

MARIA IZABEL PEREIRA



**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DOS
FUNGOS LIQUENIZADOS**

Heterodermia obscurata E *Punctelia constantimontium*

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Colaboradora: Dra. Elaine R. Carbonero

**Curitiba
2007**

MARIA IZABEL PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DOS
FUNGOS LIQUENIZADOS**

Heterodermia obscurata E Punctelia constantimontium

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Colaboradora: Dra. Elaine R. Carbonero

**CURITIBA
2007**

Em especial a Dra. Elaine R. Carbonero, que tanto me ensinou e ajudou, permitindo que este trabalho se realizasse.

Aos meus pais, José Maria e Odete, e ao meu marido,
Junior, por serem o meu porto seguro. Amor, sempre...

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Francisco Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos e por permitir a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki e Co-orientador Prof. Dr. Marcello Iacomini pelo apoio e incentivo à pesquisa científica.

Ao Prof. Philip A. J. Gorin, pelo exemplo de uma vida dedicada à pesquisa.

A Dra. Elaine R. Carbonero, por considerar um exemplo de pesquisadora, pela pronta disponibilidade, pelos ensinamentos, ajuda, confiança, amizade e estímulo no decorrer deste trabalho. “Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei nos ombros de gigantes.” Obrigada!

Aos meus pais José Maria e Odete, por serem sempre meu porto seguro e meu exemplo de vida, aos meus irmãos, Ana Lúcia e Marcelo, e aos meus sobrinhos, Raphael, Amanda e Beatriz, por estarem sempre perto, mesmo morando em cidades diferentes, pela compreensão e carinho constantes, me trazendo alegrias e estímulo.

Ao meu marido Junior pelo carinho, amizade, paciência e compreensão da minha ausência.

À Profa. Dra. Sionara Eliasaro (Departamento de Botânica – UFPR), pela coleta e identificação dos fungos liquenizados estudados.

A “equipe de multirão de limpeza dos líquens”: Andrea, Dirce, Juliana, Ricardo, Larissa, Elaine, sem vocês esta tarefa não seria tão divertida. (Eu ainda vou pagar aquela pizza...)

Aos amigos de laboratório (247) Caroline Mellinger (pela força e palavra sempre amiga), Maria Luiza, Lucimara, Andrea e “Cabelinho” (Posso usar sua bancada?), pela acolhida, agradável convivência e amizade e por tornar os dias de trabalho muito mais alegres.

Ao Ricardo, pela paciência, amizade e por estar sempre pronto a ajudar, a Fernanda (Simas), Higor e Ana Helena, pela amizade formada.

Em especial a Dirce, Elaine e Andrea, que sempre estiveram dispostas a me ajudar, pela paciência com as minhas dúvidas, pelo auxílio prestado em muitas etapas

deste trabalho, pelo apoio, mas acima de tudo, pela amizade. Nunca vou esquecer vocês.

A amiga-irmã Juliana, que esteve ao meu lado desde o começo (“par de vasos”, “as meninas”, “irmãs siamesas”), por ouvir minhas reclamações, pelo apoio, e em especial pela amizade que se formou nesse período. Espero que consigamos mantê-la...

A Mariana e Dayane pela amizade, apoio, conversas, risadas...

Ao Rodrigo Faria e a Graciele, pelas inúmeras conversas e ajudas desde o início deste trabalho.

Aos amigos de turma (Marco Aurélio, Amanda, Viviane, Caroline, Heide, Vanessa, Francine, Luciana e Juliana) pelos momentos de estudos, “sofrimento”, conversas e alegria.

Aos colegas do laboratório E-1 e laboratório “anexos” pelos momentos de convivência e colaboração, Marco (por favor, deixa que eu faço café pra você), Juliana Cassolato...

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação, Profa. Dra. Leda Satie Chubatsu e Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá, pelo empenho e dedicação prestados e ao crescimento e reconhecimento deste curso.

Aos professores Dr. Guilherme L. Sasaki e Dr. Miguel Daniel Nosedá, pela disponibilidade para a realização das análises de RMN.

À Rosane e a Andréia, pela disponibilidade para a realização de inúmeras análises de GC-MS e HPSEC-MALLS.

À Dona Marilza pela presença alegre e prestativa.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, pela colaboração e amizade.

