

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELE LIMA BETTIM

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*.**

**CURITIBA
2010**

FRANCIELE LIMA BETTIM

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*.**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Bioquímica do Curso de Ciências Biológicas, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucimara Mach Côrtes Cordeiro

**CURITIBA
2010**

Aos meus amados pais Marli e Assis, à minha irmã Ariane, querida e inseparável companheira e à minha dedicada e paciente orientadora, professora Dr.^a Lucimara Cordeiro.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marli e Assis pelo carinho, apoio, incentivo, compreensão, dedicação e que sempre procuraram me oferecer a oportunidade de atingir os meus objetivos, sendo fundamentais para todas as minhas conquistas até o momento.

À minha irmã Ariane que sempre me acompanhou nessa longa caminhada (como costumamos dizer, para ser alguém na vida) e por quem sinto muito orgulho e tenho como exemplo de dedicação à pesquisa científica. Agradeço pelo incentivo, auxílio e sugestões, principalmente, na redação da monografia.

À minha orientadora, professora Dr.^a Lucimara Cordeiro pela oportunidade oferecida, confiança, incentivo, dedicação, paciência e auxílio, além das conversas, que contribuíram para a minha formação.

Agradeço à professora Dr.^a Sionara Eliasaro por meio da qual conheci a professora Lucimara e assim colaborou para o meu ingresso no mundo científico.

À Vanessa, Carolina e Antônia que contribuíram na realização deste estudo participando em algumas etapas e pelas explicações e ajudas prestadas, além da convivência no laboratório. Também agradeço à Vanessa, que realizou o cultivo da microalga para a obtenção da biomassa.

Ao pessoal do grupo de Química de Carboidratos pela convivência e que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR.

Ao CAPES, CNPq e PRONEX-CARBOIDRATOS pelo apoio financeiro.

Às minhas colegas de graduação e amigas Ana Caroline, Andressa, Jovana, Lílian, Sara e Tatiane, com as quais compartilhei as minhas conquistas e frustrações durante o desenvolvimento dos meus estudos, e que sempre me ajudaram com sugestões e palavras de incentivo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste estudo e servem como exemplo de dedicação à pesquisa.

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte.”

Albert Einstein

“O que importa nessa vida, mais do que ganhar sozinho é ajudar os outros a vencer, mesmo que isso signifique ter que diminuir os nossos passos.”

Autor desconhecido

RESUMO

Myrmecia biatorellae é uma microalga verde pertencente à classe Trebouxiophyceae e ocorre como fotobionte do líquen *Lobaria linita*. A atividade biológica (antitumoral, antiviral e imunomoduladora) dos polissacarídeos está relacionada às suas estruturas químicas. O conteúdo polissacarídico de fotobiontes ainda é pouco conhecido, portanto, o presente estudo visou extrair, purificar e caracterizar estruturalmente os polissacarídeos da microalga liquênica *M. biatorellae*. Esta foi cultivada em laboratório em meio nutriente orgânico para *Trebouxia*, segundo Ahmadjian (1993), obtendo-se uma biomassa de 41,23 g. Para a extração dos polissacarídeos, a biomassa da microalga foi submetida a quatro processos extrativos. Inicialmente, foram realizadas as extrações com os solventes orgânicos, etanol e clorofórmio-metanol para a remoção dos pigmentos e dos componentes lipídicos. Após a deslipidificação do material, ele foi submetido à extração aquosa com água destilada sob refluxo, por 4 horas a 100 °C, obtendo-se a fração MYRA com rendimento de 7,4 g%. Os resíduos remanescentes da extração aquosa foram submetidos à extração com hidróxido de potássio a 10%, sob refluxo a 100 °C, originando a fração MYRK (13,4 g%). A partir da extração aquosa foi possível a obtenção de duas amostras purificadas, por ultrafiltração em membranas, SMYRA-AMIL-100R e SMYRA-AMIL-50R, as quais apresentaram como composição monossacarídica Rha:Ara:Man:Gal, nas proporções 6,4:4,8:4,8:84,1 e 2,9:4,4:3,9:88,7 respectivamente. A análise do espectro de RMN.⁻¹³C destas frações indicou a presença de galactose na conformação furanosídica, indicando desta maneira, a presença de galactofurananas. A partir da extração alcalina foi possível purificar, por tratamento com solução de Fehling, um polissacarídeo insolúvel em água fria, fração PMYRK-AMIL-SF, e composto principalmente por ramnose (30,1%) e galactose (55,9%). A análise de RMN.⁻¹³C desta fração também indicou que as unidades de galactose estão na conformação furanosídica, e provavelmente (1→3) ligadas, indicando a presença de uma ramnogalactofuranana. Este polissacarídeo assemelha-se à ramnogalactofuranana presente em *Asterochloris* sp (CORDEIRO *et al.*, 2007) que apresenta uma cadeia principal constituída por unidades de Galf (1→3) ligadas, com ramificação em C-6 em aproximadamente 6,4% das unidades. A observação da árvore filogenética de clorófitas liquenizadas e de vida livre (NASH III 2008) revela que as algas do gênero *Myrmecia* se aninham com as algas do gênero *Asterochloris*, indicando que elas estão muito próximas evolutivamente e explica a semelhança estrutural dos polissacarídeos encontrados nesses fotobiontes.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: (A) CÉLULAS VEGETATIVAS COCÓIDES DE <i>Myrmecia Biatorellae</i> (LINHAGEM SAG 8.82) CULTIVADA EM LABORATÓRIO. CLOROPLASTOS PARIETAIS (→) E O NÚCLEO CENTRAL (*). EM CULTURA, PODE SE REPRODUZIR POR AUTÓSPOROS (▲); (B) LÍQUEN <i>Lobaria linita</i> | 3 |
| FIGURA 2: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA LIQUÊNICA <i>M. biatorellae</i> | 8 |
| FIGURA 3: FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA LIQUÊNICA <i>M. Biatorellae</i> | 10 |
| FIGURA 4: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA LIQUÊNICA <i>M. biatorellae</i> | 15 |
| FIGURA 5: PERFIS DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICO (HPSEC) DE FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA <i>Myrmecia Biatorellae</i> : (A) SMYRA-AMIL; (B) SMYRA-AMIL-100R, (C) SMYRA-AMIL-50R E (D) SMYRA-AMIL-50E. DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO..... | 18 |
| FIGURA 6: ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DA SMYRA-AMIL-100R OBTIDA DA MICROALGA LIQUÊNICA <i>M. Biatorellae</i> : (A) E EXPERIMENTO DEPT (B) (EM DMSO- <i>d</i> ₆ A 50 °C). DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m..... | 19 |
| FIGURA 7: ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO SMYRA-AMIL-50R OBTIDA DA MICROALGA LIQUÊNICA <i>M. biatorellae</i> : (A) E EXPERIMENTO DEPT (B) (EM DMSO- <i>d</i> ₆ A 50 °C). DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m..... | 20 |
| FIGURA 8: COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN- ¹³ C (EM DMSO- <i>d</i> ₆ , A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.) DE FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA <i>M. Biatorellae</i> : (A) SMYRA-AMIL-50R; (B) SMYRA-AMIL-100R..... | 21 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 9: PERFIL DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICO (HPSEC) DA FRAÇÃO SMYRK-AMIL OBTIDA DA MICROALGA LIQUÊNICA <i>Myrmecia biatorellae</i> . DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO..... | 22 |
| FIGURA 10: COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES (A) SMYRA-AMIL-100R, (B) SMYRA-AMIL-50R (EM DMSO- <i>d</i> ₆ , A 50 °C) E (C) SMYRK-AMIL (EM D ₂ O, A 50 °C)..... | 23 |
| FIGURA 11: ESPECTROS DE RMN- ¹³ C (EM DMSO- <i>d</i> ₆ , A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.) DE FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA <i>M. Biatorellae</i> : (A) PMYRK-AMIL; (B) PMYRA-AMIL E (C) PMYRK-AMIL-SF..... | 24 |
| FIGURA 12: ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS FOTOBIONTES E ALGAS NÃO LIQUENIZADAS CLORÓFITAS BASEADA NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO 18S rDNA. FONTE: NASH III (2008)..... | 26 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1: RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA <i>Myrmecia Biatorellae</i> | 16 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------------------------|--|
| δ | - deslocamento químico |
| Ara | - arabinose |
| C | - carbono |
| CH ₃ | - grupo metil |
| Da | - daltons |
| DEPT | - <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> |
| DMSO- <i>d</i> ₆ | - dimetilsulfóxido deuterado |
| D ₂ O | - água deuterada |
| <i>f</i> | - furanosídico |
| g | - gramas |
| g% | - g/100g |
| Gal | - galactose |
| Glc | - glucose |
| GLC | - cromatografia líquido-gasosa |
| HPSEC | - cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração |
| KOH | - hidróxido de potássio |
| Man | - manose |
| MYRA | - fração <i>Myrmecia</i> obtida da extração aquosa |
| MYRK | - fração <i>Myrmecia</i> obtida da extração alcalina |
| m/v | - massa por volume |
| NaBH ₄ | - boroidreto de sódio |
| NaN ₃ | - azida de sódio |
| NaNO ₃ | - nitrito de sódio |
| <i>p</i> | - piranosídico |
| Pac.MYRK | - fração precipitado ácido de <i>Myrmecia</i> obtido da extração alcalina |
| PMYRA | - fração precipitado de <i>Myrmecia</i> aquosa obtido após congelamento e degelo de MYRA |

