

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLAVIO BEILKE

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DE *Myrmecia*
biatorellae, FOTOBIONTE DO LÍQUEN *Lobaria linita***

CURITIBA

2012

FLAVIO BEILKE

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DE *Myrmecia*
biatorellae, FOTOBIONTE DO LÍQUEN *Lobaria linita***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, área de concentração em Taxonomia, biologia e diversidade de algas e líquens. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lucimara M. Côrtes Cordeiro.

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Beilke, Flavio

Análise estrutural de polissacarídeos de *Myrmecia biatorellae* fotobionte do líquen *Lobaria linita* / Flavio Beilke. – Curitiba, 2012.
80 f.: il. color. ; 30cm.

Orientador: Lucimara Mach Cortês Cordeiro

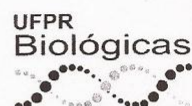
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica

1. Microalgas 2. Botânica I. Título II. Cordeiro, Lucimara Mach Cortês
II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Botânica

TERMO DE APROVAÇÃO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BOTÂNICA



260^a.
2012

Ata de Julgamento da Dissertação de Mestrado do pós-graduando **FLÁVIO BEILKE**. Aos dezesseis dias do mês de abril de dois mil e doze, às nove horas na Sala 421, no Bloco da Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, na presença da Comissão Examinadora, composta pelos Professores Doutores Lucimara Mach Côrtes Cordeiro (UFPR) presidente e orientadora, Thales Ricardo Cipriani (UFPR) e Ricardo Wagner (UFPR) como titulares, foi aberta a sessão de julgamento da Dissertação intitulada: "**Análise Estrutural de Polissacarídeos de *Myrmecia biatorellae*, Fotobionte do Líquen *Lobaria linita***". Após a apresentação, perguntas e esclarecimentos acerca da Dissertação, a Comissão Examinadora **APROVA O TRABALHO DE CONCLUSÃO DO ALUNO Flávio Beilke**. Nada mais havendo a tratar, encerrou-se a sessão da qual foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos componentes da Comissão Examinadora.

Prof. Dra. Lucimara Mach Côrtes Cordeiro.....

Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani.....

Prof. Dr. Ricardo Wagner.....

*Em especial aos meus pais Edla
e Egon pelo amor e incentivo
sempre presentes e as minhas
irmãs Jenifer e Vânia (in
memorian).*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me manter firme, sem hesitar nos momentos em que tudo parecia perdido.

A minha orientadora, Dr^a Lucimara, pelo apoio, por ser muitas vezes mais que uma mãe, pelas críticas e pelo exemplo de pessoa e pesquisadora.

A minha família pelo amor incondicional, pelas palavras de conforto, orientação...Sou muito grato a vocês!

A professora Sionara Eliasaro, pelo seu senso crítico, pelas conversas descontraídas no seu laboratório, pelo auxílio no estágio de docência e por me apoiar em vários momentos.

Ao grande amigo, Emerson, que sempre esteve presente, seja nas horas boas ou ruins, apoiando, incentivando e pelas conversas, coletas de líquens, acampamentos, festas e cumplicidade.

A Alice por ter-me aguentado nos últimos meses de mestrado, pelos filmes que assistimos, pelas inúmeras conversas, pelo grande apoio e pela amizade criada nesses dois anos.

A Ana Marcia, que considero como irmã, agradeço pelas correções, apoio, conversas, pelo seu positivismo, pelas coletas e acampamentos, por me agüentar em vários momentos.

A Simone, por ser a pessoa maravilhosa que é, por seus conselhos, por estar sempre ali quando precisei de um ombro amigo. Pela ajuda no teste biológico, pelas risadas, conversas e pela amizade construída.

A Yanna, vulgarmente Luana, pela amizade, auxílio nos testes biológicos, análise dos dados, pelos bons conselhos e pelo exemplo de pessoa e pesquisadora.

Aos meus amigos Joinvillenses, Clemens, Josias e Luciano, que entenderam a minha ausência nesses dois anos e nunca deixaram de me apoiar.

Aos amigos de laboratório: Aline, Nadi, Stephani, Ester, Luciano, Larry, Adamara, Thaisa, Georgia, Vanessa, Yanna, Nessana, Franciele, Aramís, Daniel, Ana Flávia... pelos bons momentos, apoio e pela convivência que tornaram esses dois anos de mestrado mais leves.

Aos meus amigos de república (Mata Atlântica Catarinense) pela amizade, discussões, conversas, conselhos e por aguentar meu mau humor matinal.

Ao Prof. Dr. Guilherme Sasaki, Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e Arquimedes pela disponibilidade em realizar as análises de RMN.

À Nessana e Rosane pela disponibilidade em realizar as análises de GC-MS.

À Elizangela pelas análises de HPSEC-MALLS.

Ao Dr. Lauro pelo auxílio nas interpretações dos perfis de fragmentação dos metilados, pela amizade e inúmeras conversas.

RESUMO

As frações W e K10, extraídas da microalga liquênica *Myrmecia biatorellae*, utilizando água e KOH 10%, respectivamente, tiveram seus polissacarídeos purificados e estruturalmente caracterizados por métodos químicos, cromatográficos e espectroscópicos. A partir da fração W foram purificadas quatro frações, denominadas SW-100R, SW-50R, SW-30R e SW-10R. Estas frações apresentavam ramnogalactofurananas com estruturas semelhantes, mas com massas molares diferentes, a saber 647.600 Da, 211.000 Da, 170.000 Da e 108.000 Da, respectivamente. A ramnogalactofuranana presente na fração SW-50R apresentou ramnose (6,0%) e galactose (94,0%) e era constituída por cadeia principal formada por unidades de β -Galf (1 \rightarrow 6)-ligadas, podendo ser substituídas em O-2 por unidades de β -Galf (1 \rightarrow 2)-ligadas ou por unidades terminais não redutoras de α -ramnose e β -galactofuranose. A fração alcalina K10 também apresentou uma mistura de ramnogalactofurananas com diferentes massas molares, mas com estruturas semelhantes à ramnogalactofuranana presente na fração SW-50R. A partir desta fração também foi purificada outra ramnogalactofuranana com cadeia principal formada por unidades de β -Galf (1 \rightarrow 3)-ligadas, as quais são substituídas em O-6 (cerca de 6,0%) por cadeias laterais constituídas por unidades de ramnose 2-O- e 2,4-di-O-substituídas. Os terminais não redutores são formados por unidades de β -D-Galf. Quando testada em um modelo de sepse murino, a fração SK10 tratada com amilase (SK10-A) causou um aumento significativo da letalidade em relação ao grupo controle, na dose de 50 mg/kg. Este aumento da mortalidade por sepse nos animais tratados com os polissacarídeos constituiu um forte indicativo de atividade pró-inflamatória dos mesmos e deve-se, provavelmente, à presença das galactofuranoses em sua estrutura.

Palavras-chave: *Myrmecia biatorellae*, fotobionte, polissacarídeos, ramnogalactofurananas.

ABSTRACT

Fractions W and K10, extracted from the lichenic microalgae *Myrmecia biatorellae*, using water and KOH 10%, respectively, had their polysaccharides purified and characterized through chemical methods (methylation analysis), chromatographic and spectroscopic (RMN mono- and bidimensional). From the fraction W were purified four fractions, called SW-100R, SW-50R, SW-30R e SW-10R. These showed rhamnogalactofuranans with similar structures, but with different molar mass, namely 647.600 Da, 211.000 Da, 170.000 Da and 108.000 Da, respectively. The rhamnogalactofuranan present in the SW-50R fraction showed rhamnose (6,0%) and galactose (94,0%) and was constituted by a main chain formed by (1→6)-linked β -Gal f units, substituted at O-2 by (1→2)-linked β -Gal f units or by non reducing terminal ends of α -rhamnose and β -galactofuranose. The alkaline fraction K10 also showed a mixture of rhamnogalactofuranans with different molar mass, but with similar structures to the rhamnogalactofuranan present in the SW-50R fraction. From this fraction was also purified another rhamnogalactofuranan insoluble in cold water. This had a main chain formed by (1→3)-linked β -Gal f units which were substituted at O-6 (around 6,0%) by sidechains constituted by rhamnose 2-O- and 2,4-di-O-substituted. The non reducing terminal ends are formed by β -Gal f units. When tested in a murine model of sepsis, the fraction SK10-A caused a significant increase in the lethality when compared to control group, in the dose of 50 mg/Kg. This increased mortality by sepsis in animals treated with the polysaccharides provided a strong indication of pro-inflammatory activity of the same and should be, probably, to the presence of galactofuranoses in its structure.

Keywords: *Myrmecia biatorellae*, photobiont, polysaccharides, rhamnogalactofuranans

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** CÉLULAS DE *Myrmecia biatorellae* CULTIVADAS EM LABORATÓRIO. EXTRAÍDO DE BETTIN (2010). 19
- FIGURA 2:** ESTRUTURA DA β -GALACTOFURANANA DE *Trebouxia* sp., ISOLADA DO LÍQUEN *Ramalina gracilis*. FONTE: Cordeiro et al. (2005). 20
- FIGURA 3:** ESTRUTURA DA MANOGALACTOFURANANA DE *Trebouxia* sp., ISOLADA DO LÍQUEN *Ramalina gracilis*. Cordeiro et al (2007). 21
- FIGURA 4:** MANOGALACTANA DE *Coccomyxa mucigena*. FONTE: Cordeiro et al., (2010). 23
- FIGURA 5: PROCEDIMENTO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP).**
A SEPSE É INDUZIDA APÓS INCISÃO ABDOMINAL E EXPOSIÇÃO DA VÁLVULA ILEOCECAL, QUE ESTÁ LOCALIZADA NA JUNÇÃO ENTRE O INTESTINO DELGADO E O GROSSO (a). O CECO SE ESTENDE INFERIORMENTE A UMA BOLSA CEGA (b), E NORMALMENTE O MATERIAL FECAL PASSA DISTALMENTE PARA O INTESTINO GROSSO (SENTIDO DA SETA). A LIGADURA CECAL (c) É REALIZADA ABAIXO DA VÁLVULA ILEOCECAL DE FORMA NÃO-OBSTRUTIVA. O CECO É LIGADO PARCIALMENTE E PERFURADO. ATRAVÉS DA PUNÇÃO, OCORRE O EXTRAVAZAMENTO DE MATERIAL FECAL PARA A CAVIDADE

PERITONEAL, QUE EM CONDIÇÕES NORMAIS É UM AMBIENTE ESTÉRIL. FONTE: BURAS *et al.*, 2005. 36

FIGURA 6: ESQUEMA GERAL DAS EXTRAÇÕES, PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS REALIZADAS NO ESTUDO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Myrmecia biatorellae*. 37

FIGURA 7: ESPECTROS DE RMN-¹³C DE (A) FRAÇÃO SW E (B) FRAÇÃO SW-A OBTIDAS DE *M. biatorellae* (EM DMSO-*d*₆, A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). OS RETÂNGULOS EM VERMELHO INDICAM OS SINAIS REFERENTES A AMIOLOSE. 39

FIGURA 8: PERFIL DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICO (HPSEC) DA FRAÇÃO SW-A (A) E (B) DAS FRAÇÕES PURIFICADAS SW-100R, SW-50R, SW-30R E SW-10R, OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO. 41

FIGURA 9: FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DE ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DA FRAÇÃO SW-A OBTIDA DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*. A LETRA R INDICA QUE A FRAÇÃO FOI RETIDA NA MEMBRANA, ENQUANTO QUE A LETRA E INDICA ELUÍDA DA MEMBRANA. 42

FIGURA 10: ESPECTROS DE RMN-¹³C DAS FRAÇÕES: (A) SW-100R; (B) SW-50R; (C) SW-10R e (D) EXPERIMENTO DEPT-135 DA FRAÇÃO SW-50R OBTIDAS DE *M. biatorellae* (EM DMSO-*d*₆, A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). 43

FIGURA 11: ESPECTRO DE HSQC (RMN ¹³C/¹H) ACOPLADO DA FRAÇÃO SW-50R OBTIDA DE *M. biatorellae* (EM DMSO-*d*₆, A 70 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). 44

FIGURA 12: ESPECTRO DE HSQC (RMN-¹³C/¹H) DA FRAÇÃO SW-50R. EM (A) REGIÃO ANOMÉRICA E (B) REGIÃO C2-C6; OBTIDA DE *M.*

biatorellae (EM DMSO- d_6 , A 70 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). 45

FIGURA 13: ESPECTRO DE COSY (RMN- $^1\text{H}/^1\text{H}$) DA FRAÇÃO SW-50R OBTIDA DE *M. biatorellae* (EM DMSO- d_6 , A 70 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). 46

FIGURA 14: ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DE (A) FRAÇÃO SK10 (EM DMSO- d_6 , A 50°C) E (B) FRAÇÃO SK10-A (EM D_2O , A 50°C) OBTIDAS DE *Myrmecia biatorellae*, (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). 51

FIGURA 15: PERFIL DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICO (HPSEC) DE (A) FRAÇÃO SK10-A, (B) FRAÇÃO SK10-300R E (C) DAS FRAÇÕES SK10-100R E SK10-50R, OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO. 52

FIGURA 16: FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DE ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DA FRAÇÃO SK10-A OBTIDA DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*. A LETRA R INDICA QUE A FRAÇÃO FOI RETIDA NA MEMBRANA, ENQUANTO QUE A LETRA E INDICA ELUÍDA DA MEMBRANA. 53

FIGURA 17: ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DE (A) FRAÇÃO SK10-100R E (B) FRAÇÃO SK10-50R OBTIDAS DE *Myrmecia biatorellae*, (EM D_2O , A 50°C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). 54

TABELA 6: ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO SK10-50R OBTIDA DA MICROALGA *Myrmecia biatorellae*. 55

FIGURA 18: ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DE (A) FRAÇÃO PK10-A E (B) FRAÇÃO PK10-SF OBTIDAS DE *Myrmecia biatorellae* (EM DMSO- d_6 , A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). 56

- FIGURA 19:** ESPECTRO DE COSY (RMN-¹H/¹H) DA FRAÇÃO PK10-SF, EM DMSO-*d*₆ A 50 °C. DESLOCAMENTOS QUIMICOS (δ) EXPRESSOS EM p.p.m. 57
- FIGURA 20:** ESPECTRO DE HSQC (RMN ¹³C/¹H) DA FRAÇÃO PK10-SF, EM DMSO-*d*₆ A 50 °C. DESLOCAMENTOS QUIMICOS (δ) EXPRESSOS EM p.p.m. 58
- FIGURA 21:** ESTRUTURA PROPOSTA PARA A RAMNOGALACTOFURANANA PRESENTE NA FRAÇÃO PK10-SF DE *Myrmecia biatorellae*. 59
- FIGURA 22:** ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS FOTOBIONTES E ALGAS NÃO LIQUENIZADAS CLORÓFITAS BASEADA NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO 18S rDNA. FONTE: NASH III (2008). 61
- FIGURA 23.** CURVA DE LETALIDADE EM MODELO DE SEPSE EM ANIMAIS TRATADOS OU NÃO COM A FRAÇÃO SK10-A DE *Myrmecia biatorellae*. OS ANIMAIS FORAM TRATADOS DIARIAMENTE COM SALINA (CONTROLE) OU COM A FRAÇÃO SK10-A NA DOSE DE 50 mg/Kg, PELA VIA SUBCUTÂNEA. O TRATAMENTO FOI INICIADO NO MOMENTO DA CIRURGIA DE INDUÇÃO DA SEPSE E FOI REPETIDO NOS SETE DIAS SEGUINTEs, QUANDO A LETALIDADE DOS ANIMAIS FOI MENSURADA A CADA 12 HORAS. UM GRUPO FALSO-OPERADO FOI PROVIDENCIADO PARA COMPROVAR QUE A SIMPLES EXPOSIÇÃO DA VÁLVULA ILEOCECAL, SEM PERFURAÇÕES, NÃO CAUSA A SEPSE NEM MORTALIDADE. * INDICA P < 0,05 65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: GÊNEROS DE ALGAS ASSOCIADAS A FUNGOS LIQUENIZADOS ..	17
TABELA 2: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AQUOSAS OBTIDAS DE <i>Myrmecia biatorellae</i>	38
TABELA 3: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS CARBONOS E HIDROGÊNIOS DAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NA FRAÇÃO SW-50R DE <i>Myrmecia biatorellae</i>	48
TABELA 4: ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO SW-50R OBTIDA DA MICROALGA <i>Myrmecia biatorellae</i>	48
TABELA 5: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ALCALINAS OBTIDAS DE <i>Myrmecia Biatorellae</i>	50
TABELA 6: ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO SK10-50R OBTIDA DA MICROALGA <i>Myrmecia biatorellae</i>	55
TABELA 7: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ PPM) DE RMN ^{13}C E ^1H OBTIDOS PARA AS UNIDADES DE GALACTOFURANOSE DA FRAÇÃO PK10- SF.....	58
TABELA 8: ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO PK10-SF OBTIDA DA MICROALGA <i>Myrmecia biatorellae</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CH ₃ I	iodeto de metila
δ	deslocamento químico
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
DEPT-135	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
D ₂ O	água deuterada
GC-MS	cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectroscopia de massa
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
M	molar
MHz	megahertz
NaBD ₄	boroidreto de sódio deuterado
NaOH	hidróxido de sódio
<i>p</i>	piranosídico
<i>f</i>	furanosídico
p.p.m	partes por milhão
RMN- ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN- ¹ H	ressonância magnética nuclear de Hidrogênio
TFA	ácido trifluoracético
W	Fração derivada da extração aquosa a quente
SW	Fração sobrenadante aquosa do processo de congelamento de degelo
SW - 50R	Fração sobrenadante aquosa retida na membrana de 50 kDA
K10	Fração alcalina extraída com KOH 10%
SK10 – A	Fração sobrenadante alcalina purificada por amilase
SK10	Fração sobrenadante alcalina
SK10 – 50R	Fração sobrenadante alcalina retida na membrana de 50 kDa
PK10	Fração precipitada alcalina
PK10 – SF	Fração precipitada alcalina sobrenadante da reação de Fehling

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 LIQUENS.....	16
1.2 <i>Myrmecia biatorellae</i> J. B. Peterson	17
1.3 POLISSACARÍDEOS DE FOTOBIONTES LIQUÊNICOS.....	18
1.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS LIQUÊNICOS E SEUS SIMBIONTES	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 MATERIAL DE ESTUDO.....	29
3.2 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	29
3.2.1 Purificação por congelamento e degelo	29
3.2.2 Purificação por tratamento com α -amilase	30
3.2.3 Purificação por precipitação em solução de Fehling	30
3.2.4 Filtração por membranas.....	30
3.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS	31
3.3.1 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL E REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE	31
3.3.2 ANÁLISE DE METILAÇÃO.....	31
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	32
3.4.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	32
3.4.1.1 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC- MS).....	32
3.4.1.2 Determinação da homogeneidade e massa molar	33
3.5 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	33
3.5.1 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN- ¹³ C) e DEPT 135.....	33
3.5.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ¹ H)	34
3.5.3 Ressonância magnética nuclear bidimensional.....	34
3.6 ENSAIO BIOLÓGICO.....	34
3.6.1. Procedimento para indução da sepse por da cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	34
3.6.2. Teste de letalidade em animais tratados com a fração SK10-A	35
3.6.3 Análise estatística	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA FRAÇÃO W	38
4.2 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA FRAÇÃO K10.....	49
4.3 AÇÃO DA FRAÇÃO SK10-A EM MODELO DE SEPTICEMIA INDUZIDA POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO.	63
5 CONCLUSÕES	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 LIQUENS

Líquen é um termo biológico utilizado para nomear uma associação simbiótica entre um fungo, Ascomycota ou Basidiomycota, denominado micobionte e uma clorófita ou cianobactéria, o fotobionte (HAWKSWORTH e HILL, 1984; AHMADJIAN, 1993a). Nesta associação simbiótica, fotobiontes e micobiontes se comportam como um organismo composto, formando o talo liquênico (MIAO *et al.*, 2001). Este apresenta forma e estrutura internas constantes e definidas, onde os mesmos são morfologicamente distintos dos simbiontes que se desenvolvem aóposimbioticamente (HALE, 1979).

Para micólogos e liquenólogos, os liquens são referidos como fungos liquenizados, por haver predominância do micobionte na associação simbiótica (BARINAGA, 1995). Na classificação geral dos seres vivos, pelo sistema dos cinco reinos, os liquens estão inseridos no reino Fungi, classe Lichenes (LINHARES e GEWANDSZAJDER, 1985).

A liquenização é o resultado da adaptação mútua dos simbiontes para suprir suas necessidades (GALUN *et al.*, 1984). Nessa simbiose, a alga contribui com a produção de açúcares através da fotossíntese e, no caso das cianofíceas, também com a elaboração de aminoácidos a partir da fixação de gás carbônico e nitrogênio atmosféricos.

Apesar da contribuição do fungo ser aparentemente secundária, este forma uma camada de hifas, onde ficam alojadas as células do fotobionte, que promove proteção contra luz excessiva e ressecamento e, ainda facilitando a troca de gases (AHMADJIAN, 1993b).

Os liquens habitam os mais diferentes locais e ambientes, tais como rochas e regiões subárticas. Em regiões polares, por exemplo, eles são frequentemente predominantes em relação a vegetação no ambiente. Outra característica que pode ser considerada inerente a esses organismos é sua excepcional resistência às variações de temperatura, que pode passar de um resfriamento de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uma temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (XAVIER FILHO e RIZZINI, 1976).

A maioria das associações liquênicas tem como parceiro fotossintético algas verdes (classe Chlorophyceae), que estão presentes em aproximadamente 90% dos líquens, e em menor ocorrência cianobactérias, encontradas em cerca de 10% das associações (TSCHERMAK-WOESS, 1989; AHMADJIAN, 1993).

Dentre as clorófitas, os gêneros mais comuns são *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Coccomyxa* e *Dictyochloropsis* (TSCHERMAK-WOESS, 1989). Até o momento foram identificados 32 gêneros (Tabela 1), entre algas verdes e cianobactérias, como simbioses em líquens (AHMADJIAN, 1993a). Estima-se que esse número seja muito maior, pois a porcentagem de espécies de fungos liquenizados nos quais o gênero do fotobionte é conhecido compreende apenas 2% do número total (TSCHERMAK-WOESS, 1989; HELMS, 2003), demonstrando que esta é uma área da ciência ainda muito pouco explorada.

