221–237, 1987.

KÖNIG, J.; PEVELÜNG, E. Cell wall of the phycobiont *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia*: constituents and their localization. **Lichenologist**, London, v. 16, p. 129-144, 1984.

KOMURA, D. L.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of Agaricus spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Bioresource Technology**. Aceito para publicação. 2010.

KORIEEM, A. M.; AHMADJIAN, V. An structural study of lichenized and cultured *Nostoc* photobionts of *Peltigera canina*, *Peltigera rufescens*, and *Peltigera spuria*. **Endocyt. C. Res.**, v. 3, p. 65-78, 1986.

KOVAC, P.; HIRSCH, J. <sup>13</sup>C-NMR spectra of xylo-oligosaccharides and their application to the elucidation of xylan structures. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 85, p. 177-185, 1980.

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

KUHL, A.; LORENZEN, H. Handling and culturing of *Chlorella*. In: Prescott, D. M. ed. **Methods of Cell Physiology**. Academic Press, London, 1964; v. 1, p. 159-187.

LAU, J. M.; McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Selective degradation of the glycosyluronic acid residues of complex carbohydrates by lithium dissolved in ethylenediamine. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 168, p. 219–243,. 1987.

LAZAROFF, N. Photomorphogenesis and nostocacean development. In: **The biology of blue-green alga**. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, p. 279-319, 1973.

LEAL, J. A.; PRIETO, A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Structure and conformational features of an alkali- and water-soluble galactofuranan from the cell walls of *Eupenicillium crustaceum*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 244, p. 361–368, 1993a.

LEAL, J. A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M. Differences in cell wall polysaccharides of several species of *Eupenicillium*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 108, p. 341–346, 1993b.

LINDBERG, B. Components of bacterial polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, San Diego, v. 48, p. 279-318, 1990.

LUCENA, G. M. R. S.; GADOTTI, V. M.; MAFFI, L. C.; SILVA, G. S.; AZEVEDO, M. S.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cypura paludosa* Aubl. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 112, p. 19-25, 2007.

LUTZONI, F.; PAGEL, M.; REEB, V. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. **Nature**, London, v. 411, p. 937-940. 2001.

MARTI, J. Die Toxizität von Zink, Schwefel - und Stickstoffverbindungen auf Flechten - Symbionten. **Biblioth. Lichenol.**, v. 21, p. 1-129. 1985.

MATEOS, J. L.; PEDROSA, M.M; MOLINA, M. C.; PEREIRA, C. E.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Involvement of phytochrome-mediated cyclic AMP in the synthesis and deposition of fumarprotocetraric acid on the cortical hyphae of *Cladonia verticillaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 31, p. 667-674, 1993.

MEEKS, J. C. Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. **Bioscience**, Washington, v. 48, p. 266-276, 1998.

MELKONIAN, M.; PEVELING, E. Zoospore ultrastructure in species of *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* (Chlorophyta). **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 158, p. 183-210, 1988.

MEYER, K. H.; GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXI. La constitution de la lichénine. **Helv. Chim. Acta**, v. 30, p. 751-761, 1947a.

MEYER, K. H.; GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXII. L'isolichénine. **Helv. Chim. Acta**, v. 30, p. 761-765, 1947b.

MORT, A. J.; BAUER, W.D. Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 257, p. 1870-1875, 1982.

NASH III, T. H. Introduction In: Nash III, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge: University Press, p. 1-8, 1996.

NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. Antitumor active O-acetylated pustulan-type glucans from lichens of *Umbilicaria* species. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 18, p. 1431-1434, 1970.

NISHIKAWA, Y.; OHKI, K.; TAKAHASHI, K.; KURANO, G.; FUKUOKA, F.; EMORI, M. Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea*, and *Cladonia* species. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 22, p. 2692-2702, 1974.

ODONMAŽIG, P.; EBRINGEROVÁ, A.; MACHOVÁ, E.; ALFÖLDI, J. Structural and molecular properties of the arabinogalactan isolated from Mongolian larchwood (*Larix dohurica* L.). **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 252, p. 317-324, 1994.

OLAFSDOTTIR, E. S.; INGOLFSDOTTIR, K.; BARSETT, H.; SMETAD P. B.; JURCIC, K.; WAGNER, H. Immunologically active (1→3) (1→4)- $\alpha$ -D-glucan from *Cetraria islandica*. **Phytomedicine**, v. 6, n. 1, p. 33-39, 1999.

OLAFSDOTTIR, E. S.; INGÓLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from lichens: Structural characteristics and biological activity. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 67, p. 199-208, 2001.

OXLEY, D.; WILKINSON, S. G. Structures of neutral glycans isolated from the lipopolysaccharides of reference strains for *Serratia marcescens* serogroups O-16 and O-20. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 193, p. 241-248, 1989.

PALMQVIST, K.; SAMUELSSON, G.; BADGER, M. R. Photobiont - related differences in carbon acquisition among green - algal lichens. **Planta**, New York, v. 195, p. 70-79, 1994.

PALMQVIST, K. Carbon economy of lichens. **New Phytologist**, Malden, v. 148, p. 11-36, 2000.

PARRA, E.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M.; LEAL, J. A.; PRIETO, A.; GÓMEZ-MIRANDA, B. Structural investigation on two cell-wall polysaccharides of *Penicillium expansum* strains. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 257, p. 239–248, 1994.

PEREYRA, M. T.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M.; LEAL, J. A. Studies of new polysaccharide from *Lasallia pustulata* (L.) Hoffm. **The Lichenologist**, Cambridge, v. 35, p. 177-185, 2003.

PERLIN, A. S.; CASU, B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-<sup>13</sup>C. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 34, p. 2919-2924, 1969.

PEVELING, E. Pyrenoidstrukturen in symbiontisch lebenden *Trebouxia*-arten. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 59, p. 393–396. 1968.

PIERCEY-NORMORE, M. D.; DePRIEST, P. T. Algal switching among lichen symbioses. **American Journal of Botany**, St Louis, v. 88, p. 1490-1498, 2001.

POELT, J. Classification. - In: AHMADJIAN, V.; HALE, M. E. eds. **The Lichens**. Academic Press, New York and London, 1973; p. 599-632.

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

PRADO, S. R. T.; GORIN, P. A. J.; STUELP, P. M.; HONDA, N. K.; IACOMINI, M. An unusual juxtaposition of polysaccharides components of *Collema leptosporum*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 40, p. 271-276. 1999.

PRADO-MALUCELLI, S. R. **Análise estrutural de polissacarídeos do líquen *Collema leptosporum* Malme**. Curitiba. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 105p., 1996.

PURVIS, W. **Lichens**. Singapore: Craft Print, 2000.

QUEIROZ, L. S.; NASCIMENTO, M. S.; CRUZ, A. K. M.; CASTRO, A. J. G.; MOURA, M. F. V.; BASEIA, I. G.; ARAÚJO, R. M.; BENEVIDES, N. M. B.; LIMA, L. F. A.; LEITE, E. L. Glucans from *Caripia montagnei* mushroom present anti-inflammatory activity. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 10, p. 34-42, 2010.

RAI, A. N.; BERGMAN, B. Cyanolichens. **Biology And Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy**, v. 102B, p. 19-22, 2002.

RAI, A. N.; SODERBACK, E.; BERGMAN, B. Cyanobacterium-plant symbioses. **New Phytologist**, Malden, v. 147, p. 449-481, 2000.

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

RICHARDSON, D. H. S.; SMITH, D. C.; LEWIS, D. H. Carbohydrate movement between the symbionts of lichens. **Nature**, London, v. 214, 1967.

RICHARDSON, D. H. S. War in the world of lichens: Parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. **Mycological Research**, Oxford, v. 103, p. 641-650, 1999.

RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 929-967, 2001.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, New Jersey, v. 111, p. 1-61, 1979.

RIPPKA, R.; HERDMAN, M. Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains. **Catalogue and taxonomic handbook**. Institute Pasteur, Paris, France. v. 1, 1992/1993.

RITCHIE, R. G. S.; CYR, N.; KORSCH, B.; KOCH, U. J.; PERLIN, A. S. Carbon-13 chemical shifts of furanosides and cyclopentanols. Configuration and conformational influences. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 53, p. 1424-1433, 1975.

RUTHES, A. C. **Caracterização estrutural de heteropolissacarídeos do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans* e dos polissacarídeos do seu micobionte, isolado e cultivado axenica e apossimbioticamente**. Curitiba, 2006. 78p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M. A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SASSAKI, G. L.; CRUZ, L. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Fatty acid composition of lipids present in selected lichenized fungi: a chemotyping study. **Lipids**, Heidelberg, v. 36, p.167-174, 2001.

SASSAKI, G. L.; FERREIRA, J. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; TORRI, G.; TONI, F., GORIN, P.A.J. AND IACOMINI, M. (2002) Pustulan and branched b-galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa*, excreted from media containing glucose and sucrose. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 48, p. 385-389, 2002.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; REIS, R. A.; SERRATO, R. V.; ELÍFIO, S. L.; IACOMINI, M. Carbohydrate, glycolipid, and lipid components from the photobiont (*Scytonema* sp.) of the lichen *Dictyonema glabratum*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 340, p. 1808-1817, 2005.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; SERRATO, R. V.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1208, p. 215-222, 2008.

SCHWENDENER, S. 1869. **Die Algentypen der Flechtengonidien**. Programm für die Rectoratsfeier der Universität. Universitätsbuchdruckerei von C. Schultze, Basel. 42 pp.

SERIANNI, A. S.; BARKER, A. [<sup>13</sup>C]-Enrichment tetroses and tetra-furanosides: an evaluation of the relationship between NMR parameters and furanosyl ring conformations. **Journal OF Organic Chemistry**, Washington, v. 49, p. 3292-3300, 1984.

SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M.; FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M. Studies on the chemical structures of the new glucans isolated from *Gyrophora esculenta* Miyoshi and *Lasallia papulosa* (Ach.) Llano and their inhibiting effect on implanted sarcoma 180 in mice. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 16, p. 1639-1641, 1968.

SHIBATA, S. Polysaccharides of lichens. **J. Nat. Science Council Sri Lanka**, v. 1, p. 183-188, 1973.

SIMAS, F. F., GORIN, P. A. J.; WAGNER, R.; SASSAKI, G. L.; BONKERNER, A.; IACOMINI, M. Comparison of structure of gum exudate polysaccharides from the trunk and fruit of the peach tree (*Prunus persica*). **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 71, p. 218-228, 2008.

SIMAS-TOSIN, F. F.; WAGNER, R.; SANTOS, E. M. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharide of nectarine gum exudate: Comparison with that of peach gum. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 76, p. 485-487, 2009.

SKALOUD, P.; PEKSA, O. Evolutionary inferences based on its rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 54, p. 36-46. 2010.

SKIPSKI, V. P. Thin layer chromatography of neutral glycolipids. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 35, p. 396-425, 1975.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked β-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 597, p. 86-91, 2008a.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; MARCON, R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, Oxford, v. 69, p. 2731-2736, 2008b.