Ao CNPQ, pela bolsa de Mestrado concedida durante o desenvolvimento desta dissertação.

A Fundação Araucária – PRONEX-Carboidratos pelo suporte financeiro.

A todos que, de algum modo, contribuíram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 FUNGOS LIQUENIZADOS	1
1.2 APLICAÇÃO DOS FUNGOS LIQUENIZADOS.....	4
1.3 PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS FUNGOS LIQUENIZADOS..	5
1.3.1 Substâncias Liquênicas	5
1.3.2 Carboidratos de Fungos Liquenizados.....	6
1.3.2.1 Homopolissacarídeos de fungos liquenizados.....	7
1.3.2.2 Heteropolissacarídeos de fungos liquenizados.....	8
1.4 IMPORTÂNCIA DA CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	
LIQUÊNICOS	13
1.4.1 Quimiotaxonomia	13
1.4.2 Polissacarídeos com Atividades Biológicas.....	15
1.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS LIQUENIZADOS	
ESTUDADOS	16
1.5.1 <i>Heterodermia obscurata</i>	16
1.5.2 <i>Punctelia constantimontium</i>	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 MATERIAL DE ESTUDO	19
3.2 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	20
3.2.1 Extrações	20
3.2.1.1 Extração com Acetona	20

3.2.1.2	Extração Etanólica	21
3.2.1.3	Extração Aquosa	21
3.2.1.4	Extração alcalina.....	21
3.3	FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS	22
3.3.1	Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo.....	22
3.3.2	Purificação dos Polissacarídeos com Solução de Fehling	22
3.4	ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS	23
3.4.1	Composição Monossacarídica	23
3.4.1.1	Hidrólise Ácida Total.....	23
3.4.1.2	Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise.....	23
3.4.2	Metilação dos Polissacarídeos	24
3.4.3	Dosagem de ácidos urônicos dos heteropolissacarídeos	25
3.4.4	Carboxi-redução do heteropolissacarídeo de <i>P. constantimontium</i>	25
3.4.5	Hidrólise Ácida Parcial	25
3.5	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	26
3.5.1	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS).....	26
3.5.2	Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS)	26
3.5.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	DESLIPIDIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO ETANÓLICA	28
4.2	EXTRAÇÕES AQUOSAS E ALCALINAS	30
4.3	FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS	31
4.4	POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO PRECIPITADO CONGELAMENTO/ DEGELO	31
4.5	POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO PRECIPITADO DE FEHLING (PF).....	39
4.5.1	Polissacarídeo do Fungo Liquenizado <i>Heterodermia obscurata</i>	37
4.5.2	Polissacarídeo do Fungo Liquenizado <i>Punctelia constantimontium</i>	48
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	–	Corte transversal de <i>Canomaculina pilosa</i> (Stiz.) Elix & Hale em eletromicrografia de varredura (cedida pela Profa. Dra. Sionara Eliasaro, Departamento de Botânica-UFPR). Aumento de 1000 x.	3
FIGURA 2	–	Principais estruturas observadas em galactomananas de fungos liquenizados	12
FIGURA 3	–	Foto do fungo liquenizado <i>Punctelia constantimontium</i> (A) vista face superior (B) vista face inferior.....	19
FIGURA 4	–	Foto do fungo liquenizado <i>Heterodermia obscurata</i>	20
FIGURA 5	–	Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos dos fungos liquenizados <i>Heterodermia obscurata</i> e <i>Punctelia constantimontium</i>	29
FIGURA 6	–	Espectros de RMN- ¹³ C das frações precipitado de congelamento e degelo (PW) obtidas de <i>Punctelia constantimontium</i> (A) e <i>Heterodermia obscurata</i> (B).....	33
FIGURA 7	–	Espectro de RMN- ¹³ C da fração PPG/D obtida de <i>Heterodermia obscurata</i> (A) e <i>Punctelia constantimontium</i> (B).	34
FIGURA 8	–	Estrutura proposta para nigerana obtida por precipitado gelo/degelo <i>H. obscurata</i> e <i>P. constantimontium</i>	36
FIGURA 9	–	Espectro de RMN- ¹³ C das frações do precipitado de Fehling, PFK2 (A) PFK10 (B) PFW (C), obtidas de <i>Heterodermia obscurata</i> , em D ₂ O a 70°C.	39
FIGURA 10	–	Espectro 2D ¹ H, ¹³ C HMQC da fração precipitado de Fehling (PFK2; glucomanana) obtida de <i>Heterodermia obscurata</i> (D ₂ O, 70°C).....	40
FIGURA 11	–	Região anomérica do espectro de HMQC acoplado da fração precipitado Fehling (PFK2; glucomanana) obtida da <i>Heterodermia obscurata</i> (em D ₂ O, 70°C)	41
FIGURA 12	–	Espectro de DEPT da fração precipitado de Fehling (PFK2; glucomanana) obtida de <i>Heterodermia obscurata</i> , em D ₂ O a 70°C.	42
FIGURA 13	–	Espectros de RMN- ¹³ C das frações PFK2-HO (nativa) (A), PFK2-HP4 (B) e PFK2-HP10 (C), em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 70°C.....	45
FIGURA 14	–	Espectro de RMN- ¹³ C-DEPT para HP10-HO, em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 70°C.....	46
FIGURA 15	–	Estrutura proposta para glucomanana obtida do líquen <i>H. obscurata</i>	47
FIGURA 16	–	Espectro de RMN- ¹³ C das frações do precipitado de Fehling, PFK2 (A) PFK10 (B) PFW (C), obtidas de <i>Punctelia constantimontium</i> , em D ₂ O a 70°C.....	50
FIGURA 17	–	Espectro 2D ¹ H, ¹³ C HMQC da fração precipitado de Fehling (PFK2; galactoglucomanana) obtida de <i>P. constantimontium</i> (em D ₂ O, 70°C).....	51
FIGURA 18	–	Região anomérica do espectro de HMQC acoplado da fração precipitado Fehling (PFK2; galactoglucomanana) obtida da <i>P. constantimontium</i> (em D ₂ O, 80°C).....	52