TABELA 1: GÊNEROS DE ALGAS ASSOCIADAS A FUNGOS LIQUENIZADOS

<i>Anacystis</i>	<i>Dictyochloropsis</i>	<i>Petroderma</i>
<i>Asterochloris</i>	<i>Dilabifilum</i>	<i>Phycopeltis</i>
<i>Botrydiopsis</i>	<i>Elliptochloris</i>	<i>Pleurococcus</i>
<i>Calothrix</i>	<i>Gloeocapsa</i>	<i>Pseudochlorella</i>
<i>Cephaleuros</i>	<i>Gloeocystis</i>	<i>Scytonema</i>
<i>Chlorella</i>	<i>Heterococcus</i>	<i>Stichococcus</i>
<i>Chlorosarcina</i>	<i>Hyalococcus</i>	<i>Stigonema</i>
<i>Chroococcum</i>	<i>Hyella</i>	<i>Trebouxia</i>
<i>Coccobotrys</i>	<i>Leptosira</i>	<i>Trentepohlia</i>
<i>Coccomyxa</i>	<i>Myrmecia</i>	<i>Trochiscia</i>
<i>Dichothrix</i>	<i>Nostoc</i>	

Fonte: AHMADJIAN, 1993a

1.2 *Myrmecia biatorellae* J. B. Peterson

De acordo com Friedel e Büdel (2008), *Myrmecia* é um gênero de algas pertencente à Divisão Chlorophyta, Classe Trebouxiophyceae, Ordem Trebouxiales. Até o momento foram descritas 12 espécies para este gênero, sendo elas: *M. astigmatica* Vinatzer, *M. biatorellae*, *M. bisecta* Reisinger, *M. globosa* Printz, *M. incisa*

Reisigl, *M. irregularis* Ettl & Gärtner, *M. israeliensis* Friedl, *M. macronucleata* Andreeva, *M. pyriformis* Tschermak-Woess & Plesl, *M. reticulata* Tschermak-Woess, *M. scandens* Willd. e *M. tachia* Gmel..

Myrmecia é um gênero que pode ser encontrada tanto em simbiose com fungos liquenizados como também em vida livre, como por exemplo, no solo (NAKANO *et al.*, 1991). Em simbiose, já foi encontrado associado aos seguintes gêneros de fungos liquenizados: *Catilaria*, *Lobaria*, *Pulmonaria*, *Bacidia*, *Dermatocarpon*, *Phlyctis*, *Psora*, *Psoroma*, *Lobiona* e *Pannaria* (GEITLER, 1963; JAMES e AINO HENSEN, 1975; TSCHERMAK-WOESS, 1978; KILIAS e SCHENEIDER, 1978; ELVEBAKK e BJERKE, 2005).

A microalga *Myrmecia biatorellae* utilizada neste estudo, possui como características morfológicas células agrupadas (Figura 1), esféricas quando jovens, mas tornando-se alongadas e ovóides quando maduras, com um tamanho aproximado de 3 µm, apresentam um cloroplasto em formato de taça em posição parietal e não apresentam grânulos de pirenóides (FRIEDL e BUDEL, 2008).

Em meios de cultura *Myrmecia biatorellae* desenvolve-se preferencialmente de maneira heterotrófica, apresentando maior crescimento em meios contendo nitrogênio orgânico, como aminoácidos, peptona ou hidrolisado de caseína. Ahmadjian (1993) destaca que essa necessidade de nitrogênio orgânico ainda é um mistério, pois é desconhecida a fonte de compostos nitrogenados em associações simbióticas.

1.3 POLISSACARÍDEOS DE FOTOBIONTES LIQUÊNICOS

Os primeiros trabalhos com polissacarídeos de fotobiontes liquênicos estão relacionados, principalmente, à fixação de CO₂ do meio (GOLDSMITH *et al.*, 1997) e ao movimento de carboidratos de baixa massa molar e polióis da alga para o fungo (AHMADJIAN, 1993).

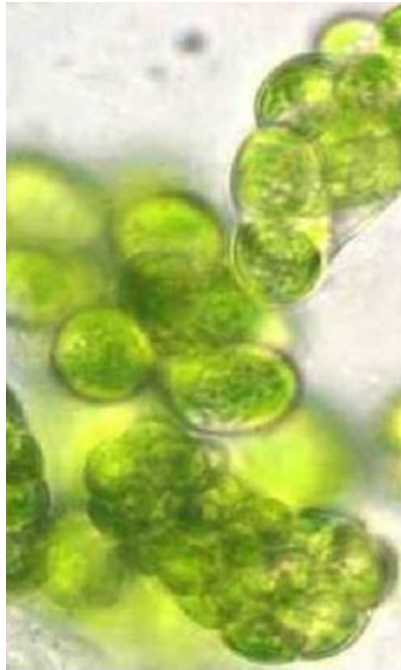


FIGURA 1: CÉLULAS DE *Myrmecia biatorellae* CULTIVADAS EM LABORATÓRIO. EXTRAÍDO DE BETTIN (2010).

Richardson *et al.* (1967) estudando a movimentação de carboidratos da alga para o fungo, de quatro espécies de *Lobaria* e de *Sticta fuliginosa*, utilizando bicarbonato de sódio marcado com ^{14}C , observaram que o modelo de movimento de carboidratos dentro do talo liquênico é determinado pela natureza do fotobionte. Quando algas do gênero *Nostoc* estão presentes, é produzida glucose, enquanto que o ribitol é produzido pelo gênero *Trebouxia*.

Poucos anos depois, Komiya e Shibata (1971) estudando o transporte de carboidratos da alga para o fungo, em *Ramalina subbreviscula* e *Ramalina crassa*, obtiveram resultados semelhantes ao de Richardson *et al.*, (1967). Também observaram que arabinitol e manitol são sintetizados pelo micobionte.

König e Peveling (1984) avaliando a composição monossacarídica da parede celular de algumas espécies de *Trebouxia* e *Pseudotrebouxia*, observaram a presença de cinco camadas distintas na parede celular, denominadas de S1 a S5. Nessas camadas, como constituintes dos polissacarídeos, foram encontradas xilose, galactose, ramnose, arabinose, glucose e manose, além de aminoaçucares como a glucosamina e galactosamina, como constituintes polissacarídeos. A proporção dos

açúcares variou de acordo com a espécie de *Trebouxia* e *Pseudotrebouxia* e a camada celular. Os autores não observaram a ocorrência de ácidos urônicos nos gêneros estudados.

Cordeiro e colaboradores (2005) estudando os polissacarídeos extraídos da microalga *Trebouxia*, foram pioneiros na elucidação estrutural de polissacarídeos produzidos por fotobiontes associados a fungos liquenizados. Analisando *Trebouxia* sp., isolada do líquen *Ramalina gracilis*, os autores observaram estruturas de carboidratos muito incomuns para as algas verdes, como uma β -galactofuranana composta por uma cadeia principal formada por unidades de β -galactofuranose (1 \rightarrow 5)-ligadas, substituídas em O-6 por pequena proporção de unidades de β -Galf (Figura 2).

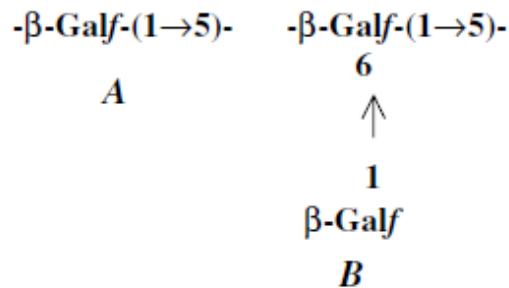


FIGURA 2: ESTRUTURA DA β -GALACTOFURANANA DE *Trebouxia* sp., ISOLADA DO LÍQUEN *Ramalina gracilis*. FONTE: Cordeiro et al. (2005).

Em outro trabalho, Cordeiro e colaboradores (2008) encontraram outro polissacarídeo para *Trebouxia* sp., um heteropolissarídeo composto de uma cadeia principal formada por unidades de galactofuranose (1 \rightarrow 5)-ligadas, sendo 11% dessas unidades substituídas em O-6 por cadeias laterais. Essas cadeias laterais são formadas por estruturas ramificadas muito complexas, compostas principalmente por unidades de manopirranose 4-O-, 2,4-O-, 2,3-O- e 3,6-O-substituídas. A ramnose e a arabinose foram encontrados apenas como unidades não redutoras, juntamente com as unidades terminais não redutoras de Galf e Manp (Figura 3).

foram extraídas de paredes celulares de várias espécies de fungos, como por exemplo *Penicillium* (PARRA *et al.* 1994), *Eupenicillium* (LEAL *et al.* 1993), *Neosartorya* (LEAL *et al.* 1995), *Aspergillus* (LEAL *et al.* 1992) e *Guignardia* (SASSAKI *et al.* 2002b). Estas β -galactofurananas fúngicas apresentam uma variedade de estruturas, sendo compostas por cadeias lineares constituídas apenas pelas ligações (1 \rightarrow 5) ou por unidades alternadas (1 \rightarrow 5) e (1 \rightarrow 6)-ligadas, bem como podem apresentar estruturas ramificadas. Além disso, resíduos de galactofuranose são citados como estruturas-chave envolvidas no mecanismo de reconhecimento e/ou invasão por parasitas em seus hospedeiros (LEVERY *et al.*, 1998).

Em relação à simbiose liquênica, a superfície da parede celular do fotobionte pode ser importante na interação entre os simbiotes, uma vez que lectinas produzidas pelo micobionte, localizadas na parede celular, foram encontradas interagindo com ligantes específicos na parede celular das algas (BUBRICK *et al.*, 1980, 1981, 1983). Essas lectinas parecem ser capazes de distinguir entre algas compatíveis e incompatíveis, agindo como proteínas de reconhecimento quando uma alga compatível tem um receptor específico na parede celular, mas produzindo deterioração e morte celular quando este receptor está ausente (MOLINA *et al.*, 1998b).

Em experimentos de ressíntese, Ahmadjian e Jacobs (1981), a partir do micobionte de *Cladonia cristatella*, observaram que enquanto houve a formação de esquâmulas com todas as cepas de algas do gênero *Asterochloris*, todas as cepas de *Trebouxia* foram parasitadas. Este fato pode ser explicado pelos diferentes polissacarídeos e galactofurananas presentes em *Trebouxia* e *Asterochloris*, os quais podem estar envolvidos no processo de reconhecimento entre os simbiotes (CORDEIRO *et al.* 2005, 2007, 2008).

Recentemente, outro fotobionte estudado foi *Coccomyxa mucigena*, simbiote de *Peltigera aphthosa* (CORDEIRO *et al.*, 2010). Este fotobionte produz uma manogalactana parcialmente O-metilada, composta por galactose (75%), 3-O-metilmanose (15%) e manose (10%). Este polímero é formado por uma cadeia principal composta por unidades de β -galactopiranosose (1 \rightarrow 6)-ligadas, parcialmente substituídas em O-3 por unidades de β -Galp, 3-O-Me- α -Manp ou α -Manp (Figura 4). Em termos de simbiose, não existem semelhanças entre este polímero e os polissacarídeos anteriormente encontradas no talo intacto do líquen *Peltigera*

aphthosa. Gorin e Iacomini (1985) relataram para esta espécie de fungo liquenizado a presença de uma fração rica em glucose (83%) e de uma galactomanana (Man:Gal:Glc proporção de 58:39:2), composto de uma cadeia principal de α -manopirranana (1 \rightarrow 6)-ligada, monossubstituída em O-4 por unidades β -Galp e dissustituído em O-2 e O-4 por unidades α -Manp e β -Galp, respectivamente. Esta galactomanana parece ser comum ao gênero *Peltigera*, uma vez que Omarsdottir *et al.* (2006a) relataram uma estrutura semelhante em *Peltigera canina*.

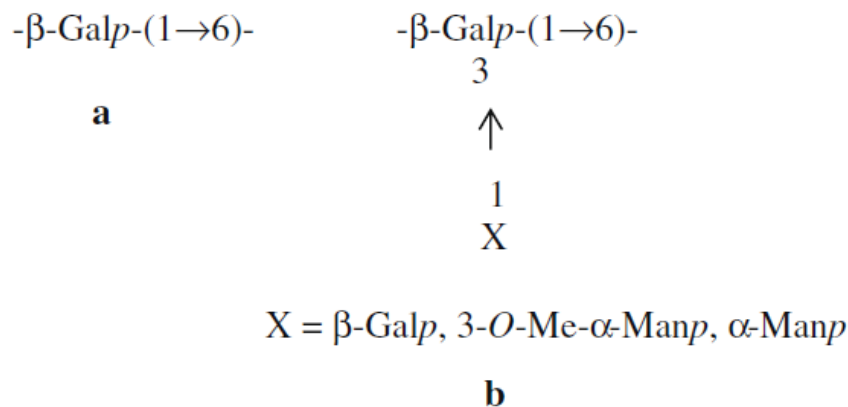


FIGURA 4. MANOGALACTANA DE *Coccomyxa mucigena*. FONTE: Cordeiro *et al.*, (2010).

Uma observação importante feita por Cordeiro e colaboradores (2010) é que, como acima, *P. aphthosa* e *P. canina* possuem galactomananas semelhantes em seus talos, apesar de estarem associados a fotobiontes diferentes. Enquanto *P. aphthosa* está associada com *Coccomyxa mucigena* como fotobionte primário, *P. canina* tem *Nostoc* como seu parceiro fotossintético (AHMADJIAN 1989, GALUN 1988). Estes fotobiontes pertencem a grupos taxonômicos muito distintos, uma Chlorophyta (Eucariota) e uma Cianobactéria (Procariota), respectivamente. No entanto, parece que a liquenização com gêneros de fotobiontes diferentes não modificou as estruturas dos polissacarídeos sintetizados por fungos liquenizados do gênero *Peltigera*.

Ruthes e colaboradores (2010) incluíram a caracterização estrutural dos polissacarídeos de *Nostoc muscorum*, fotobionte do líquen *P. canina*. Os autores observaram que esta cianobactéria secreta no meio de cultura um

exopolissacarídeo, uma β -D-xilana linear (1 \rightarrow 4)-ligada. A partir dos extratos da biomassa celular, os autores purificaram um heteropolissacarídeo complexo, formado principalmente por unidades de β -L-Arap e β -D-Xilp-(1 \rightarrow 4)-ligadas, parcialmente substituídas em O-3 por unidades α -D-Manp. Este último foi substituído em O-3 ou O-2 por unidades α -D-Manp ou α -L-Fucp como terminais não redutores. Novamente, é possível observar que não há semelhanças entre estes polissacarídeos com os previamente encontrados por Omarsdottir *et al.* (2006a) no talo líquen intacto de *P. canina*.

Outra microalga que foi estudada é pertencente ao gênero *Chlorella*, a qual pode ser encontrada tanto em vida livre como em simbiose líquênica. Os estudos presentes na literatura até o momento sobre os polissacarídeos presentes nesta alga foram realizados apenas com cepas de vida livre. O primeiro relato de um polissacarídeo isolado a partir de *C. pyrenoidosa* foi a quase 30 anos atrás por White e Barber (1972). Neste trabalho os autores observaram que este polissacarídeo era formado por ramnose (52%), galactose (13%) e arabinose (12%), além de outros açúcares em menores proporções. Um polissacarídeo diferente foi isolado de *C. ellipsoidea*, sendo constituído majoritariamente por glucose, e por arabinose e galactose em pequenas proporções (KOJIMA *et al.* 1973). Matsubayashi (1986) encontrou um heteropolissacarídeo com alta viscosidade em *Chlorella* sp., o qual era constituído principalmente por ramnose, arabinose, manose e ácidos urônicos. Anos mais tarde, foi observada a presença de fucose e ramnose em *C. ellipsoidea*, porém não foi detectada a presença de arabinose (UKAI *et al.*, 1990). Yalcin e colaboradores (1994) isolaram um outro polissacarídeo extracelular de *Chlorella* sp. sendo este formado por ácido glucurônico e arabinose como componentes principais (38,3% e 32,5%, respectivamente). Noda e colaboradores (1995) isolaram principalmente galactose como monossacarídeo extracelular de *Chlorella*, este numa proporção de 80%. Açúcares mono-O-metilados (3-O-metil-D-galactose, 2-O- e 3-O-metil-L-ramnose) foram encontrados como componentes minoritários em *Chlorella vulgaris* K-22 por Ogawa e colaboradores (1997). Pugh e colaboradores (2001) isolaram um polissacarídeo de *C. pyrenoidosa* que era composto por arabinose (31,6%) e galactose (26,3%) e traços de muitos outros açúcares. Sendo que este polímero apresentou-se como um potente ativador de monócitos e fagócitos humanos.

Como pôde ser observado a partir dos dados citados acima, nenhum dos polissacarídeos produzidos pelos fotobiontes cultivados apossimbioticamente foram encontrados na associação liquênica, sendo desconhecido o fato que desencadeia tal fenômeno. Cordeiro e colaboradores (2010) realizaram uma discussão a respeito desse fenômeno. De acordo com os autores, uma das hipóteses seria devido à pequena proporção de células de fotobionte no talo liquênico, levando a não detecção dos polissacarídeos oriundos dos fotobiontes nos extratos de talos liquênicos intactos, o qual é dominado por polissacarídeos do micobionte.

Na literatura é relatado que os fotobiontes passam por uma série de modificações como resultado do processo de liquenização, como por exemplo: as paredes celulares passam a ser mais permeáveis à perda de carboidratos, podem desenvolver-se mais lentamente e sofrer dramáticas modificações morfológicas, como por exemplo, em *Trentepohlia*. Esta alga é formada por células filamentosas, ramificadas e cilíndricas no estado de vida livre, ao passo que em simbiose forma somente filamentos curtos ou é formada apenas por estágios unicelulares (BUBRICK 1988, FRIEDL e BÜDEL 2008). Porém, a influência da liquenização na produção de polissacarídeos pelas algas simbióticas não é conhecida ainda. Cordeiro e colaboradores (2010) sugerem que em cultivo apossimbiótico (no estado de vida livre), a microalga seja capaz de produzir todo o seu espectro de moléculas de carboidratos, enquanto que isto é restrito no estado liquenizado. Isto está de acordo com Bubrick (1988), onde o autor afirma que as algas estão reprimidas na associação liquênica e são induzidas a exportar nutrientes para o fungo.

1.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS LIQUÊNICOS E SEUS SIMBIONTES

Vários trabalhos relatam as atividades biológicas de polissacarídeos isolados de líquens e seus simbiontes, principalmente relacionados a atividades antitumorais, estimulação não específica do sistema imunológico, atividade anticoagulante, antiviral e efeitos na memória (OLAFSDOTTIR e INGOLFSDOTTIR 2001, MARTINEZ *et al.*, 2005).

Carneiro-Leão e colaboradores (1997), estudando a atividade *in vitro* de uma α -glucana (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-ligada extraída de *Ramalina celastri*, bem como de seus derivados sulfatados sobre células HeLa, observaram que estes polímeros são citotóxicos pois causaram morte celular na linhagem de células testada. Stuelp-Campelo e colaboradores (2002) testaram *in vivo* a atividade desta α -glucana sobre Sarcoma 180, bem como seus efeitos em células fagocitárias de exudatos peritoneais. Os autores observaram que o desenvolvimento dos tumores em animais tratados com o polímero eram aproximadamente 80% menor quando comparados com o grupo controle. Também foi possível observar que o número de fagócitos peritoneais e sua atividade aumentaram após a inoculação da α -glucana.

Estudos sobre a influência de polissacarídeos de líquens sobre o sistema imune inato foram conduzidos por cientistas islandeses. Eles avaliaram os efeitos fagocitários e/ou efeito anticomplemento do heteropolissacarídeo thamnolana (Ths-3) e da β -glucana (Ths-2) de *Thamnia vermicularis* var. *subuliformis* (OLAFSDOTTIR *et al.*, 1999a, OLAFSDOTTIR *et al.*, 2003), bem como da α -glucana (Ci-3) do tipo isoliquenana de *Cetraria islandica* (OLAFSDOTTIR *et al.* 1999b). Os resultados demonstraram que estes polímeros são imunologicamente ativos, pois estimularam a fagocitose e reduziram a hemólise induzida pelo complemento *in vitro*.

Os efeitos de polissacarídeos derivados de líquens em experimentos *in vitro*, em estudos de proliferação celular e secreção de citocina foram primariamente realizados por Omarsdottir e colaboradores (2005), onde foram testados quatro polissacarídeos isolados de *Peltigera canina*. Estes mostraram atividade mitogênica em células de baço de rato e estimularam a secreção de interleucina 10, enquanto que em macrófagos peritoneais os polissacarídeos estimularam a secreção de fator de necrose tumoral α (TNF- α). De acordo com os autores, estes resultados indicaram que os polissacarídeos influenciaram as células do sistema imune, tanto inato quanto adaptativo.

O efeito anti-inflamatório da liquenana isolada de *Cetraria islandica* foi confirmado em experimentos *in vivo* (FREYSDOTTIR *et al.*, 2008). Mais recentemente, a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva foram reportadas para uma glucomanana isolada do líquen *Heterodermia obscurata* (PEREIRA *et al.*, 2010).

Derivados sulfatados de líquens já foram testados em atividades antivirais, antitrombóticas e anticoagulantes. Hirabayashi e colaboradores (1989) reportaram

que um derivado sulfatado de β -glucana inibiu a replicação do vírus HIV *in vitro*. As β glucanas (1 \rightarrow 6)-ligadas, quimicamente sulfatadas, de *Parmotrema mantiqueirense* e uma galactoglucomanana de *Cladonia ibitipocae* demonstraram atividade anticoagulante *in vitro*. Além disso, ambos os polissacarídeos sulfatados demonstraram propriedades antitrombóticas *in vivo* quando avaliados usando um modelo de trombose em ratos Wistar (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005a, b).