| | |
|-----------------------|--|
| PMYRA-AMIL | - fração precipitado de <i>Myrmecia</i> aquosa obtido após tratamento de PMYRA com amilase |
| PMYRK | - fração precipitado de <i>Myrmecia</i> alcalina obtido após congelamento e degelo de MYRK |
| PMYRK-AMIL | - fração precipitado de <i>Myrmecia</i> alcalina obtido após tratamento de PMYRK com amilase |
| PMYRK-AMIL-SF | - fração precipitado de <i>Myrmecia</i> alcalina obtido após tratamento de PMYRK-AMIL com solução de Fehling |
| p.p.m | - partes por milhão |
| Rha | - ramnose |
| RMN.- ¹³ C | - ressonância magnética nuclear de carbono treze |
| SMYRA | - fração sobrenadante de <i>Myrmecia</i> aquosa obtido após congelamento e degelo de MYRA |
| SMYRA-AMIL | - fração sobrenadante de <i>Myrmecia</i> aquosa obtido após tratamento de SMYRA com amilase |
| SMYRA-AMIL-50E | - fração eluída de <i>Myrmecia</i> aquosa obtida da filtração de SMYRA-AMIL em membrana de 50 000 Da |
| SMYRA-AMIL-50R | - fração retida de <i>Myrmecia</i> aquosa obtida da filtração de SMYRA-AMIL em membrana de 50 000 Da |
| SMYRA-AMIL-100R | - fração retida de <i>Myrmecia</i> aquosa obtida da filtração de SMYRA-AMIL em membrana de 100 000 Da |
| SMYRK | - fração sobrenadante de <i>Myrmecia</i> alcalina obtido após congelamento e degelo de MYRK |
| SMYRK-AMIL | - fração sobrenadante de <i>Myrmecia</i> alcalina obtido após tratamento de SMYRK com amilase |
| TFA | - ácido trifluoracético |
| v/v | - volume por volume |
| Xyl | - xilose |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 LIQUENS | 1 |
| 1.2 A MICROALGA <i>Myrmecia biatorellae</i> BOYE-PETERSEN..... | 2 |
| 1.3 POLISSACARÍDEOS DE FOTOBIONTES LIQUÊNICOS..... | 3 |
| 2 OBJETIVOS..... | 6 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 6 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 6 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 7 |
| 3.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DA MICROALGA..... | 7 |
| 3.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS..... | 7 |
| 3.2.1 Extração com etanol | 7 |
| 3.2.2 Extração com clorofórmio-metanol..... | 8 |
| 3.2.3 Extração aquosa..... | 8 |
| 3.2.4 Extração alcalina..... | 9 |
| 3.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS..... | 9 |
| 3.3.1 Purificação por congelamento e degelo..... | 9 |
| 3.3.2 Purificação por tratamento com α -amilase..... | 11 |
| 3.3.3 Purificação por ultrafiltração em membranas..... | 11 |
| 3.3.4 Purificação por precipitação em solução de Fehling..... | 11 |
| 3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS..... | 12 |
| 3.4.1 Composição monossacarídica..... | 12 |
| 3.4.1.1 Hidrólise ácida total..... | 12 |
| 3.4.1.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise..... | 12 |
| 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 12 |
| 3.5.1 Métodos cromatográficos..... | 12 |
| 3.5.1.1 Cromatografia líquido-gasosa..... | 13 |
| 3.5.1.2 Determinação da homogeneidade..... | 13 |
| 3.5.2 Métodos espectroscópicos..... | 13 |
| 3.5.2.1 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN.- ^{13}C)..... | 13 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 14 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| 5 CONCLUSÕES..... | 27 |
| REFERÊNCIAS..... | 28 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 LIQUENS

Líquens ou fungos liquenizados representam uma associação simbiótica entre um fungo, o micobionte, e um organismo fotossintético, que pode ser uma alga verde, o fotobionte, ou uma cianobactéria, o cianobionte. A natureza dualística de muitos líquens é bastante reconhecida e, ainda que incomum, sabe-se que alguns líquens envolvem três ou mais simbiontes (NASH III, 2008).

Nesta associação simbiótica, fungos e algas verdes, fungos e cianobactérias ou todos os três, fungos, algas verdes e cianobactérias, se comportam como um organismo composto, formando o talo liquênico (MIAO *et al.*, 2001). Este apresenta forma e estrutura interna constantes e definidas, o qual não tem nenhuma semelhança morfológica com a alga, a cianobactéria, ou o fungo crescidos separadamente (HALE, 1979).

Estima-se que foram descritos cerca de 18.500 táxons diferentes de líquens (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2007), constituindo-se em aproximadamente 46% de todos os ascomicetos e, aproximadamente, um quinto de todos os fungos conhecidos (HAWKSWORTH, 1988).

O componente fúngico predomina na associação simbiótica (BARINAGA, 1995) e pode ser um ascomiceto, basidiomiceto ou deuteromiceto. Quanto ao organismo fotossintético, a maioria são algas verdes (classe Chlorophyceae) presentes em aproximadamente 90% dos líquens, e em menor ocorrência cianobactérias, encontradas em cerca de 10% das associações (TSCHERMAK-WOESS, 1989; AHMADJIAN, 1993).

As cianobactérias são representadas pelos gêneros *Nostoc* e *Scytonema* (AHMADJIAN, 1993; HAWKSWORTH e HILL, 1984), mas gêneros como *Calothrix* (TSCHERMAK-WOESS, 1988; FRIELD, 1996) e *Fischerella* (incluindo: *Hyphomorpha*, *Stigonema* e *Mastigocladus*) também tiveram ocorrência observada nas associações liquênicas. Outras formas unicelulares como *Gloecocapsa*, *Gloetotheca* e *Synechocystis* também foram reportadas (RAI e BERGMAN, 2002). Dentre as algas

clorofícias, os gêneros mais comuns são *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Coccomyxa* e *Dictyochloropsis* (TSCHERMAK-WOESS, 1989; AHMADJIAN, 1993).

Aproximadamente 32 gêneros, entre algas verdes e cianobactérias, já foram identificados como simbiontes em líquens (AHMADJIAN, 1993):

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

No entanto, a porcentagem de espécies de líquens nos quais o gênero do fotobionte é reportado compreende apenas a 2% do número total de espécies liquênicas descritas (TSCHERMAK-WOESS, 1989; HELMS, 2003), demonstrando ser, dessa maneira, uma área da ciência ainda muito pouco explorada.

1.2 A MICROALGA *Myrmecia biatorellae* BOYE-PETERSEN

Myrmecia biatorellae é uma microalga verde pertencente à classe Trebouxiophyceae, na qual também se encontra a microalga *Trebouxia*, que é o gênero de fotobionte mais comum em líquens (AHMADJIAN, 1993; NASH III, 2008).

A microalga *M. biatorellae* é unicelular de morfologia cocóide (Figura 1a). As células vegetativas apresentam cloroplastos parietais e não possuem pirenóides e o núcleo ocupa posição central na célula. Esta alga ocorre como fotobionte do líquen *Lobaria linita* (Figura 1b) (NASH III, 2008).

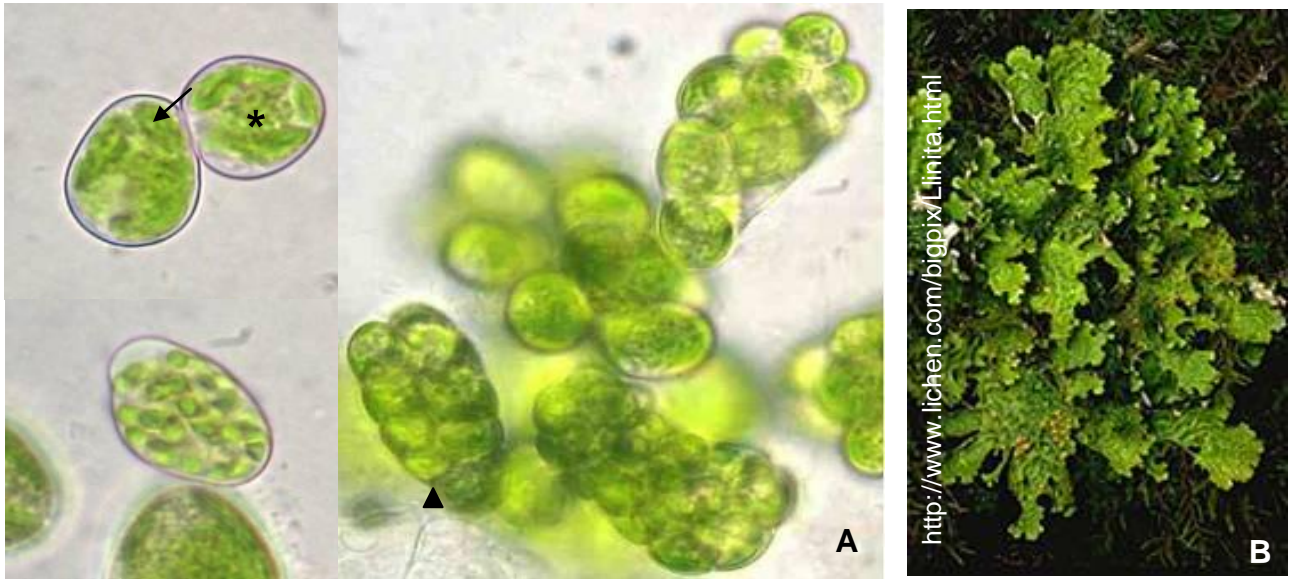


FIGURA 1: (A) CÉLULAS VEGETATIVAS COCÓIDES DE *Myrmecia Biatorellae* (LINHAGEM SAG 8.82) CULTIVADA EM LABORATÓRIO. CLOROPLASTOS PARIETAIS (→) E O NÚCLEO CENTRAL (*). EM CULTURA, PODE SE REPRODUZIR POR AUTÓSPOROS (▲); (B) LÍQUEN *Lobaria linita*.

1.3 POLISSACARÍDEOS DE FOTOBIONTES LIQUÊNICOS

Trabalhos com base em culturas puras de algas originadas de talos liquênicos foram reportados na literatura, principalmente no que diz respeito à fixação de CO₂ do meio (GOLDSMITH *et al.*, 1997) e ao movimento de carboidratos de baixo peso molecular e polióis da alga para o fungo (AHMADJIAN, 1993).

Com relação aos polissacarídeos de fotobiontes, dados de composição monossacarídica da parede celular de algumas espécies de *Trebouxia* (*Asterochloris* sensu RAMBOLD *et al.*, 1998) e *Pseudotrebouxia* (*Trebouxia* sensu RAMBOLD *et al.*, 1998) foram investigadas por König e Peveling (1984). Foi verificado que a parede celular de *Trebouxia* e *Pseudotrebouxia* consiste de algumas camadas (S1 a S5) e que os monossacarídeos encontrados foram a ramnose, arabinose, xilose, galactose, glucose, manose, glucosamina e galactosamina, com proporções variadas dependendo da espécie. Não houve ocorrência de ácidos urônicos.

A elucidação estrutural dos polissacarídeos presentes em *Trebouxia* foi primeiramente realizada por Cordeiro *et al.* (2005), os quais encontraram uma

galactofuranana. Este polissacarídeo apresentava uma cadeia principal composta por unidades de β -Gal f unidas por ligações (1 \rightarrow 5), substituídas em pequena proporção no C-6 por terminais não redutores de β -Gal f .

Outro polissacarídeo foi descrito para *Trebouxia*, uma manogalactofuranana (CORDEIRO *et al.*, 2008). Este heteropolissacarídeo também apresentava uma cadeia principal de unidades de β -Gal f unidas por ligações (1 \rightarrow 5), entretanto, as cadeias laterais presentes no C-6 destas unidades apresentavam estruturas mais complexas. Estas cadeias laterais eram compostas por unidades de Man p 4-O-, 2,4-di-O-, 2,3-di-O- e 3,6-di-O-substituídas e as extremidades terminais por Gal f e Man p .

Polissacarídeos podem ter um papel importante no processo de reconhecimento entre os simbioses liquênicos, uma vez que estudos demonstraram que lectinas produzidas pelo micobionte interagem com ligantes específicos localizados na parede celular do fotobionte discriminando entre algas compatíveis e incompatíveis (BUBRICK e GALUN, 1980; BUBRICK *et al.*, 1981; 1983; MOLINA *et al.*, 1998a, b). Segundo, Fontaniella *et al.* (2004), o monossacarídeo reconhecido pelas lectinas naturais de líquens é a galactose, embora os autores não especifiquem entre Gal p ou Gal f .