SMITH, D. C.; DOUGLAS, A. E. **The biology of symbiosis**. London: Edward Arnold. 1987.

STAHL, L. J.; MOEZELAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, v. 21, p. 179-211, 1997.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Experimental cultivation of lichens and lichen symbionts. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p.579-589, 1995.



STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Investigations on the photobiont and resynthesis of the tropical lichen *Coenogonium leprieurii* (Mont.) Nyl. from the north east coast of Brazil in culture symbiosis, v. 23, p. 117-124, 1997.

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 symbionts: DNA analysis, differentiation and secondary chemistry of selected mycobionts, resynthesis of two- and tripartite symbiosis. **Symbiosis**, Rehovot, v. 30, n. 2, p. 207-227, 2001.

STUELP-CAMPELO, P. M. A.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Effect of a soluble  $\alpha$ -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, p. 691-698, 2002.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 39, p. 243-270, 1985.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharide modification; a physiological approach. In M. Yalpani (Ed.). **Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications** (pp. 71-437 79). Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1987.

SUTHERLAND, I. W. **Biotechnology of Microbial Polysaccharides**. Cambridge: 441 Cambridge University Press. 1990.

SUTHERLAND, I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 12, p. 393-448, 1994.

SWAMY, N. R.; SALIMATH, P. V. Arabinans from *Cajanus cajan* cotyledon. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, p. 263-265, 1991.

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

TAKEDA, T.; FUNATSU, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. Antitumor active polysaccharides of *Evernia*, *Acroscyphus* and *Alectoria* species. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 20, p. 2445-2449, 1972.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, Washington, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Mannose-containing heteropolysaccharides of lichens: an unusual glucomannan from *Tornabenia intricata*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, p. 3467-3470, 1992.

TSCHERMAK-WOESS, E. *Asterochloris phycobiontica*, gen. et spec. nov., der Phycobiont der flechte *Varecellaria carneonivea*. **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 135, p. 279-294, 1980.

TSCHERMAK-WOESS, E. The algal partner. In: M. Galun (ed.): **CRC Handbook of Lichenology**. Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 39 - 92. 1988.

TSCHERMAK-WOESS, E. Developmental studies in trebouxoid algae and taxonomical consequences. **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 164, p. 161-195, 1989.

ULANDER, A.; TOLLENS, B. Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 39, p. 401, 1906.

VARTIA, K. O. Antibiotics from Lichens. In: Ahmadjian, V., Hale, M. S. editors. **The Lichens**. New York: Academic Press, 1973: 547.

VICENTE, C. Biochemical and environmental influence on the synthesis and accumulation of lichen phenolics. **Symbiosis**, Rehovot, v. 11, p. 279-297, 1991.

VINEGAR *et al.*, 1979- VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R. Antagonism of pain and hyperalgesia. Anti-inflammatory Drugs. In: VANE, J. R.; FERREIRA, S.H. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin: Springer Verlag, v. 50, p. 208-222, 1979.

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; KANNAPPA REDDY, M.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A. B.; SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 71, p. 564-566, 2000.

WANG-YANG, J. R.; AHMADJIAN, V. A morphological study of the algal symbionts of *Cladonia rangiferina* (L.) Web. and *Parmelia caperata* (L.) Ach. **Taiwania**, Taiwan, v. 17, p. 170-181, 1972.

WARÉN, H. Reinkulturen von Flechtengonidien. **Finska Vet. Soc. Förh.**, v. 61, p. 1-79. 1920.

WASTLHUBER, R.; LOOS, E. Differences between cultured and freshly isolated cyanobiont from *Peltigera* – Is there symbiosis-specific regulation of a glucose carrier?. **Lichenologist**, Cambridge, v. 28, p. 67-78, 1996.

WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 34, p. 415-20, 1988.

WOLUCKA, B.; HOFFMAN, E. The presence of  $\beta$ -D-ribosyl-1-monophosphodecaprenol in mycobacteria. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 20151-20155, 1995.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; TISCHER, C. A.; AHTI, T.; IACOMINI, M. Chemotyping studies on the glucans of lichens of the genus *Cladonia*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 52, p. 1069-1074, 1999a.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M. **Estudo comparativo de polissacarídeos e oligossacarídeos de líquens do gênero *Cladonia***. Curitiba, 1999b. 170 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

WORANOVICZ, S. M.; PINTO, B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, Oxford, v. 51, p. 395-402, 1999c.

XAVIER-FILHO, L.; LEITE, J. B. M.; LIMA, E. O. Atividade antimicrobiana de líquens antárticos. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 63, p. 93-98, 1990.

YAMAMOTO, Y.; MIZUGUCHI, R.; YAMADA, Y. Tissue cultures of *Usnea rubescens* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their cultures. **Agricultural and Biological Chemistry**, New Jersey, v. 49, p. 3347-3348, 1985.

YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y.; HIGUCHI, M.; KINOSHITA, Y.; YOSHIMURA, I. Using lichen tissue cultures in modern biology. **The Bryologist**, Omaha, v. 96, p. 384-393, 1993.

YAMAMOTO, Y.; KINOSHITA, Y.; TAKAHAGI, T.; KROKEN, S.; KUROKAWA, T.; YOSHIMURA, I. Factors affecting discharge and germination of the lichen ascospores. **Journal of Hattori Botanical Laboratory**, Japan, v. 85, p. 267-278, 1998.

YOKOTA, I.; SHIBATA, S.; SAITÔ, H.A. <sup>13</sup>C-n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 69, p. 252-258, 1979.

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.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, Amsterdam, v. 16, p. 109-110, 1983.

ZULPA de CAIRE, G.; STORNI de CANO, M.; ZACCARO de MULÉ, M. C.; PALM, R. M.; COLOMBO, K. Exopolysaccharide of *Nostoc muscorum* (Cyanobacteria) in the aggregation of soil particles. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 9, p. 249-253, 1997.

**ANEXOS**



Research article

## Polysaccharides present in cultivated *Teloschistes flavicans* symbiosis: Comparison with those of the thallus

Andrea C. Ruthes<sup>a</sup>, Dirce L. Komura<sup>a</sup>, Elaine R. Carbonero<sup>a</sup>, Lucimara M.C. Cordeiro<sup>a</sup>,  
Rodrigo A. Reis<sup>b</sup>, Guilherme L. Sasaki<sup>a</sup>, Philip A.J. Gorin<sup>a</sup>, Marcello Iacomini<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CP 19.046, CEP 81.531-980 Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> UFPR Litoral, Rua Jaguariva 512, CEP 83260-000 Matinhos, PR, Brazil

Received 7 March 2007

Available online 26 October 2007

### Abstract

The chemical structures of polysaccharides present in aposymbiotically cultured myco- and photobionts of the lichen *Teloschistes flavicans* were determined, in order to compare them with those previously found in the intact thallus. The mycobiont was cultured on a solid Lilly and Barnett medium and the resulting colonies were freeze dried, defatted, and their polysaccharides were extracted successively with 2%, 10% and 30% aq. KOH, each at 100 °C. The extracts were neutralized (HOAc) and fractionated, giving rise to three homogeneous fractions, PFSK2 from 2% KOH, which contained a (1 → 4),(1 → 6)-linked  $\alpha$ -glucan (1:1 ratio, pullulan), fraction PK10 from 10% KOH extraction, which was a linear (1 → 3)-linked linear  $\beta$ -glucan (laminaran), and fraction PK30 from 30% KOH extraction, being a branched (1 → 3),(1 → 6)-linked  $\beta$ -glucan. The photobiont (*Trebouxia* sp. de Puymary) was cultured in liquid nutrient medium, and after purification, a linear (1 → 5)-linked  $\beta$ -galactofuranan was characterized. The galactofuranan and the laminaran were not present in the symbiotic thallus, in contrast to the glucans, showing that the mycobiont alone produces them without participation of the photobiont.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** *Teloschistes flavicans*; Cultured mycobiont; Cultured photobiont; Polysaccharides;  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucans; Galactofuranan

### 1. Introduction

Lichen thalli, the symbiotic phenotype of lichen-forming fungi in association with their photobiont, are known to contain considerable amounts of polysaccharide. The thallus of the ascolichen *Teloschistes flavicans* contained glucans, which are soluble and insoluble in cold-water [16]. The soluble  $\alpha$ -glucan was a pullulan, composed of alternate (1 → 4) and (1 → 6)-linkages, while the insoluble one was a branched  $\beta$ -glucan with a (1 → 6)-linked main chain, partially substituted at O-3. Not yet known is whether these glucans are produced by the mycobiont alone, or if there might be a still unknown contribution of the photobiont. To date, by comparing extracts of whole lichen thallus homogenates with those of the aposymbiotically cultured mycobionts and photobionts, Takahashi et al. [20] demonstrated that most but not all water-soluble

polysaccharides are produced by the fungal partner. More recently, Cordeiro et al. [6] studied polysaccharides from the aposymbiotically cultured *Ramalina peruviana* mycobiont and showed that a galactomannan, a (1 → 3),(1 → 4)-linked  $\alpha$ -glucan (nigeran, 1:1 molar ratio) and a linear (1 → 3)-linked  $\beta$ -glucan (laminaran), previously found in the thallus [5], were also produced by the cultured fungus, without participation of the *Trebouxia* photobiont.

We now identify the fine chemical structure of polysaccharides, isolated from aposymbiotically grown *Teloschistes flavicans* myco- and photobionts, and compare them with those produced by the intact lichenized fungi.

### 2. Methods

#### 2.1. General experimental procedures

Gas-liquid chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was performed using a Varian model 3300 gas chromatograph

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1655; fax: +55 41 3266 2042.  
E-mail address: [iacomini@ufpr.br](mailto:iacomini@ufpr.br) (M. Iacomini).

linked to a Finnigan Ion-Trap model 810 R-12 mass spectrometer, with He as carrier gas. A capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.) of DB-225 held at 50 °C during injection and then programmed at 40 °C min<sup>-1</sup> to 220 °C (constant temperature) was used for quantitative analysis of alditol acetates and to 215 °C for partially *O*-methylated alditol acetates.

<sup>13</sup>C NMR spectra were obtained using a Bruker DRX 400 spectrometer incorporating Fourier transform. Analyses were performed at 50 °C, samples being dissolved in D<sub>2</sub>O or in Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>. Chemical shifts are expressed as δ PPM, using the resonances of CH<sub>3</sub> groups of acetone internal standard (<sup>1</sup>H at δ 2.22; <sup>13</sup>C, δ 30.2), or Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H at δ 2.40; <sup>13</sup>C, δ 39.7).

COSY, HMQC and DEPT spectra were obtained according to the Bruker manual.

## 2.2. Isolation and culture of the symbionts

The lichenized fungus *T. flavicans* was collected from stunted trees growing in a “resting” environment (sand banks, close to the sea, virtually at sea level) at 25° 32'50" S/48°20' 30" W, on the Ilha do Mel, Pontal do Paraná, State of Paraná, Brazil and was kindly identified by Prof. Dr. Sionara Eliasaro of the Department of Botany, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil. A voucher specimen of the lichen is deposited in the UPCB (Herbarium of the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil), registration number 44617.