No entanto, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos biológicos promovidos pelos polissacarídeos isolados de simbiontes liquênicos, pois até o momento, somente os polissacarídeos de *Trebouxia* sp (CORDEIRO *et al.*, 2008) e de *Nostoc* sp (RUTHES, 2010) foram estudados.

Cordeiro e colaboradores (2008) estudaram a atividade imunológica da manogalactofuranana do fotobionte *Trebouxia* sp. (simbionte de *Ramalina gracilis*), *in vitro* usando macrófagos peritoneais. Foi observada a atividade biológica deste polímero em todas as concentrações testadas (1-150 μ g/mL), e em 150 μ g/mL houve um incremento na ativação de macrófagos em 60% quando comparado ao grupo controle. Além disso, foram verificadas modificações morfológicas nos macrófagos quando observados por microscopia eletrônica de varredura.

Ruthes (2010) avaliou 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 (ácido nosturônico) 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.

Embora exista uma diversidade considerável de gêneros de fotobiontes liquênicos, a composição e a estrutura dos polissacarídeos produzidos e sua atividade biológica ainda é pouco conhecida, sendo assim um campo aberto para estudos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é determinar a estrutura química fina de polissacarídeos presentes na microalga *Myrmecia biatorellae*, fotobionte do líquen *Lobaria linita*, cultivada axenicamente, bem como testar a atividade biológica destes polissacarídeos em modelo de sepse murino.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Purificar os polissacarídeos existentes nos extratos aquoso e alcalino (KOH a 10%);
- 2) Quantificar e analisar a composição monossacarídica dos polissacarídeos purificados;
- 3) Caracterizar as estruturas químicas dos polissacarídeos purificados.
- 4) Testar a atividade biológica dos polissacarídeos em modelo de sepse murino.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL DE ESTUDO

A microalga *Myrmecia biatorellae* (linhagem 8.82), isolada do líquen *Lobaria linita* e obtida do *Culture Collection of Algae* (SAG), da University of Göttingen (Alemanha), foi cultivada em laboratório em meio nutriente orgânico para *Trebouxia*, segundo Ahmadjian (1993a), sendo constituído por 1 L de meio Bold's Basal Medium (BBM, DEASON e BOLD, 1960), 5 g de peptona de carne (fonte de nitrogênio) e 15 g de glucose (fonte de carbono).

Cada cultivo era composto por 5 L de meio, onde cerca de 1 ml de inóculo foi adicionado a cada 1 L de meio, e o cultivo foi mantido por 30 dias, a uma temperatura de 21 °C (\pm 2 °C), com radiação incidente de 45 mol.m⁻².s⁻¹, e fotoperíodo de 12 h/12 h de luz.

Decorridos os 30 dias, as algas foram retiradas do meio de cultivo por meio de filtração em funil de Büchner utilizando filtros de papel. Em seguida, as algas foram lavadas em água destilada para retirada do meio residual e congeladas, liofilizadas e pesadas. A biomassa obtida (41,23 g) foi deslipidificada com clorofórmio:metanol e os polissacarídeos extraídos com água e 10% KOH, sob refluxo. Os extratos brutos foram submetidos ao procedimento de congelamento-degelo (GORIN e IACOMINI, 1984) e gentilmente cedidos para este estudo pelas alunas de Iniciação Científica Vanessa de Fátima Reinhardt e Franciele Lima Bettin.

3.2 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.2.1 Purificação por congelamento e degelo

As frações brutas obtidas pelas extrações aquosa e alcalina passaram pelo processo de separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo segundo Gorin e Iacomini (1984).

As frações foram solubilizadas em água destilada e submetidas ao procedimento de congelamento e posterior degelo a temperatura ambiente. Houve a

formação de um precipitado insolúvel em água fria, o qual foi separado por centrifugação. A purificação por congelamento e degelo foi repetida por várias vezes até que não ocorresse mais a formação de precipitado a partir do sobrenadante. O precipitado formado também passou pelo congelamento e degelo repetidamente a fim de eliminar por completo todos os compostos solúveis em água fria. Os sobrenadantes foram reunidos, congelados e liofilizados, assim como os precipitados das frações.

3.2.2 Purificação por tratamento com α -amilase

As frações contendo altos teores de glucose foram tratadas com a enzima α -amilase (SIGMA), Tipo XII-A, de *Bacillus licheniformis*, em temperatura ambiente sob agitação, por aproximadamente 24 horas, em água destilada. Em seguida, as amostras foram dialisadas por 48 horas, congeladas e liofilizadas.

3.2.3 Purificação por precipitação em solução de Fehling

A fração foi solubilizada na solução A de Fehling e em seguida adicionou-se igual volume da solução B. Após forte agitação manual, a amostra foi deixada em geladeira, por alguns minutos, com o objetivo de favorecer a formação de precipitado. Em seguida, a amostra foi centrifugada (15min, 8.000 rpm), e o precipitado e sobrenadante neutralizados com ácido acético e dialisados por 24 horas. Os materiais dialisados foram tratados com resina catiônica fortemente ácida, filtrados em algodão, neutralizados com hidróxido de sódio, novamente dialisados e por fim, liofilizados.

3.2.4 Filtração por membranas

As amostras foram solubilizadas em água destilada, e filtradas em membranas com limite de exclusão de 300KDa, 100KDa e 50KDa, (Millipore), utilizando suporte apropriado para estes tipos de membranas.

Para identificar estas frações purificadas, houve o acréscimo dos números 300, 100 e 50, que representam o limite da exclusão das membranas utilizadas, e das letras E e R, que se referem a eluída e retida, respectivamente, após o nome da fração.

3.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS

3.3.1 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL, REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE

Dois miligramas das frações foram tratadas com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 2M, a 100 °C por oito horas. Após este período, o ácido foi eliminado das amostras por evaporação até a secura, sendo em seguida, submetidas à redução e acetilação.

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4) em temperatura ambiente, pH 9-10, *overnight* (12-15 horas) (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Após este período, os materiais foram neutralizados com ácido acético e liofilizados.

Os alditóis formados foram acetilados com 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de piridina (1:1, v/v) por 30 minutos a 100 °C (SASSAKI *et al.*, 2008). A reação foi interrompida pela adição de água destilada e os acetatos de alditóis formados foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual, ainda presente na fração clorofórmica, foi removida por complexação com sulfato de cobre 5% e o material lavado com água destilada por várias vezes. A completa desidratação da fase clorofórmica foi feita pela adição de sulfato de sódio anidro. O clorofórmio foi evaporado e os acetatos de alditóis analisados por cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

3.3.2 ANÁLISE DE METILAÇÃO

Os polissacarídeos purificados foram submetidos à metilação pelo método de CIUCANU e KEREK (1984). As amostras devidamente liofilizadas e secas (10

mg) foram solubilizadas em 2 mL de DMSO. Após solubilização, adicionou-se NaOH pulverizado e seco, e o sistema foi agitado por 30 minutos. A seguir, acrescentou-se o agente metilante, iodeto de metila (CH_3I), sendo a mistura agitada por mais 30 minutos, em agitador magnético. A reação foi interrompida com água destilada e neutralizada com gotas de ácido acético. Em seguida a amostra foi dialisada contra água corrente e liofilizada. O processo de metilação foi repetido mais uma vez.

O material liofilizado, aproximadamente 2 mg, foi submetido à hidrólise ácida com 0,3 mL de ácido fórmico a 45%, por um período que variou de 3 a 30 horas, na temperatura de 100°C. Após esse período o ácido foi evaporado e posteriormente a amostra foi reduzida com NaBD_4 e acetilado pelo método convencional com anidrido-acético e piridina, na proporção de 1:1 (V/V), sendo os alditóis acetatos parcialmente O-metilados resultantes analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) em colunas capilares como se descreve adiante.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.4.1.1 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas usando-se o cromatógrafo a gás "VARIAN", modelo Saturno 3300, acoplado a um espectrômetro de massa da marca FINNIGAN ION-TRAP, modelo 800, com He como gás carreador, munido com ITS-40 e equipado com coluna capilar (30m x 0,25 mm d.i.) DB-225.

As injeções foram feitas utilizando-se a seguinte programação: Temperatura inicial da coluna de 50 °C, após injeção, aumento de temperatura a 40 °C/min até 220 °C e mantida constante, o gás de arraste foi o Hélio ultrapuro, com fluxo de 2 mL/min.

Esse método foi empregado para quantificação de acetatos de alditóis e acetatos de alditóis parcialmente metilados (JANSSON *et al.*, 1967), identificados

pelos seus perfis característicos de fragmentação e pelos seus tempos de retenção, os quais foram comparados com padrões. As áreas dos picos foram obtidas por integração automática.

3.4.1.2 Determinação da homogeneidade e massa molar

As amostras foram solubilizadas em água na concentração de 1 mg/mL e filtradas através de membranas de acetato de celulose de 0,22 μm . Em seguida foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de $1 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$, em série. O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_2 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo NaN_3 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL/min, pressão de 920 psi a 30 $^\circ\text{C}$, monitorados através de bomba peristáltica WATERS 515.

Para o cálculo da massa molar, as amostras com perfil de eluição homogêneo tiveram 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 amostra. E os resultados de homogeneidade e de determinação de massa molar foram analisados com o *software* ASTRA 4.70.07.

3.5 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.5.1 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN- ^{13}C) e DEPT 135

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 e DEPT 135 foram obtidos pelo uso de espectrômetro Bruker Avance DRX 400, com frequência de 100 MHz. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ ppm. A acetona ou $\text{DMSO-}d_6$ forneceram sinal de referência (30,2 ppm e 39,7 ppm, respectivamente).

Os polissacarídeos foram dissolvidos em D_2O ou $\text{DMSO-}d_6$ de acordo com a solubilidade, e as soluções foram colocadas em tubos de 150 mm de comprimento e diâmetro de 5 mm, e foram analisados a temperaturas de 50 $^\circ\text{C}$ ou 70 $^\circ\text{C}$.

3.5.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H)

Os espectros de RMN-¹H foram obtidos pelo uso do espectrômetro Bruker Avance DRX 400, com frequência de 400 MHz, acoplado ao transformador de Fourier. Os polissacarídeos foram analisados com soluções de D₂O ou DMSO-*d*₆, em tubos de 150 x 5 mm d.i. e mantidos a 70 °C. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (p.p.m.). A acetona ou DMSO-*d*₆ forneceram sinal de referência (2,224 p.p.m e 2,60 p.p.m, respectivamente).

3.5.3 Ressonância magnética nuclear bidimensional

Os espectros bidimensionais (COSY, HSQC e HSQC acoplado) foram obtidos pelo uso do espectrômetro Bruker Avance DRX 400. Os polissacarídeos foram analisados com soluções em DMSO-*d*₆, em tubos de 150 x 5 mm d.i. e mantidos a 70 °C. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (p.p.m).

3.6 ENSAIO BIOLÓGICO

A fração SK10-A foi testada em camundongos submetidos à septicemia induzida por ligadura e perfuração do ceco (BURAS *et al.*, 2005).

3.6.1. Procedimento para indução da sepse por da cirurgia de ligadura e perfuração do ceco

O modelo de indução da sepse em animais através da perfuração do intestino para a cavidade abdominal é clinicamente relevante, uma vez que simula a septicemia por extravasamento de fezes e acesso das suas bactérias à corrente sanguínea (SPRONK *et al.*, 2004). Para a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP), os camundongos Swiss (7 a 8 semanas de idade) foram anestesiados com uma mistura de cetamina/xilazina (80/10 mg/kg, i.p.), e realizada uma incisão abdominal, através da qual a válvula ileocecal foi retirada da cavidade abdominal. A

válvula ileocecal foi ligada em sua região central utilizando um fio cirúrgico (Figura 5). Para evitar a obstrução total da luz do intestino e garantir um padrão de similaridade na ligadura em todos os experimentos, utilizou-se uma cânula de polietileno com cerca de 3 mm de diâmetro, a qual foi colocada ao longo do eixo intestinal no momento da ligadura.

Após a ligadura, a válvula ileocecal foi perfurada (3 furos) com uma agulha (22G). As perfurações foram confirmadas por uma leve pressão manual, a qual resultou em extravasamento de pequena quantidade de conteúdo intestinal. Após este procedimento, o intestino perfurado foi imediatamente recolocado na cavidade abdominal e a incisão foi suturada. Após a cirurgia, todos os animais receberam uma injeção subcutânea de solução salina isotônica (1 mL/100g) e foram acondicionados em uma caixa aquecida até a recuperação total da anestesia.

3.6.2. Teste de letalidade em animais tratados com a fração SK10-A

Neste estudo, para efeitos de comparação da mortalidade, foram providenciados diferentes grupos (n= 8 a 10), os quais estão listados abaixo:

- Grupo Falso-Operado - cujos animais foram anestesiados, sofreram a incisão, tiveram a válvula ileocecal exposta e recolocada no abdômen, mas sem as perfurações;
- Grupo Controle – constituídos por animais com sepse e tratados somente com salina (soro fisiológico);
- Grupo de animais com sepse tratados com a fração SK10-A (mistura das galactofurananas) de *Myrmecia biatorellae*. O extrato foi administrado no momento da cirurgia e a cada 24 horas, na dose de 50 mg/kg, pela via subcutânea.

O tratamento foi mantido durante os sete dias seguintes à cirurgia. Neste período, a mortalidade dos animais foi quantificada a cada 12 horas. Posteriormente, as mortalidades dos diferentes grupos foram comparadas entre si.

Ligadura e perfuração do ceco (*caecal ligation and puncture – CLP*)

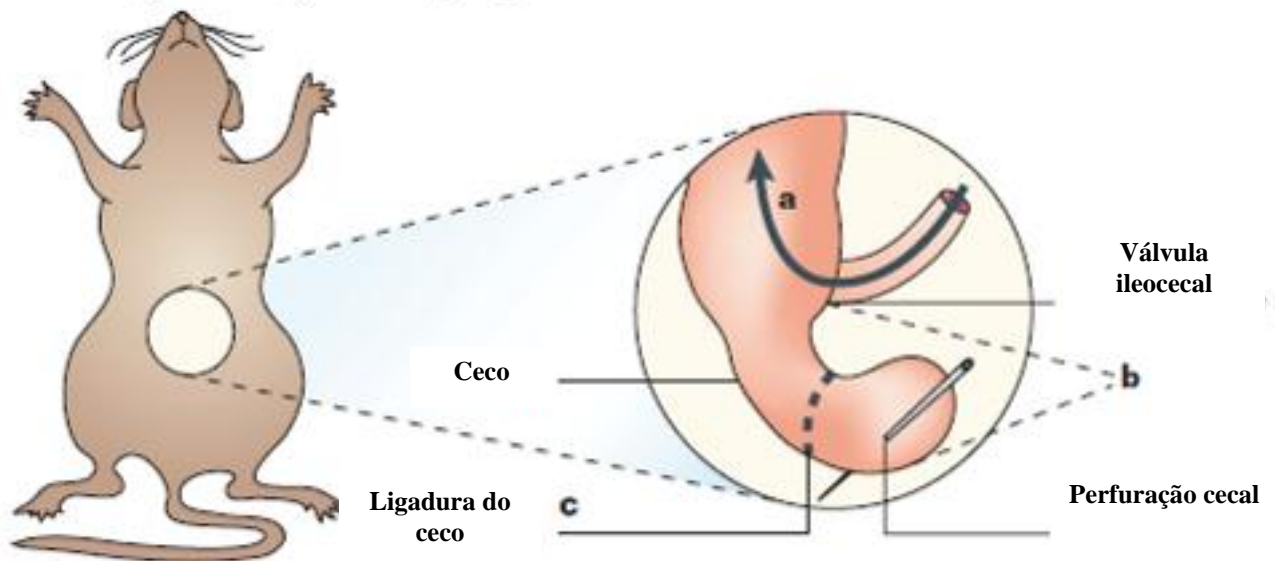


FIGURA 5. PROCEDIMENTO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP). A SEPSE É INDUZIDA APÓS INCISÃO ABDOMINAL E EXPOSIÇÃO DA VÁLVULA ILEOCECAL, QUE ESTÁ LOCALIZADA NA JUNÇÃO ENTRE O INTESTINO DELGADO E O GROSSO (a). O CECO SE ESTENDE INFERIORMENTE A UMA BOLSA CEGA (b), E NORMALMENTE O MATERIAL FECAL PASSA DISTALMENTE PARA O INTESTINO GROSSO (SENTIDO DA SETA). A LIGADURA CECAL (c) É REALIZADA ABAIXO DA VÁLVULA ILEOCECAL DE FORMA NÃO-OBSTRUTIVA. O CECO É LIGADO PARCIALMENTE E PERFURADO. ATRAVÉS DA PUNÇÃO, OCORRE O EXTRAVAZAMENTO DE MATERIAL FECAL PARA A CAVIDADE PERITONEAL, QUE EM CONDIÇÕES NORMAIS É UM AMBIENTE ESTÉRIL. FONTE: BURAS *et al.*, 2005.

3.6.3 Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O gráfico e a análise estatística foram obtidos com o auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os polissacarídeos foram extraídos da biomassa seca e deslipidificada de *Myrmecia biatorellae* utilizando extrações aquosas e alcalinas (KOH 10%), dando origem a duas frações, W e K10, respectivamente (Figura 6). Estas frações foram purificadas e os polissacarídeos estruturalmente caracterizados utilizando várias metodologias que foram adaptadas de acordo com as características químicas de cada fração (Figura 6).

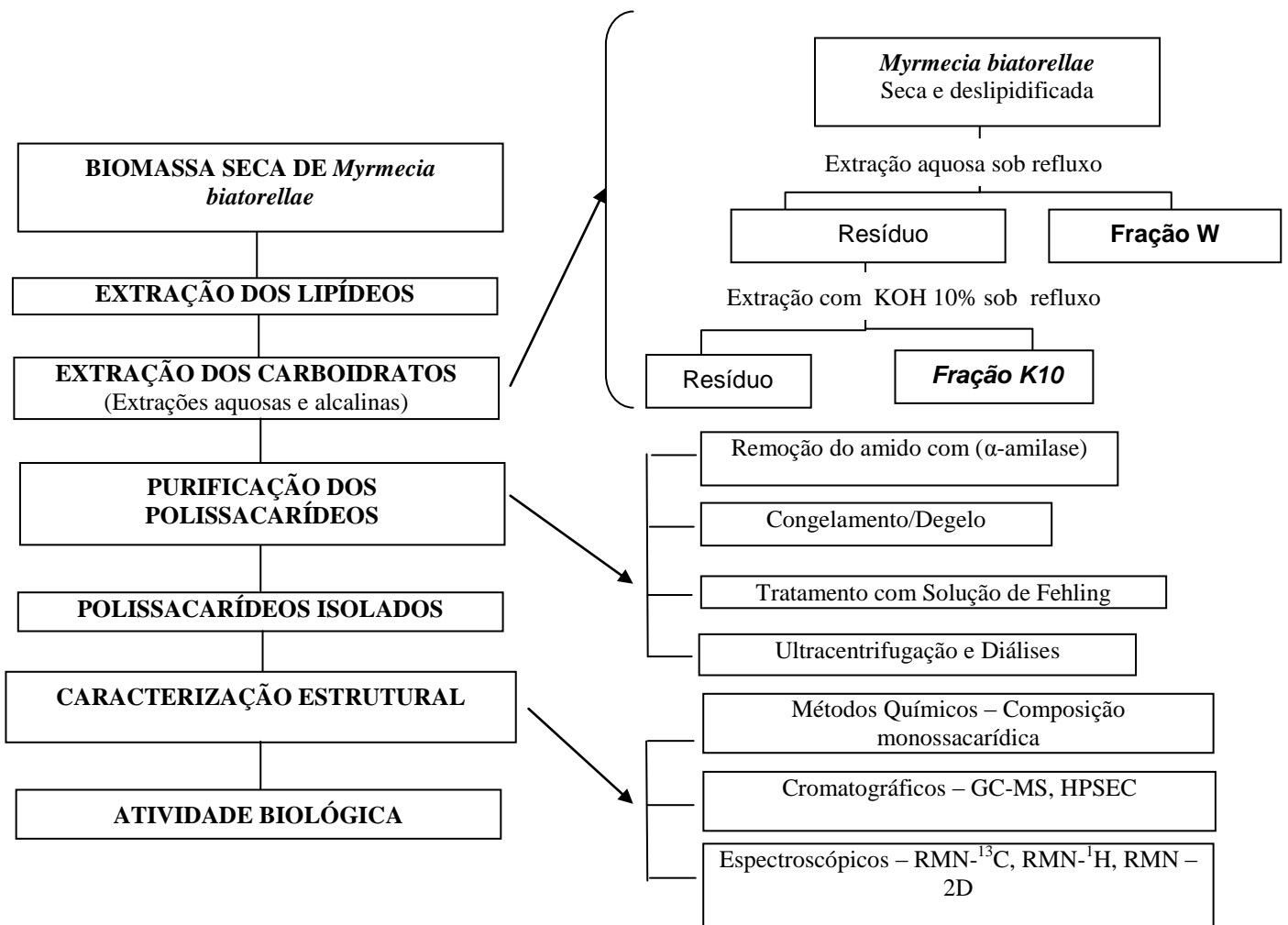


FIGURA 6: ESQUEMA GERAL DAS EXTRAÇÕES, PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS REALIZADAS NO ESTUDO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Myrmecia biatorellae*. Fonte: O autor (2012)

4.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA FRAÇÃO W

A fração W (3,0 g) apresentou, na análise da composição monossacarídica, principalmente galactose e glucose, com pequenas quantidades de ramnose, arabinose e manose (Tabela 2). Para o início da purificação dos polissacarídeos presentes nesta fração foi realizado o procedimento de congelamento/degelo, o qual separa os polissacarídeos de acordo com sua solubilidade, em solúveis e insolúveis em água fria. Desta maneira, duas novas frações foram obtidas, uma sobrenadante do congelamento/degelo (fração SW) com 2,0 g de rendimento e a outra precipitada (fração PW), cujo rendimento foi de 0,7 g. Pode-se observar uma maior proporção de polissacarídeos solúveis em água fria, correspondendo a cerca de 67% do peso da fração W.