Devido à sua estrutura, rica em unidades de galactose furanosídica, as quais são citadas por alguns autores (SUZUKI *et al.*, 1997; LEVERY *et al.*, 1998) como moléculas chave envolvidas em mecanismos de reconhecimento antigênico, a manogalactofuranana encontrada em *Trebouxia* sp. foi testada quanto à sua atividade biológica. Este polissacarídeo provocou alterações morfológicas em macrófagos peritoneais de camundongo *in vitro* em todas as concentrações testadas (1, 5, 10, 50 e 150 μ g/mL), e na concentração de 150 μ g/mL aumentou em 60% a atividade destes macrófagos em comparação com o controle (CORDEIRO *et al.*, 2008).

A partir do fotobionte *Asterochloris* sp., Cordeiro *et al.* (2007) purificaram uma xiloramnogalactofuranana. Esta apresentou uma cadeia principal constituída por unidades de Gal f (1 \rightarrow 3) ligadas, com ramificação em C-6 em aproximadamente 6,4% das unidades. As cadeias laterais apresentaram unidades de Gal f 5- e 6-O-substituídas, bem como unidades de Rhap 2-O, 3-O e 2,3-di-O-substituídas, e os terminais não redutores eram compostos por xilose e galactofuranose.

Recentemente, Cordeiro *et al.* (2010) ao investigar a estrutura dos carboidratos de *Coccomyxa mucigena*, fotobionte do fungo liquenizado *Peltigera*

aphthosa, verificaram a produção de uma manogalactana naturalmente O-metilada, com cadeia principal constituída por unidades de β -Galp (1 \rightarrow 6) ligadas, parcialmente 3-O-substituídas por unidades de β -Galp, 3-O-Me- α -Manp ou α -Manp.

Como citado anteriormente, embora cerca de 32 gêneros de fotobiontes já tenham sido identificados em líquens, o conteúdo polissacarídico destes fotobiontes continua ainda muito pouco explorado, sendo portanto, um campo aberto à descoberta de novas moléculas, tanto em estrutura como em aplicabilidade biotecnológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Extrair, purificar e caracterizar estruturalmente os polissacarídeos da microalga liquênica *Myrmecia biatorellae* cultivada aposimbioticamente.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Extrair e quantificar as frações solúveis e insolúveis nos extratos etanólico, clorofórmio-metanólico, aquoso e alcalino da microalga liquênica *Myrmecia biatorellae*;
- 2) Purificar os polissacarídeos existentes em maior quantidade no extrato aquoso e alcalino;
- 3) Analisar a composição monossacarídica dos polissacarídeos purificados;
- 4) Caracterizar as estruturas químicas dos polissacarídeos purificados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DA MICROALGA

A microalga *Myrmecia biatorellae* (linhagem 8.82), obtida do Culture Collection of Algae (SAG), da University of Göttingen (Alemanha), foi cultivada em laboratório em meio nutriente orgânico para *Trebouxia*, segundo Ahmadjian (1993), 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). A biomassa obtida (41,23 g) foi gentilmente cedida para este estudo pela aluna Vanessa de Fátima Reinhardt.

3.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A biomassa da microalga foi submetida a quatro processos extrativos. Inicialmente, foram realizadas as extrações com os solventes orgânicos, etanol e clorofórmio-metanol, para a remoção dos pigmentos e dos componentes lipídicos. Após a deslipidificação do material, este foi submetido às extrações aquosa e alcalina para a obtenção dos carboidratos. A Figura 2 representa um esquema geral destes processos extrativos, os quais serão descritos a seguir.

3.2.1 Extração com etanol

Neste processo extrativo, a biomassa (41,23 g) foi tratada com 1 L de etanol absoluto durante 3 horas, sob refluxo a 70 °C e, em seguida, filtrada. Este procedimento foi repetido até a remoção total dos pigmentos (nove vezes). Os extratos foram reunidos e evaporados até *secura* em rotaevaporador, para calcular o rendimento. O material residual foi seco a temperatura ambiente e então submetido ao próximo processo de extração, com clorofórmio-metanol.

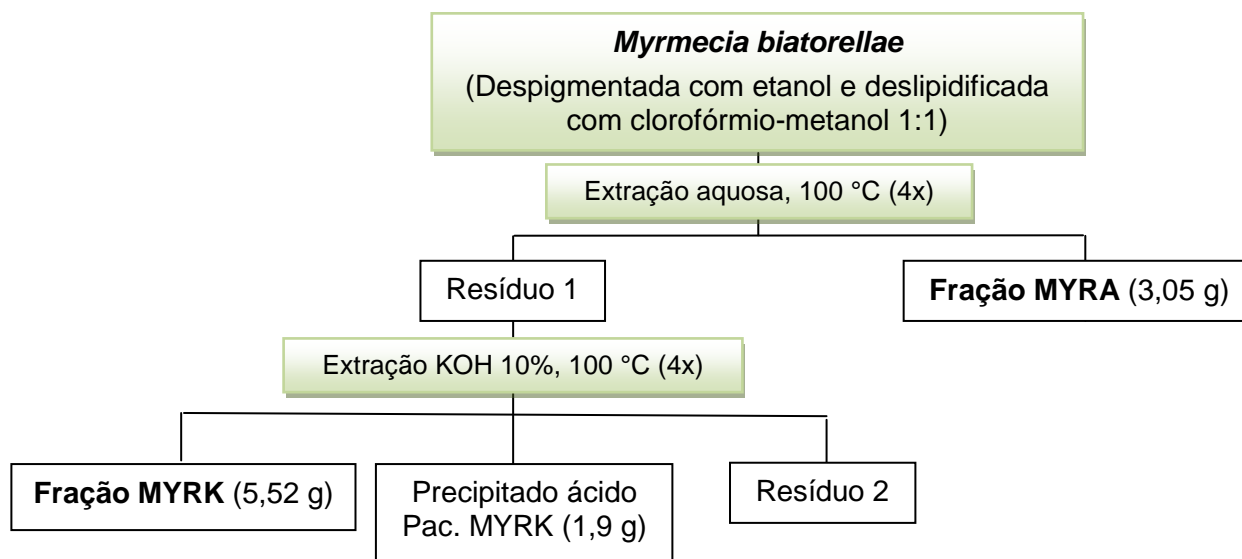


FIGURA 2: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA LIQUÊNICA *M. biatorellae*.

3.2.2 Extração com clorofórmio-metanol

O resíduo proveniente da extração com etanol passou apenas uma vez pela extração com clorofórmio-metanol (1:1, v/v) durante 3 horas, sob refluxo a 70 °C e depois foi filtrado. O extrato foi evaporado até securo em rotaevaporador para calcular o rendimento. O material residual foi seco a temperatura ambiente e então foi submetido à extração aquosa.

3.2.3 Extração aquosa

O material residual remanescente da extração com clorofórmio-metanol foi tratado com 1 L de água destilada, sob refluxo por 4 horas a 100 °C, sendo filtrado em seguida. Este procedimento foi repetido por quatro vezes. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador, reunidos e tratados com excesso de etanol (3:1, v/v) para separar os carboidratos de alta massa molecular (precipitado) dos de baixa massa molecular (sobrenadante). Em seguida, o material foi centrifugado e o precipitado foi liofilizado. O sobrenadante etanólico foi evaporado em rotaevaporador para redução do volume e liofilizado para obter os carboidratos de baixa massa molar. A extração aquosa originou a fração denominada MYRA (fração *Myrmecia*

obtida da extração aquosa) e o resíduo final (Resíduo 1) foi submetido à extração alcalina.

3.2.4 Extração alcalina

O material residual resultante das extrações aquosas foi tratado com 1 L de solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 10%, por 4 horas sob refluxo, a 100 °C. Este procedimento foi realizado por quatro vezes. Os extratos foram filtrados e neutralizados com ácido acético. Após a neutralização, houve a formação de precipitado, o qual foi removido por centrifugação. O sobrenadante e o precipitado foram então concentrados em rotaevaporador, dialisados e liofilizados e respectivamente denominados MYRK (fração *Myrmecia* obtida da extração alcalina) e Pac.MYRK (fração precipitado ácido de *Myrmecia* da extração alcalina).

3.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As metodologias utilizadas para purificar os polissacarídeos estão sumarizadas na Figura 3 e serão descritas a seguir.

3.3.1 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 (identificados com as letras S para sobrenadante e P para precipitado).

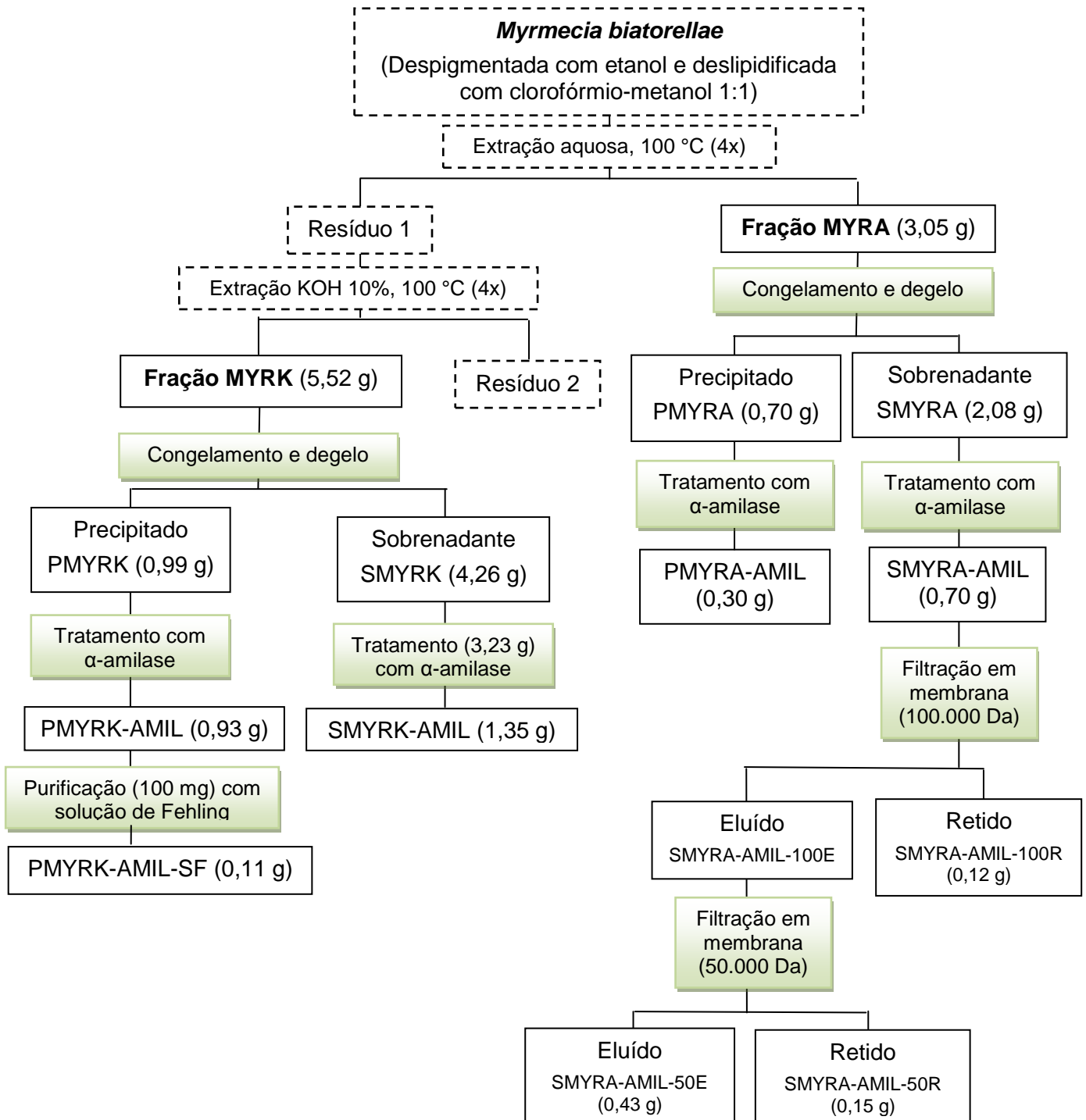


FIGURA 3: FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA LIQUÊNICA *M. Biatorellae*.