The isolation of the mycobiont and the production of biomass were obtained according to Reis et al. [15].

Photobiont cultures were obtained from thallus fragments, using the tissue culture method of Yamamoto [22]. To obtain biomass, the photobiont was cultivated on a modified BBM liquid medium, to which 1.5% glucose and 0.5% peptone was added. The cultures were left to grow with a 12 h light/12 h dark periodicity, at 21 ± 2 °C. After 30 days, the algal cells were removed by filtration, washed with distilled water and freeze-dried, to give 53 g of biomass.

## 2.3. Extraction and fractionation of polysaccharides

The mycelial mass of the mycobiont of *T. flavicans* was extracted with 2:1 (v/v) CHCl<sub>3</sub>-MeOH at 60 °C for 3 h (×3, 250 mL each), in order to solubilize low molecular weight components. The residue was then submitted to a sequential extraction (Fig. 2) with 2%, 10% and 30% aq. KOH containing traces of NaBH<sub>4</sub> at 100 °C for 3 h (×3, 250 mL each). The extracts were neutralized (HOAc), added to excess ethanol (3 vol.) and the resulting polysaccharide precipitates were dissolved in water and dialyzed against tap water, giving rise to fractions K2 (2% aq. KOH extraction), K10 (10% aq. KOH extraction) and K30 (30% KOH extraction, each at 100 °C). These were frozen and then allowed to thaw slowly, resulting in insoluble (PK2, PK10 and PK30, respectively) and soluble fractions (SK2, SK10 and SK30, respectively). Fraction SK2 was submitted to a second fractionation process using Fehling solution, resulting in a supernatant (SFSK2) and a precipitated

fraction (Cu<sup>2+</sup> complex, PFSK2), which were separated by centrifugation (15 min, 9000 rpm, 25 °C).

The mass of *T. flavicans* photobiont (53 g) was extracted with 2:1 (v/v) CHCl<sub>3</sub>-MeOH at 60 °C for 3 h and 1:1 (v/v) CHCl<sub>3</sub>-MeOH at 80 °C for 2 h (×3, 1 L each), giving soluble material in a 29% combined yield. The defatted residue was then submitted to aqueous extraction (Fig. 2) for 3 h (×3, 1 L each). The extracts were concentrated, added to excess ethanol (3 vol.) and the resulting polysaccharide precipitates were dissolved in water and dialyzed against tap water, giving rise to fraction P1 (10.5% yield). The P1 solution was frozen and then allowed to thaw slowly, resulting in insoluble material (P2, 2.3% yield) and a soluble one (fraction P3, 5% yield). Fraction P3 was submitted to a second purification process (trichloroacetic acid protein precipitation), resulting in a supernatant (P4, 1% yield) and a precipitated fraction P5 (2% yield), which were resolved by centrifugation (15 min, 9000 rpm, 25 °C). P4 was purified by ultrafiltration through a membrane of 10 kDa *M<sub>r</sub>* cut-off (Millipore-regenerated cellulose), resulting in an eluted fraction P6 (yield 0.2%).

## 2.4. Monosaccharide composition of polysaccharides

The monosaccharide components of the polysaccharides and their molar ratios were determined by hydrolysis with 2 M TFA at 100 °C for 8 h, followed by conversion of resulting aldoses to alditol acetates (GC-MS) by successive NaBH<sub>4</sub> reduction and acetylation with Ac<sub>2</sub>O-pyridine (1:1, v/v) at room temperature for 12 h. The alditol acetates obtained were analyzed by GC-MS as in item 2.1.

## 2.5. Determination of homogeneity of polysaccharides

The homogeneity and molecular weight (*M<sub>w</sub>*) of water-soluble polysaccharides were determined by high performance steric-exclusion chromatography (HPSEC), using a refractive index (RI) detector, and four WATERS gel permeation columns in series, with an exclusion limit of 1 × 10<sup>6</sup>, 4 × 10<sup>5</sup>, 8 × 10<sup>4</sup>, and 5 × 10<sup>3</sup>. The eluent was 0.1 M NaNO<sub>3</sub>, containing 0.5 g L<sup>-1</sup> NaN<sub>3</sub>, using a flux of 0.6 mL min<sup>-1</sup>, monitored by a WATERS peristaltic pump. The polysaccharide solution (1 mg mL<sup>-1</sup>) was filtered through a membrane with pores of 0.2 μm diameter (Millipore). The specific refractive index increment (*dn/dc*) was determined, the samples being dissolved in 50 mM NaNO<sub>3</sub>, and five increasing concentrations, ranging from 0.2 to 1.0 mg mL<sup>-1</sup>, were used to determine the slope of the increment.

## 2.6. Methylation analysis of polysaccharides

Following the method of Ciucanu and Kerek [3], isolated polysaccharides (5 mg) were dissolved in dimethyl sulfoxide (2 mL), to which MeI (2 mL) was added, followed by powdered NaOH (0.5 g). The mixtures were agitated vigorously for 30 min, and then left overnight. Excess HOAc was added and the products partitioned between CHCl<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O. The lower layers were washed once with H<sub>2</sub>O and evaporated to



dryness to give per-*O*-methylated derivatives. These were partially hydrolyzed with 50% v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 1 h at 0 °C, followed by dilution to 8% aq. solutions, which were completely hydrolyzed at 100 °C for 14 h, neutralized (BaCO<sub>3</sub>), and filtered [17]. The resulting mixtures of *O*-methylaldoses was reduced with NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> and acetylated, as cited above, to give a mixture of partially *O*-methylated alditol acetates, which were analyzed by GC-MS and identified by their typical electron impact breakdown profiles and retention times [18].

### 3. Results and discussion

The mycobiont and photobiont of *Teloschistes flavicans* (Fig. 1A) were successfully isolated from spores and thallus fragments, respectively. Briefly, mycobiont cultures were grown starting from germination of spores (Fig. 1B), which formed mycelia on the surface of solid Bolds Basal medium after 42 days of incubation (Fig. 1C). In order to obtain biomass, mycelia were transferred to plates containing Lilly and Barnett medium (LBM), in which well-developed colonies were formed (Fig. 1D). After 3 months, colony samples were collected, freeze dried, giving 8.7 g of biomass, and isolation of polysaccharides was carried out.

To obtain biomass of the photobiont, cultures obtained from thallus fragments were cultivated for 30 days on a modified

BBM liquid medium (plus 1.5% glucose and 0.5% peptone), giving 53 g of photobiont cells. For morphological evaluation, the photobiont was cultivated in inorganic BBM medium for 4 weeks, and analysis of its mature vegetative cells and life cycle showed that it belongs to the genus *Trebouxia*. Moreover, identification of both symbionts has also been demonstrated by comparison of their ITS rDNA sequence [15].

In order to remove pigments, lipids, and other hydrophobic material, the mycelial mass of the mycobiont was extracted with CHCl<sub>3</sub>-MeOH, giving soluble material in 2% yield. The residual mycelium was then submitted to successive alkaline extraction, with 2%, 10% and 30% aq. KOH (Fig. 2). Extracted polysaccharides were precipitated with ethanol, dialyzed and freeze-dried, giving rise to fractions K2 (60% yield), fraction K10 (5% yield) and fraction K30 (15% yield), respectively. These were then submitted to a freeze-thawing process, resulting in precipitates (PK2, PK10 and PK30, respectively) and supernatants (SK2, SK10 and SK30, respectively).

Fraction SK2 (20% yield) was composed of mannose, glucose, rhamnose, and galactose in 50:19:14:12 molar ratio. Its polysaccharides were fractionated by treatment with Fehling solution, which gave rise to a supernatant (4% yield) and a precipitate (PFSK2, 10% yield), mainly composed of glucose units (95%). PFSK2 proved to be homogeneous on HPSEC analysis, giving a single peak with  $M_w = 43$  kDa ( $dn/dc = 0.155$ ). Its <sup>13</sup>C NMR spectrum contained 10 signals

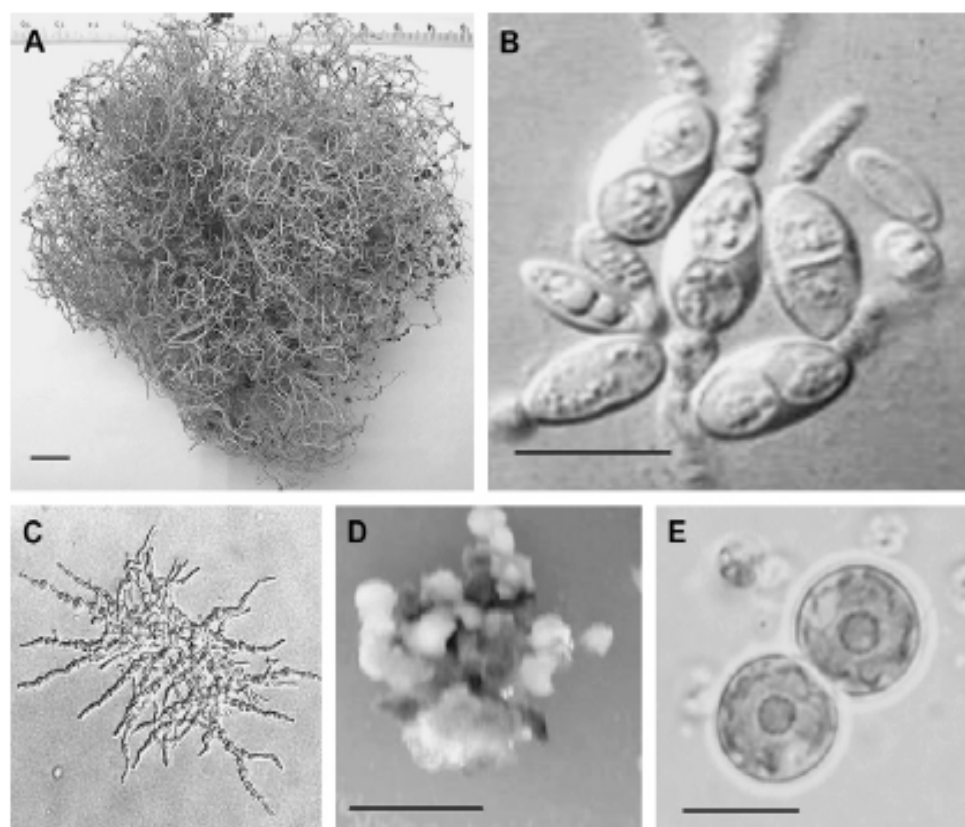


Fig. 1. (A) Thallus of lichenized fungus *Teloschistes flavicans*; (B) spore germination; (C) mycobiont mycelium formed after 42 days on solid BBM medium ( $\times 400$ ); (D) mycobiont colony formed after 3 months on solid nutrient Lilly and Barnett medium; (E) mature vegetative cells of the photobiont *Trebouxia* sp. Bars: (A, D) 1 cm, (B, E) 10  $\mu$ m.