TABELA 2: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AQUOSAS OBTIDAS DE *Myrmecia biatorellae*

Frações	Composição monossacarídica (mol%) ^a				
	Rha	Ara	Man	Gal	Glc
W	2,7	1,0	2,4	50,0	43,6
SW	4,2	1,0	5,0	29,8	60,0
SW-A	11	2,6	14,4	68,0	4,0
SW-100R	6,4	-	-	93,6	-
SW-50R	6,0	-	-	94,0	-
SW-10R	10,0	-	-	90,0	-
SW-10E	3,3	27,7	25,0	33,4	10,6

^aPor GLC, como acetato de alditóis, coluna DB-225.

Fonte: O autor (2012)

Na análise da composição monossacarídica, a fração SW foi composta principalmente por galactose e glucose (Tabela 2). A presença de alta concentração de glucose nesta fração pode ser devida a presença de amilose, um polímero de reserva muito comum encontrado em algas trebouxioides (KÖNIG E PEVELING, 1984; CORDEIRO *et al.*, 2005). Isto foi confirmado pela análise de RMN-¹³C desta fração (Figura 7A), a qual mostrou os sinais característicos de amilose. Foi

observado o sinal característicos em δ 100,1 do C-1 das unidades de α -Glc_p, bem como um sinal em δ 78,9 do C-4 substituído. O sinal de C-6 não substituído apareceu em δ 60,6 (CORDEIRO *et al.*, 2005).

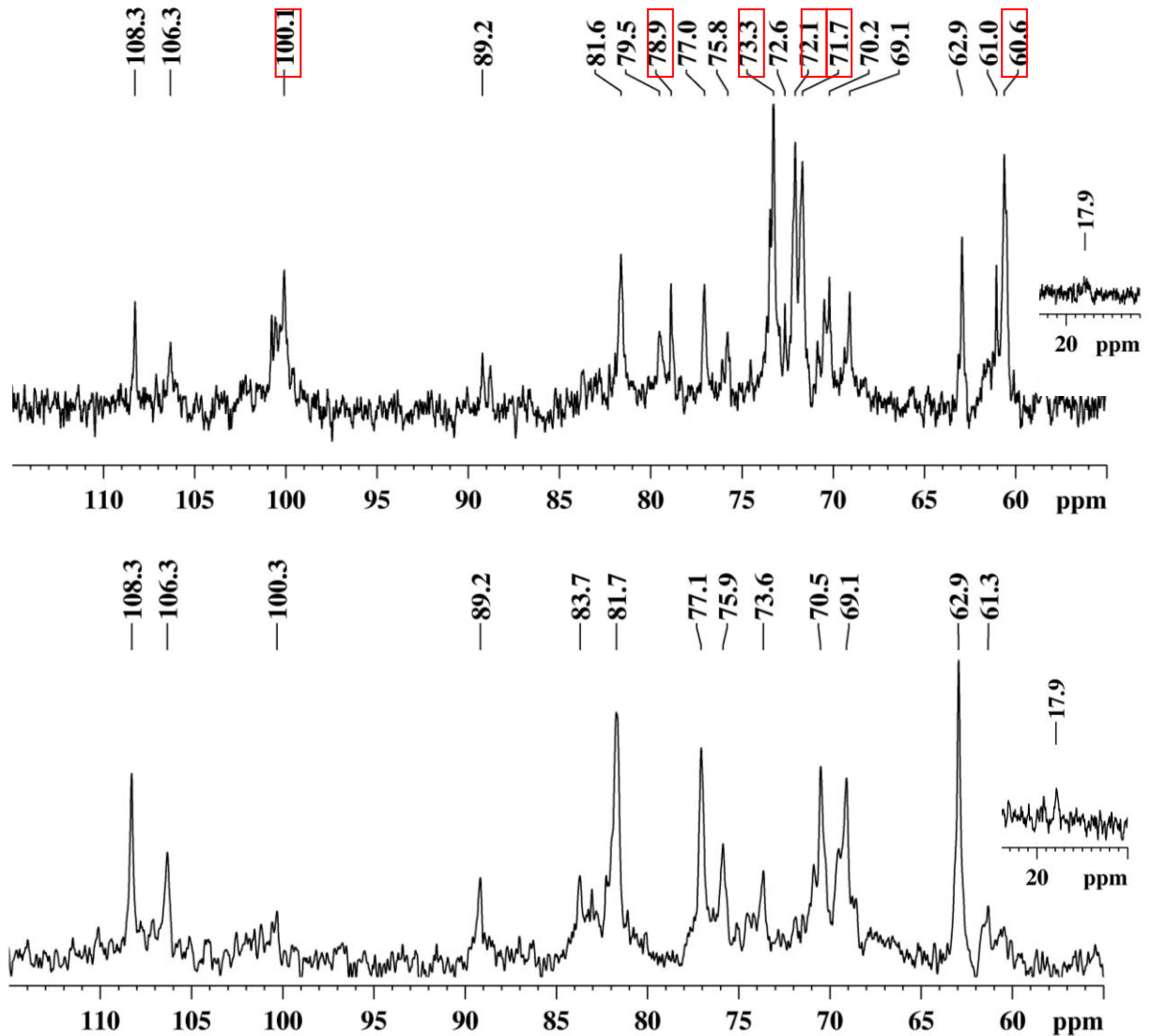


FIGURA 7: ESPECTROS DE RMN-¹³C DE (A) FRAÇÃO SW E (B) FRAÇÃO SW-A OBTIDAS DE *M. biatorellae* (EM DMSO-*d*₆, A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). OS RETÂNGULOS INDICAM OS SINAIS REFERENTES A AMILOSE. Fonte: O autor (2012)

Para a remoção da amilose, a fração SW foi tratada com α -amilase originando a fração SW-A (700 mg), cuja análise da composição monossacarídica revelou elevada proporção de galactose, seguida por manose e ramnose (Tabela 2). Pode-

se observar que este tratamento foi eficiente, pois reduziu os teores de glucose para apenas 4,0%, bem como pode-se observar o desaparecimento dos sinais de amilose no espectro de RMN-¹³C desta fração (Figura 7B). Interessante notar neste espectro a presença de dois sinais intensos na região de carbono anomérico em δ 106,3 e 108,3, correspondentes às unidades de galactose na configuração β - e conformação furanosídica (GORIN e MAZUREK, 1975; GORIN 1981; OXLEY e WILKINSON 1989; LEAL *et al.*, 1993, SASSAKI *et al.*, 2005), indicando a presença de galactofurananas.

A análise por cromatografia de exclusão estérica (HPSEC) da fração SW-A demonstrou a presença de vários picos (Figura 8A), indicando a presença de polissacarídeos com diferentes massas molares. Para a purificação destes polímeros, a fração SW-A foi submetida à purificação por sucessivas ultrafiltrações em membranas com limites de exclusão decrescentes, de 100 kDa, 50 kDa, 30 kDa e 10 kDa, conforme demonstrado na Figura 9. Este processo se mostrou muito eficiente na purificação dos polissacarídeos, como pode ser visto na Figura 8B, onde o perfil de eluição de todas as amostras retidas nas membranas utilizadas, ou seja, SW-100R, SW-50R, SW-30R e SW-10R, demonstrou-se homogêneo, com a presença de um único pico em cada fração. Foi, em seguida, realizada a determinação das massas molares destes polissacarídeos, os quais apresentaram valores de 647.600 Da, 211.000 Da, 170.000 Da e 108.000 Da para os polissacarídeos presentes nas frações SW-100R, SW-50R, SW-30R e SW-10R, respectivamente.

As análises de composição monossacarídica das frações SW-100R, SW-50R e SW-10R indicaram principalmente a presença de galactose, com pequenas proporções de ramnose (Tabela 2), sugerindo a presença de polímeros denominados ramnogalactofurananas. Não foi realizada a análise da composição monossacarídica da fração SW-30R devido ao seu baixo rendimento.

As frações purificadas SW-100R, SW-50R e SW-10R foram, em seguida, analisadas por RMN-¹³C, e os seus espectros estão mostrados na Figura 10A, B e C, respectivamente.

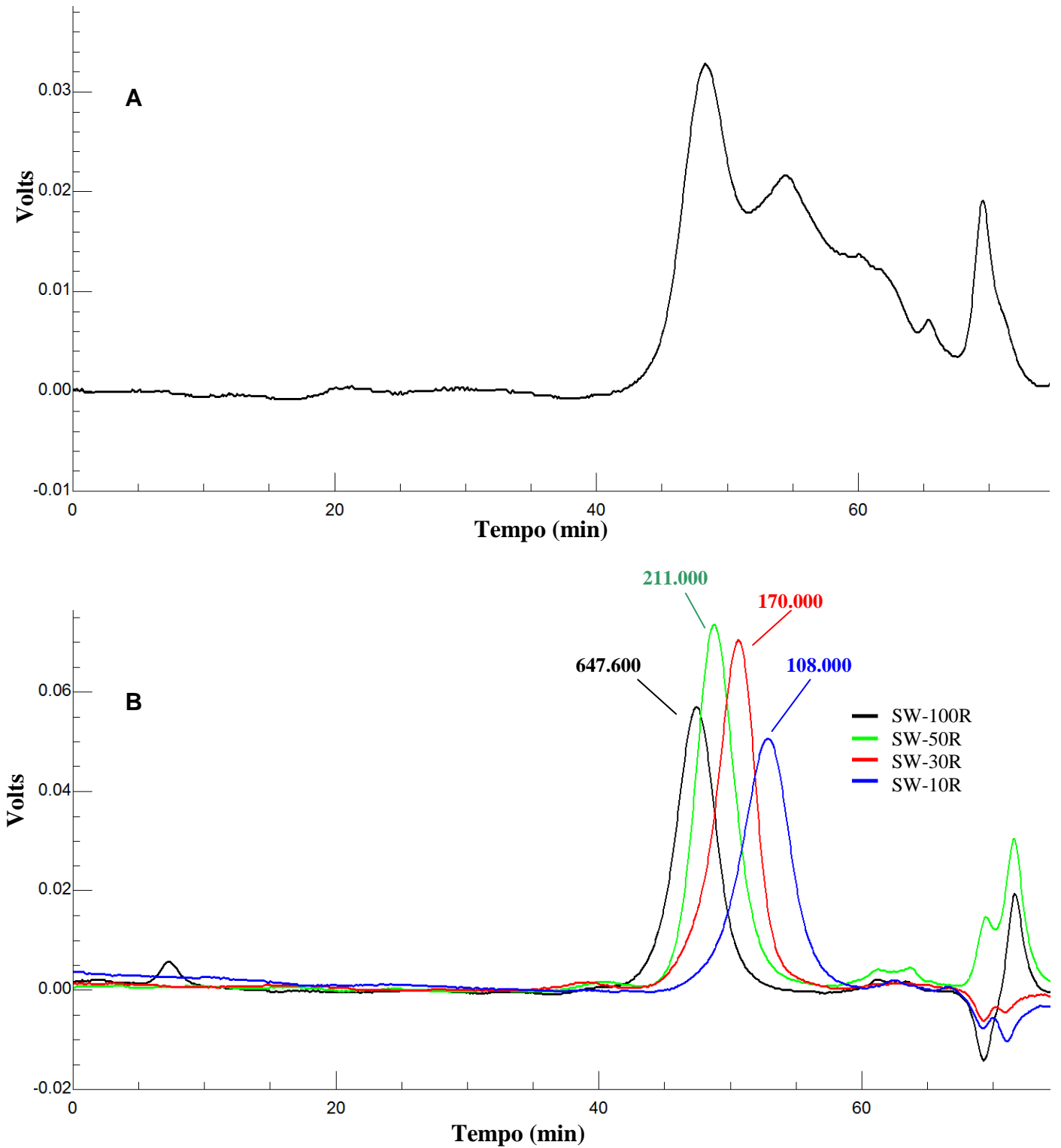


FIGURA 8: PERFIL DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICO (HPSEC) DA FRAÇÃO SW-A (A) E (B) DAS FRAÇÕES PURIFICADAS SW-100R, SW-50R, SW-30R E SW-10R, OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO. Fonte: O autor (2012)

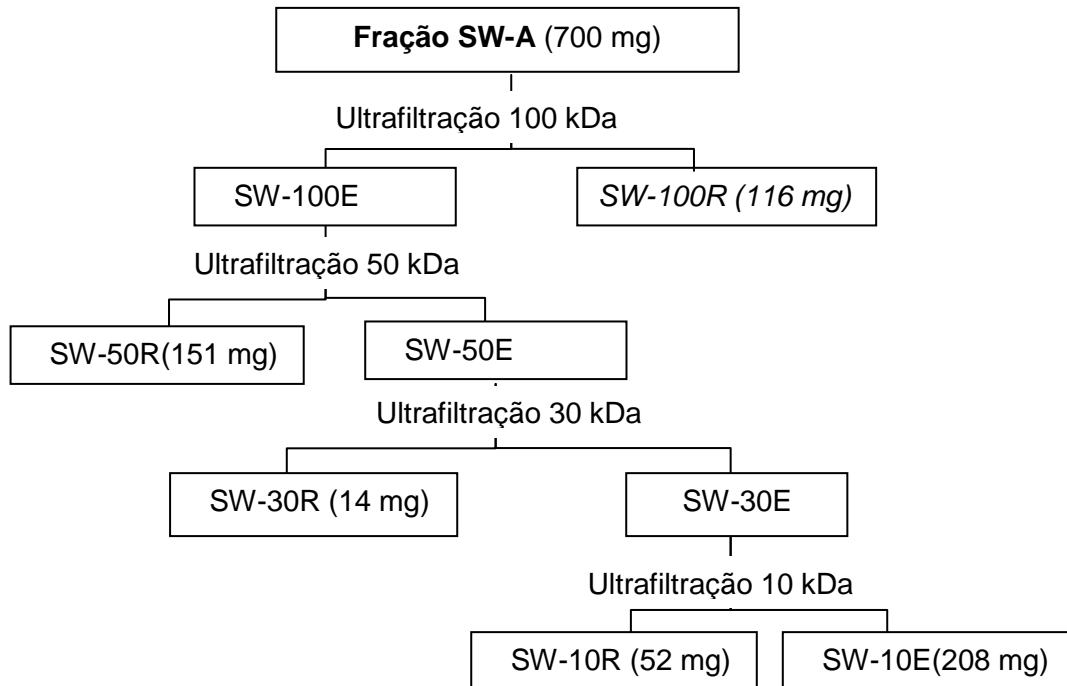


FIGURA 9: FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DE ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DA FRAÇÃO SW-A OBTIDA DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*. A LETRA R INDICA QUE A FRAÇÃO FOI RETIDA NA MEMBRANA, ENQUANTO QUE A LETRA E INDICA ELUÍDA DA MEMBRANA. Fonte: O autor (2012)

Pode-se observar que as três frações apresentam espectro de RMN- ^{13}C bastante similares, indicando a presença de ramnogalactofurananas com estrutura química semelhantes, mas com massas molares diferentes. Desta maneira, apenas a fração SW-50R, que apresentou um maior rendimento (Figura 9) foi elucidada estruturalmente.

A fração SW-50R foi em seguida analisada por RMN ^{13}C . O espectro (Figura 10B) apresentou 5 sinais na região de carbono anomérico, aos quais foram atribuídas as letras A, B, C, D e E, levando em conta a ordem decrescente dos deslocamentos químicos. Os sinais em δ 108,2, 107,7, 106,3 e 106,2 correspondem às unidades de galactofuranose na configuração β . O sinal em δ 100,4 é correspondente às unidades de ramnopiranosose. Para descobrir a anomericidade destas unidades, e devido à proximidade dos anômeros α - e β - de ramnose em espectroscopia de RMN- ^{13}C , foi realizado o experimento de RMN HSQC acoplado, no qual se pode medir a constante de acoplamento ($^1J_{\text{C-H}}$), entre o C-1 e H-1 destas unidades. Pode-se verificar na Figura 11 que a $^1J_{\text{C-H}}$ foi de 172,3Hz, característica de

carboidratos com conformação piranosídica e com anomeridade α (AHRAZEM et al., 2007; MOLINARO et al., 2000).

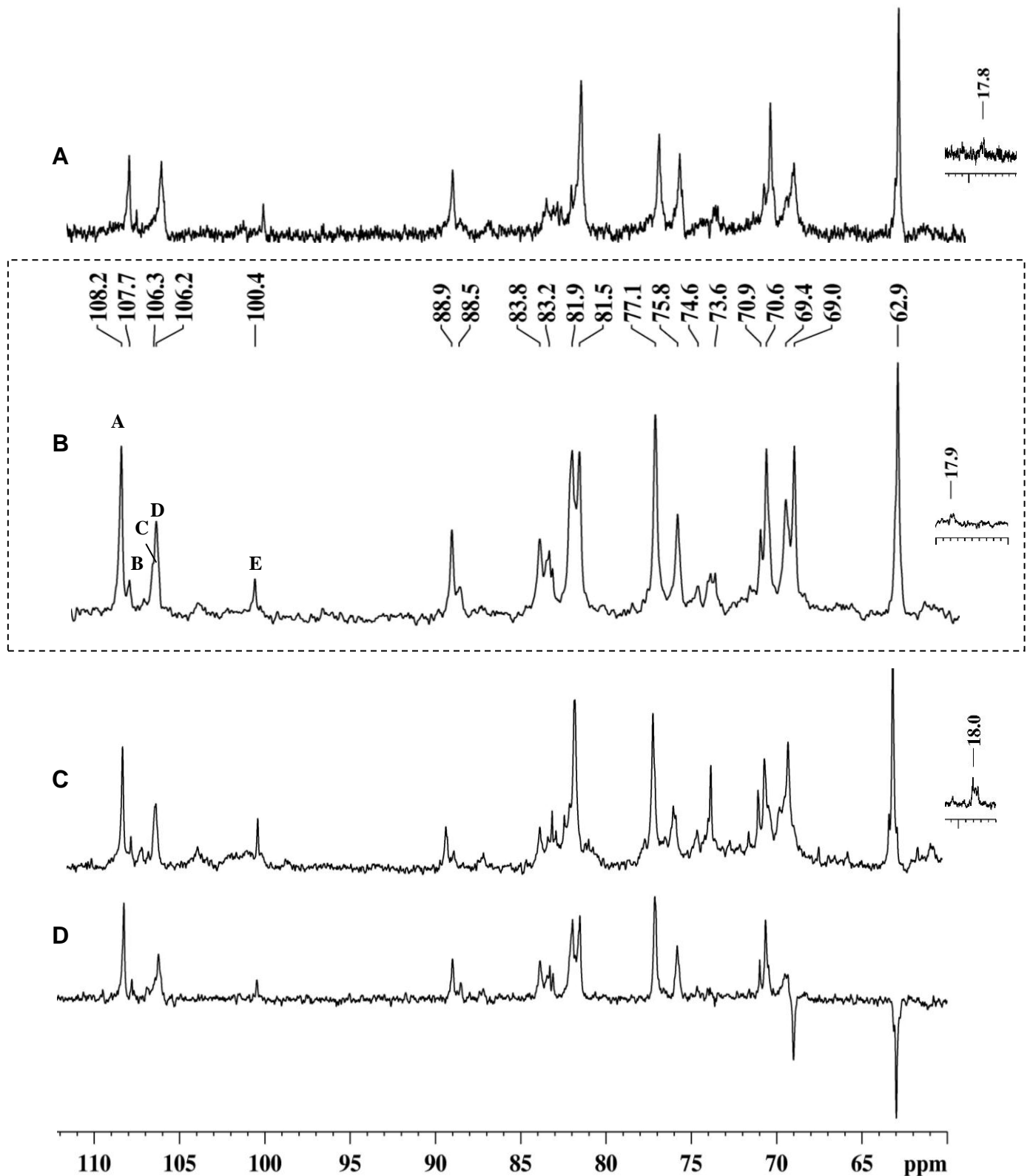


FIGURA 10: ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES: (A) SW-100R; (B) SW-50R; (C) SW-10R e (D) EXPERIMENTO DEPT-135 DA FRAÇÃO SW-50R OBTIDAS DE *M. biatorellae* (EM DMSO- d_6 , A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). Fonte: O autor (2012)

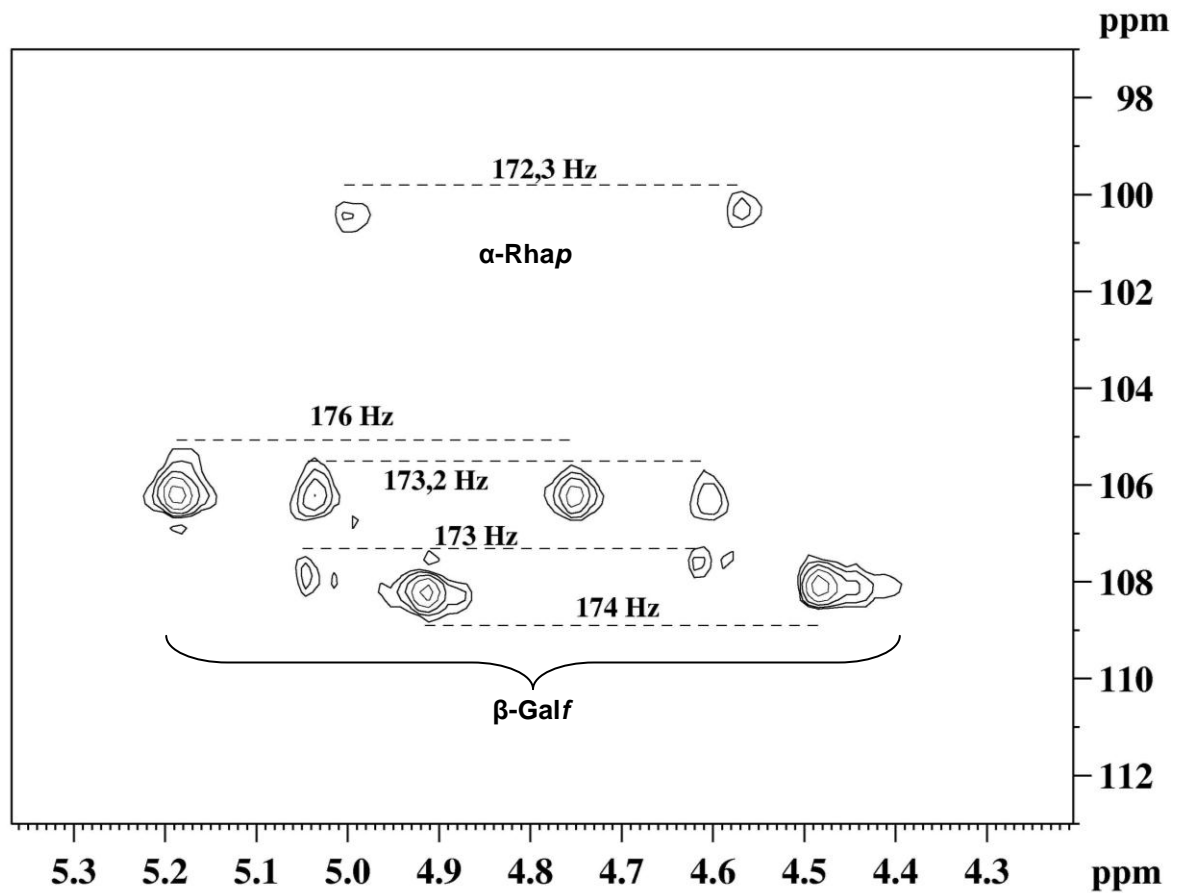


FIGURA 11: ESPECTRO DE HSQC (RMN $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) ACOPLADO DA FRAÇÃO SW-50R OBTIDA DE *M. biatorellae* (EM DMSO- d_6 , A 70 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.).
Fonte: O autor (2012)

Foi realizado ainda o experimento de RMN HSQC, no qual foi possível observar o acoplamento entre os carbonos das unidades monossacarídicas e os hidrogênios diretamente ligados a eles. Desta maneira, como observado na Figura 12A, pôde-se assinalar todos os hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos das unidades de Galf e Rhap.