FIGURA 19	–	Espectro de RMN- ¹³ C-DEPT da fração precipitado de Fehling (PFK2; galactoglucomanana) obtida de <i>Punctelia constantimontium</i> em D ₂ O a 70°C.....	53
FIGURA 20	–	Espectro de RMN- ¹³ C das Frações PFK2-PC (nativa) (A), PFK2-HP4 (B) e PFK2-HP6 (C) do fungo liquenizado <i>P. constantimontium</i> , em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 70°C.....	56
FIGURA 21	–	Espectro de RMN- ¹³ C-DEPT para HP4-PC, em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 70°C.	57
FIGURA 22	–	Estrutura proposta para galactoglucomanana obtida do líquen <i>P. constantimontium</i>	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	–	Tipos de glucanas encontradas em fungos liquenizados	8
TABELA 2	–	Tipos de heteropolissacarídeos encontrados em fungos liquenizados.....	13
TABELA 3	–	Rendimento das frações obtidas das extrações dos fungos liquenizados <i>H. obscurata</i> e <i>P. constantimontium</i>	28
TABELA 4	–	Composição monossacarídica e rendimento das frações precipitado gelo/degelo obtidos a partir de extrações aquosas, alcalinas a 2% e 10% do fungo liquenizado <i>H. obscurata</i>	32
TABELA 5	–	Composição monossacarídica e rendimento das frações precipitado gelo/degelo obtidos a partir de extrações aquosas, alcalinas a 2% e 10% do fungo liquenizado <i>Punctelia constantimontium</i>	32
TABELA 6	–	Deslocamentos químicos de ^{13}C obtidos da α -D-glucana isolada de <i>H. obscurata</i> e <i>P. constantimontium</i>	35
TABELA 7	–	Análise por metilação da glucana isolada na fração precipitado gelo/degelo PPG/D-HO e PPG/D-PC.....	36
TABELA 8	–	Composição monossacarídica e rendimento das frações precipitado de Fehling do fungo liquenizado <i>H. obscurata</i>	37
TABELA 9	–	Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFK2; glucomanana) obtida de <i>Heterodermia obscurata</i> e de suas subfrações obtidas por hidrólise parcial.	43
TABELA 10	–	Composição monossacarídica da Fração PFK2-HO e suas subfrações após hidrólises ácidas parciais do fungo liquenizado <i>Heterodermia obscurata</i>	43
TABELA 11	–	Composição monossacarídica e rendimento das frações precipitado de Fehling do fungo liquenizado <i>Punctelia constantimontium</i>	49
TABELA 12	–	Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFK2) obtida de <i>Punctelia constantimontium</i> e de suas subfrações obtidas por hidrólise parcial.	54
TABELA 13	–	Composição monossacarídica da fração precipitado Fehling (PFK2-PC; galactoglucomanana) após hidrólises ácidas parciais do fungo liquenizado <i>Punctelia constantimontium</i>	55