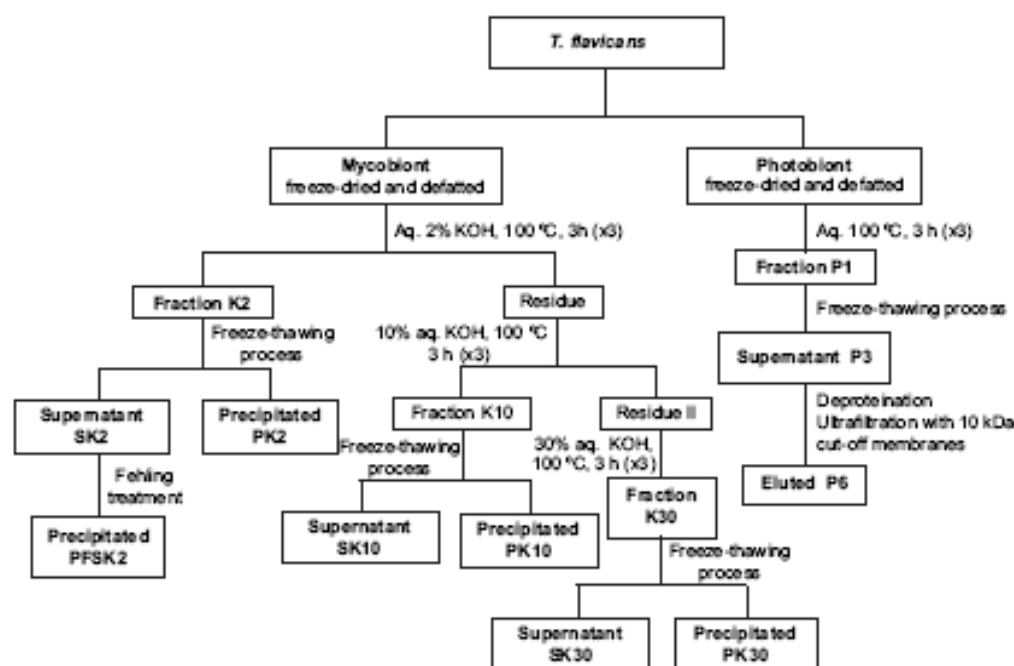


Fig. 2. Scheme of extraction and fractionation of polysaccharides of cultured *T. flavicans* symbionts.

(Fig. 3A), two of which were overlapping, consistent with a two-unit alternating structure. The C-1 signals at  $\delta$  100.5 and  $\delta$  98.1 arose from (1  $\rightarrow$  6) and (1  $\rightarrow$  4)-linked  $\alpha$ -GlcP units respectively, as with pullulan [2,10,16,21]. These units have an  $\alpha$ -glycosidic configuration by virtue of their high frequency H-1 signals at  $\delta$  5.34 (100.5) and  $\delta$  4.97 (98.1), both were in agreement with the  $J_{C-1,H-1}$  value of 173.7 Hz [13]. The  $^{13}\text{C}$  signal at  $\delta$  66.7 (and H-6 at 3.97, H-6' at 3.81) suggested an *O*-substituted  $\text{CH}_2$  group. These data are in agreement with a methylation analysis, which showed non-reducing end (trace), 6-*O*- (52%) and 4-*O*-substituted glucopyranosyl units (48%).

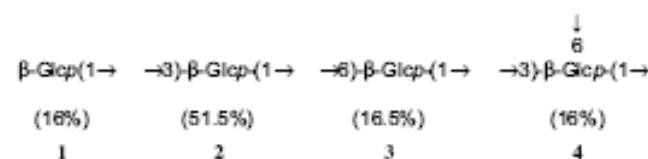
Fraction PFSK2, prepared from the cultivated mycobiont of *T. flavicans*, is thus a linear  $\alpha$ -D-glucan with alternate (1  $\rightarrow$  4) and (1  $\rightarrow$  6) linkages, identical to that previously found in the symbiotic thallus [16]. It is classified as a pullulan with 1:1 linkage ratio, different from the pullulans formed on growth of *Aureobasidium pullulans* and *Tremella mesenterica*, which contains (1  $\rightarrow$  4) and (1  $\rightarrow$  6) linkages in a 2:1 molar ratio [2,10]. A related pullulan with a 1:2 molar linkage ratio was produced by the fungus *Cyttaria harioi* [21].

The alkaline extract K10 contained glucose, manose, galactose, rhamnose, arabinose and xylose, in 74:11:9:2:2:2 molar ratio. After a freeze-thawing process, an insoluble fraction (PK10, 1% yield) consisted mainly of Glc (98%). When analyzed by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy (Fig. 3B), it proved to be a linear (1  $\rightarrow$  3)-linked  $\beta$ -glucan (laminaran) [1] with six typical signals at  $\delta$  102.9 (C-1), 86.1 (C-3), 76.3 (C-5), 72.8 (C-2), 68.4 (C-4) and 60.9 (C-4) [7]. Interestingly, this glucan was not found in extracts of the symbiotic thallus of *T. flavicans* [16].

After a final, hot alkaline extraction, fraction K30 was composed of glucose, galactose, mannose, rhamnose, and arabinose in a 78:10:8:2:2 molar ratio, while water-insoluble PK30 (5% yield), obtained via a freeze-thawing process, was composed mainly of glucose (94%). Methylation analysis of fraction PK30 showed a branched structure, with non-reducing end (16%), 3-*O*- (51.5%), 6-*O*- (16.5%) and 3,6-di-*O*-substituted glucopyranosyl units (16%).

$^{13}\text{C}$  NMR (Fig. 3C) and  $^1\text{H}$  (obs.),  $^{13}\text{C}$  HMQC spectra contained signals (C-1/H-1) in the anomeric region at  $\delta$  103.2/4.60 corresponding to non-reducing end and 6-*O*-substituted units, while those at  $\delta$  103.2/4.81 are from 3-*O*-substituted and 3,6-di-*O*-substituted residues, all having a  $\beta$ -configuration [19].

The glycosidic linkages of the  $\beta$ -glucan were shown by the presence of 3-*O*-substituted signals at  $\delta$  86.2 and 86.9 arising respectively from 3-*O*- and 3,6-di-*O*-substituted units, and an *O*-substituted- $\text{CH}_2$ -6 signal at  $\delta$  68.9 (Fig. 3C), in the form of an HMQC doublet at  $\delta$  68.9; 4.01/3.68, corresponding to 6-*O*- and 3,6-di-*O*-substituted residues. Substitution at *O*-6 was confirmed by a corresponding, inverted resonance in a DEPT spectrum. According to the data, the  $\beta$ -glucan contains units with structures 1, 2, 3, and 4.



These structures have been found in *T. flavicans* symbiotic thalli, a controlled Smith degradation, having shown that it did not have a (1  $\rightarrow$  3)-linked main chain [16].

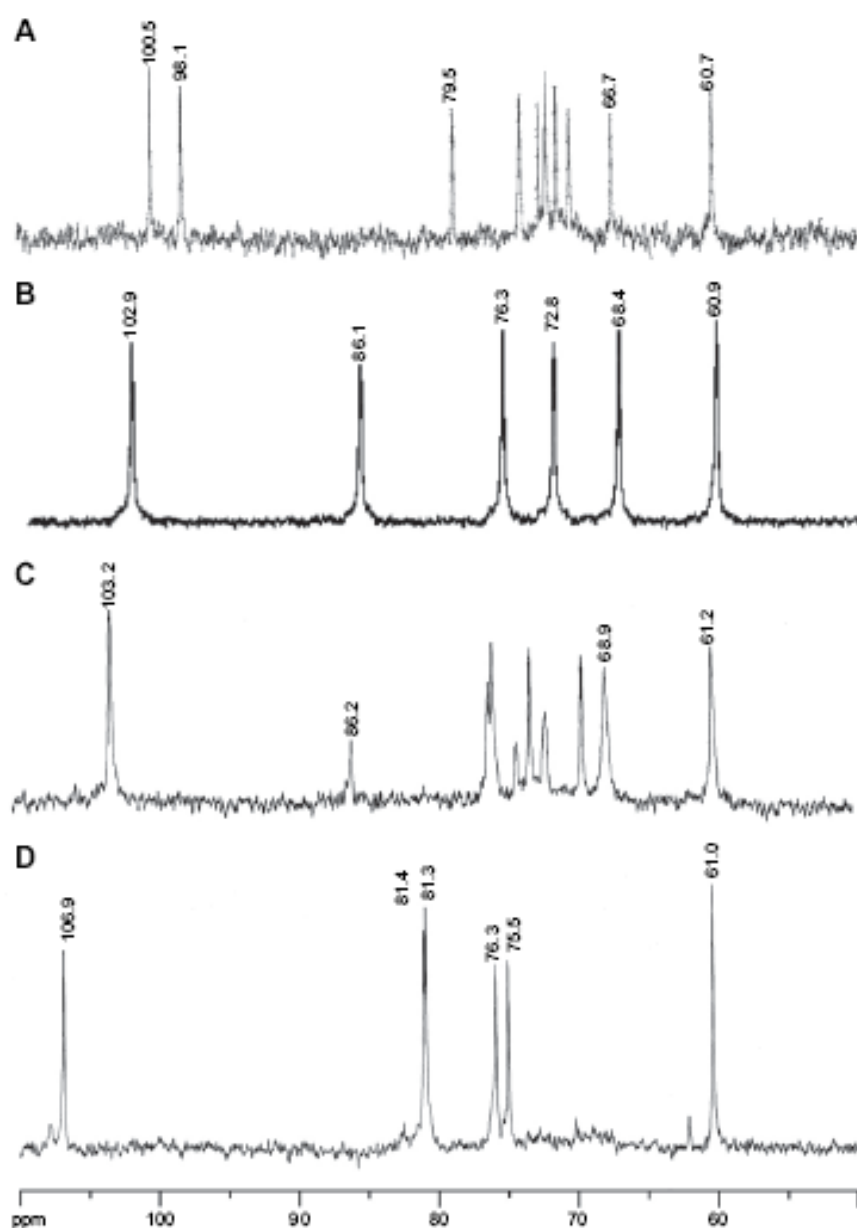


Fig. 3.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of fractions obtained from cultured *T. flavicans* symbionts: (A) fraction PFSK2, a (1  $\rightarrow$  4),(1  $\rightarrow$  6)-linked  $\alpha$ -D-glucan; (B) fraction PK10, a linear (1  $\rightarrow$  3)-linked  $\beta$ -D-glucan; (C) fraction PK30, a branched (1  $\rightarrow$  3),(1  $\rightarrow$  6)-linked  $\beta$ -D-glucan (solvent:  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ); (D) fraction P6, a (1  $\rightarrow$  5)-linked  $\beta$ -D-galactofuranan (solvent:  $\text{D}_2\text{O}$ ).