3.3.2 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 seguida, as amostras foram dialisadas por 48 horas, congeladas e liofilizadas. O volume de α -amilase utilizado variou de 100 a 300 μ l de acordo com a porcentagem de glucose presente nas amostras.

As frações que receberam esse tratamento enzimático foram identificadas com a sua denominação original sucedida por AMIL.

3.3.3 Purificação por ultrafiltração em membranas

A fração foi, primeiramente, dissolvida em água destilada em um volume suficiente para total solubilização, sobre agitador magnético e depois filtrada em membranas de ultrafiltração com limites de exclusão de 100.000 Da e 50.000 Da (Sartorius®), utilizando suporte adequado para este tipo de membrana. Após as filtrações, as frações eluída e retida pelas membranas foram liofilizadas.

A fim de identificar estas frações, houve o acréscimo dos números 50 e 100, 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.

3.3.4 Purificação por precipitação em solução de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965).

A fração foi solubilizada em 10 mL da solução A de Fehling sobre agitador magnético com aquecimento. Posteriormente, a amostra foi transferida para tubos do tipo *Eppendorf*® e centrifugada por 3 minutos, para remoção de precipitado que não solubilizou completamente. O sobrenadante dos tubos foi reunido em um tubo de ensaio e foi adicionado 10 mL 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, porém esta não ocorreu.

Em seguida, a amostra foi neutralizada com ácido acético e dialisada por 24 horas. O material dialisado foi deionizado por resina catiônica fortemente ácida, filtrado em algodão, neutralizado com hidróxido de sódio e novamente dialisado e por fim, liofilizado.

A fração agora tratada com solução de Fehling recebeu a sigla SF (sobrenadante de Fehling).

3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS

3.4.1 Composição monossacarídica

A composição monossacarídica dos polissacarídeos isolados foi analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC) após hidrólise, redução e acetilação. Os monossacarídeos foram identificados pelos seus respectivos valores de tempo de retenção, comparados com padrões.

3.4.1.1 Hidrólise ácida total

Dois miligramas das frações foram tratados com 1,4 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 1 M, a 100 °C, *overnight* (12-15 horas). Após este tempo, o ácido foi eliminado das amostras por evaporação em estufa a aproximadamente 50 °C, sendo em seguida, submetidas à redução e acetilação.

3.4.1.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4) em temperatura ambiente, pH 9-10, *overnight* (12-15 horas) (WOLFROM; 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), ou *overnight* (12-15 horas) a temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). 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 acetato de sódio anidro. O clorofórmio foi evaporado e os acetatos de alditóis analisados por cromatografia líquido-gasosa.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Métodos cromatográficos

3.5.1.1 Cromatografia líquido-gasosa (GLC)

As análises cromatográficas em fase líquido-gasosa foram realizadas usando-se um cromatógrafo a gás modelo Trace GC-Ultra Thermo, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) revestida com DB-225.

As injeções foram feitas diretamente na coluna a 100 °C, mantendo-se essa temperatura por 0,1 minuto, gradualmente houve o aumento de 60 °C/min, até 230 °C, sendo essa temperatura mantida constante até o final da análise. O gás hélio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL/min.

3.5.1.2 Determinação da homogeneidade

As amostras foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio e azida na concentração de 1 mg/mL sob agitação. Em seguida, foram filtradas através de membranas de acetato de celulose de 0,22 µm (Millipore®).

Posteriormente, foi realizada cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência, utilizando um cromatógrafo WATERS, equipado com detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação com limites de exclusão de $1 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ Da em série. O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_3 0,1 M contendo NaN_3 200 ppm num fluxo de 0,6 mL/min, monitorados por bomba peristáltica WATERS 515. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa ASTRA (WAYTT TECHNOLOGY).

3.5.2 Métodos espectroscópicos

3.5.2.1 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN-¹³C)

Os espectros de RMN-¹³C foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance DRX 400, com frequência de 100 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, relativos a ressonância dos grupos CH_3 do padrão interno dos solventes, acetona (30,2 ppm) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6 , 39,7 ppm).

Os polissacarídeos foram dissolvidos em óxido de deutério (D_2O) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) de acordo com a solubilidade, as amostras foram colocadas em tubos com diâmetro de 5 mm, e as análises foram realizadas em temperatura de 50 °C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A biomassa (41,23 g) da microalga *Myrmecia biatorellae* foi submetida à extração com etanol e clorofórmio-metanol 1:1 para a remoção de pigmentos e deslipidificação. Os extratos desses dois procedimentos foram unidos e o rendimento total foi de 36,6 g% (15,08 g).

O material deslipidificado foi submetido à extração com água para obtenção de seus polissacarídeos (Figura 4). O extrato aquoso foi precipitado em etanol e os polissacarídeos recuperados por centrifugação, obtendo-se um rendimento de 7,4 g% (Fração MYRA). A análise da composição monossacarídica desta fração demonstrou, principalmente, a presença de galactose e glucose, com pequenas quantidades de ramnose, arabinose, xilose e manose (Tabela 1).

A fração MYRA passou por sucessivos processos de congelamento e degelo fornecendo duas frações, uma sobrenadante (fração SMYRA) com 5,04 g% de rendimento e a outra precipitado (fração PMYRA), cujo rendimento foi de 1,70 g%. A análise da composição monossacarídica de tais frações indicou que ambas são compostas predominantemente por glucose e galactose, respectivamente 59,7% e 29,8% para a fração solúvel em água fria, SMYRA, e 57,0% e 26,0% para a fração insolúvel, PMYRA, a qual também possui ramnose (13,2%) como um dos monossacarídeos mais abundantes (Tabela 1).

No espectro de RMN-¹³C da fração SMYRA foi observado sinais característicos em δ 100,1 para C-1 das unidades de α -Glc_p, um sinal em δ 78,9 para C-4 substituído e um sinal em δ 60,6 correspondente aos átomos de carbono ligados a grupos hidroxil primários não-substituídos (C-6) os quais sugerem a presença de amilose (unidades de α -Glc_p (1→4) ligadas) e corroboraram com a observação de glucose na composição monossacarídica desta fração. Desta maneira, esta fração foi tratada com α -amilase originando a fração SMYRA-AMIL (Figura 4), cuja análise da composição monossacarídica revelou elevada proporção de galactose (67,0%), seguida por manose (14,4%) e ramnose (10,4%).

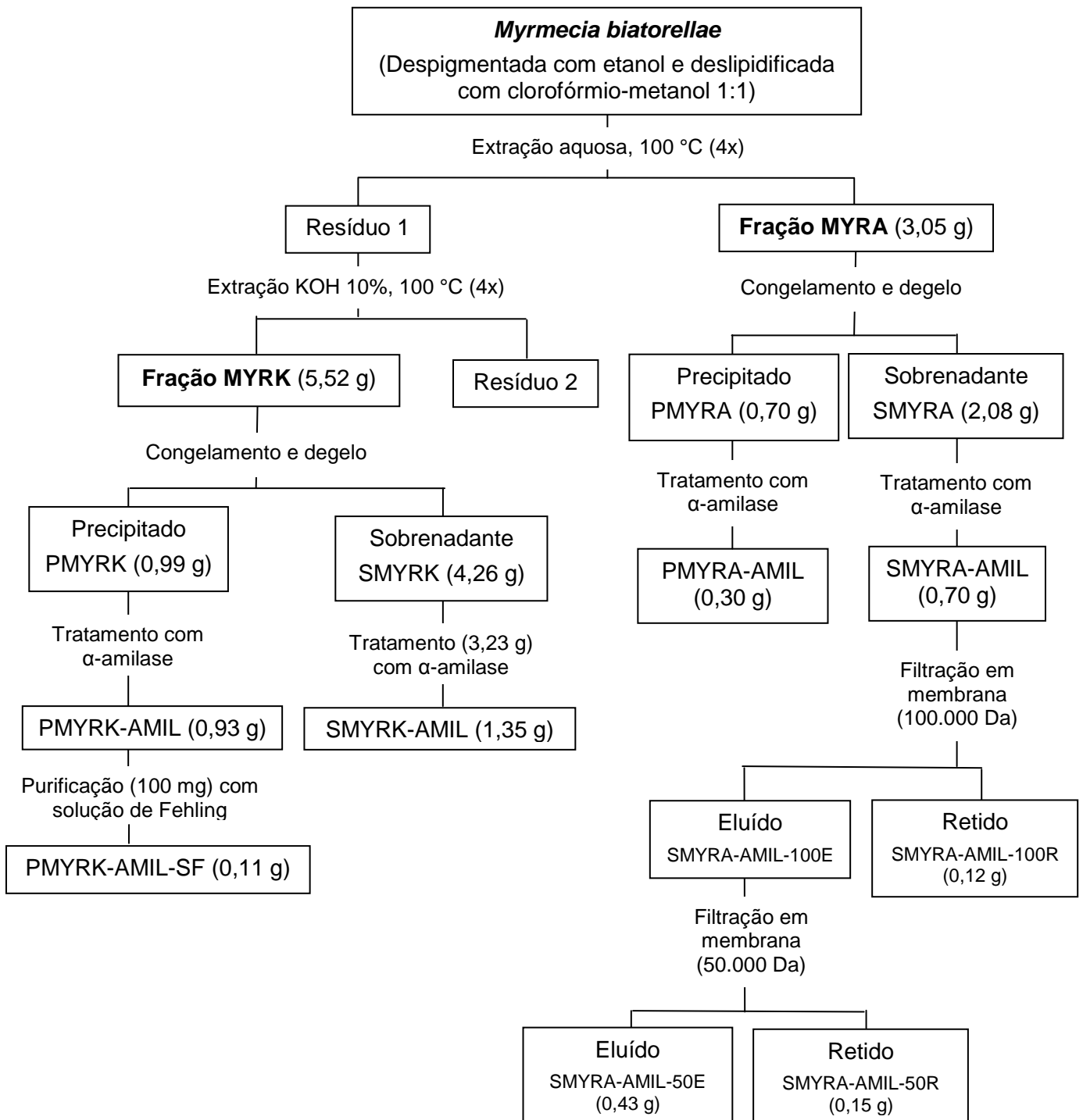


FIGURA 4: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA LIQUÊNICA *M. biatorellae*.