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS

^{13}C	- Carbono treze
BaCO_3	- Carbonato de bário
CH_3I	- Iodeto de metila
CHCl_3	- Clorofórmio
CuSO_4	- Sulfato de cobre
D_2O	- Óxido de deutério
DEPT	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
<i>f</i>	- Furanosídico
Gal	- Galactose
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glc	- Glucose
HMQC	- <i>Heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy</i>
HOAc	- Ácido acético
HPSEC-MALLS	- Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS)
Hz	- Hertz
IR	- Índice de refração
<i>J</i>	- Constante de acoplamento
kDa	kilodaltons
KOH	- Hidróxido de potássio
LS	- Espalhamento de luz
M	- Molar
Man	- Manose
Me_2SO	- Dimetilsulfóxido
$\text{Me}_2\text{SO}-d_6$	- Dimetilsulfóxido deuterado
MeOH	- Metanol
NaB^2H_4	- Boroidreto de sódio deuterado
NaBH_4	- Boroidreto de sódio
NaN_3	- Azida de sódio
NaNO_2	- Nitrito de sódio
NaOAc	- Acetato de sódio
<i>p</i>	- Piranosídico
p/v	- Peso/volume
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
rpm	- Rotações por minuto
TFA	- Ácido trifluoracético
v/v	- Volume/volume

RESUMO

No presente trabalho foram estudadas as estruturas de polissacarídeos obtidos dos fungos liquenizados *Heterodermia obscurata* e *Punctelia constantimontium* (algas do gênero *Trebouxia* como fotobiontes). Estes, após deslipidificados, foram extraídos com água e KOH a 2 e 10%, resultando em frações que foram submetidas aos processos de purificação por congelamento/degelo e precipitação com solução de Fehling. Os precipitados de congelamento/degelo (PPG/D) de ambos os fungos liquenizados apresentaram α -D-glucana, e dados de metilação e RMN sugerem uma estrutura contendo ligações glicosídicas alternadas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4), do tipo nigerana, com relação molar de 1,07:1 para *H. obscurata* e 1,3:1 para *P. constantimontium*. O precipitado de Fehling do fungo liquenizado *H. obscurata* apresentou manose e glucose como componentes monossacarídicos e, por meio de análises de metilação e RMN (^{13}C , HMQC e HMQC-acoplado), esta estrutura consiste em uma glucomanana altamente ramificada, com uma cadeia principal composta por unidades de α -D-Manp ligadas-(1 \rightarrow 6), sendo a maioria substituída em O-2, principalmente por unidades terminais não redutoras de α -D-Glcp, α -D-Manp e, possivelmente, por cadeias laterais constituídas por unidades de α -D-Manp 4-O-substituídas. A galactoglucomanana isolada do precipitado de Fehling do fungo *P. constantimontium* contém manose, galactose e glucose como componentes monossacarídicos neutros e 6% de ácidos urônicos, os quais foram carboxirreduzidos e os resultados mostram que este ácido é GlcAp. De acordo com os dados de metilação e RMN (^{13}C , HMQC e HMQC-acoplado), esta apresenta cadeia principal de unidades de α -D-Manp ligadas (1 \rightarrow 6), sendo parcialmente substituídas em O-2, e/ou O-2,4 por unidades de β -Galp, sendo que as unidades de β -Galp encontram-se substituindo as unidades de α -Manp da cadeia principal em O-4 e O-2, e não apenas em O-4, como geralmente observado em líquens.

1 INTRODUÇÃO

1.1 FUNGOS LIQUENIZADOS

Fungos liquenizados são definidos como organismos simbióticos compostos por um fungo, o micobionte, e um ou mais parceiros fotossintéticos, o fotobionte, que pode ser uma alga verde ou uma cianobactéria (NASH III, 1996). Apesar dos fungos liquenizados serem constituídos por dois ou mais organismos, seus nomes científicos referem-se apenas ao fungo que participa da simbiose; a alga tem sua taxonomia própria dentro dos grupos comuns de algas (PURVIS, 2000).