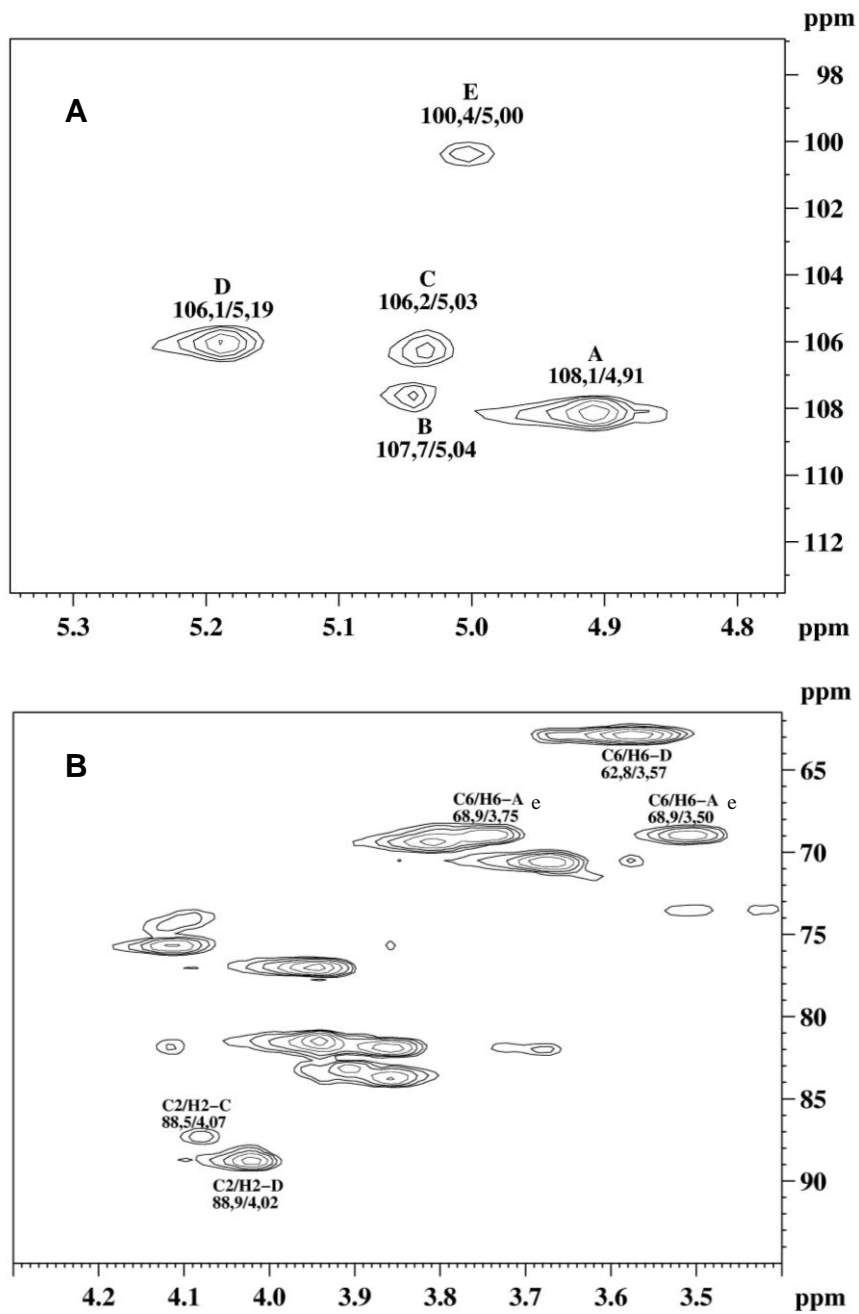


FIGURA 12: ESPECTRO DE HSQC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) DA FRAÇÃO SW-50R. EM (A) REGIÃO ANOMÉRICA E (B) REGIAO C2-C6; OBTIDA DE *M. biatorellae* (EM DMSO- d_6 , A 70 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). Fonte: O autor (2012)

Em seguida, foi realizado o experimento de RMN COSY, onde foi possível a visualização do acoplamento de hidrogênios vizinhos e separados por três ligações químicas. Com isso, foi possível observar o acoplamento de H-1 de todas as unidades de Galf (A, B, C e D) e Rhap com seus respectivos H-2 (Figura 13). Interessante notar o acoplamento de H-1 das unidades de Galf C e D (δ 5,03 e 5,19, respectivamente) com seus H-2, em 4,07 e 4,02 ppm, respectivamente. O acoplamento destes hidrogênios com seus respectivos carbonos pode ser visualizado no experimento RMN HSQC (Figura 12B), onde o sinal de H-2 da unidade C em δ 4,07 se acopla com seu C-2 em δ 88,5, e o sinal de H-2 da unidade D em δ 4,02 se acopla com seu C-2 em δ 88,9. A presença destes C-2 em campo baixo indica O-substituição, podendo-se concluir desta maneira, que as unidades de Galf C e D apresentam-se 2-O-substituídas. Pode-se verificar no RMN HSQC (Figura 12A), que estas unidades apresentam C-1 em δ 106,2 e 106,1, respectivamente, o que também está de acordo com dados de literatura (SØRUM *et al.*, 1997; AHRAZEM *et al.*, 2001; PERRY e MACLEAN, 2004; LEMERCINIER e JONES, 2005).

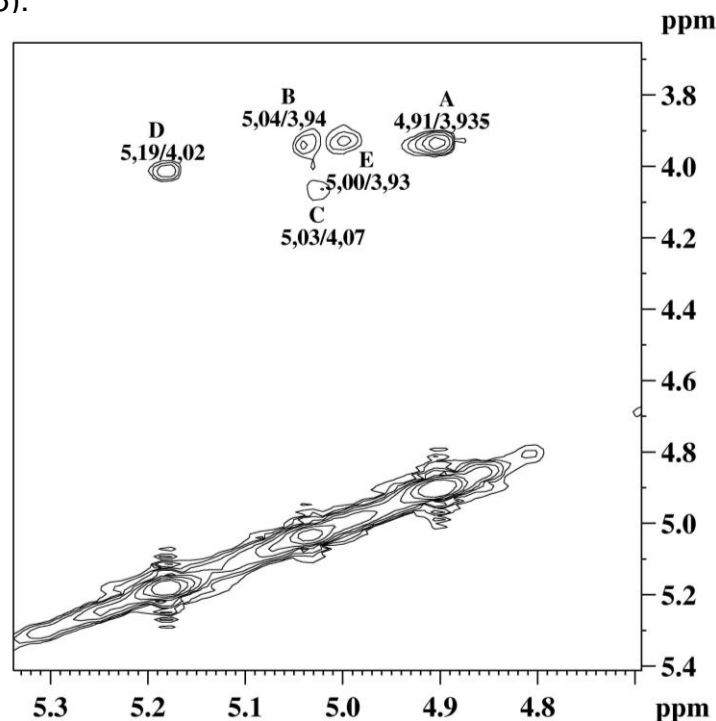


FIGURA 13: ESPECTRO DE COSY (RMN- $^1\text{H}/^1\text{H}$) DA FRAÇÃO SW-50R OBTIDA DE *M. biatorellae* (EM DMSO- d_6 , A 70 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). Fonte: O autor (2012)

Foi também realizado o experimento RMN DEPT-135, onde os carbonos metílicos ($-\text{CH}_2-$) aparecem invertidos no espectro. Em carboidratos, grupos $-\text{CH}_2-$ aparecem no carbono 5 de pentoses e carbono 6 de hexoses. O espectro de RMN DEPT-135 da fração SW-50R (Figura 10D) apresentou 2 sinais invertidos, em δ 62,8 e 68,9. O sinal em δ 62,8 refere-se a C-6 não substituído, o qual está presente nas unidades de Galf que constituem os terminais não redutores (unidades B), bem como nas unidades de Galf (1 \rightarrow 2)-ligadas (unidades D). O sinal em δ 68,9, devido ao seu deslocamento para a esquerda em campo baixo, refere-se a C-6 substituído, ou seja, envolvido em ligação glicosídica. Este carbono está presente nas unidades de Galf 6-O- e 2,6-di-O-substituídas (unidades A e C, respectivamente). Com relação ao C-6 das unidades de ramnose, este aparece em δ 17,8 no espectro de RMN- ^{13}C (Figura 10B). Isto se deve ao fato de que a ramnose é um 6-deoxiaçúcar, e apresenta um grupo metil como C-6. No espectro de RMN HSQC, este carbono acoplou com seus hidrogênios em δ 1,24 (dados não mostrados).

Desta maneira, utilizando os dados de RMN uni- (^{13}C e DEPT 135) e bidimensionais (COSY, HSQC e HSQC acoplado), bem como dados de literatura (SØRUM *et al.*, 1997; AHRAZEM *et al.*, 2001; PERRY e MACLEAN, 2004; LEMERCINIER e JONES, 2005, CORDEIRO *et al.*, 2005), foi possível realizar o assinalamento dos carbonos e hidrogênios das principais unidades monossacarídicas presentes na ramnogalactofuranana presente na fração SW-50R, os quais estão mostrados na Tabela 3.

A análise de metilação da fração SW-50R (Tabela 4), mostrou que as unidades de ramnose estão presentes apenas como terminais não redutores, juntamente com galactofuranose, devido à presença dos derivados 2,3,4-Me₃-Rha e 2,3,5,6-Me₄-Gal, respectivamente. A presença dos derivados 2,3,5-Me₃-Gal e 3,5-Me₂-Gal indicam unidades de galactofuranose 6-O- e 2,6-di-O-substituídas, respectivamente, provenientes provavelmente da cadeia principal do polissacarídeo. Também foi verificada a presença de galactofuranose 2-O-substituída, relativas ao derivado metilado 3,5,6-Me₃-Gal.

TABELA 3: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS CARBONOS E HIDROGÊNIOS DAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NA FRAÇÃO SW-50R DE *Myrmecia biatorellae*.

Unidades		1	2	3	4	5	6
→6)-β-Galf-(1→	C	108,1	81,5	77,0	81,9	70,5	68,9^a
A	H	4,91	3,935	3,94	3,86	3,67	3,75/3,50
β-Galf-(1→	C	107,7	-	-	-	-	62,8
B	H	5,04	3,94	-	-	-	3,57
→2,6)-β-Galf-(1→	C	106,2	88,5^a	74,2	83,3	70,6	68,9^a
C	H	5,03	4,07	4,10	3,94	3,57	3,75/3,50
→2)-β-Galf-(1→	C	106,1	88,9^a	75,6	83,7	69,3	62,8
D	H	5,19	4,02	4,11	3,86	3,81	3,57
α-Rhap-(1→	C	100,4	-	-	-	-	17,8
E	H	5,00	3,93	-	-	-	1,24

^a Números em negrito e sublinados representam carbonos envolvidos em ligação glicosídica.

Fonte: O autor (2012)

TABELA 4: ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO SW-50R OBTIDA DA MICROALGA *Myrmecia biatorellae*.

Acetato de alditois parcialmente O-metilados	Fração (%) ^a	Tipo de ligação ^b
2,3,4-Me ₃ -Rha	6,0	Rhap-(1→
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	7,8	Galf-(1→
3,5,6-Me ₃ -Gal	28,8	→ 2)-Galf-(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal	44,6	→ 6)-Galf-(1→
3,5-Me ₂ -Gal	12,7	2,6)-Galf-(1→

^a % obtida através da integração dos respectivos sinais no espectro de HSQC.

^b Baseado no derivado O-metilalditol acetato.

Fonte: O autor (2012)

A análise de metilação sugere, desta maneira, a presença na fração SW-50R de uma ramnogalactofuranana com cadeia principal formada provavelmente por unidades de Galf (1→6)-ligadas, podendo ser substituídas em O-2 por unidades de Galf (1→2)-ligadas ou por unidades terminais não redutoras de ramnose e galactofuranose. A presença de unidades de Galf 2-O-substituídas na cadeia principal, intercaladas às unidades de Galf (1→6)-ligadas, não pode ser descartada. A quantificação dos derivados metilados não pôde ser realizada por GC-MS dos

derivados metilados. Nesta análise ocorreu uma percentagem de terminais não redutores muito maiores do que de ramificações, mesmo testando-se diferentes (3, 6, 9, 12, 15, 24 e 30 horas) tempos de hidrólise. Por isso, a quantificação foi realizada, pela integração dos sinais referentes a cada uma destas unidades no espectro de HSQC (Figura 12A), sendo os resultados demonstrados na Tabela 4.

Pode-se observar que os experimentos de RMN mono- e bidimensionais confirmaram os dados de metilação, indicando desta maneira uma ramnogalactofuranana formada por unidades de Galf 2-O-, 6-O e 2,6-di-O-substituídas, bem como por unidades terminais não redutoras de ramnose e galactofuranose.

Uma discussão a respeito deste polissacarídeo será apresentada juntamente com os polissacarídeos presentes na fração K10, a qual será descrita a seguir.

4.2 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA FRAÇÃO K10

A fração K10 (5,5 g), obtida a partir da extração com KOH 10% (Figura 6) apresentou, na análise da composição monossacarídica, principalmente a presença de galactose e glucose, com pequenas quantidades de ramnose, arabinose e manose (Tabela 5). Pode-se observar que esta composição é semelhante àquela observada para a fração W (Tabela 2).

A fração K10 também foi submetida ao processo de congelamento e degelo, formando uma fração solúvel (fração SK10) com 4,2 g de rendimento e um precipitado (fração PK10), cujo rendimento foi de 0,99 g. Assim como para a fração W, pôde-se observar uma maior proporção de polissacarídeos solúveis em água fria, correspondendo a cerca de 76% do peso da fração K10.

Na análise da composição monossacarídica, a fração SK10 é composta principalmente por galactose e glucose (Tabela 5). A presença de alta concentração de glucose nesta fração também é devida a presença de amilose, fato que foi confirmado pela análise de RMN-¹³C desta fração, a qual demonstrou os sinais característicos deste polímero de reserva (Figura 14A).

TABELA 5: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ALCALINAS OBTIDAS DE *Myrmecia Biatorellae*

Frações	Composição monossacarídica (mol%) ^a				
	Rha	Ara	Man	Gal	Glc
K10	8,0	1,8	3,4	37,0	49,8
SK10	2,3	1,7	3,7	48,0	44,3
SK10-A	6,6	3,6	9,6	80,2	-
SK10-100R	4,0	3,5	4,5	88,0	-
SK10-50R	4,0	-	-	96,0	-
PK10	24,0	2,0	4,0	49,0	21,0
PK10-A	18,3	-	5,4	62,7	12,9
PK10-SF	5,0	-	-	95,0	-

^aPor GLC, como acetato de alditóis, coluna DB-225.

Fonte: O autor (2012)

Para a remoção da amilose, a fração SK10 foi tratada com α -amilase originando a fração SK10-A (1,8 g), cuja análise da composição monossacarídica revelou elevada proporção de galactose (Tabela 5). Novamente pode-se observar que este tratamento foi eficiente, pois houve o desaparecimento de glucose, bem como pôde-se observar o desaparecimento dos sinais de amilose no espectro de RMN-¹³C desta fração (Figura 14B). Uma comparação deste espectro com o da fração SW-A (Figura 7B) demonstra que são bastante semelhantes, com a presença dos mesmos picos, indicando que ambas as frações apresentam polissacarídeos com a mesma estrutura química, ou seja, as ramnogalactofurananas.

Em seguida foi realizada a análise por cromatografia de exclusão estérica (HPSEC) da fração SK10-A, a qual demonstrou a presença dois picos com tempo de eluição muito próximos (Figura 15A).

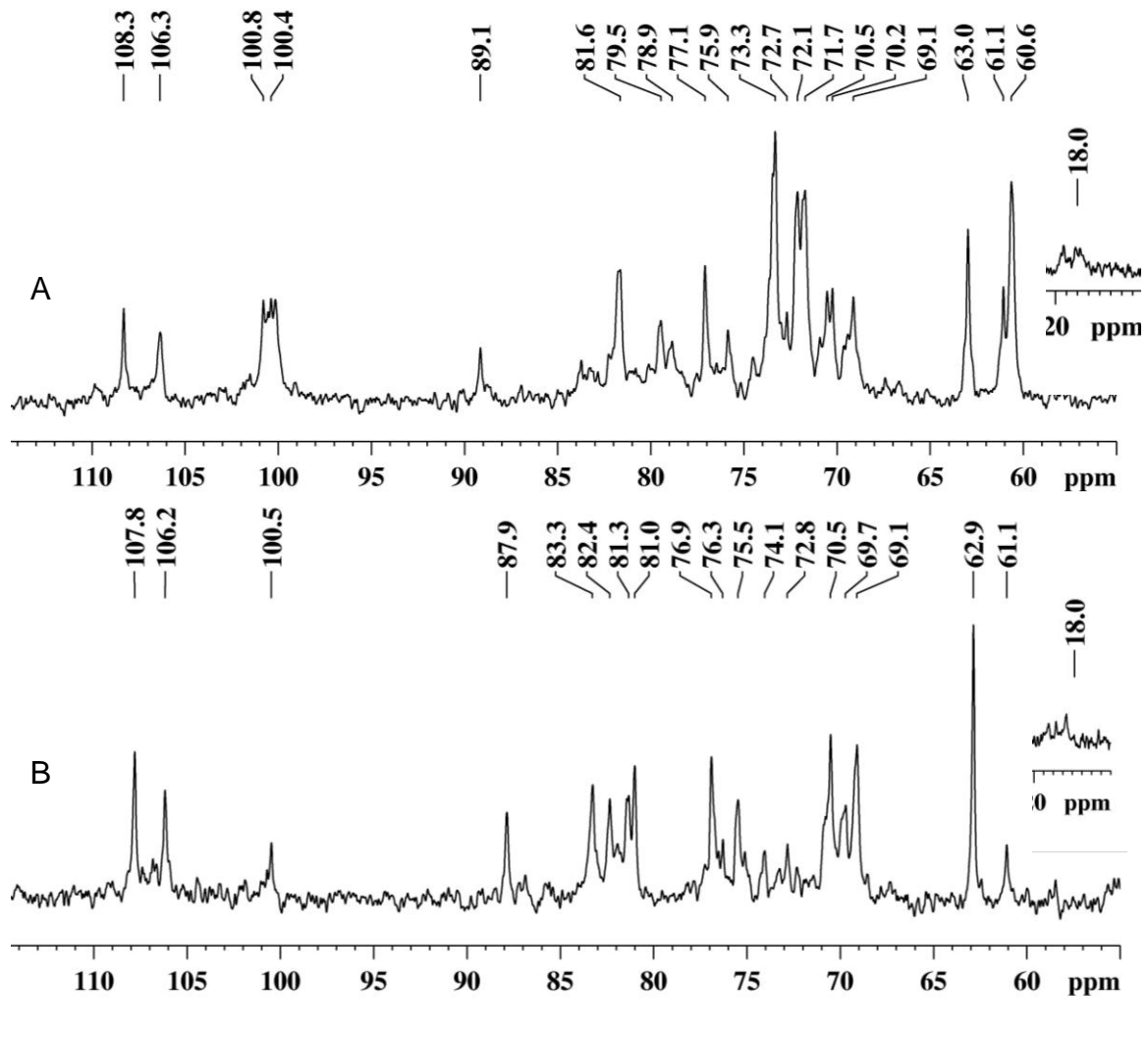


FIGURA 14: ESPECTROS DE RMN-¹³C DE (A) FRAÇÃO SK10 (EM DMSO-d₆, A 50 °C) E (B) FRAÇÃO SK10-A (EM D₂O, A 50°C) OBTIDAS DE *Myrmecia biatorellae*, (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). Fonte: O autor (2012)

]

Para a purificação desta fração também foram realizadas sucessivas ultrafiltrações em membranas, com limites de exclusão decrescentes, de 300 kDa, 100 kDa e 50 kDa, conforme demonstrado na Figura 16. Pode-se observar que a fração SK10-300R apresentou um perfil heterogêneo (Figura 15B), com a presença de 3 picos, indicando que nesta fração existe ainda uma mistura de polissacarídeos e com alta massa molar. A fração SK10-100R apresentou um pico principal com um pequeno ombro a direita, enquanto a fração SK10-50R apresentou apenas um pico, indicando se tratar de uma amostra homogênea (Figura 15C). Foi, em seguida,

realizada a determinação das massas molares destes polissacarídeos, os quais apresentaram valores de 114.000 Da e 139.000 Da para os polissacarídeos presentes nas frações SK10-100R e SK10-50R, respectivamente.