TABELA 1: RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia Biatorellae*

| Frações | | Rendimento (g) | Composição monossacarídica (mol%) ^a | | | | | |
|---------------------------------|-----------------|-------------------|--|-----|-----|------|------|------|
| | | | Rha | Ara | Xyl | Man | Gal | Glc |
| Frações brutas | MYRA | 3,05 | 2,7 | 1,0 | 0,6 | 2,4 | 50,0 | 43,0 |
| | MYRK | 5,52 | 8,0 | 1,9 | 2,0 | 3,4 | 34,6 | 49,8 |
| Frações solúveis em água fria | SMYRA | 2,08 | 4,2 | 1,0 | - | 5,2 | 29,8 | 59,7 |
| | SMYRA-AMIL | 0,70 | 10,4 | 2,9 | 1,1 | 14,4 | 67,0 | 3,9 |
| | SMYRA-AMIL-100R | 0,12 | 6,4 | 4,8 | - | 4,8 | 84,1 | - |
| | SMYRA-AMIL-50R | 0,15 | 2,9 | 4,4 | - | 3,9 | 88,7 | - |
| | SMYRA-AMIL-50E | 0,43 | 5,2 | 5,4 | 3,6 | 11,3 | 74,5 | - |
| | SMYRK | 4,26 | 2,3 | 1,7 | - | 3,7 | 48,0 | 44,3 |
| | SMYRK-AMIL | 1,35 | 6,6 | 3,6 | - | 9,6 | 80,2 | - |
| Frações insolúveis em água fria | PMYRA | 0,70 | 13,2 | - | 0,7 | 3,0 | 26,0 | 57,0 |
| | PMYRA-AMIL | 0,30 | 19,3 | 2,8 | 4,4 | 7,5 | 55,2 | 10,7 |
| | PMYRK | 0,99 | 23,9 | 2 | 3,1 | 4,34 | 47,4 | 21,2 |
| | PMYRK-AMIL | 0,93 | 18,3 | - | - | 5,4 | 62,7 | 12,9 |
| | PMYRK-AMIL-SF | 0,11 | 30,1 | 2,3 | 7,6 | 3,9 | 55,9 | - |

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

O perfil de eluição da fração SMYRA-AMIL, por cromatografia de exclusão estérica (HPSEC), indica a heterogeneidade desta fração (Figura 5a), que foi dissolvida em volume de água suficiente para sua total solubilização (aproximadamente 20 mL) e posteriormente submetida à purificação por ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 100.000 Da (Figura 4)

gerando uma fração retida (SMYRA-AMIL-100R) e uma fração eluída (SMYRA-AMIL-100E).

A fração SMYRA-AMIL-100R é composta basicamente por galactose (84,1%) (Tabela 1) e apresentou um perfil de eluição homogêneo quando analisado por cromatografia de exclusão estérica (Figura 5b), apresentando apenas um pico principal. O espectro de RMN-¹³C (Figura 6a) apresentou três sinais de C-1 em δ 106.5, 108.0 e 108.4 referentes às unidades de galactose na conformação furanosídica, e um sinal em δ 100,5 referente às unidades piranosídicas. No experimento DEPT (Figura 6b) houve a inversão dos sinais em δ 69.2 e 73.8, indicando a existência de C-5 ou C-6 substituídos. O sinal de C-6 das unidades de ramnose pode ser visto em δ 17.8. O sinal em δ 58.5 pode ser atribuído a grupamentos $-O-\underline{C}H_3$. Uma comparação dos sinais encontrados com dados da literatura (SØRUM *et al.*, 1997; AHRAZEM *et al.*, 2001; PERRY e MACLEAN, 2004; LEMERCINIER e JONES, 2005; PRIETO *et al.*, 2007) sugere que o sinal em δ 89.3 é referente ao C-2 substituído das unidades de Galf. A análise de metilação desta fração está sendo realizada, para a determinação da estrutura química detalhada da galactofuranana presente.

A fração eluída pela membrana de 100.000 Da (fração SMYRA-AMIL-100E) foi filtrada em membrana com limite de exclusão de 50.000 Da (Figura 4) e originou duas novas frações, retida (SMYRA-AMIL-50R) e eluída (SMYRA-AMIL-100-50E). Os componentes monossacarídicos destas frações estão indicados na Tabela 1 e verifica-se que em ambas há o predomínio de galactose.

O perfil de eluição por cromatografia de exclusão estérica da fração SMYRA-AMIL-50R (Figura 5c) demonstrou apenas um pico principal, o que indica se tratar de uma fração homogênea. Na fração SMYRA-AMIL-50E ainda não ocorreu uma completa separação dos polissacarídeos, conforme observado na análise por HPSEC (Figura 5d), portanto, novas filtrações em membranas com limite de exclusão de 30.000 e 10.000 Da serão futuramente realizadas.

O espectro de RMN-¹³C da fração SMYRA-AMIL-50R (Figuras 7 e 8) demonstrou ser semelhante à fração SMYRA-AMIL-100R (Figuras 6 e 8) e a análise de metilação também está sendo realizada, para a determinação da estrutura química detalhada.

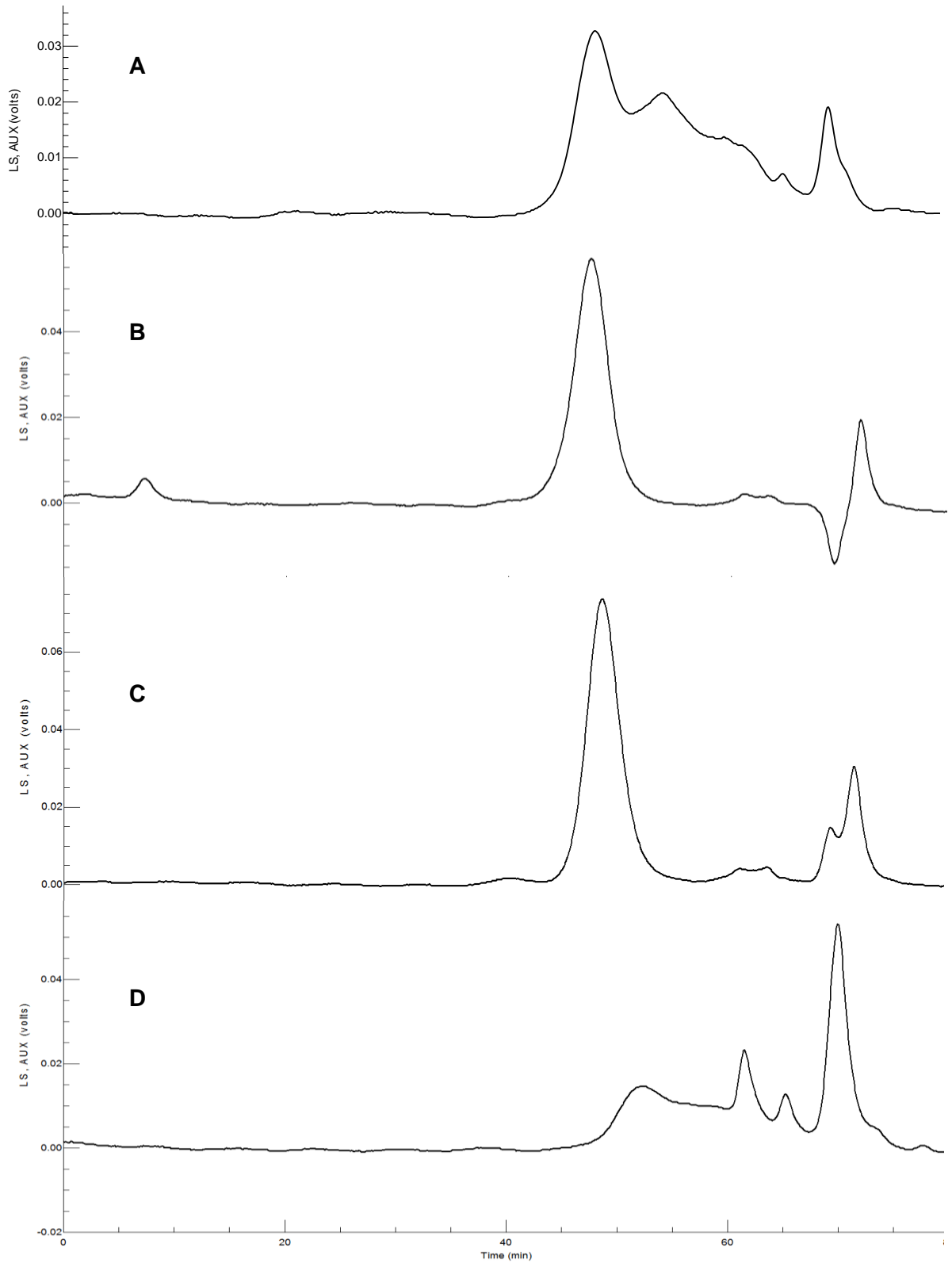


FIGURA 5: PERFIS DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICO (HPSEC) DE FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia Biatorellae*: (A) SMYRA-AMIL; (B) SMYRA-AMIL-100R, (C) SMYRA-AMIL-50R E (D) SMYRA-AMIL-50E. DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.