A natureza da simbiose liquênica é amplamente discutida. A maioria dos pesquisadores refere-se a fungos liquenizados como um caso clássico de mutualismo, onde todos os pares possuem vantagens na associação. Alternativamente, fungos liquenizados são considerados como um exemplo de parasitismo controlado, uma vez que os fungos parecem obter mais benefícios e o fotobionte crescer mais lentamente no estado liquenizado do que no estado de vida livre (AHMADJIAN, 1993).

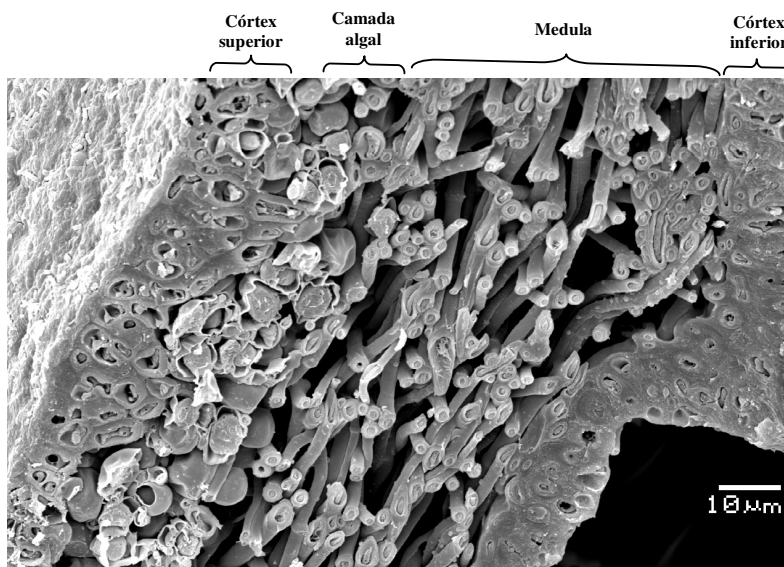
Os fungos, como organismos heterótrofos, desenvolveram várias estratégias nutricionais para adquirir carbono fixado, sendo uma delas a liquenização, que consiste da aquisição do carbono fixado de uma população de algas verdes e/ou cianobactérias (HONEGGER, 1996). A transferência de metabólitos do fotobionte para o micobionte depende do tipo de fotobionte que está envolvido na associação. Em fungos liquenizados contendo cianobactérias, o carboidrato liberado e transferido para o fungo é a glucose e nos organismos contendo algas verdes, o carboidrato liberado é um poliol, podendo ser ribitol, eritritol ou sorbitol (ELIX, 1996). Além disso, as cianobactérias produzem aminoácidos a partir de gás carbônico e nitrogênio, em associação com a água e são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, contribuindo para a fixação de nitrogênio no ecossistema. Dessa maneira, em cianoliquens o micobionte ganha uma fonte de nitrogênio (AHMADJIAN, 1993; PURVIS, 2000).

Atualmente estima-se que o número de espécies de fungos liquenizados seja de aproximadamente 17.000. A respeito do micobionte, cerca de 20% de todas as espécies de fungos atualmente conhecidas são encontradas na natureza na forma liquenizada, dentre os quais 98% são ascomicetos. Ao contrário, existem poucos basidiomicetos e deuteromicetos (fungos imperfeitos) liquenizados (HONNEGER, 1991; NASH III, 1996).

Com relação aos fotobiontes, 40 gêneros de algas verdes e cianobactérias já foram descritos como fotobiontes liquênicos, e estes responsabilizam-se totalmente pela fotossíntese (HONNEGER, 1996). Os cianobiontes mais comuns são espécies dos gêneros *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Gloeocapsa*, e *Calothrix*, em ordem de sua frequência e os fotobiontes de algas verdes incluem *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Coccomyxa*, e *Dictyochloropsis*. O fotobionte mais comum é *Trebouxia*, sendo que este ocorre em mais da metade de todos os fungos liquenizados conhecidos (AHMADJIAN, 1993). Pode ocorrer também a presença de dois fotobiontes associados a um único fungo, sendo uma alga verde o bionte primário e uma cianobactéria o organismo secundário, o último encontrando-se nos cefalódios, regiões de crescimento do talo liquênico (MARCELLI, 2006a).