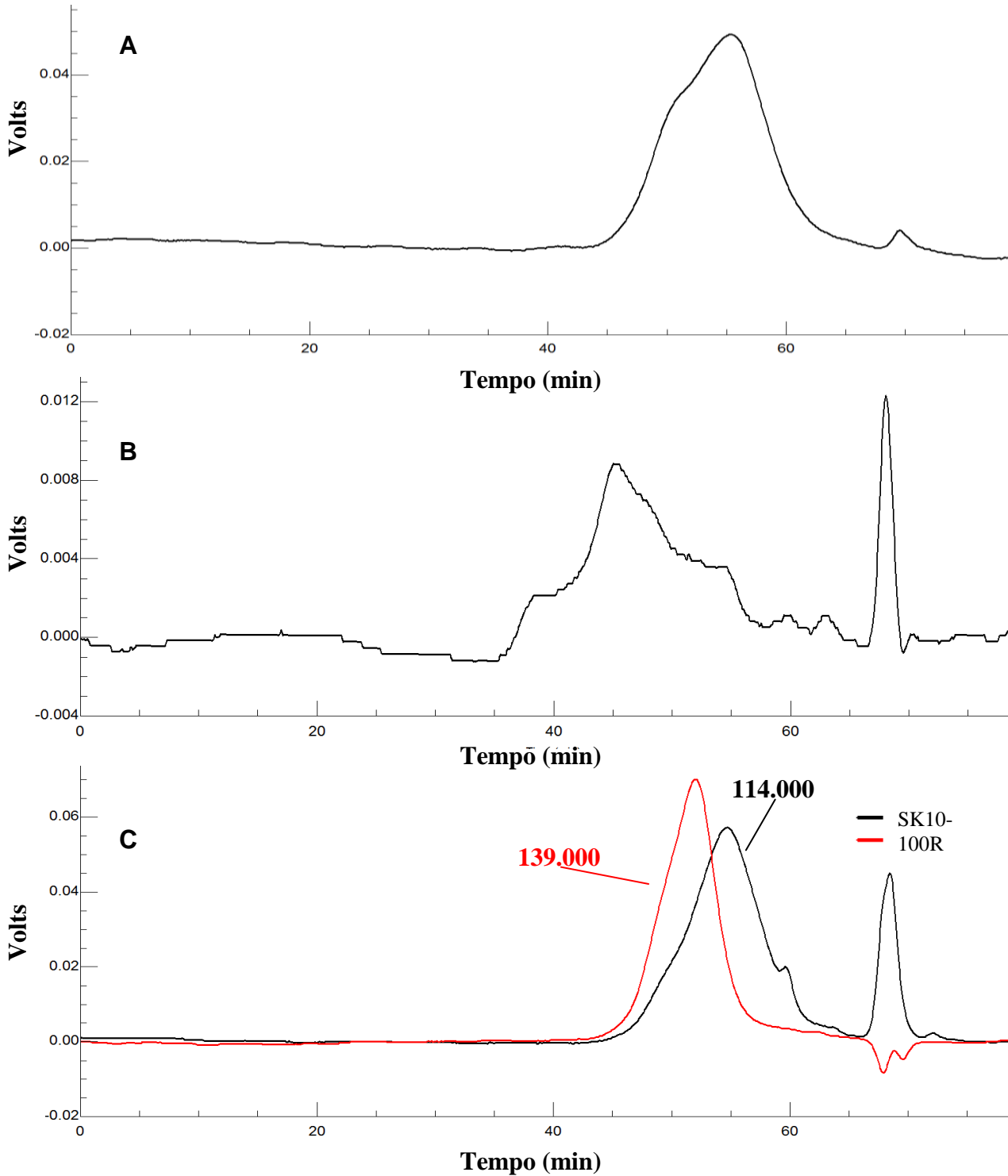


FIGURA 15: PERFIL DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICO (HPSEC) DE (A) FRAÇÃO SK10-A, (B) FRAÇÃO SK10-300R E (C) DAS FRAÇÕES SK10-100R E SK10-50R, OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO. Fonte: O autor (2012)

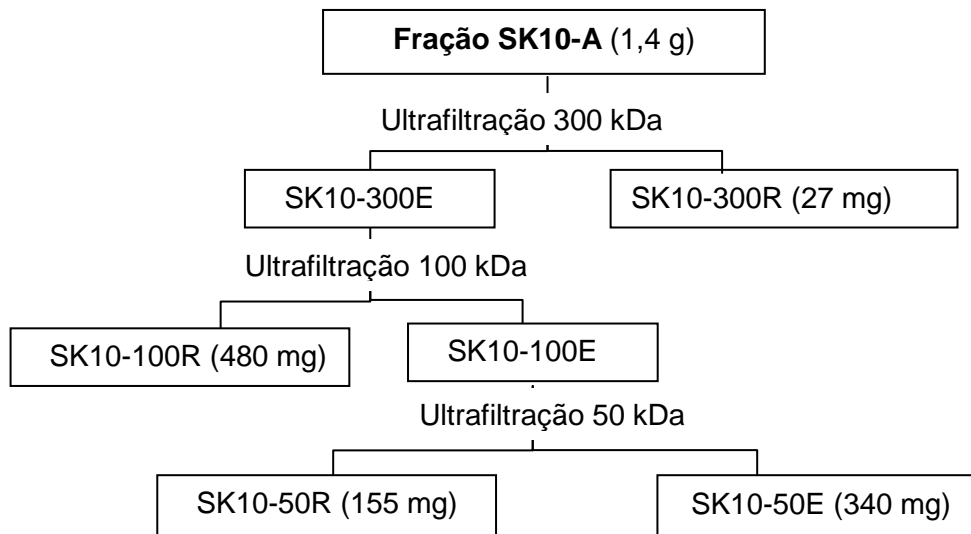


FIGURA 16: FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DE ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DA FRAÇÃO SK10-A OBTIDA DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*. A LETRA R INDICA QUE A FRAÇÃO FOI RETIDA NA MEMBRANA, ENQUANTO QUE A LETRA E INDICA ELUÍDA DA MEMBRANA. Fonte: O autor (2012)

A análise da composição monossacarídica destas frações (Tabela 5) demonstra que a fração SK-50R é composta apenas por galactose e ramnose, enquanto que a fração SK10-100R é composta por galactose, ramnose, arabinose e manose.

As frações SK10-100R e SK10-50R foram, em seguida, analisadas por RMN- ^{13}C , e os seus espectros estão mostrados na Figura 17A e B, respectivamente. Pode-se observar que as duas frações apresentam espectros de RMN- ^{13}C bastantes similares, indicando a presença de ramnogalactofurananas com estruturas químicas semelhantes. Da mesma maneira, uma comparação destes espectros com o espectro de RMN- ^{13}C da fração SW-50R (Figura 10B) demonstra a presença dos mesmos picos, mas com pequenas diferenças de intensidades. Isto se deve provavelmente à presença, na fração SK10-50R, das mesmas unidades de galactofuranose e ramnose presentes na fração SW-50R, ou seja, Galf e Rhap terminais, Galf 2-O-, 6-O e 2,6-di-O-substituídas, mas presentes em percentagens

diferentes. Para o detalhamento da estrutura química fina da ramnogalactofurana presente na fração SK10-50R foi realizado o processo de metilação (Tabela 6).

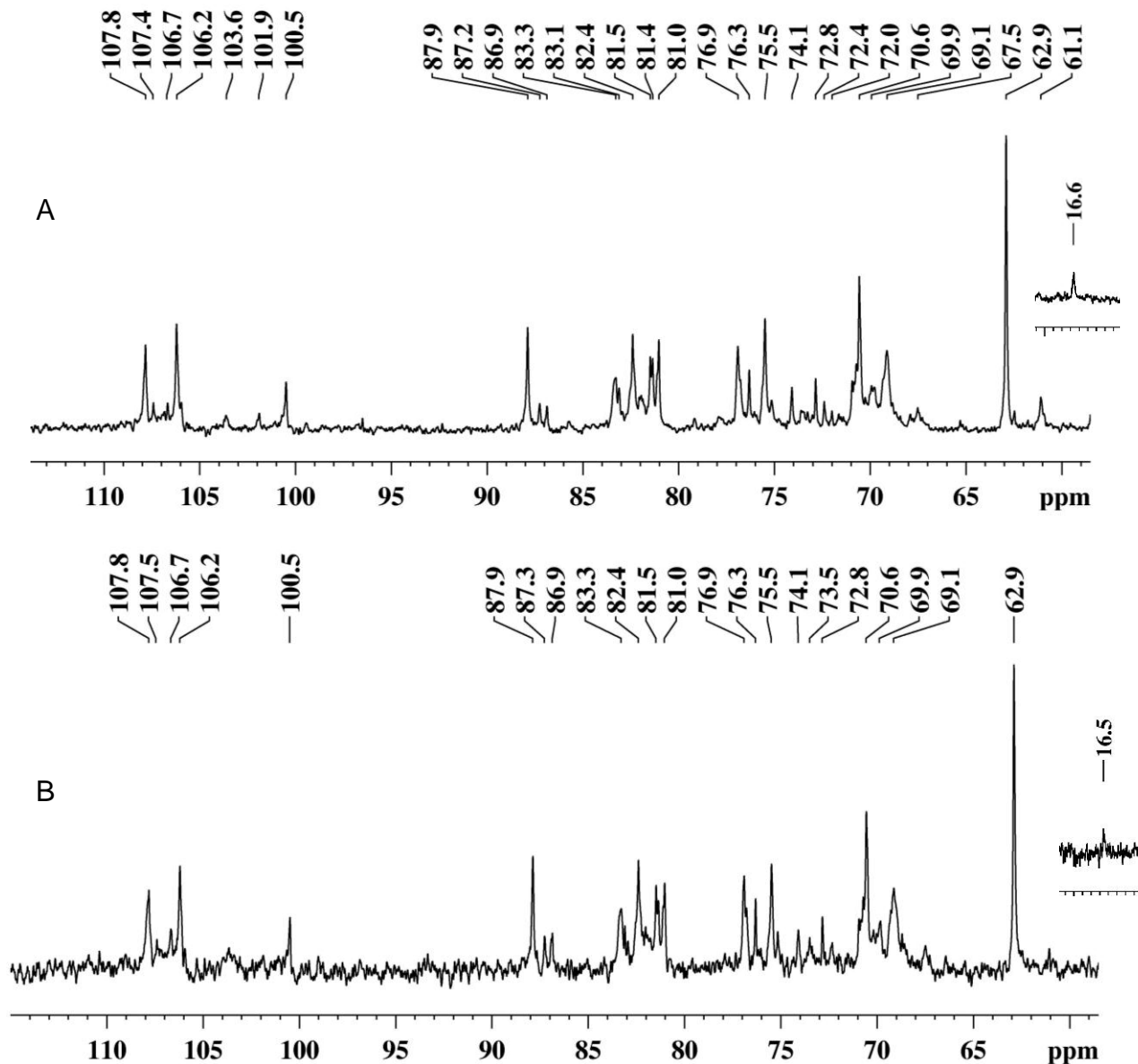


FIGURA 17: ESPECTROS DE RMN-¹³C DE (A) FRAÇÃO SK10-100R E (B) FRAÇÃO SK10-50R OBTIDAS DE *Myrmecia biatorellae*, (EM D₂O, A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). Fonte: O autor (2012)

TABELA 6: ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO SK10-50R OBTIDA DA MICROALGA *Myrmecea biatorellae*.

Acetato de alditois parcialmente O-metilados	Fração (%) ^a	Tipo de ligação ^b
2,3,4-Me ₃ -Rha	5,3	Rhap-(1→
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	4,3	Galf-(1→
3,5,6-Me ₃ -Gal	17,2	→ 2)-Galf-(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal	63,0	→ 6)-Galf-(1→
3,5-Me ₂ -Gal	10,2	→2,6)-Galf-(1→

^a % obtida pela integração dos respectivos sinais no espectro de HSQC.

^b Baseado no derivado O-metilalditol acetato.

Fonte: O autor (2012)

A análise de metilação da fração SK10-50R demonstrou a presença dos mesmos derivados presentes na fração SW-50R, apenas com pequenas diferenças com relação a quantidades das unidades de Galf 2-O- e 6-O-substituídas, indicando a presença de ramnogalactofurananas similares.

A fração insolúvel em água fria (PK10), obtida pelo procedimento de congelamento/degelo da fração K10 possui em sua composição monossacarídica elevadas proporções de galactose, ramnose e glucose, além arabinose, xilose e manose em menores proporções (Tabela 5). Como observado para as frações sobrenadantes do processo de congelamento/degelo, a presença de glucose na fração PK10, se dá devido a presença de amilose. Desta maneira, esta fração foi tratada com α -amilase, dando origem a fração PK10-A.

A fração PK10-A é composta basicamente por galactose e ramnose (Tabela 5), com pequenas proporções de manose e glucose. O seu espectro de RMN-¹³C está demonstrado na Figura 18A e apresenta 6 sinais principais, os quais podem ser atribuídos às unidades de β -galactose na conformação furanosídica, devido ao seu sinal de C-1 em δ 107,1. Os demais sinais aparecem em δ 81,7; 80,9; 80,7; 70,3 e 63,0. O sinal em δ 63,0 pode ser atribuído ao C-6 livre das unidades de β -D-Galf. Os sinais de C-1 das unidades de ramnose podem ser vistos em δ 100,9 e 101,7, enquanto que os seus sinais de C-6 podem ser vistos em δ 17,7. Com o objetivo de purificar esta amostra, foi realizada a precipitação com reativo de Fehling, dando

origem a fração PK10-SF, a qual ficou solúvel neste tratamento. Essa fração não foi submetida ao processo de purificação por ultrafiltração por não ser solúvel em água.

A fração PK10-SF é composta basicamente por galactose, com pequena proporção de ramnose (Tabela 5). O seu espectro de RMN-¹³C está demonstrado na Figura 18B e apresenta os 6 sinais principais referentes à galactofuranose. Uma comparação destes sinais com dados da literatura (SØRUM *et al.*, 1997; AHRAZEM *et al.*, 2001; PERRY e MACLEAN, 2004; LEMERCINIER e JONES, 2005) indica provavelmente que as unidades de β-Galf estão (1→3)-ligadas. Sinais de C-1 de pequena intensidade referentes às unidades de ramnose podem ser observados em δ 101,0 e 101,8, enquanto que os seus sinais de C-6 podem ser vistos em δ 17,6 e 17,9.

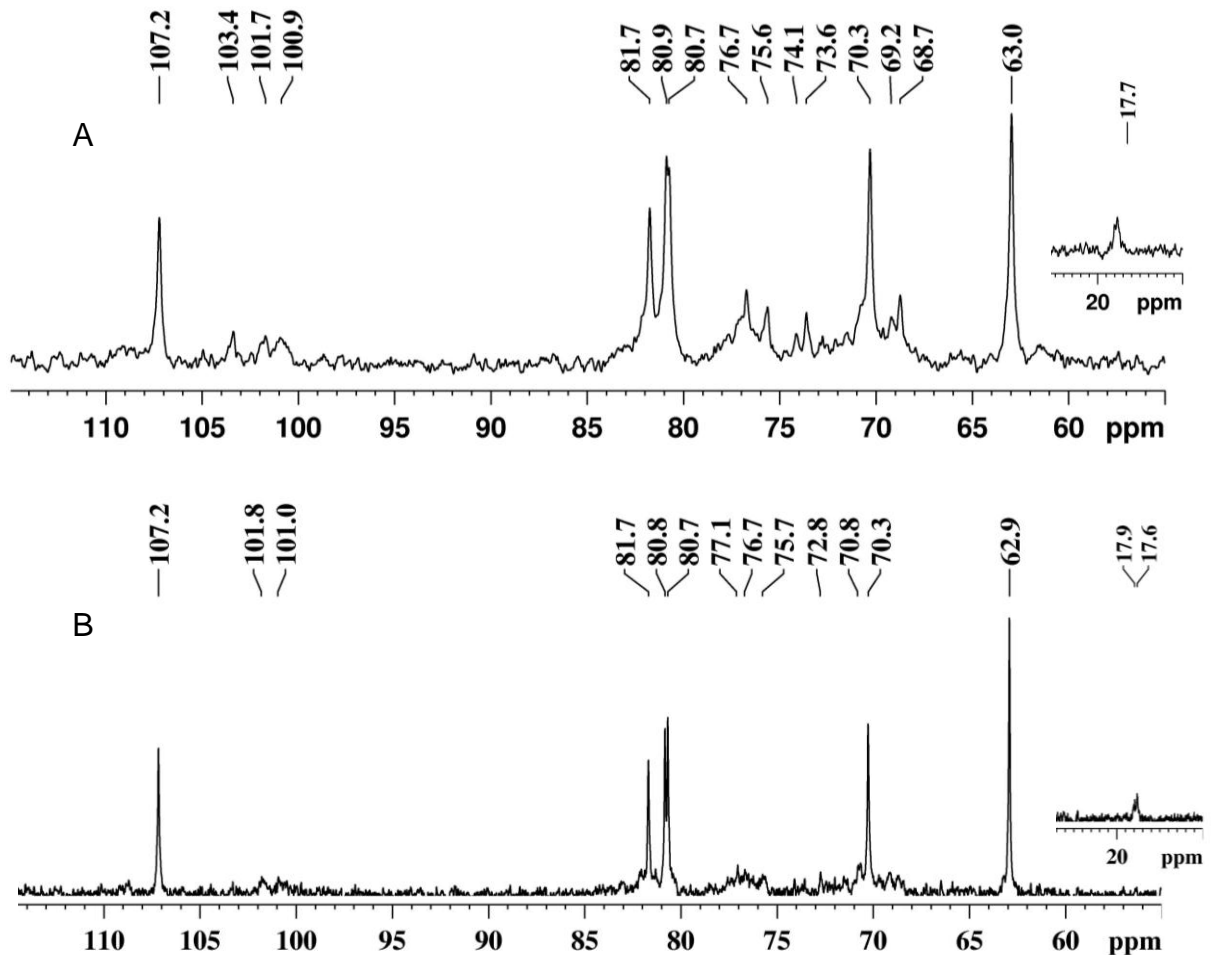


FIGURA 18: ESPECTROS DE RMN-¹³C DE (A) FRAÇÃO PK10-A E (B) FRAÇÃO PK10-SF OBTIDAS DE *Myrmecia biatorellae* (EM DMSO-*d*₆, A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.). Fonte: O autor (2012)

A fim de estabelecer os deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H e confirmar o tipo de ligação das unidades de galactofuranose foram utilizadas as técnicas de RMN bidimensional COSY e HSQC. No experimento COSY (Figura 19), foi possível assinalar todos os sinais de hidrogênios. O sinal de H1 (δ 5,08) correlacionou com o sinal de H2 (δ 4,06), e este com H3 (δ 4,16). O sinal de H4 (δ 3,96) se correlacionou com o sinal de H5 (δ 3,72) e este com o sinal de H6 (δ 3,56).

Após o assinalamento, os resultados foram lançados no espectro de HSQC e desta forma os sinais de carbono também puderam ser assinalados (Figura 20, Tabela 7). Estes experimentos confirmaram que as unidades de galactofuranose estão (1 \rightarrow 3)-ligadas, devido a presença do sinal de C-3 em campo baixo em 81,7 ppm, indicando O-substituição (SØRUM *et al.*, 1997; AHRAZEM *et al.*, 2001; PERRY e MACLEAN, 2004; LEMERCINIER e JONES, 2005).