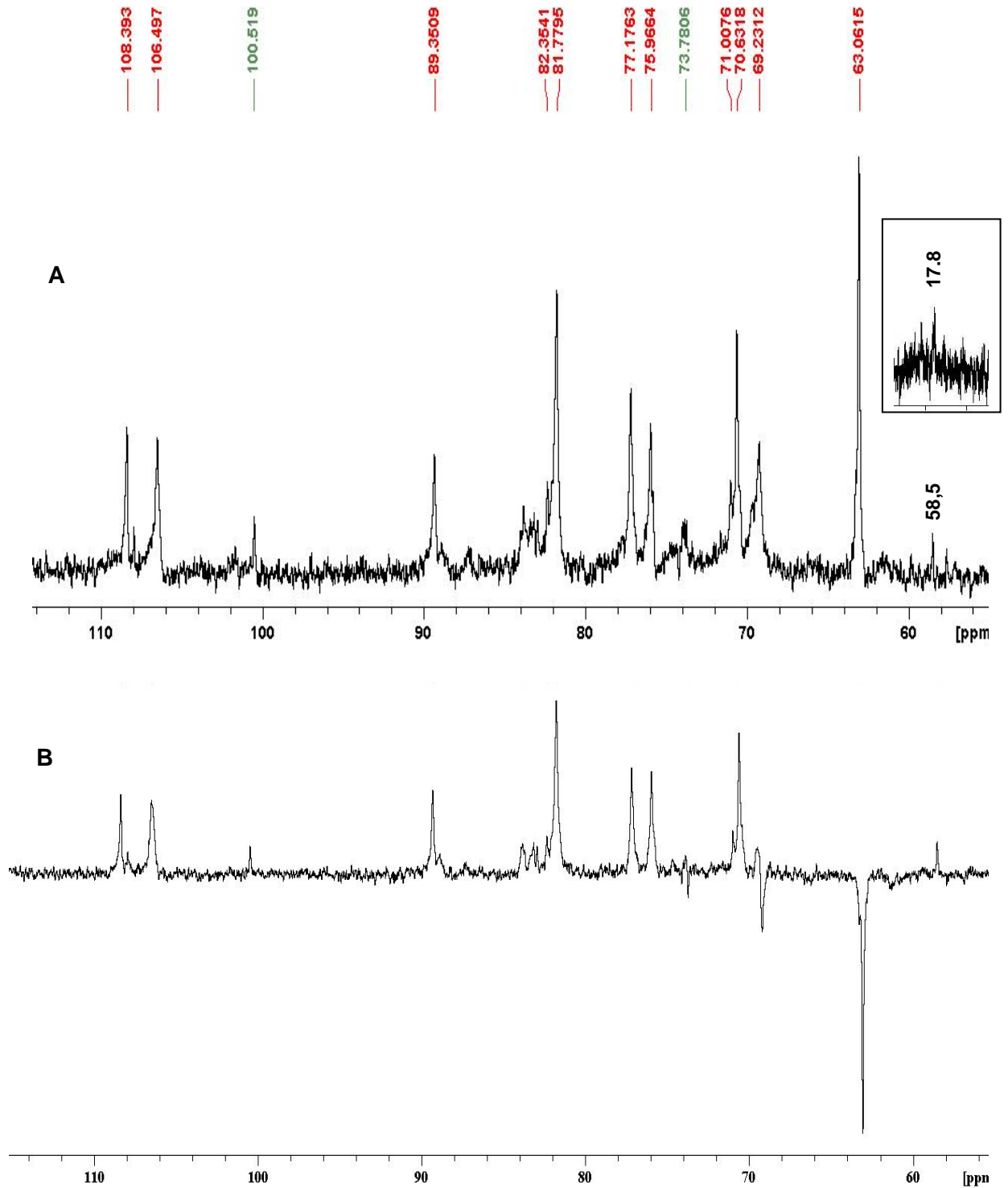


FIGURA 6: ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DA SMYRA-AMIL-100R OBTIDA DA MICROALGA LIQUÊNICA *M. Biatorellae*: (A) E EXPERIMENTO DEPT (B) (EM DMSO- d_6 A 50 °C). DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.

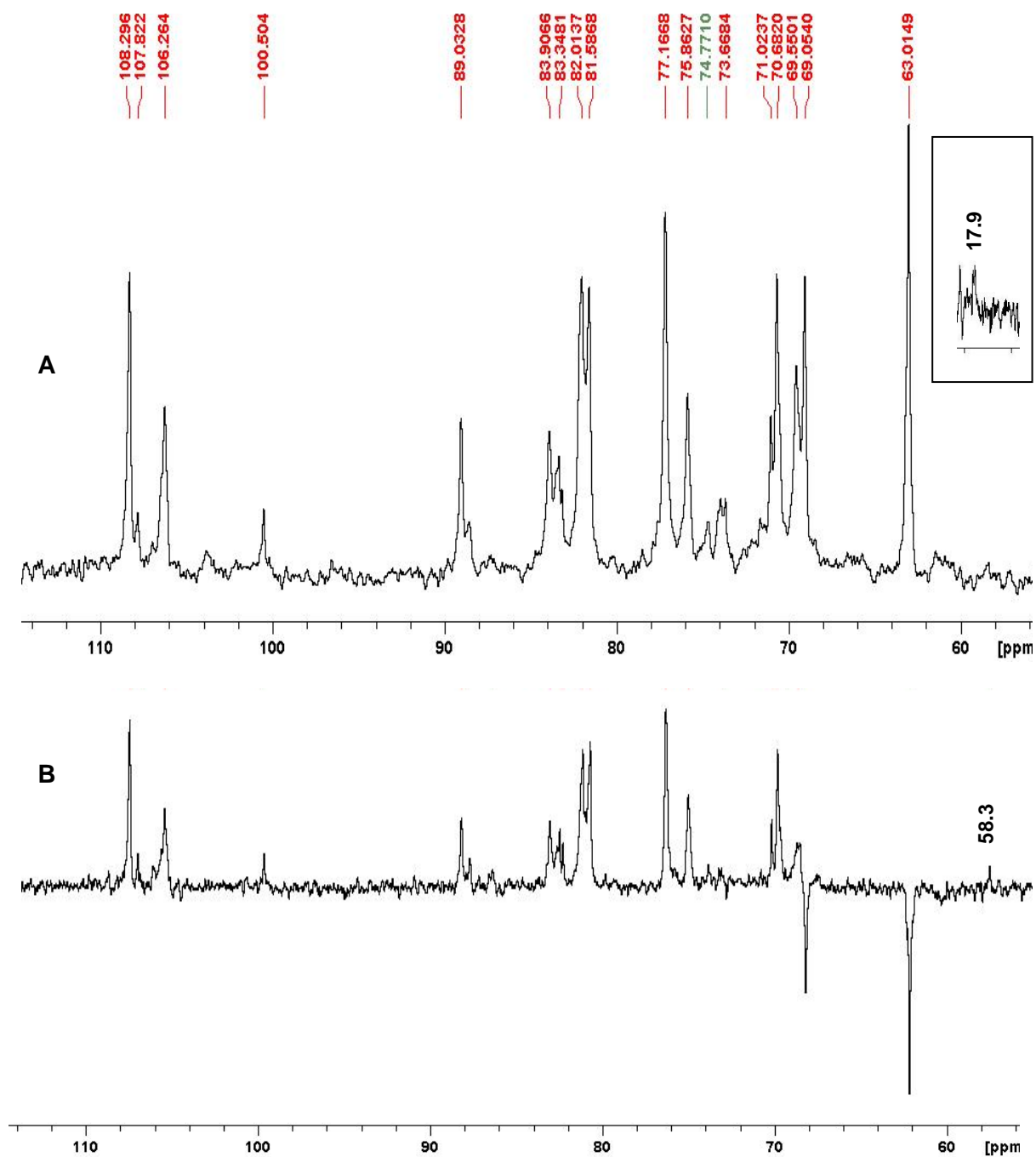


FIGURA 7: ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DA FRAÇÃO SMYRA-AMIL-50R OBTIDA DA MICROALGA LIQUÊNICA *M. biatorellae*: (A) E EXPERIMENTO DEPT (B) (EM DMSO- d_6 A 50 °C). DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.

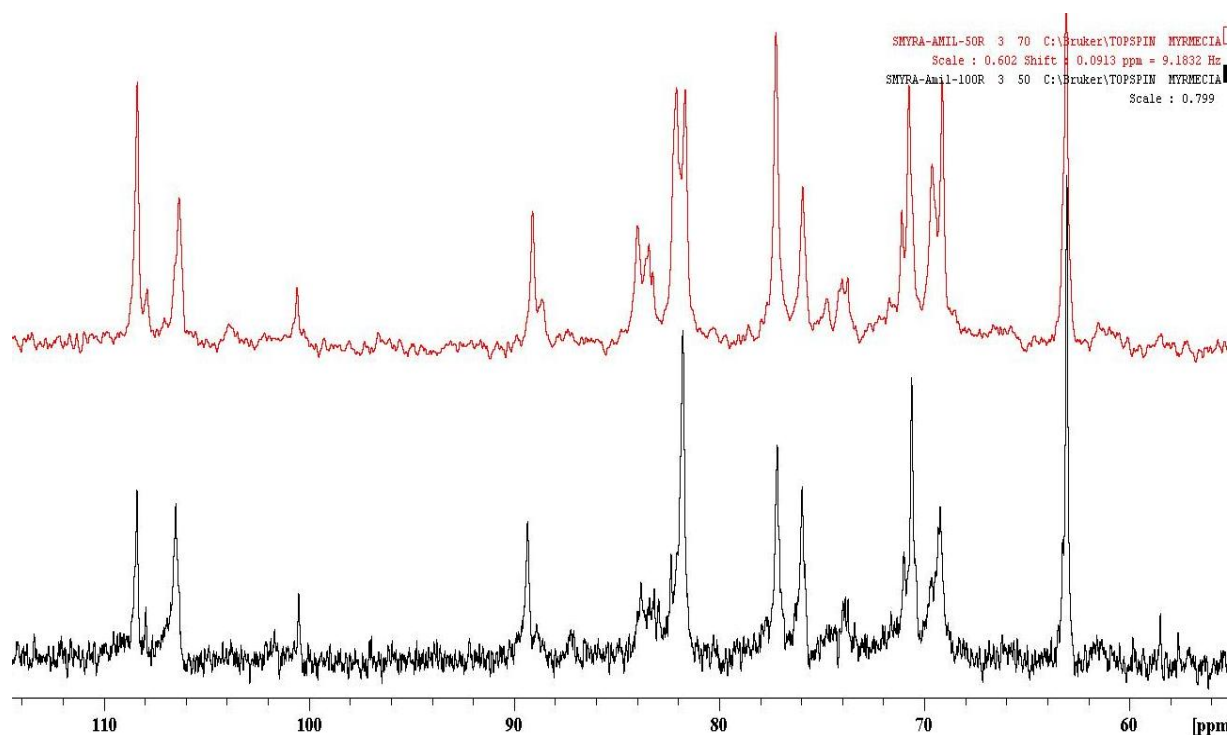


FIGURA 8: COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN- ^{13}C (EM DMSO- d_6 , A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.) DE FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA *M. Biatorellae*: (A) SMYRA-AMIL-50R; (B) SMYRA-AMIL-100R.

O resíduo remanescente da extração aquosa foi submetido à extração com KOH a 10% e os extratos obtidos foram neutralizados. Após a neutralização do extrato alcalino, houve a formação de precipitado, o qual foi removido por centrifugação (fração Pac.MYRK). O sobrenadante (Fração MYRK) e o precipitado foram então dialisados e liofilizados, tendo como rendimento 13,4 g% e 4,6 g%, respectivamente. A análise da composição monossacarídica da fração MYRK demonstrou que contém principalmente glucose e galactose, juntamente com ramnose, arabinose, xilose, manose (Tabela 1).

A fração MYRK foi submetida ao processo de congelamento e degelo, formando um sobrenadante (fração SMYRK) com 10,33 g% de rendimento e um precipitado (fração PMYRK), cujo rendimento foi de 2,40 g%. A análise da composição monossacarídica da SMYRK mostrou, basicamente, galactose (48,0%) e glucose (44,3%). Devido ao alto teor de glucose, esta fração também foi tratada

com α -amilase, dando origem à fração SMYRK-AMIL, composta principalmente por galactose (80,2%) e manose (9,6%) (Tabela 1).