The presence of the branched (1  $\rightarrow$  3),(1  $\rightarrow$  6)-linked  $\beta$ -glucan in the thalli of *T. flavicans*, and its isolation from the aposymbiotically cultured mycobiont, confirms its fungal origin. However, for many years it was suggested that it had a photobiont origin, due to its low yield when isolated from thalli [14]. Moreover, similar  $\beta$ -D-glucans were thought in 1987 to be typical of basidiomycetous mycobionts, as with *Dictyonema glabratum* (originally *Cora pavonia*) [9]. However, a branched lentinan-type (1  $\rightarrow$  3),(1  $\rightarrow$  6)-linked  $\beta$ -glucan containing a (1  $\rightarrow$  3)-linked main-chain, has been obtained from the imperfect lichen *Thamnoia vermicularis* var. *subuliformis* [12]. We now find that the lichen contained

an ascomycetous biont and the (1  $\rightarrow$  3),(1  $\rightarrow$  6)-linked  $\beta$ -glucan was also found.

In contrast with our results, in which 80% of the cultivated mycobiont was soluble in aqueous alkali, Honegger and Bartnicki-Garcia [8] reported that for the cultured mycobionts of *Cladonia macrophylla*, *Cladonia caespiticia* and *Physcia stellaris*, most of the extracted hexosan was alkali-insoluble and accounted for almost 40% of the dry weight, while that of the alkali-soluble was only 7–15%.

Regarding polysaccharides of the photobiont *Trebouxia* sp. from *T. flavicans*, fraction P6, obtained in a very low yield (0.2%), was composed mainly of galactose (98%). When

analyzed by  $^{13}\text{C}$  NMR (Fig. 3D) and  $^1\text{H}$  (obs.),  $^{13}\text{C}$  HMQC, this fraction gave rise mainly to six signals (CH), a high frequency C-1 signal at  $\delta$  106.9 (H-1 at  $\delta$  5.19), showing a  $\beta$ -configuration [10,11], and others at  $\delta$  81.4/4.14 (C-4/H-4),  $\delta$  81.3/4.13 (C-2/H-2),  $\delta$  76.3/4.10 (C-3/H-3),  $\delta$  75.5/3.93 (C-5/H-5), and  $\delta$  61.0/3.80 (C-6/H-6), typical of (1  $\rightarrow$  5)-linked  $\beta$ -Gal units. Methylation analysis of the galactofuranan was consistent with non-reducing end (2%), as well 5-O-substituted Gal units (98%). This polysaccharide was not detected in the lichen, probably due to its very low content. It has been suggested that it can play an important role in the recognition of symbionts in the symbiosis process [4].

#### 4. Conclusions

Our studies on polysaccharides from the aposymbiotically cultured *T. flavicans* mycobiont showed that the linear (1  $\rightarrow$  4),(1  $\rightarrow$  6)-linked  $\alpha$ -glucan (pullulan with a 1:1 ratio) and the branched (1  $\rightarrow$  3),(1  $\rightarrow$  6)-linked  $\beta$ -glucan found in the symbiotic thallus are produced by the fungus, without participation of the *Trebouxia* photobiont. The third glucan, a linear (1  $\rightarrow$  3)-linked  $\beta$ -glucan (laminaran), in contrast, was not found in the lichenized thallus.

It was demonstrated that the aposymbiotic cultivation of lichen symbionts is a useful technique, followed by analysis of their component polysaccharides, to determine their origin in lichen symbiosis. Moreover, this technique would permit studies on polysaccharide structure in microlichens, which was impracticable due to the very low amounts of thalli available in nature.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the Brazilian funding agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Araucária.

#### References

- [1] M. Baron, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, Isolation and identification of a linear (1  $\rightarrow$  3)-linked  $\beta$ -D-glucan and other carbohydrate components of the lichen *Stereocaulon ramulosum* (Sw.). *Ruizh.* *Carbohydr. Res.* 177 (1988) 235–239.
- [2] M. Bemier, The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter, *Can. J. Microbiol.* 4 (1958) 195–204.
- [3] I. Ciucanu, F. Kerek, A simple and rapid method for permethylation of carbohydrates, *Carbohydr. Res.* 131 (1984) 209–217.
- [4] L.M.C. Cordeiro, E.R. Carbonero, G.I. Sasaki, R.A. Reis, E. Stocker-Wörgötter, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, A fungus-type  $\beta$ -galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 244 (2005) 193–198.
- [5] L.M.C. Cordeiro, E. Stocker-Wörgötter, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, Comparative studies of the polysaccharides from species of the genus *Ramalina* – lichenized fungi – of three distinct habitats, *Phytochemistry* 60 (2003) 967–975.
- [6] L.M.C. Cordeiro, E. Stocker-Wörgötter, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, Elucidation of polysaccharide origin in *Ramalina parviana* symbiosis, *FEMS Microbiol. Lett.* 238 (2004) 79–84.
- [7] P.A.J. Gorin, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 38 (1981) 13–104.
- [8] R. Honegger, S. Baránicki-García, Cell wall structure and composition of cultured mycobionts from the lichens *Cladonia macrophylla*, *Cladonia costaricensis*, and *Physcia stellaris* (Lecanomiales, Ascomycetes), *Mycol. Res.* 95 (1991) 905–914.
- [9] M. Iacomini, S.M.W. Zanin, J.D. Fontana, L. Hogge, P.A.J. Gorin, Isolation and characterization of  $\beta$ -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*, *Carbohydr. Res.* 168 (1987) 55–65.
- [10] H.J. Jennings, I.C.P. Smith, Determination of the composition and sequence of a glucan containing mixed linkages by carbon 13 nuclear magnetic resonance, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1973) 606–608.
- [11] T. Kohama, M. Fujimoto, A. Kuniaka, H. Yoshima, Structure of manogalactan, an acidic polysaccharide of *Penicillium citrinum*, *Agric. Biol. Chem.* 38 (1974) 127–134 (Japan).
- [12] E.S. Olafsdottir, S. Omarsson, B. Smestad Paulsen, H. Wagner, Immunologically active O-6-branched (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -glucan from the lichen *Thamnosia vermicularis* var. *subuliformis*, *Phytomedicine* 10 (2003) 318–324.
- [13] A.S. Perlin, B. Cava, Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose- $^{13}\text{C}$ , *Tetrahedron Lett.* 10 (1969) 2921–2924.
- [14] S.R.T. Prado, P.A.J. Gorin, P.M. Stuelp, N.K. Honda, M. Iacomini, An unusual juxtaposition of polysaccharides components of *Collema leptosporum*, *Carbohydr. Polym.* 40 (1999) 271–276.
- [15] R.A. Reis, M. Iacomini, P.A.J. Gorin, L.M. Souza, M. Grube, L.M.C. Cordeiro, G.I. Sasaki, Fatty acid composition of the tropical lichen *Teloschistes flavicans* and its cultivated symbionts, *FEMS Microbiol. Lett.* 247 (2005) 1–6.
- [16] R.A. Reis, C.A. Fischer, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, A new pullulan and a branched (1  $\rightarrow$  3)-, (1  $\rightarrow$  6)-linked  $\beta$ -glucan from the lichenized ascomycete *Teloschistes flavicans*, *FEMS Microbiol. Lett.* 210 (2002) 1–5.
- [17] J.F. Saeman, W.E. Moore, R.I. Mitchell, M.A. Millet, Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography, *Tech. Assoc. Pulp. Pap. Ind.* 37 (1954) 336–343.
- [18] G.I. Sasaki, P.A.J. Gorin, L.M. Souza, P.A. Czelusniak, M. Iacomini, Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Puntie methylation, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 731–739.
- [19] T.R. Skjærve, S. Kirkvold, J. Skjærve, K.I. Reitan, A branched  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  3,1  $\rightarrow$  6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (Bacillariophyceae) characterized by NMR, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 2108–2114.
- [20] K. Takahashi, T. Takeda, S. Shibata, Polysaccharides of lichen symbionts, *Chem. Pharm. Bull.* 27 (1979) 238–241.
- [21] N. Waksman, R.M. de Lederkremer, A.S. Cerezo, The structure of an  $\alpha$ -D-glucan from *Cytaria hirsuti* (Fischer), *Carbohydr. Res.* 59 (1977) 505–515.
- [22] Y. Yamamoto, R. Mizuguchi, Y. Yamada, Tissue cultures of *Usnea rubesces* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their cultures, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 3347–3348.





## Structural characterization of the uncommon polysaccharides obtained from *Peltigera canina* photobiont *Nostoc muscorum*

Andrea C. Ruthes<sup>a</sup>, Dirce L. Komura<sup>a</sup>, Elaine R. Carbonero<sup>b</sup>, Guilherme L. Sasaki<sup>a</sup>, Philip A.J. Gorin<sup>a</sup>, Marcello Iacomini<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-980 Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão, CEP 75704-020 Catalão, GO, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 December 2009

Received in revised form 19 January 2010

Accepted 21 January 2010

Available online 29 January 2010

#### Keywords:

Cyanobacteria

*Nostoc muscorum*

Polysaccharide

Structural characterization

### ABSTRACT

Cellular and extracellular polysaccharides of the lichenized fungus *Peltigera canina* photobiont *Nostoc muscorum* (UTEX-2493) were evaluated. From EPS a linear (1 → 4)-linked β-D-xylan was chemically characterized, and because of this and other findings involving lichenized fungi it could be proposed that this polymer may be typical of photobionts isolated from lichen thalli. From cellular biomass extracts a complex polysaccharide formed mainly of L-arabinose (2,3-O-Me<sub>2</sub>, 24.8%) and D-xylose (2,3-O-Me<sub>2</sub>, 10.6%) both units (1 → 4)-linked was described. A smaller part of this structure has β-L-Arap and β-D-Xylp units branched at O-3 by α-D-Manp units, which in turn presents O-3 or O-2 single-unit substitution by α-D-Manp or α-L-Fucp as non-reducing ends. Arabinosyl residues were found to be in the β-L-arabinopyranosyl form, different from the most common form described in plant cell wall polysaccharides, α-L-arabinofuranosyl (Araf). Both polymers characterized in this work were not previously described when analyzing *Nostoc* sp. or cyanobacteria in general.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Like many microorganisms, cyanobacteria also produce polysaccharides (Slodki, 1987; Sutherland, 1987; Zevenhuizen, 1987), which could be cellular or extracellular. While some other microbial polysaccharides have been extensively studied (Sutherland, 1985, 1987; Whitfield, 1988), cyanobacterial polysaccharides are reported in literature mainly for the determination of sugar polymers composition. Among these studies the majority is related to water-soluble released polysaccharides (RPSs), including in this group capsule and slime polysaccharides that may be released as water-soluble material into the surrounding medium, and the properly named exopolysaccharides (EPS). This new field of possible exploitation of cyanobacteria has arisen in the 80's decade by the growing industrial interest towards polysaccharides of microbial origin, that often show advantages over the polysaccharides extracted from plants or marine macroalgae (De Philippis & Vincenzini, 1998).