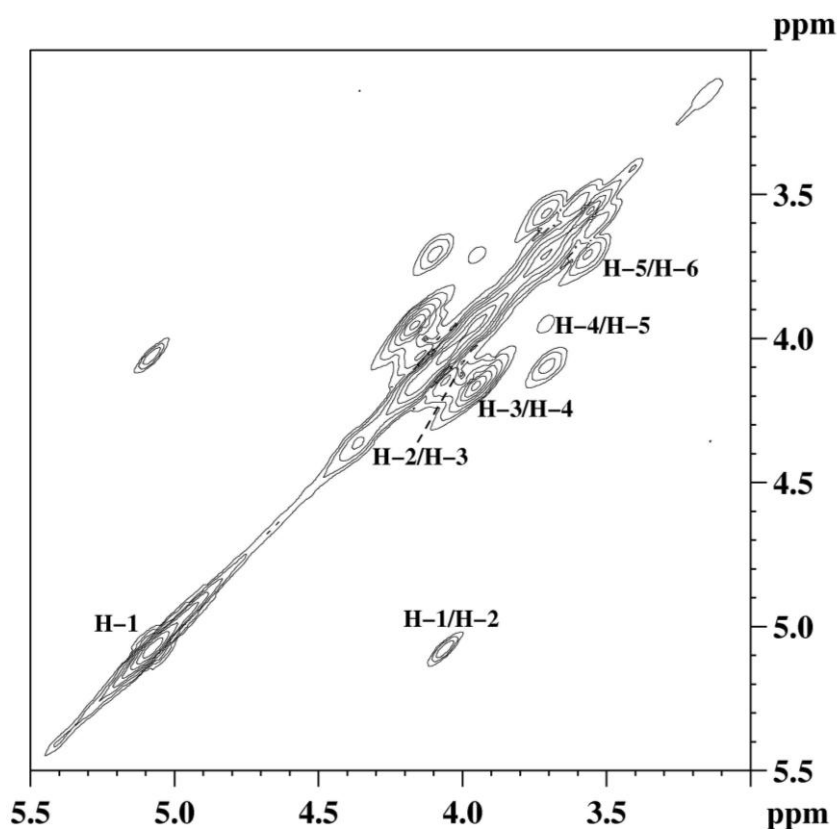


FIGURA 19: ESPECTRO DE COSY (RMN- $^1\text{H}/^1\text{H}$) DA FRAÇÃO PK10-SF, EM $\text{DMSO-}d_6$ A 50 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM p.p.m. Fonte: O autor (2012)

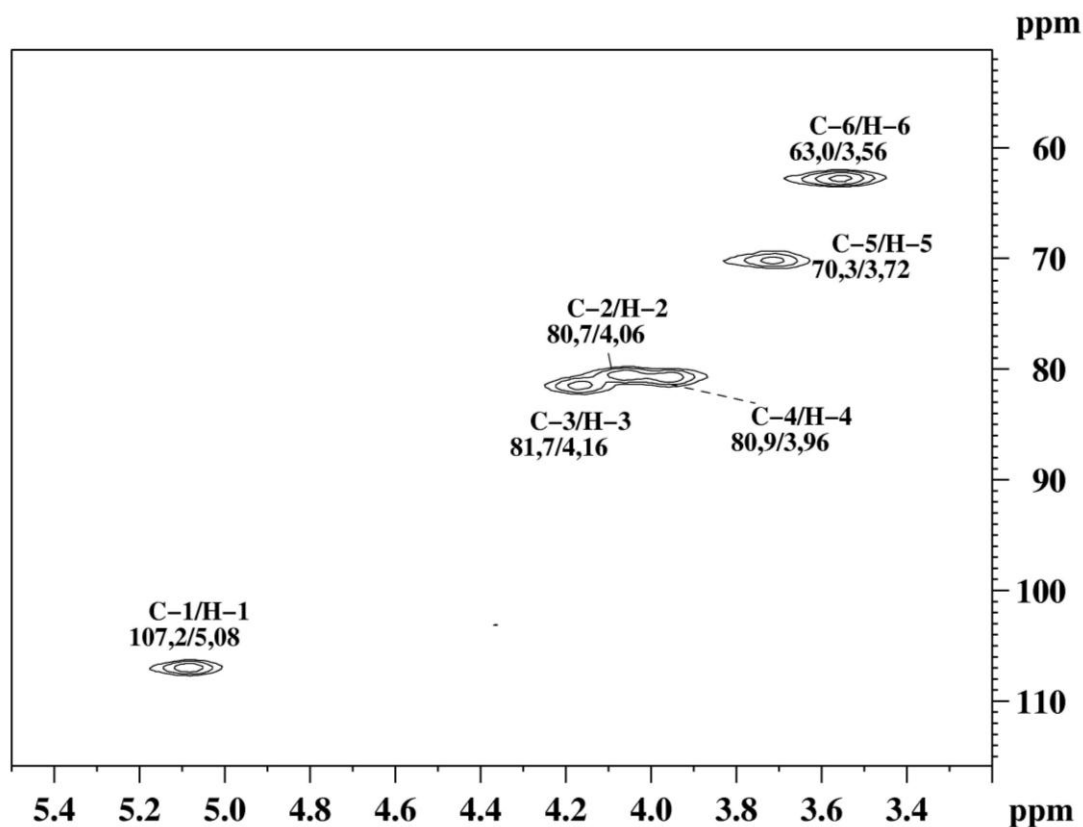


FIGURA 20: ESPECTRO DE HSQC (RMN $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) DA FRAÇÃO PK10-SF, EM DMSO- d_6 A 50 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM p.p.m. Fonte: O autor (2012)

TABELA 7: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ PPM) DE RMN ^{13}C E ^1H OBTIDOS PARA AS UNIDADES DE GALACTOFURANOSE DA FRAÇÃO PK10-SF

Unidade de H e C	^{13}C (δ)	^1H (δ)
H1/C1	107,2	5,08
H2/C2	80,7	4,06
H3/C3	81,7	4,16
H4/C4	80,9	3,96
H5/C5	70,3	3,72
H6/C6	63,0	3,56

Fonte: O autor (2012)

Para um detalhamento da estrutura química da ramnogalactofuranana presente na fração PK10-SF foi realizada a análise de metilação (Tabela 8). Esta indicou como principal derivado o 2,5,6-Me₃-Gal, confirmando que as unidades de galatose estão na forma furanosídica e (1→3)-ligadas, formando a cadeia principal da

ramnogalactofurana. Esta é ramificada em O-6 em aproximadamente 6,0% de suas unidades, devido à presença do derivado 2,5-Me₂-Gal. As cadeias laterais são formadas por unidades de ramnose 2-O- e 2,4-di-O-substituídas, as quais se apresentam substituídas por terminais não redutores de β-D-Galf (2,3,5,6-Me₄-Gal, 9%). Desta maneira, pode-se verificar que a ramnogalactofuranana presente na fração PK10-SF de *Myrmecia biatorellae* apresenta uma estrutura semelhante à mostrada na Figura 21.

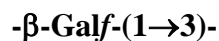
TABELA 8: ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO PK10-SF OBTIDA DA MICROALGA *Myrmecia biatorellae*.

Acetato de alditois parcialmente O-metilados	Fração (%) ^a	Tipo de ligação ^b
3,4Me ₂ Rha	4,0	→ 2)-Rhap-(1→
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	9,0	Galf-(1→
3-Me-Rha	1,0	→ 2,4)-Rhap-(1→
2,5,6-Me ₃ -Gal	80,0	→ 3)-Galf-(1→
2,5-Me ₂ -Gal	6,0	→3,6)-Galf-(1→

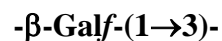
^a % da área do pico do O-metilalditol acetato em relação às áreas totais dos picos, determinada por GC-MS.

^b Baseado no derivado O-metilalditol acetato.

Fonte: O autor (2012)



A



6

↑

1

R

B

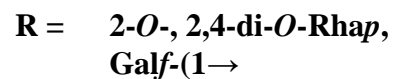


FIGURA 21: ESTRUTURA PROPOSTA PARA A RAMNOGALACTOFURANANA PRESENTE NA FRAÇÃO PK10-SF DE *Myrmecia biatorellae*. Fonte: O autor (2012)

Devido aos escassos relatos na literatura sobre polissacarídeos de microalgas envolvidas em simbiose líquênica, não se torna possível uma ampla discussão.

Com relação aos polissacarídeos relatados para os fotobiontes líquênicos, é possível observar que as ramnogalactofurananas presentes nas frações SW-50R, SK10-50R e PK10-SF de *Myrmecia biatorellae* apresentam uma estrutura diferente da manogalactana presente em *Coccomyxa mucigena* (CORDEIRO *et al.*, 2010) e das galactofurananas presentes em *Trebouxia*, as quais apresentam uma cadeia principal formada por unidades de Galf (1→5)-ligadas (CORDEIRO *et al.*, 2005, RUTHES *et al.*, 2008).

Por outro lado, a ramnogalactofuranana presente na fração PK10-SF apresenta uma estrutura relacionada com a ramnogalactofuranana de *Asterochloris* sp, descrita por Cordeiro *et al.* (2007). Esta também apresenta uma cadeia principal constituída por unidades de Galf (1→3)- ligadas, com ramificação em C-6 em aproximadamente 6,4% das unidades. Entretanto, suas cadeias laterais apresentam unidades de Galf 5-O- e 6-O-substituídas, bem como unidades de Rhap 2-O, 3-O e 2,3-di-O-substituídas. Os terminais não redutores eram compostos por xilose e galactofuranose. Não é possível uma comparação das ramnogalactofurananas solúveis em água fria de *Myrmecia* e *Asterochloris*, pois estes polissacarídeos ainda não foram publicados para este último gênero.

Vários estudos empregaram a estrutura de polissacarídeos na quimiotaxonomia de vários gêneros de fungos liquenizados (TEIXEIRA *et al.*, 1995; WORANOVICZ-BARREIRA *et al.*, 1999a,b; STUELP *et al.*, 1999, CARBONERO *et al.*, 2001, 2002, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2003; PRIETO *et al.*, 2008). Interessantemente, se observarmos a árvore filogenética (Figura 22) de clorófitas liquenizadas e de vida livre presente em Nash III (2008) pode-se verificar que as algas do gênero *Myrmecia* se aninham com as algas do gênero *Asterochloris*, indicando que elas estão muito próximas evolutivamente. Fato este que pôde ser corroborado pela semelhança na estrutura de suas ramnogalactofurananas.

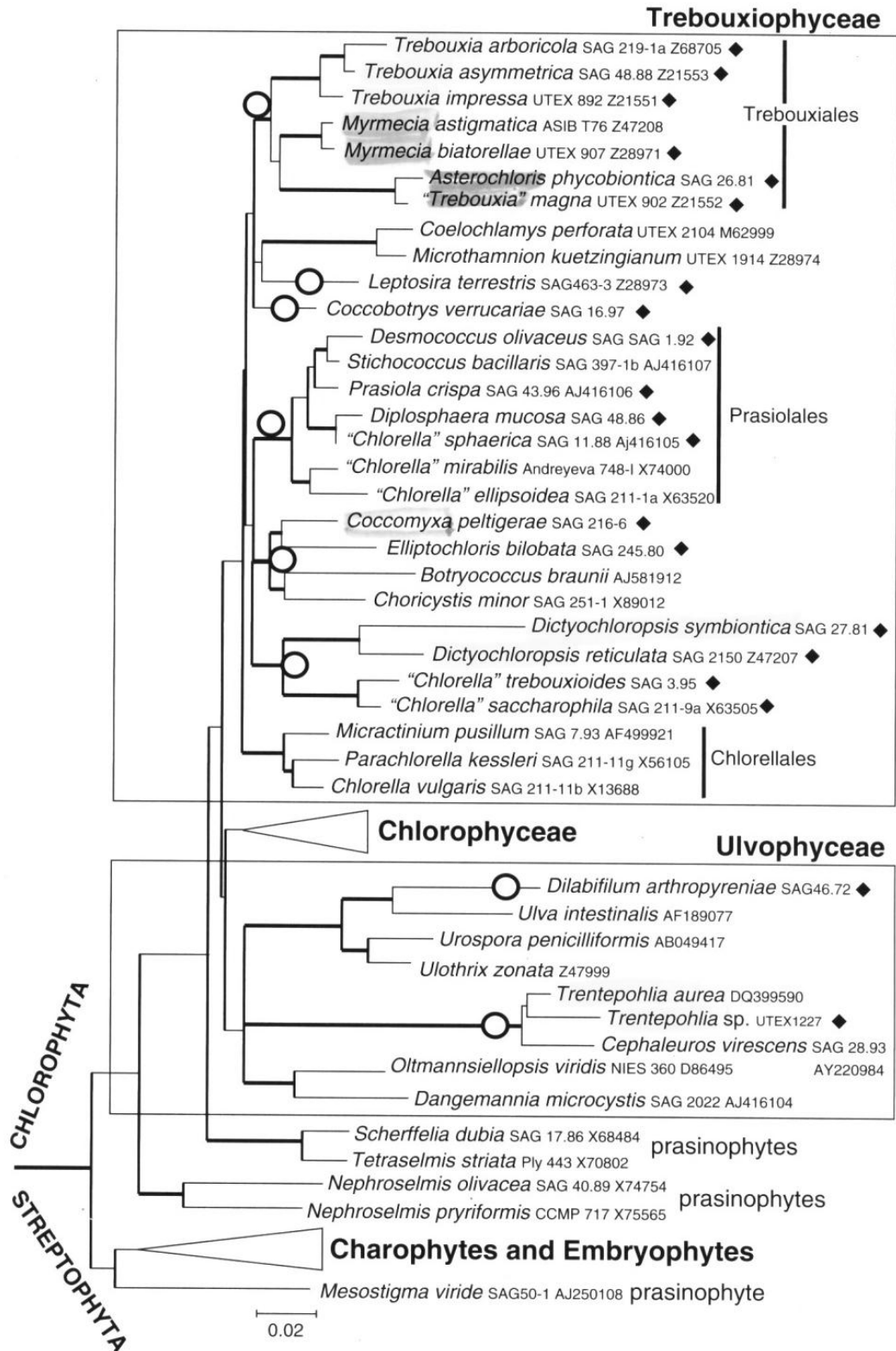


FIGURA 22: ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS FOTOBIONTES E ALGAS NÃO LIQUENIZADAS CLORÓFITAS BASEADA NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO 18S rDNA. FONTE: NASH III (2008).

Estes polissacarídeos ricos em galactofuranose encontrados em *Trebouxia*, *Asterochloris* e agora também em *Myrmecia* são polissacarídeos únicos em algas. Galactofurananas foram extraídas de paredes celulares de várias espécies de fungos, como por exemplo *Penicillium* (PARRA *et al.* 1994), *Eupenicillium* (LEAL *et al.* 1993), *Neosartorya* (LEAL *et al.* 1995), *Aspergillus* (LEAL *et al.* 1992) e *Guignardia* (SASSAKI *et al.* 2002b). Estas β -galactofurananas fúngicas apresentam, entretanto, unidades de Galf (1→5)- e/ou (1→6)-ligadas, não apresentando unidades de Galf (1→2)-ligadas, como observadas em *Myrmecia biatorellae*.

Além disso, resíduos de galactofuranose são citados como estruturas-chave envolvidas no mecanismo de reconhecimento e ou invasão por parasitas em seus hospedeiros (LEVERY *et al.*, 1998). Em relação a simbiose líquênica, como citado na introdução, a superfície da parede celular do fotobionte pode ser importante na interação entre os simbiontes, uma vez que lectinas produzidas pelo micobionte, localizadas na parede celular, foram encontradas interagindo com ligantes específicos na parede celular das algas (BUBRICK *et al.*, 1980, 1981, 1983). Essas lectinas parecem ser capazes de distinguir entre algas compatíveis e incompatíveis, agindo como proteínas de reconhecimento quando uma alga compatível tem um receptor específico na parede celular, mas produzindo deterioração e morte celular quando este receptor está ausente (MOLINA *et al.*, 1998). Além disso, de acordo com Fontaniella *et al.* (2004), o monossacarídeo reconhecido pelas lectinas naturais de líquens é a galactose, embora os autores não especifiquem entre Galp ou Galf. Como pode ser observado na literatura e neste estudo, todos os fotobiontes estudados até a presente data (*Trebouxia*, *Asterochloris*, *Coccomyxa* e *Myrmecia*) apresentaram polissacarídeos ricos em galactose, e poderiam estar envolvidas no processo de reconhecimento entre os simbiontes. Contudo, experimentos para confirmação desta hipótese precisam ser realizados.

Interessante notar, que embora poucos fotobiontes tenham sido estudados quanto aos seus polissacarídeos, foi encontrada uma grande variedade de estruturas químicas, ressaltando que este campo da liquenologia é muito rico e deve ser amplamente explorado.

4.3 AÇÃO DA FRAÇÃO SK10-A EM MODELO DE SEPTICEMIA INDUZIDA POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO.

Galactofuranoses estão ausentes em plantas e mamíferos, sendo amplamente encontradas como componentes da parede celular de inúmeros microorganismos, especialmente naqueles patogênicos aos homens. Quando na superfície de bactérias, fungos e protozoários, as galactofuranoses estão associadas ao aumento da virulência, proliferação e disseminação destes patógenos no hospedeiro (BARRETO-BERGTER *et al.*, 1983; SUZUKI *et al.*, 1997; LEVERY *et al.*, 1998; SASSAKI *et al.*, 2002). Como exemplo, foi demonstrado que a virulência dos parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania spp* está relacionada aos galactofuranosídeos presentes em glicoconjugados de superfície (PEDERSEN e TURCO, 2003).

Além disso, as galactofuranoses têm sido relatadas como potentes moléculas antigênicas, capazes de deflagrar uma rápida resposta imune inata, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ARRUDA *et al.* 1989; PEDERSEN e TURCO, 2003; SASSAKI *et al.* 2011).

Interessantemente, galactofuranoses foram encontradas nas microalgas liquênicas *Trebouxia* e *Asterochloris* (CORDEIRO *et al.*, 2005, 2007 e 2008). A manogalactofuranana de *Trebouxia* induziu a ativação dos macrófagos em todas as concentrações testadas (1 a 150 µg/mL) e na concentração de 150 µg/mL, este polissacarídeo foi capaz de ativar cerca de 63,9% das células incubadas, o que corresponde ao um aumento de 60% em relação ao grupo controle. Neste estudo, também foi verificado que todas as concentrações da manogalactofuranana testadas causaram alterações morfológicas nos macrófagos (CORDEIRO *et al.* 2008).

Como visto acima nas seções 4.1 e 4.2, os polissacarídeos de *Myrmecia biatorellae* são ricos em galactofuranoses. Desta maneira, decidiu-se testar a ação destes polissacarídeos em um modelo de sepse murino, no qual os macrófagos apresentam um papel muito importante. Foi escolhida a fração SK10-A, pois apresenta uma mistura de galactofurananas e com rendimento suficiente para a realização dos ensaios biológicos.

A sepse é definida como uma reação inflamatória aguda sistêmica, normalmente decorrente de uma infecção bacteriana generalizada. Apresenta alta

letalidade e pode ter origem em inúmeras causas como pneumonia, apendicite, queimaduras, complicações de cirurgias abdominais, lesão no trato intestinal por instrumentos perfurocortantes e infecções hospitalares. Por meio da circulação sanguínea, os microorganismos infectantes (fungos, protozoários ou bactérias e suas toxinas) atingem os tecidos e causam danos a diversos sistemas orgânicos, especialmente o cardiovascular, hepático, renal e respiratório. Os microorganismos ativam os macrófagos, os quais amplificam a resposta inflamatória por meio da liberação de mediadores inflamatórios como o óxido nítrico, os eicosanóides, e as citocinas pró-inflamatórias, especialmente o TNF- α (fator de necrose tumoral – α) e a IL-1 β (interleucina - 1 β). Esta cascata inflamatória sistêmica resulta no recrutamento intenso de leucócitos polimorfonucleares para vários tecidos (mesmo aqueles distantes do foco da infecção), lesionando-os, causando falência múltipla dos órgãos e consequente morte (SPRONK *et al.*, 2004; BONE, 1991).

Desta maneira, neste experimento, o aumento da mortalidade por sepse nos animais tratados com os polissacarídeos constitui um forte indicativo de atividade pró-inflamatória dos mesmos.

Em nosso estudo, a sepse foi induzida por ligadura e perfuração do ceco (*cecal ligation and puncture* – CLP). Este modelo tem relevância clínica, uma vez que se assemelha à sepse produzida por traumas com perfurações intestinais ou colite pós-operatória em humanos (BURAS *et al.*, 2005). Para efeitos de comparação da mortalidade, foram providenciados 3 grupos: (a) falso-operado; (b) grupo controle com sepse e (c) grupo de animais com sepse e tratados com os polissacarídeos. O tratamento foi mantido durante os sete dias seguintes à cirurgia. Neste período, a mortalidade dos animais foi quantificada a cada 12 horas. Posteriormente, as mortalidades dos diferentes grupos foram comparadas entre si. Os dados obtidos encontram-se expressos na Figura 23. Pode-se observar que a simples abertura da cavidade abdominal, seguida da exposição da válvula ileocecal dos animais não causa a sepse. Portanto, todos os animais do grupo falso-operado se mantiveram vivos durante todo o período de observação. Ao contrário, os animais cuja válvula ileocecal foi perfurada (grupo controle com sepse), desenvolveram a sepse e apresentaram uma mortalidade acentuada. Neste grupo, a letalidade correspondeu a 100% para o período de 60 horas após a CLP. No grupo tratado com a fração SK10-A (50 mg/kg), houve um aumento significativo da letalidade em

relação ao grupo controle, correspondente a 30 e 10% respectivamente para os períodos de 24 e 36 h.

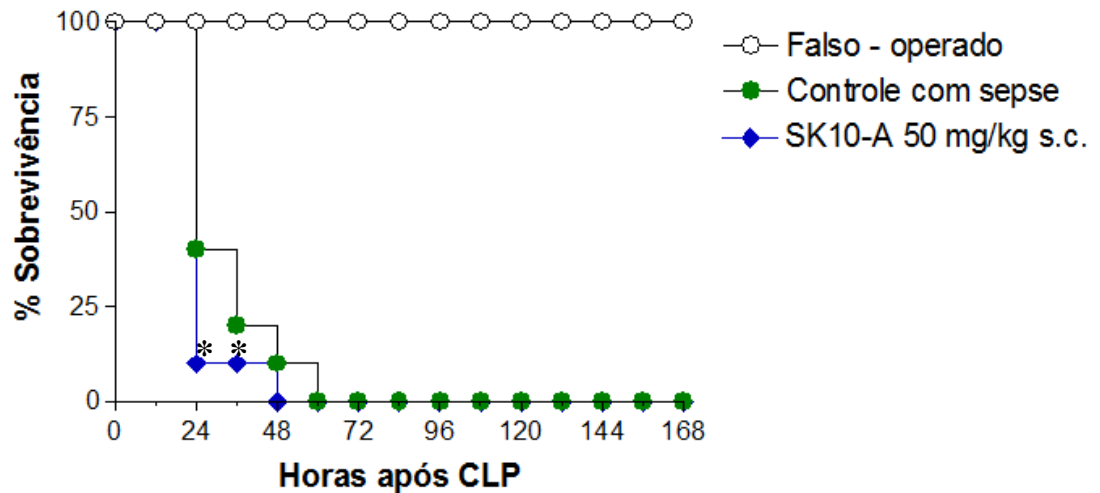


FIGURA 23. CURVA DE LETALIDADE EM MODELO DE SEPSE EM ANIMAIS TRATADOS OU NÃO COM A FRAÇÃO SK10-A DE *Myrmecia biatorellae*. OS ANIMAIS FORAM TRATADOS DIARIAMENTE COM SALINA (CONTROLE) OU COM A FRAÇÃO SK10-A NA DOSE DE 50 mg/Kg, PELA VIA SUBCUTÂNEA. O TRATAMENTO FOI INICIADO NO MOMENTO DA CIRURGIA DE INDUÇÃO DA SEPSE E FOI REPETIDO NOS SETE DIAS SEGUINTE, QUANDO A LETALIDADE DOS ANIMAIS FOI MENSURADA A CADA 12 HORAS. UM GRUPO FALSO-OPERADO FOI PROVIDENCIADO PARA COMPROVAR QUE A SIMPLES EXPOSIÇÃO DA VÁLVULA ILEOCECAL, SEM PERFURAÇÕES, NÃO CAUSA A SEPSE NEM MORTALIDADE. * INDICA $P < 0,05$. Fonte: O autor (2012)

O aumento da mortalidade causado pelos polissacarídeos de *Myrmecia biatorellae* nos indica que estes polímeros podem interferir na reação inflamatória que ocorre na sepse. A presença confirmada das galactofuranoses nos fornece uma importante explicação para o aumento da mortalidade. A capacidade imunogênica descrita para polímeros contendo galactofuranoses, sugere que estas unidades funcionam como um amplificador da resposta pró-inflamatória decorrente da sepse. Provavelmente, as ramnogalactofurananas de *M. biatorellae* estão estimulando os macrófagos, que são considerados a primeira linha de defesa do organismo. Estas células, através da liberação de vários mediadores, dentre eles os radicais livres e citocinas, tentam eliminar os patógenos. Entretanto, baseados na literatura científica, os macrófagos ativados são capazes de recrutar leucócitos para fortalecer o

combate ao agressor exógeno. Dentre os leucócitos, os neutrófilos são os mais envolvidos e desempenham um papel primordial na patogênese da sepse. Sua migração intensa para diversos tecidos (mesmo aqueles distantes do foco da sepse) geram lesões devido à liberação intensa de radicais livres no local. Conseqüentemente, estas lesões dos tecidos se intensificam, especialmente quando associadas a outras complicações (por exemplo, ativação da cascata de coagulação sanguínea). Esta sequência de eventos leva a uma falência múltipla de órgãos e conseqüente morte dos animais sépticos (COHEN, 2002).