A análise do perfil de eluição da fração SMYRK-AMIL por cromatografia de exclusão estérica revelou dois picos (Figura 9), o que indica uma mistura de polissacarídeos e a necessidade de outros processos de purificação os quais serão realizados futuramente. Entretanto, uma comparação do espectro de RMN- ^{13}C desta fração com os espectros das frações SMYRA-AMIL-100R e SMYRA-AMIL-50R (Figura 10) sugere que estas frações são semelhantes.

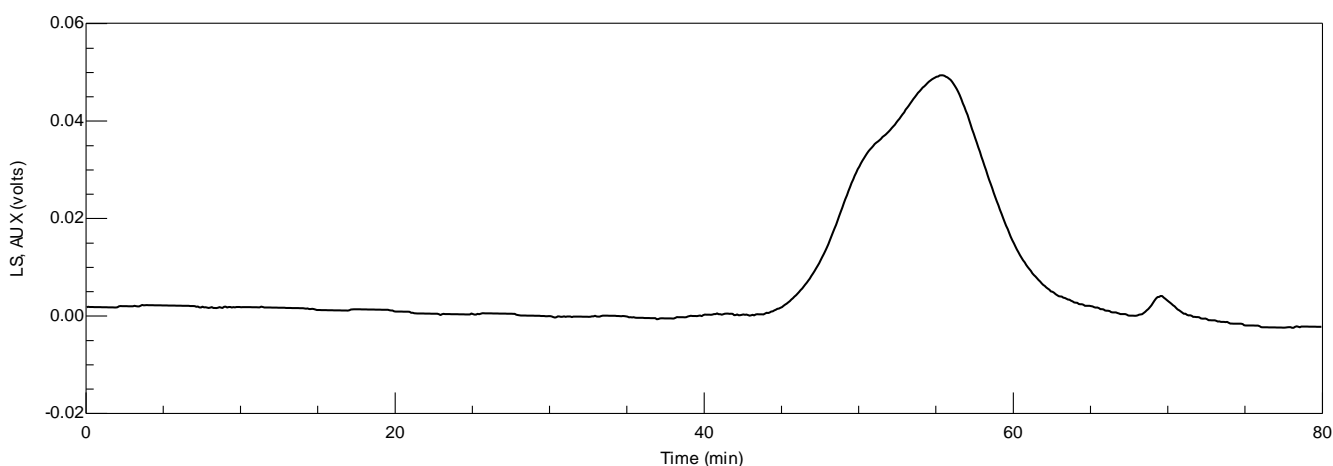


FIGURA 9: PERFIL DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICO (HPSEC) DA FRAÇÃO SMYRK-AMIL OBTIDA DA MICROALGA LIQUÊNICA *Myrmecia biatorellae*. DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.

A partir dos estudos presentes na literatura para os polissacarídeos de fotobiontes liquênicos, pode-se verificar que as galactofurananas presentes nas frações SMYRA-AMIL-100R E SMYRA-AMIL-50R apresentam estruturas diferentes daquelas presentes em *Trebouxia* (CORDEIRO *et. al.*, 2005), as quais apresentam unidades de *Galf* ligadas (1→5) e (1→6), não apresentando nenhum sinal em δ 89.3 (unidades C-2 substituídas).

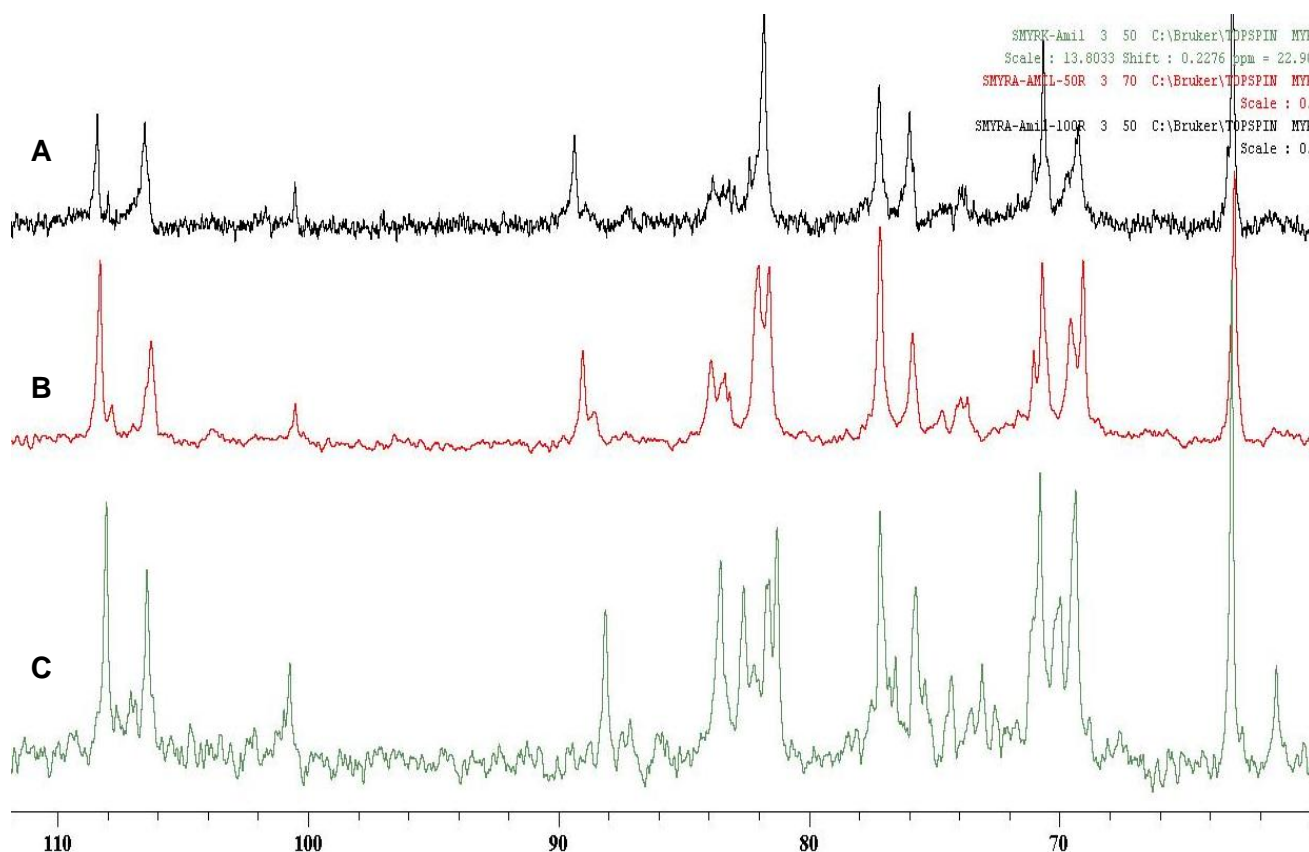


FIGURA 10: COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN-¹³C DAS FRAÇÕES (A) SMYRA-AMIL-100R, (B) SMYRA-AMIL-50R (EM DMSO-*d*₆, A 50 °C) E (C) SMYRK-AMIL (EM D₂O, A 50 °C).

A fração insolúvel em água fria PMYRK possui em sua composição monossacarídica elevadas proporções de galactose (47,4%), ramnose (23,9%) e glucose (21,2%) além de, em menores proporções, arabinose, xilose e manose (Tabela 1). Devido ao seu alto conteúdo de glucose, esta fração também foi tratada com α -amilase, dando origem a fração PMYRK-AMIL (Figura 4). Uma comparação do espectro de RMN-¹³C desta fração com o espectro da fração PMYRA-AMIL obtida a partir da extração aquosa (Figura 11a, b) demonstra que estas frações são similares, fato que também pode ser observado pela composição monossacarídica (Tabela 1).

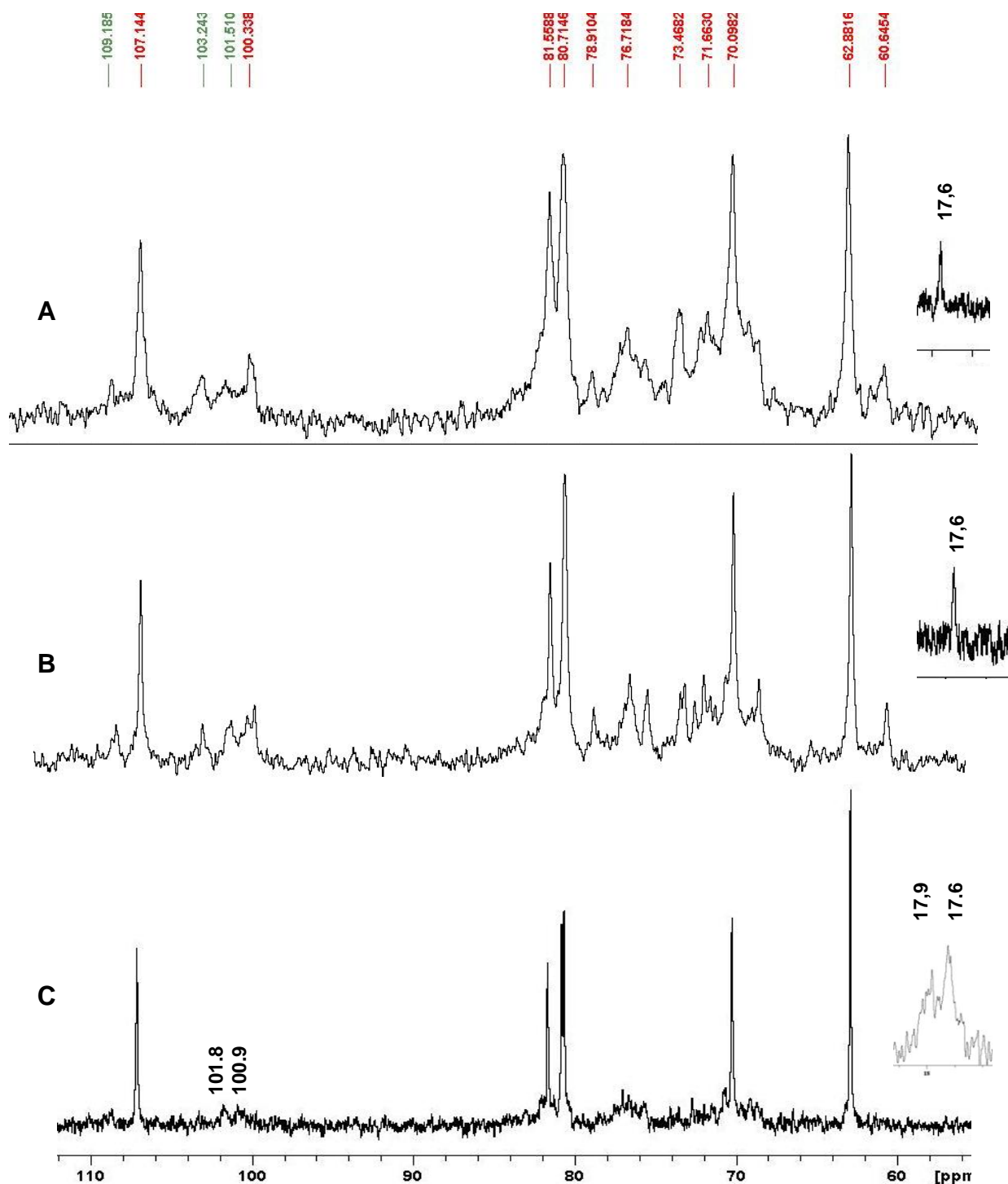


FIGURA 11: ESPECTROS DE RMN-¹³C (EM DMSO-*d*₆, A 50 °C, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM p.p.m.) DE FRAÇÕES OBTIDAS DA MICROALGA LIQUÊNICA *M. Biatorellae*: (A) PMYRK-AMIL; (B) PMYRA-AMIL E (C) PMYRK-AMIL-SF.