One of the cyanobacteria studied regarding to its polysaccharides content was the free-living *Nostoc muscorum* (Biswas, 1957). In this study the author determined the monosaccharidic composition of a polysaccharide isolated from *N. muscorum* cell wall, describing a polymer made up of glucose, galactose, arabinose, xylose, ribose, rhamnose and two non-identified sugars (Bis-

was, 1957). Another study refers to the purification and properties of glycogen isolated from this microorganism (Chao & Bowen, 1971). This same *Nostoc* specie could be isolated as photobiont from the lichen thalli of *Peltigera canina* (Ahmadjian, 1989; Koriem & Ahmadjian, 1986), but its polysaccharide content has not been evaluated.

Due to the fact that the structure and properties of cyanobacteria polysaccharides are described only in a small number of studies, the aim of this work was the structural characterization of *Nostoc muscorum* photobiont polysaccharides either cellular or extracellular. One of the most important prerequisites of a polysaccharide is that it must possess, together an adequate composition, structure (Margaritis & Pace, 1985), and molecular mass ( $M_w$ ) (Shepherd, Rocky, Sutherland, & Roller, 1995), which could be achieved through the structural characterization of polysaccharides. This knowledge could determine many of the properties generally considered useful for polysaccharides industrial utilization (i.e. high viscosity of its aqueous solutions, capability of forming gels with good tensile strength, stabilising emulsions, etc.).

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Biological material and growth conditions

*Nostoc muscorum* (UTEX-2493), photobiont of lichen *Peltigera canina* (Koriem & Ahmadjian, 1986); identified by D. Mollenhauer

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 33611655; fax: +55 41 32662042.  
E-mail address: iacomini@ufpr.br (M. Iacomini).

was obtained as pure culture from UTEX the Culture Collection of Algae (University of Texas at Austin).

The strain was cultivated photoautotrophically at 25 °C, illuminated with cool white fluorescent light, in 2.0 L Erlenmeyer flasks containing BG11 medium (1 L) (Rippka, 1988) for 2 weeks. After this time the culture was harvested by filtration through a filter paper and the filtrates were used for EPS analyses. Freshly harvested cells were washed (3×) for total EPS removal of the cells.

## 2.2. Extraction and purification of EPS

The cell-free supernatant fraction was evaporated to a small volume, dialyzed against tap water in an 8 kDa molecular weight cut-off membrane. The retained material was frozen and then allowed to thaw slowly giving rise to an insoluble material (IENm) were removed by centrifugation at 8000 rpm for 15 min, at 15 °C.

## 2.3. Extraction and purification of cell biomass polysaccharide

Cells biomass (3 g) was submitted to extraction with H<sub>2</sub>O at 100 °C for 6 h (6×, 500 mL). The combined aq. extracts were evaporated to a small volume with the polysaccharide precipitated by addition to excess EtOH (3:1; v/v). The resulting polysaccharide precipitates were dissolved in H<sub>2</sub>O, and dialyzed against tap water, giving rise to fraction HW-Nm. This fraction was frozen and then allowed to thaw slowly, resulting an insoluble material that was removed by centrifugation at 8000 rpm for 15 min, at 15 °C. The cold water-soluble fraction (HW-Nm) was purified by successively dialysis through membranes of 100 and 16 kDa *M<sub>w</sub>* cut-off (Spectra/Por® Cellulose Ester) giving rise to eluted and retained (RFS-Nm) material.

## 2.4. Monosaccharide composition of polysaccharide fractions

Monosaccharide compositions were determined by hydrolysis of the polysaccharide samples (1 mg) with 45% CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (formic acid) at 100 °C for 14 h. The hydrolyzed samples were converted to alditol acetates (GC-MS) by successive NaBH<sub>4</sub> reduction, and acetylation with Ac<sub>2</sub>O-pyridine (1:1, v/v) following the method described by Sasaki et al. (2008).

The resulting alditol acetates were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, using a DB-225 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.), with helium as carrier gas. The analysis was carried out from 50 to 220 °C at 40 °C min<sup>-1</sup>, maintaining the temperature constant to the end of analysis (30 min). The products were identified by their typical retention times and electron impact profiles.

## 2.5. Methylation analysis

Per-O-methylation of polysaccharide fractions was carried out by the method of Ciucanu and Kerek (1984). Samples (10 mg) were dissolved in dimethyl sulfoxide (1 mL), and powdered NaOH (20 mg) and iodomethane (CH<sub>3</sub>I) (1 mL) were added. After 30 min at 25 °C with vigorous stirring, the mixture was maintained overnight at 25 °C. The reaction was interrupted by addition of water, neutralization with HOAc, dialysis against distilled water and freeze-drying. The products were submitted to one more cycle of methylation, and the products were isolated by partition between CHCl<sub>3</sub> and water. The per-O-methylated derivatives from the lower layer (2 mg) were hydrolyzed with 45% aqueous formic acid (1 mL) for 12 h at 100 °C, followed by NaBH<sub>4</sub> reduction and acetylation as above (item 2.4), to give a mixture of partially O-methylated alditol acetates, which was analyzed by GC-MS using a DB-225 capillary

column (30 m × 0.25 mm i.d.), programmed from 50 to 210 °C at 40 °C min<sup>-1</sup>, the total analysis time being 36 min.

## 2.6. Partial acid hydrolysis of heteropolysaccharide (RFS-Nm fraction)

Fraction RFS-Nm (300 mg) was submitted to sequential partial acid hydrolysis with 0.16 M aq. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 mL) at 100 °C for 1 h, residual material of the first hydrolysis was submitted to a new partial hydrolysis with the same conditions cited above, giving rise to fraction which was submitted to the last hydrolysis method either the previously ones. The neutralized solutions were dialyzed against tap water using membranes with a size-exclusion of 2 kDa, and the retained materials were freeze dried giving rise to HP1, HP2 and HP3 fractions, respectively.

## 2.7. Determination of homogeneity and molar mass (*M<sub>w</sub>*) of purified fraction

Determination of homogeneity and molar mass (*M<sub>w</sub>*) were performed on a Waters high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) apparatus coupled to a differential refractometer (RI) and a Wyatt Technology Dawn-F Multi-Angle Laser Light Scattering detector (MALLS). Waters ultrahydrogel columns (2000, 500, 250 and 120) were connected in series and coupled with multi-detection equipment, using a NaNO<sub>2</sub> solution (0.1 M) as eluent, containing 0.5 g/L NaNO<sub>3</sub>. The polysaccharide solutions (1 mg/mL) were dissolved in the same solvent and filtered through a nitrocellulose membrane (Millipore), with pores of 0.22 or 0.45 μm. HPSEC data were collected and analyzed by the Wyatt Technology ASTRA program. The specific refractive index increment (dn/dc) was determined using a Waters 2410 detector. All experiments were carried out at 25 °C.

## 2.8. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

NMR spectra (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, HMQC) were obtained using a 400 MHz Bruker model DRX Avance spectrometer incorporating Fourier transform. <sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz) analyzes were performed at 70 °C, with the samples being dissolved in D<sub>2</sub>O or Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> according to fraction solubility. The chemical shifts are expressed in ppm (δ) relative to acetone at δ 30.20 and δ 2.22, or to Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> at δ 39.70 and δ 2.40, for <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H signals, respectively.

## 3. Results

### 3.1. Structural characterization of the xylan obtained from EPS fraction

The EPS (1 g) obtained after culture media dialysis against tap water through an 8 kDa molecular weight cut-off membrane was submitted to freeze/thawing purification process, giving rise to an insoluble fraction (IENm, 46.3 g%) containing only xylose as monosaccharide component, according to derived GC-MS alditol acetates. <sup>13</sup>C NMR experiment showed the presence of five <sup>13</sup>C signals, consistent with a linear pentose homopolymer (Fig. 1). The anomeric region showed one signal at δ 101.8, which suggests α-Xylp units having a β-glycosidic configuration and one at δ 76.6 corresponding to O-substituted C-4 (Gorin, 1973). The β-glycosidic configuration was suggested by the presence of a high-field H-1 signal at δ 4.27 when analyzed in Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (Gorin, Spencer, & Bhattacharjee, 1969), present in its HMQC spectrum (Table 1), being confirmed by values of the coupling constants *J*<sub>C-1,H-1</sub> = 163.7 Hz found in <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C coupled HMQC spectra. The others <sup>13</sup>C signals at δ 73.9, 72.9 and 63.2 could be attributed to C-3, C-2 and C-5, respectively (Fig. 1). The DEPT NMR spectrum of this xylan



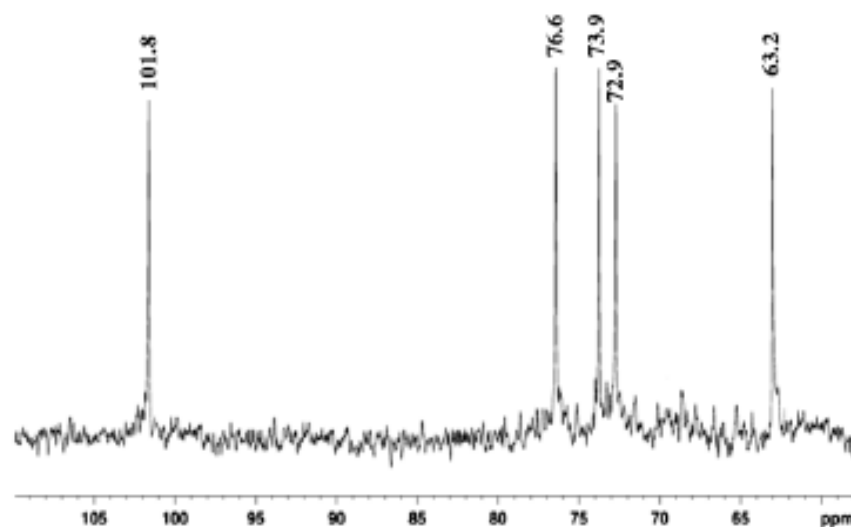


Fig. 1. <sup>13</sup>C NMR spectra of IENm fraction obtained at 70 °C in Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> (chemical shifts are expressed in δ, ppm).

contained an inverted –CH<sub>2</sub> signal at δ 63.2, arising from unsubstituted C-5.

Methylation analysis showed the presence of non-reducing ends (0.3%) and 4-O-substituted (99.7%) Xylp units, which confirmed the homopolymer structure suggested by <sup>13</sup>C NMR spectrum as a (1 → 4)-linked β-D-xylan.

### 3.2. Structural characterization of the heteropolysaccharide obtained from cell biomass fraction

Cells biomass resulting aqueous extract was submitted to polysaccharide precipitation by addition of excess EtOH (3:1; v/v) giving rise to fraction HW-Nm (43.5 g% yield), which was subjected to freezing, followed by gentle thawing was further purified by closed dialysis. First through a 100 kDa M<sub>w</sub> cut-off membrane (Spectrapor®), giving rise to an eluted and a retained material. The latter was submitted to a new dialysis, through a 16 kDa M<sub>w</sub> cut-off membrane (Spectrapor®), resulting in an eluted and a final retained fraction, named RFS-Nm (10.7 g% yield).