5 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

A partir da fração W foram purificadas quatro frações, denominadas SW-100R, SW-50R, SW-30R e SW-10R. Estas frações apresentavam ramnogalactofurananas com estruturas semelhantes, mas com massas molares diferentes, a saber 647.600 Da, 211.000 Da, 170.000 Da e 108.000 Da, respectivamente.

A ramnogalactofuranana presente na fração SW-50R foi estruturalmente caracterizada por análises de metilação e ressonância magnética nuclear mono- (RMN-¹³C, DEPT-135) e bidimensionais (COSY, HSQC e HSQC acoplado) e apresentou cadeia principal formada provavelmente por unidades de Galf (1→6)-ligadas, podendo ser substituídas em O-2 por unidades de Galf (1→2)-ligadas ou por unidades terminais não redutoras de ramnose e galactofuranose.

A fração SK10-A, obtida do tratamento de congelamento/degelo da fração alcalina K10 e após remoção de amilose, apresentou uma mistura de ramnogalactofurananas com diferentes massas molares e com estrutura semelhante à ramnogalactofuranana presente na fração SW-50R.

A partir da fração PK10, obtida do tratamento de congelamento/degelo da fração alcalina K10, foi purificada uma ramnogalactofuranana insolúvel em água fria. Esta apresenta uma cadeia principal formada por unidades de β -Galf (1 \rightarrow 3)-ligadas, as quais são substituídas em O-6 (cerca de 6,0%) por cadeias laterais constituídas por unidades de ramnose 2-O- e 2,4-di-O-substituídas. Os terminais não redutores são formados por unidades de β -D-Galf.

A fração SK10-A foi testada em um modelo de sepse murino e causou um aumento significativo da letalidade em relação ao grupo controle, na dose de 50 mg/kg. Este aumento da mortalidade por sepse nos animais tratados com os polissacarídeos constituiu um forte indicativo de atividade pró-inflamatória dos mesmos. Provavelmente, as ramnogalactofurananas de *M. biatorellae* estão agindo sobre os macrófagos, estimulando-os.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 & Sons. 1993a.

AHMADJIAN, V. The lichen photobiont – What can it tell us about lichen systematics? **The Bryologist**, v. 96, n. 3, p. 310-313. 1993b.

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.; LEAL, J.; PRIETO, A.; BARBERO, J; BERNABE, M. Chemical structure of a polysaccharide isolated from the cell wall of *Arachniotus _erruculosus* and *A. rubber*. **Carbohydrate Research**, V. 336; p 325–328. 2001.

AHRAZEM, O., PRIETO, A., LEAL, J.A., GIMÉNEZ-ABIÁN, M. I., JIMÉNEZ-BARBERO, J., BERNABÉ, M. (2007). Fungal cell wall polysaccharides isolated from *Discula destructiva* spp. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1138-1143.

ARRUDA, M. V., COLLI, W.; ZINGALES, B., Terminal β -d-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 182, p. 413–421. 1989.

BARINAGA, M. Origins of lichen fungi explored. **Science (Wash., DC)**, v. 268, p. 1437. 1995.

BETTIM, F.L. **Extração extração e caracterização estrutural de polissacarídeos da microalga liquênica *Myrmecia biatorellae***. 45 f. Trabalho de Graduação (Bacharelado em Ciências biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BONE, R.C. The pathogenesis of Sepsis. **Ann Intern Med.**, v. 115, p. 457-469. 1991.

BUBRICK, P.; GALUN, M. Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Correlation between binding patterns and cell wall cytochemistry. **Protoplasma**, v. 104, p. 167-173. 1980.

BUBRICK, P., GALUN, M., FRENSDORFF, A. Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Localization in the intact lichen and cultured mycobiont. - **Protoplasma** 105: 207-211. 1981.

BUBRICK, P., BEN-YAAKOV, M., FRENSDORFF, A., GALUN, M. Lichen symbiosis: does the surface of the phycobiont's cell wall play a role in discrimination between compatible and incompatible symbionts?. - **Israel Journal of Botany**, 32: 47-48. 1983.

BUBRICK, P. Effects of symbiosis on the photobiont. *In*: M. Galun (ed.), **Handbook of Lichenology**, v. 2, p. 133-144. 1988.

BURAS, J. A., HOLZMANN, B., SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature**, v. 4, p. 854 – 865. 2005.

CARBONERO, E., SASSAKI, G. L., STUELP, P. M., 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 Microbiol. Lett.**, v. 194, p. 65-69. 2001.

CARBONERO, E., MONTAI, A. V., WORANOVICZ-BARREIRA, S. M., GORIN, P. A. J. & IACOMINI, M. Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladonia* spp.: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 61, p. 681-686. 2002.

CARBONERO, E., MONTAI, A. V., MELLINGER, C. G., ELIASARO, S., SASSAKI, G. L., GORIN, P. A. J. & IACOMINI, M. Glucans of lichenized fungi: significance for

taxonomy of the genera *Parmotrema* and *Rimelia*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 929-934. 2005.

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 Submicroscopy Cytology and Pathology**, v. 29, p. 503-509. 1997.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 42, p. 885-891. 2002.

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**, v. 63, p. 967-975. 2003.

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 Microbiol Lett.** Mar 1;244(1):193-8. 2005.

CORDEIRO, L. M. C.; SASSAKI, G. L., IACOMINI, M. First report on polysaccharides of *Asterochloris* and their potential role in the lichen symbiosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 41, n. 2, p. 193-197. 2007.

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 effect on macrophage activation. **International Journal of Biological Macromolecules**, doi:10.1016/j.ijbiomac.2008.02.002. 2008.

CORDEIRO, L.; SASSAKI G.; GORIN.; IACOMINI M. O-Methylated mannogalactan from the microalga *Coccomyxa mucigena*, symbiotic partner of the lichenized fungus *Peltigera aphthosa*. **Phytochemistry**, v. 71 , p 1162–1167. 2010

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A (1→6)-linked α -mannopyranan, pseudonigeran, and a (1→4)-linked β -xylan, isolated from

the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 206, p.175-178. 2002.

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

CRITTENDEN, P. D.; DAVID, J. C.; HAWKSWORTH, D. L.; CAMPBELL, F. S. Attempted isolation and success in the culturing of a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v. 10, p. 267-297. 1995.

DEASON, T. R.; BOLD, H. C. *Phycological studies I. Exploratory studies of Texas soil algae*. **Univ. Texas Pub.**, n. 6022. 1960.

ELVEBAKK, A. & BJERKE, J. W.. *Pannaria isabellina* (Vain.) comb. nov., a remarkable lichen species from Chile. **The Lichenologist**, v. 37 , p. 47-54 2005.

FONTANIELLA B., MILLANES, A. M., VICENTE, C. E LEGAZ, M. E. Concanavalin A binds to a mannose-containing ligand in the cell wall of some lichen phycobionts. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 773-779. 2004.

FREYSDOTTIR, J., OMARSDOTTIR, S., INGÓLFSDÓTTIR, K., VIKINGSSON, A. & OLAFSDOTTIR, E. S. *In vitro* and *in vivo* immunomodulating effects of traditionally prepared extract and purified compounds from *Cetraria islandica*. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 423-430. 2008.

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

GALUN, M.; BUBRICK, P.; FRENSDORFF, A. Initial stages in fungus-alga interaction. **Lichenologist (Lond.)**, v. 16, n. 2, p. 103-110. 1984.

GALUN, M. Effects of symbiosis on the mycobiont. *In*: Galun, M. (Ed.) *CRC Handbook of Lichenology*. (v. II). Boca Raton, CRC Press, pp. 145–169. 1988.

- GOLDSMITH, S. J.; THOMAS, M. A.; GRIES, C. A. A new technique for photobionts culturing and manipulation. **Lichenologist (Lond.)**, v. 29, p. 559-569. 1997.
- GEITLER, L. Über Haustorien bei Flechten und über *Myrmecia biatorellae* in *Psora globifera*. **Osterreichische botanische Zeitschrift**, v. 110, p. 270-280. 1963.
- GORIN, P. A. J. AND MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in C-13 magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, v. 53, p. 1212-1222. 1975.
- GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, v. 38, p. 13-104. 1981.
- 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. *Carbohydr. Res.*, 142:253-267. 1985.
- HALE, M. E. *How to know the lichens*. 2. ed. Iowa: Brown, 246 p. 1979.
- HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J. *The lichen-forming fungi*. Glasgow: McCorquadale, 1984.
- HELMS, G. W. F. **Taxonomy and symbiosis in associations of *Physciaceae* and *Trebouxia***. Göttingen. Tese (Doktorgrades der Biologischen), Fakultät der Georg-August Universität Göttingen, 156 p. 2003.
- HIRABAYASHI, K., IWATA, S., ITO, M., SHIGETA, S., NARUI, T., MORI, T. & SHIBATA, S. Inhibitory effect of a lichen polysaccharide sulfate, GE-3-S, on the replication of human immuno-deficiency virus (HIV) *in vitro*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 37, p. 2410-2412. 1989.

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

JAMES, P. W. & AINO HENSSEN. A New Species of *Psoroma* with Sorediate Cephalodia. **The Lichenologist**, v. 7, p. 143-147. 1975.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commum. Univ. Stockholm**, v. 8, p. 1-70. 1976.

KILIAS, H.; SCHNEIDER, G. *Lobioma*, a new lichen genus from South America. **Lichenologist (Lond.)**, v. 10, p. 27-32. 1978.

KOJIMA M, SHISHIDO K, KOBAYASHI S, DOBASHI M, INO S. A Chlorella polysaccharide as a factor stimulating RES activity. **J Reticuloendothel Soc.**, v. 14, p. 192-208. 1973.

KÖNIG, J.; PEVELING, E. Cell walls of the phycobionts *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* : constituents and their localization. **Lichenologist (Lond.)**, v. 16, n. 2, p. 129-144. 1984.

LEAL, J. A.; GUERRERO, C.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M. Chemical and structural similarities in wall polysaccharides of some *Penicillium*, *Eupenicillium* and *Aspergillus* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 90, p. 165-168. 1992.

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*. **Carbohydr. Res.**, v. 244, p. 361-368. 1993.

LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PARRA, E.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M. Structural investigation of cell wall polysaccharides from *Neosartorya*: relationships with their putative anamorphs of *Aspergillus*. **Carbohydr. Res.**, v. 273, p. 255-262. 1995.

LEMERCINIER, X.; JONES, C. Full assignment of the ^1H and ^{13}C spectra and revision of the O-acetylation site of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 33F, a component of the current pneumococcal polysaccharide vaccine. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 68-74, 2005.

LEVERY, S. B., TOLEDOM M. S., STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K. Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: an immunodominant α -galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. **Biochemistry**, v. 37, p. 8764-8775. 1998.

LINHARES, S.; GEWANDSZAJDER, F. **Biologia**. 4. ed. São Paulo: Ed. Ática, p. 119-122. 1985.]

MARTINEZ, M. J. A., DEL OLMO, L. M. B.; BENITO, P. B. Antiviral activities of polysaccharides from natural sources. *In*: Atta-ur-Rahman (Ed.) **Studies in Natural Products Chemistry**, vol. 30, Elsevier B. V. 2005.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C., CARBONERO, E. R., SASSAKI G.L., GORIN P.A.J. & IACOMINI M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **Int. J. Biol. Macromolec.**, v. 35, p. 97-102. 2005a.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C., CARBONERO, E. R., GORIN P.A.J. & IACOMINI M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirensis* Hale. **Carbohydr. Polym.**, v. 60, p. 7-13. 2005b.

MATSUBAYASHI, T. JP Patent 61,096,992, 1984, **Chem. Abstr.** 1986, 105, 132160.

MIAO, V.; COFFET-LEGAL, M.; BROWN, D.; SINNEMANN, S.; DONALDSON, G.; DAVIES, J. Genetic approaches to harvesting lichen products. **TRENDS in Biotech.**, v. 19, n. 9, p. 349-355. 2001.

MOLINA, M. C., STOCKER-WÖRGÖTTER, E., TÜRK, R., BAJON, C.; VICENTE, C. Secreted, glycosylated arginase from *Xanthoria parietina* thallus induces loss of cytoplasmic material from *Xanthoria* photobionts. **Cell Adh.Commun.**, v. 6, p. 481-490. 1998a.

MOLINA, M. C., BAJON, C., SAUVANET, A., ROBERT, D.; VICENTE, C. Detection of polysaccharides and ultrastructural modification of the photobiont cell wall produced by two arginase isolectins from *Xanthoria parietina*. **J. Plant Res.**, v. 111, p. 191-197. 1998b.

MOLINARO, A., EVIDENTE, A., LANZETTA, R., PARRILLI, M, ZOINA, A. (2000). O-specific polysaccharide structure of the aqueous lipopolysaccharide fraction from *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* strain 1839. **Carbohydrate Research**, v.328, p. 435-439.

NAKANO, T.; HANDA, S. ;TAKESHITA, S. Some corticolous algae from the Taishaku-kyo Gorge, western Japan. **Nova Hedwigia**, v. 52, p. 427–451. 1991.

NODA, K.; TANAKA, K.; MATSUBAYASHI, T.; KAMYA, N.; ANDO, Y.; SANO, T.; OKUDA, M. JP Patent 06,248,003,1993. Chem. Abstr., 122, 58653. 1995.

OGAWA K; YAMAURA M; MARUYAMA, I. Isolation and identification of 2-O-methyl-L-rhamnose and 3-O-methyl-L-rhamnose as constituents of an acidic polysaccharide of *Chlorella vulgaris*. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 61, p. 539-540. 1997.

OLAFSDOTTIR, E. S., OMARSDOTTIR, S., PAULSEN, B. S., JURCIC, K. & WAGNER, H. Rhamnopyranosylgalactofuranan, a new immunologically active polysaccharide from *Thamnolia subuliformis*. **Phytomedicine**, v. 6, p. 273-279. 1999a.

OLAFSDOTTIR, E. S., INGOLFSDOTTIR, K., BARSETT, H., PAULSEN, B. S., JURCIC, K. & WAGNER, H. Immunologically active (1→3)-(1→4)- α -D-Glucan from *Cetraria islandica*. **Phytomedicine**, v. 6, p. 33-39. 1999b.

OLAFSDOTTIR, E. S. & INGOLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. **Planta Med.**, v. 67, p. 199-208. 2001.

OLAFSDOTTIR, E. S., OMARSDOTTIR, S., PAULSEN, B. S. & WAGNER, H. Immunologically active O-6 branched (1→3)- β -glucan from the lichen *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. **Phytomedicine**, v. 10, p. 318-324. 2003.

OMARSDOTTIR, S., FREYSDOTTIR, J., BARSETT, H., PAULSEN, B. S. & OLAFSDOTTIR, E. S. Effects of lichen heteroglycans on proliferation and IL-10 secretion by rat spleen cells and IL-10 and TNF- α secretion by rat peritoneal macrophages *in vitro*. **Phytomedicine**, v. 12, p. 461-467. 2005.

OMARSDOTTIR, S., PETERSEN, B. O., BARSETT, H., PAULSEN, B. S., DUUS, J. Ø. & OLAFSDOTTIR, E. S. Structural characterization of a highly branched galactomannan from the lichen *Peltigera canina* by methylation analysis and NMR-spectroscopy. **Carbohydr. Polym.**, 63: 54-60. 2006.

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

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

PEDERSEN, L.L., TURCO, S.J. Galactofuranose metabolism: a potential target for antimicrobial chemotherapy. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 60, p. 259-266. 2003.

PEREIRA, M. I., RUTHES, A. C., CARBONERO, E. R., MARCON, R., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., SANTOS, A. R. S., ELIASARO, S., SASSAKI, G. L., GORIN, P.

A. J. & IACOMINI, M. Chemical structure and selected biological properties of a glucomannan from the lichenized fungus *Heterodermia obscurata*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2132-2139. 2010.

PERRY M.; MacCLEAN L. Structural characterization of the antigenic O-polysaccharide in the lipopolysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 14. **Carbohydrate Research**, v. 339, p1399–1402, 2004

PIERCEY-NORMORE, M. D., DEPRIEST, P. T. Algal switching among lichen symbioses. **Am. J. Bot.**, v. 88, p. 1490-1498. 2001.

PRIETO, A., LEAL, J. A., BERNABÉ, M. & HAWKSWORTH, D. L. A polysaccharide from *Lichina pygmaea* and *L. confinis* supports the recognition of Lichinomycetes. **Mycologica Research**, v. 112, p. 381-388. 2008.

PUGH, N.; ROSS, S.A.; ELSOHLY, H.N.; ELSOHLY, M.A.; PASCO, D.S. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, aphanizomenon flos-aquae and *Chlorella pyrenoidosa*. **Planta Med.**, v. 67, p. 737-742. 2001.

REIS, R. A; TISCHER, C. A; GORIN, P.A.J; IACOMINI, M. A new pullulan and a branched (1→3)-, (1→6)-linked beta-glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, p.1-5. 2002.

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

RUTHES, A. C. **Ficobiontes de fungos liquenizados e de vida livre: cultivo, caracterização estrutural de polissacarídeos e atividade biológica de um polímero contendo ácido nosturônico**. 185f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RUTHES, A. C., KOMURA, D. L., CARBONERO, E. R., CORDEIRO, L. M. C., REIS, R. A., SASSAKI, G. L., GORIN, P. A. J. & IACOMINI, M Polysaccharides present in cultivated *Teloschistes flavicans* symbiosis: Comparison with those of the thallus. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 46, p.500-505. 2008.

RUTHES, A. C., KOMURA, D. L., CARBONERO, E. R., SASSAKI, G. L., GORIN, P. A. J. & IACOMINI, M Structural characterization of the uncommon polysaccharides obtained from *Peltigera canina* photobiont *Nostoc muscorum*. *Carbohydr. Polym.*, v.81, p. 29-34. 2010.

SASSAKI, G. L.; REIS, R. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The glucans of lichenized fungi. **Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg**, p. 195-211, 2002.

SASSAKI, G.L., IACOMINI, M., & GORIN, P.A.J. Methylation-GC-MS analysis of arabinofuranose- and galactofuranose-containing structures: rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 77, p. 223–234. 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.

SASSAKI, G. L., CZELUSNIAK, P. A., VICENTE, V. A, ZANATA, S. M., SOUZA, L. M., GORIN, P. A., IACOMINI, M. Some biomolecules and a partially O-acetylated exo-galactomannan containing β -Gal units from pathogenic *Exophiala jeanselmei*, having a pronounced immunogenic response. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 177-182. 2011.

SØRUM, U.; ROBERTSEN, B.; KENNE, L.; Structural studies of the major polysaccharide in the cell wall of *Renibacterium salmoninaru*. **Carbohydrate Research**, v.306, p.305–314,1998

SPRONK, P. E., ZANDSTRA, D. F., INCE, C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. **Crit Care**, v. 8, p. 462–468. 2004

STUELP, P. M., CARNEIRO LEÃO, A. M. A., GORIN, P. A. J. & IACOMINI, M. The glucans of *Ramalina celastri*: relation with chemotypes of other lichens. **Carbohydr. Polym.**, v. 40, p. 101-106. 1999.

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 α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, p. 691-698, 2002.

TEIXEIRA, A. Z. A., IACOMINI, M. & GORIN, P. A. J. Chemotypes of mannose-containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. **Carbohydr. Res.**, v. 266, p. 309-314. 1995.

TSCHERMAK-WOESS, E. *Myrmecia Reticulata* as a Phycobiont and Free-Living—free-Living *Trebouxia*— The Problem of *Stenocybe septata*. **The Lichenologist**, v.10, p. 69-79. 1978.

TSCHERMAK-WOESS, E. Developmental studies in trebouxoid algae and taxonomical consequences. **Pl. Syst. Evol.**, v. 164, p. 161-195. 1989.

UKAI, S.; KIHU, T.; NAGAI, K.; TABATA, H.; HARA, C. Reticuloendothelial system-activating polysaccharides from *Chlorella* cells. **Chem. Abstr**, v. 113. 1990.

XAVIER FILHO, L.; RIZZINI, C. T. **Manual de liquenologia brasileiro**. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 431 p. 1976.

WHITE, R.C.; BARBER, G.A. An acidic polysaccharide from the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. **Biochim Biophys Acta.**, v. 264(1), p.117-28. 1972.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 2, p. 65-67. 1963a.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M. , GORIN, P. A. J., SASSAKI, G. L., TISCHER, C. A., AHTI, T. & IACOMINI, M. Chemotyping glucans from lichens of the genus *Cladonia*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1069-1074. 1999a

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M., GORIN, P. A. J., SASSAKI, P. L., MARCELLI, M. P. & IACOMINI, M. Galactomannoglucans of lichenized fungi of *Cladonia* spp.: significance as chemotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 181, p. 313-317. 1999b.

YALCIN, Z. HICSASMAZ, B. BOZ, F. BOZOGLU. Characterization of the extracellular polysaccharide from freshwater microalgae *Chlorella* sp. **Lebensm. Wiss. u. Technol.**, v. 27, pp. 158–165. 1994.