Com o objetivo de purificar esta amostra, uma alíquota de 100 mg da fração PMYRK-AMIL foi submetida ao tratamento com solução de Fehling (Figura 4), mas nenhum precipitado foi observado. O material, então, foi neutralizado com ácido acético e dialisado por 24 horas. Após dialisado, foi deionizado por resina catiônica fortemente ácida, filtrado em algodão, neutralizado com hidróxido de sódio, e novamente dialisado, por fim, foi liofizado. Esse tratamento originou a fração PMYRK-AMIL-SF, a qual contém como componentes monossacarídicos principais galactose (55,9%) e ramnose (30,1%) (Tabela 1). O espectro de RMN-¹³C desta fração (Figura 11c) apresenta 6 sinais principais, os quais podem ser atribuídos às unidades de galactose na conformação furanosídica, devido ao seu sinal de C-1 em δ 107.1. Os demais sinais aparecem em δ 81.6, 80.8, 80.6, 70.2 e 62.9 (C-6 não substituído). Uma comparação destes sinais com dados da literatura (SØRUM *et al.*, 1997; AHRAZEM *et al.*, 2001; PERRY e MACLEAN, 2004; LEMERCINIER e JONES, 2005; PRIETO *et al.*, 2007) indica provavelmente que as unidades de Galf estão ligadas (1→3). Os sinais de C-1 das unidades de ramnose podem ser vistos em δ 100.9 e 101.8, enquanto que os sinais de C-6 podem ser vistos em δ 17.6 e 17.9. A análise de metilação desta fração está sendo realizada, para a determinação da estrutura química detalhada da ramnogalactofuranana presente.

Com relação aos polissacarídeos relatados para os fotobiontes liquênicos, é possível observar que a ramnogalactofuranana presente na fração PMYRK-AMIL-SF está relacionada com a ramnogalactofuranana de *Asterochloris* sp, descrita por Cordeiro *et al.* (2007). Esta apresenta uma cadeia principal constituída por unidades de Galf (1→3) ligadas, com ramificação em C-6 em aproximadamente 6,4% das unidades. As cadeias laterais apresentam unidades de Galf 5- e 6-O-substituídas, bem como unidades de Rhap 2-O, 3-O e 2,3-di-O-substituídas. Os terminais não redutores são compostos por xilose e galactofuranose. Interessantemente, se observarmos a árvore filogenética (Figura 12) 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.

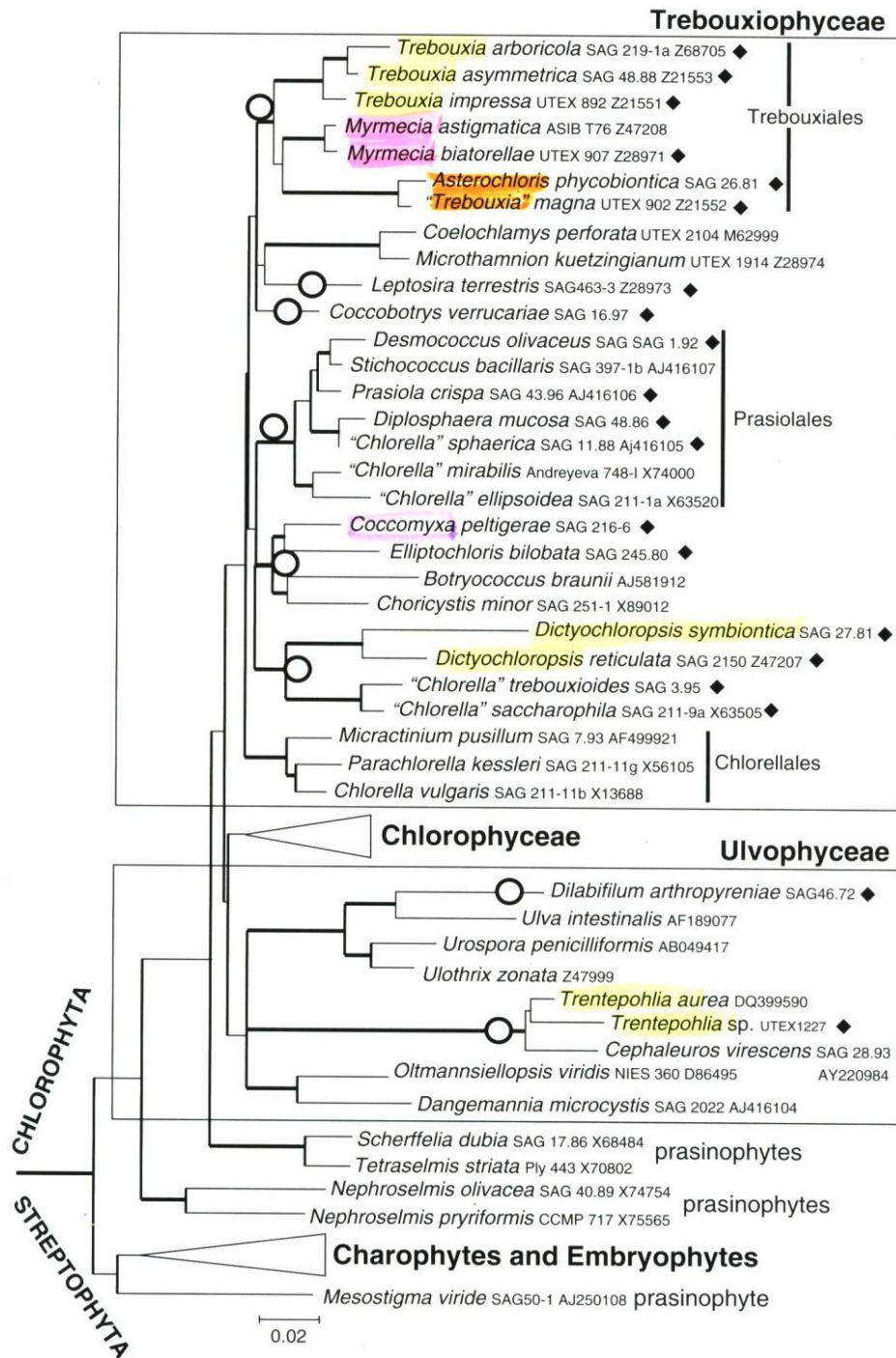


FIGURA 12: ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS FOTOBIONTES E ALGAS NÃO LIQUENIZADAS CLORÓFITAS BASEADA NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO 18S rDNA. FONTE: NASH III (2008).

5 CONCLUSÕES

A partir da extração aquosa foi possível a obtenção de duas amostras purificadas (SMYRA-AMIL-100R e SMYRA-AMIL-50R), as quais apresentam como composição monossacarídica Rha:Ara:Man:Gal, nas proporções 6,4:4,8:4,8:84,1 e 2,9:4,4:3,9:88,7 respectivamente. A análise dos espectros de RMN.-¹³C destas frações indicou a presença de galactose na conformação furanosídica, indicando desta maneira, a presença de galactofurananas.

A partir da extração alcalina foi possível purificar um polissacarídeo insolúvel em água fria (fração PMYRK-AMIL-SF) e composto principalmente por ramnose (30,1%) e galactose (55,9%). A análise do espectro de RMN.-¹³C desta fração também indicou que as unidades de galactose estão na conformação furanosídica, e provavelmente (1→3) ligadas. A comparação com a literatura também auxiliou na análise e permite sugerir a presença de uma ramnogalactofuranana,

REFERÊNCIAS

AHMADJIAN, V. **The lichen symbiosis**. New York: John Wiley & Sons, p. 170-172, 1993.

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

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

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.; FRENSDORF, A. Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Localization in the intact lichen and cultured mycobiont. **Protoplasma**, v. 105, p. 207-211, 1981.

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

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 β -galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 244, p. 193-198, 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
- DEASON, T. R.; BOLD, H. C. *Phycological studies I. Exploratory studies of Texas soil algae*. **Univ. Texas Pub.**, n. 6022, 1960.
- FONTANIELLA, B., MILLANES, A. M., VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Concanavalin A binds to a mannose-containing ligand in the cell wall of some lichen phycobionts. **PI. Physiol. Biochem.** Available online at www.sciencedirect.com, 2004.
- FRIEDL, T. Photobionts. In: Nash, T. H. ed. **Lichen Biology**. University Press, Cambridge, p. 8-24,1996.
- GOLDSMITH, S. J.; THOMAS, M. A.; GRIES, C. A. A new technique for photobiont culturing and manipulation. **Lichenologist (Lond.)**, v. 29, p. 559-569, 1997.
- GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 128, p. 119-132, 1984.
- 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.
- HAWKSWORTH, D. L. The fungal partner. In: GALUN, M. (Ed.) **CRC handbook of Lichenology**. v. I, Boca Raton: CRC Press, p. 1:35-38, 1988

HELMS, G. W. F. **Taxonomy and symbiosis in associations of *Physciaceae* and *Trebouxia***. Tese (Doktorgrades der Biologischen), Fakultät der Georg-August Universität Göttingen. Göttingen, 156 p 2003

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

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.

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 β -galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. **Biochemistry**, v. 37, p. 8764-8775, 1998.

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.

Nash III. 2 ed. **Lichen Biology**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 21.

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

PRIETO, A.; LEAL, A.; BERNABE, M.; HAWKSWORTH, D. A polysaccharide from *Lichina pygmaea* and *L. confinis* supports the recognition of Lichinomycetes. **Mycological Research**, v. 112, p. 381 – 388, 2008

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

RAMBOLD, G.; FRIEDL, T.; BECK, A. Photobionts in lichens: possible indicators of phylogenetic relationships? **The Bryologist**, v. 101, n. 3, p. 392-397, 1998.

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.

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

STOCKER-WÖRGÖTTER, E., Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. www.rsc.org/npr | **Natural Product Reports**, 2007

SUZUKI, E., TOLEDO, M. S., TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. A monoclonal antibody directed to terminal residue of β -galactofuranose of glycolipid antigen isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross-reactivity with *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi*. **Glycobiology**, v.7, p. 463-468, 1997.

TSCHERMAK-WOESS, E. The algal partner. In: M. Galun (ed.): **CRC Handbook of Lichenology**. Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 39 - 92. 1988.

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

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

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