RFS-Nm fraction was analyzed by HPSEC-MALLS showing the presence of a symmetrical peak in its elution profile, indicative of a homogeneous fraction, which molar mass was determined to be 59 kDa (dn/dc 0.143). Moreover this fraction contains arabinose (57%), mannose (16%), xylose (14%) and fucose (13%) as monosaccharide constituents.

<sup>13</sup>C NMR spectrum of RFS-Nm fraction show at least five <sup>13</sup>C signals at anomeric region at δ 101.0, 100.9, 100.1, 99.0 and 98.5 (Fig. 2). The absence of <sup>13</sup>C signals at lower field than δ 101.0 suggests that L-arabinose units were in β-configuration and in pyra-

nosidic conformation (Gorin & Mazurek, 1975). The presence of L-fucose could be confirmed because of a signal at δ 15.4, characteristic of –CH<sub>3</sub> group.

The DEPT NMR spectrum of RFS-Nm fraction contained only inverted –CH<sub>2</sub> signals at δ 62.6, 62.2 and 61.2 arising from unsubstituted C-5/C-6, suggesting the absence of substitution in these positions.

Based on methylation analysis (Table 2) it could be suggested that the RFS-Nm heteropolysaccharide is mainly formed of L-arabinose (2,3-O-Me<sub>2</sub>, 24.8%) and D-xylose (2,3-O-Me<sub>2</sub>, 10.6%) both units (1 → 4)-linked. A smaller part of this structure is formed either by β-L-Arap and β-D-Xylp units substituted at O-3 (2-O-Me-Arap and 2-O-Me-Xylp 14.5% and 6.5%, respectively) by α-D-Manp units (2,4,6-O-, 3,4,6-O- and 2,3,6-O-Me<sub>3</sub>-) having mainly as non-reducing end α-L-Fucp units (2,3,4-O-Me<sub>3</sub>, 23.8%) or α-D-Manp units (2,3,4,6-O-Me<sub>4</sub>, 2.3%) in minor proportions.

In order to elucidate the structure of the heteropolysaccharide, partial acid hydrolysis were carried out, giving rise to polysaccharides HP1, HP2 and HP3 regarding to the sequence of successive hydrolysis of 1 h each.

The residual products (HP1, HP2 and HP3) were analyzed by GC-MS as alditol acetates and present a gradual increase of L-arabinose, and simultaneous decrease of L-fucose and D-mannose.

Methylation analysis of HP3 residual product showed a substantial decrease of non-reducing L-Fucp units (3.5%) and 3,4-di-O-substituted L-Arap units, besides the absence of 4-O-substituted D-Manp units, with concomitant increase of 4-O-substituted L-Arap and D-Xylp units, suggesting the removal of the non-reducing end-groups of α-L-Fucp and 4-O-substituted α-D-Manp units, which can possibly be substituting the (1 → 4)-linked L-Arap or D-Xylp units in O-3. HMQC examination (Fig. 3) of the polymeric product (HP3 fraction) contained signals in the anomeric region which correspond to the C-1/H-1 from 4-O-substituted β-D-Xylp units (δ 101.0/4.56) and β-L-Arap units (δ 100.9/4.79), and also a signal related to the α-D-Manp units (δ 99.2/5.42). The high-field H-1 signals (Fig. 3) indicated that the units of L-Arap and D-Xylp had an β-configuration, being confirmed by values of the coupling constants J<sub>C-1,H-1</sub> 160.1 and 161.7 Hz, respectively, found in <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C coupled HMQC spectra (Perlin & Casu, 1969), while that of D-Manp had α-configuration, consistent with J<sub>C-1,H-1</sub> 172.8 Hz.

The 4-O- and 3-O-substituted signals of β-L-Arap and β-D-Xylp units were present at δ 77.9 and 77.2, and δ 80.0, respectively (Fig. 3). These data were confirmed by methylation analysis due

Table 1  
1H and <sup>13</sup>C chemical shifts (δ) of RFS-Nm fraction.<sup>a</sup>

H and C nuclei	Chemical shifts (ppm) <sup>a</sup>	
	<sup>1</sup> H (δ)	<sup>13</sup> C (δ)
H-1/C-1	4.25	101.6
H-2/C-2	3.15	72.7
H-3/C-3	3.27	73.7
H-4/C-4	3.55	76.4
H-5 and H-5'/C-5	3.18/3.86	63.0

<sup>a</sup> Data obtained from <sup>1</sup>H (sample dissolved in Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>), <sup>13</sup>C and HMQC experiments.

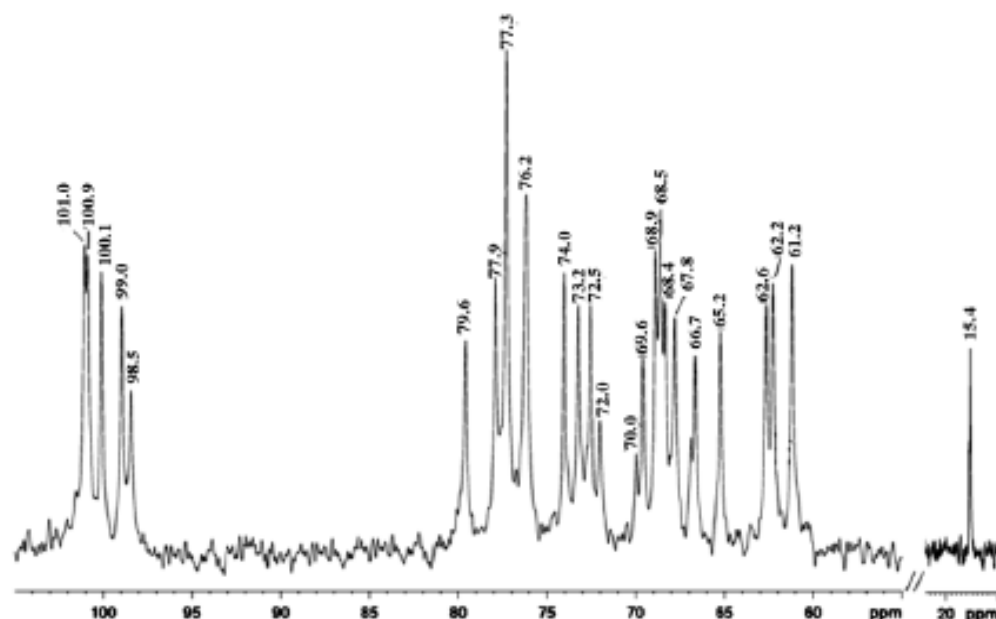


Fig. 2.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of RFS-Nm fraction obtained at 70 °C in  $\text{D}_2\text{O}$  (chemical shifts are expressed in  $\delta$ , ppm).

Table 2  
Partially O-methylalditol acetates formed on methylation analysis of a heteropolysaccharide and these obtained on partial hydrolysis (HP3 fraction).

O-Me-alditol acetate <sup>a</sup>	$\delta$ <sup>b</sup>	Fraction (%)		Linkage type <sup>d</sup>
		RFS-Nm	HP3	
2,3,4-Me <sub>3</sub> -fucose	7473	23.8	3.5	Fucose-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -mannose	8713	2.3	3.7	Mannose-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -arabinose	9129	24.8	35.7	→4)-Arabinose-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -xylose	9493	10.6	34.8	→4)-Xylose-(1→
2,4,6-Me <sub>3</sub> -mannose	11363	3.3	6.4	→3)-Mannose-(1→
3,4,6-Me <sub>3</sub> -mannose	12045	2.6	5.0	→2)-Mannose-(1→
2-Me-arabinose	12127	14.5	4.5	→3,4)-Arabinose-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -mannose	12270	8.5	–	→4)-Mannose-(1→
2-Me-xylose	13278	6.5	6.3	→3,4)-Xylose-(1→
3-Me-mannose	17649	3.1	–	→2,4,6)-Mannose-(1→

<sup>a</sup> O-Me-alditol acetates obtained by methylation analysis, followed by successive acid hydrolysis, reduction with  $\text{NaBH}_4$  and acetylation, analyzed by GC-MS (column DB-225).

<sup>b</sup> Retention time in minutes.

<sup>c</sup> Percentage of peak area relative to total peak area.

<sup>d</sup> Based on derived O-methylalditol acetate.

to the presence of the derivatives 2,3-di-O-Me<sub>2</sub>-Ara and -Xyl (35.7% and 34.8%, respectively) and 2-O-Me-Ara and -Xyl (4.5% and 6.3%, respectively). The non substituted C-6 of  $\alpha$ -D-Manp units appears as a doublet at  $\delta$  61.2 ( $\delta$  3.90, 3.75).

The heteropolysaccharide could be suggested to have a complex structure mainly formed of  $\beta$ -L-Arap and  $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-linked units, partially substituted at O-3 by  $\alpha$ -D-Manp units. The latter appeared to be substituted at O-3 or O-2 by single-unit  $\alpha$ -D-Manp or  $\alpha$ -L-Fucp as non-reducing ends.

#### 4. Discussion

Most EPS synthesized by cyanobacteria (about 80% of the polymers) are quite complex, being composed of six or more monosaccharides, differing then to those polymers synthesized by other bacteria or macroalgae, in which the number of monomers is usually less than four (Sutherland, 1990).

Most of the studies on cyanobacterium exo- and polysaccharides have been devoted to the determination of the sugar compo-

sition of these polymers. The monosaccharide most frequently found in cyanobacterium EPS is glucose (in more than 90% of the polymers), followed by galactose, mannose and rhamnose (80–85% of the polymers) (De Philippis & Vincenzini, 1998). In a large number of EPS, glucose is also the most abundant monosaccharide, but there are also polymers where other sugars, like arabinose, galactose or fucose, are present at higher concentrations than glucose (De Philippis & Vincenzini, 1998).

Differing from that a polysaccharide containing only xylose has not been previously described for cyanobacteria either as cellular or extracellular polymer. Xylose-containing polysaccharides, in the form of hemicelluloses, are one of the most abundant biopolymers, after cellulose, synthesized in the biosphere (Joseleau, Comtat, & Ruel, 1992).

In this study we found a linear (1→4)-linked  $\beta$ -D-xylan as EPS produced by *Nostoc muscorum* (UTEX-2493) isolated as *Peltigera canina* photobiont, this structure is commonly found in higher plants and some algae (Ahmadjian, 1993). It was further described for the cultured *Trebouxia* sp. photobionts isolated from *Ramalina celastri* (Cordeiro et al., 2008) and has been detected for the first time in intact lichen *Dyctionema glabratum* (Carbonero, Sasaki, Gorin, & Iacomini, 2002). The authors suggested that this polymer could be produced by the cyanobacterium *Scytonema* sp. found as *D. glabratum* photobiont (Carbonero et al., 2002). This suggestion may now be reinforced due to our finding, and could be proposed that this polymer may be typical of photobionts isolated from lichen thalli.

Besides the linear  $\beta$ -D-xylan found as EPS, the other structure related in this study was a heteropolysaccharide with a complex structure mainly formed of  $\beta$ -L-Arap and  $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-linked units, partially branched units at O-3 by  $\alpha$ -D-Manp, which appeared to be substituted at O-3 or O-2 by single-unit  $\alpha$ -D-Manp or  $\alpha$ -L-Fucp as non-reducing ends.

The presence of  $\beta$ -L-arabinopyranosyl as related in this study is uncommon in these polymers and few authors have mentioned its presence. L-Arabinose is a predominant glycosyl residue of plant cell wall polysaccharides (Ishii et al., 2005), like arabinoxylan or present as side-chains that are linked to the backbone of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan-1 (RG-1) (Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001). In these polysaccharides the arabinosyl residues exist predominantly in the  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl (Araf) form

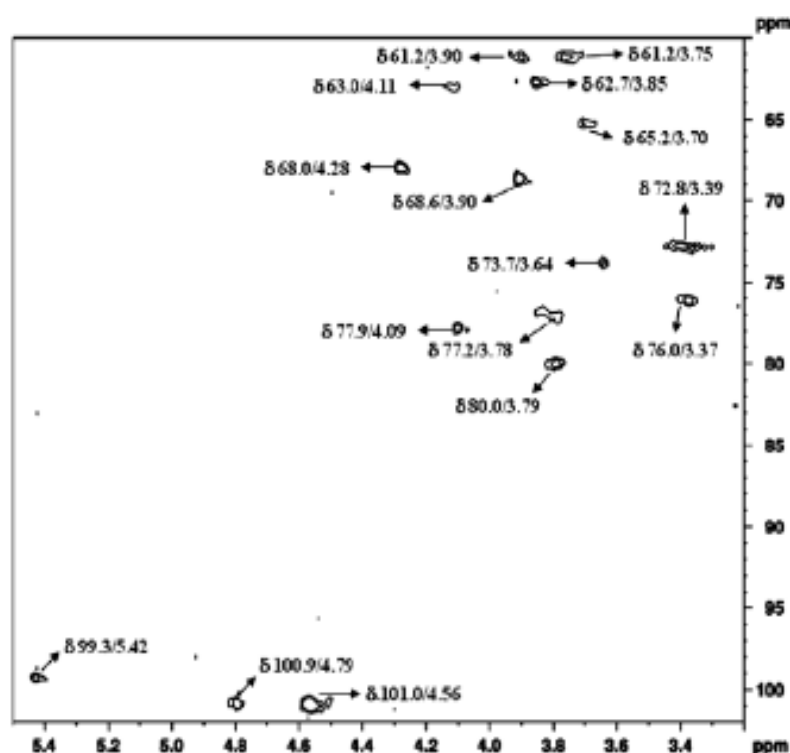


Fig. 3.  $^1\text{H}$  (obs.),  $^{13}\text{C}$  HMQC spectrum of HP3 fraction from *N. muscorum* in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $70^\circ\text{C}$  (chemical shifts are expressed in  $\delta$ , ppm).

(Carpita & Gibeau, 1993).  $\alpha$ -L-Arabinopyranosyl (Arap) residues are quantitatively minor components of arabinans isolated from several plants (Aspinall, Fairweather, & Wood, 1968; Capek, Toman, Kardosova, & Rosik, 1983; Kiyohara, Yamada, & Otsuka, 1987; Swamy & Salimath, 1991). 3-O- $\beta$ -L-Arabinopyranosyl-L-arabinose was isolated from partial acid hydrolyzates of larch wood arabinogalactan (Odonmažig, Ebringerová, Machová, & Alföldi, 1994) and from gum exudate of the trunk of *Prunus persica* (Andrews, Ball, & Jones, 1953).  $\beta$ -L-Arap (4-O- and 2,4-di-O-substituted) was also described as part of a polysaccharide isolated from gum exudate of the trunk and fruit of *P. persica* and from trunk of nectarine (*Prunus persica* var. *nucipersica* Schneid.) (Simas et al., 2008; Simas-Tosin et al., 2009), and in general arabinopyranose has also been found in the non-reducing end of pectic galactan (Huisman et al., 2001).

Both polymers characterized in this work were not previously described when analyzing *Nostoc* sp. or cyanobacteria in general. Therefore this study may contribute to the knowledge of polysaccharides produced by cyanobacteria, more specifically of the genus *Nostoc* principally due to the fact that the structure and properties of cyanobacterial polysaccharides are described only in some rare cases because of the great structural diversity and complexity of the produced polymers.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the Brazilian funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and Fundação Araucária for financial support.

#### References

Ahmadjian, V. (1989). Studies on the isolation and synthesis of blots of the cyanolichen *Rhizoglyphus cernuus* (Peltigeraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 165, 29–38.

Ahmadjian, V. (1993). *The lichen symbiosis*. New York: John Wiley and Sons.

Andrews, P., Ball, D. H., & Jones, J. K. N. (1953). The isolation of oligosaccharides from gums and mucilages. Part I. *Journal of the Chemical Society*, 4090–4095.

Aspinall, G. O., Fairweather, R. M., & Wood, T. M. (1968). Arabinogalactan A from Japanese larch (*Larix leptalepis*). *Journal of the Chemical Society (C)*, 17, 2174–2179.

Biswas, B. B. (1957). A polysaccharide from *Nostoc muscorum*. *Science & Culture*, 22, 696–697.

Capek, P., Toman, R., Kardosova, A., & Rosik, J. (1983). Polysaccharides from the roots of the Marsh Mallow (*Althaea officinalis* L.): Structure of an arabinan. *Carbohydrate Research*, 117, 133–140.

Carbonero, E. R., Sasaki, G. L., Gotin, P. A. J., & Iacomini, M. (2002). A (1 → 6)-linked  $\beta$ -mannopyranan, pseudonigeran, and a (1 → 4)-linked  $\beta$ -xylian, isolated from the lichenised basidiomycete *Dicranema glabratum*. *FEMS Microbiology Letters*, 206, 175–178.

Carpita, N. C., & Gibeau, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3, 1–30.

Chao, L., & Bowen, C. C. (1971). Purification and properties of glycogen isolated from a blue-green alga, *Nostoc muscorum*. *Journal of Bacteriology*, 105, 331–338.

Clucanu, I., & Kerek, F. (1984). Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209–217.

Cordeiro, L. M. C., Reis, R. A., Tischer, C. A., Gotin, P. A. J., Ferreira, J. C., & Iacomini, M. (2003). Linear  $\beta$ -mannose-containing polysaccharide,  $\beta$ -xylian, and amylose from the cultured photobiont *Trebouxia* sp. of the ascolichen *Ramalina celastri*. *FEMS Microbiology Letters*, 220, 89–94.

De Philippis, R., & Vincenzini, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 22, 151–175.

Gotin, P. A. J. (1973). Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. *Canadian Journal of Chemistry*, 51, 2375–2383.

Gotin, P. A. J., & Mazurek, M. (1975). Further studies on the assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Canadian Journal of Chemistry*, 53, 1212–1222.

Gotin, P. A. J., Spencer, J. F. T., & Bhattacharjee, S. S. (1969). Structures of yeast mannans containing both alpha and beta-linked mannopyranose units. *Canadian Journal of Chemistry*, 47, 1499–1505.

Huisman, M. M. H., Brüll, L. P., Thomas-Oates, J. E., Haverkamp, J., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2001). The occurrence of internal (1,5) linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectin substances. *Carbohydrate Research*, 330, 103–114.

Ishii, T., Konishi, T., Ito, Y., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., & Maeda, I. (2005). A  $\beta$ -(1 → 3)-arabinopyranosyltransferase that transfers a single arabinopyranose onto arabino-oligosaccharides in mung bean (*Vigna radiata*) hypocotyls. *Phytochemistry*, 66, 2418–2425.



- Joseleau, J. P., Comtat, J., & Ruel, K. (1992). Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In J. Visser, G. Beldman, M. A. Kuster van Someren, & A. G. J. Voragen (Eds.), *Xylans and xylanases* (Vol. 7, pp. 1–15). Elsevier Science Publishers B.V.
- Kiyohara, H., Yamada, H., & Otsuka, Y. (1987). Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. Unit structure of the anti-complementary arabinogalactan from *Angelica acutiloba*. *Kitagawa Carbohydrate Research*, 167, 221–237.
- Korim, A. M., & Ahmadjian, V. (1986). An ultrastructural study of lichenized and cultured *Nostoc* photobionts of *Peltigera canina*, *Peltigera rufescens*, and *Peltigera spuria*. *Endocytobiosis and Cell Research*, 3, 65–78.
- Margaritis, A., & Pace, G. W. (1985). Microbial polysaccharides. In H. W. Blanch, S. Drew, & D. I. C. Wang (Eds.), *Comprehensive biotechnology* (Vol. 3, pp. 1005–1044). Oxford: Pergamon.
- Odonmađig, P., Ebringerová, A., Machová, E., & Alšödi, J. (1994). Structural and molecular properties of the arabinogalactan isolated from Mongolian larchwood (*Larix dolabrata* L.). *Carbohydrate Research*, 252, 317–324.
- Pedra, A. S., & Casu, B. (1969). Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of  $\alpha$ -glucose- $^{13}\text{C}$ . *Tetrahedron Letters*, 34, 2919–2924.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929–967.
- Rippia, R. (1988). Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods in Biozoology*, 167, 28–67.
- Sasaki, G. L., Souza, L. M., Serrato, R. V., Cipriani, T. R., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2008). Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. *Journal of Chromatography A*, 1208, 215–222.
- Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I. W., & Roller, S. (1995). Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology*, 40, 207–217.
- Simas, F. F., Gorin, P. A. J., Wagner, R., Sasaki, G. L., Bonkernet, A., & Iacomini, M. (2008). Comparison of structure of gum exudate polysaccharides from the trunk and fruit of the peach tree (*Prunus persica*). *Carbohydrate Polymers*, 71, 218–228.
- Simas-Tosin, F. F., Wagner, R., Santos, E. M. R., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2009). Polysaccharide of nectarine gum exudate: Comparison with that of peach gum. *Carbohydrate Polymers*, 76, 485–487.
- Slodki, M. E. (1987). New bacterial polysaccharides. In S. S. Stivala, V. Crescenzi, & I. C. M. Dea (Eds.), *Industrial polysaccharides* (pp. 3–14). New York: Gordon and Breach Science Publishers.
- Sutherland, I. W. (1985). Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, 39, 243–270.
- Sutherland, I. W. (1987). Polysaccharide modification: A physiological approach. In M. Yalpani (Ed.), *Industrial polysaccharides: Genetic engineering, structure/property relations and applications* (pp. 71–79). Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Sutherland, I. W. (1990). *Biotechnology of microbial polysaccharides*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Swamy, N. R., & Sallimath, P. V. (1991). Arabinans from *Gajanus cajan* cotyledon. *Phytochemistry*, 30, 263–265.
- Whitfield, C. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 415–420.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. (1987). Production of exopolysaccharides by fast-growing *Rhizobium* and *Agrobacterium*. In S. S. Stivala, V. Crescenzi, & I. C. M. Dea (Eds.), *Industrial polysaccharides* (pp. 45–68). New York: Gordon and Breach Science Publishers.