Nessa associação ocorre a formação de uma estrutura específica, denominado talo liquênico (Figura 1), morfológicamente diferente da estrutura adquirida pela alga ou fungo quando em vida livre. A constituição do talo liquênico compreende algas microscópicas semelhantes às mesmas espécies de vida livre e filamentos fúngicos (hifas), desenvolvendo-se simbioticamente. Um tecido resistente periférico, denominado córtex, protege as células dos fotobiontes do ressecamento e luz excessiva, enquanto outro mais interno, chamado medula, é frouxamente entrelaçado, facilitando as trocas gasosas (AHMADJIAN, 1993).

FIGURA 1 - Corte transversal de *Canomaculina pilosa* (Stiz.) Elix & Hale em eletromicrografia de varredura (cedida pela Profa. Dra. Sionara Eliasaro, Departamento de Botânica- UFPR). Aumento de 1000 x.



A aparência do talo do fungo liquenizado é determinada primeiramente pelo micobionte, entretanto sabe-se que a influência do fotobionte na morfogênese é importante, uma vez que somente após a simbiose o talo característico é desenvolvido (BÜDEL; SCHEIDEGGER, 1996). De maneira geral, existem três tipos de talo liquênico, podendo ser crostoso, folioso ou fruticoso, e estes variam muito em aparência, existindo desde formas muito simples até estruturas morfológicas e anatomicamente complexas. A maior parte dos talos liquênicos pode ser medida em centímetros (1 até 30 cm), entretanto, existem talos adultos de poucos milímetros, que crescem em frestas de troncos ou de rochas, assim como enormes formas foliosas, com mais de um metro de diâmetro, ou longas barbas-de-velho de até quatro metros de comprimento (MARCELLI, 2006a).

Quanto à coloração dos fungos liquenizados, nos portadores de algas verdes, a maioria dos talos liquênicos tem coloração entre o branco e o cinza, com um toque de verde fornecido pela clorofila. Nos cianoliquens, as cores variam entre o preto, marrom e cinza-chumbo. Por outro lado, alguns fungos liquênicos produzem

substâncias coloridas, para defesa contra o excesso de iluminação que pode degradar a clorofila. Neste caso, o talo ou parte dele pode adquirir cores como amarelo, laranja e vermelho (MARCELLI, 2006a).

Os fungos liquenizados possuem distribuição cosmopolita, podendo ser encontrados desde os trópicos até as regiões polares, onde são frequentemente a vegetação predominante, no interior de rochas e cascas de árvores, em todos os substratos, climas, altitudes e latitudes (GORIN et al., 1993). Os fungos liquenizados conseguem sobreviver em condições de vida muito adversas devido à sua capacidade de dessecação rápida, oferecendo resistência a condições ambientais extremas de temperatura e luz (RAVEN, 1996).

Esses organismos são os melhores bioindicadores de poluição de uma região, devido à sua extrema sensibilidade a SO₂, NO₂ e ozônio e habilidade em absorver e acumular metais pesados (AHMADJIAN, 1993).

1.2 APLICAÇÃO DOS FUNGOS LIQUENIZADOS

Os fungos liquenizados são pouco usados na alimentação humana, devido ao seu baixo conteúdo protéico, seu sabor geralmente amargo e sua escassa produção de biomassa (LEGAZ et al., 2006). Entretanto, a espécie *Cetraria islandica* pode ser convertida em um tipo de farinha usada no preparo de mingau, *Gyrophora esculenta* usada no preparo do popular “iwatake” dos japoneses e *Lecanora esculenta*, o maná, utilizado como alimento pelo homem e animais nas estepes semi-áridas (GORIN et al., 1993).

Lethariella cashmeriana e *L. sernanderi* são utilizadas na medicina tradicional tibetana e chinesa, no preparo de chás medicinais, possuindo a propriedade de baixar a pressão arterial e reduzir inflamações. Os fungos liquenizados também têm sido empregados para a fabricação de bebidas alcoólicas, substituindo o lúpulo da cerveja por *Lobaria pulmonaria* (LEGAZ et al., 2006).

Devido as suas cores, que variam do branco ao negro, vermelho, laranja, marron, amarelo e verde, muitos foram utilizados como corantes, entretanto, hoje possuem pequena importância econômica (RAVEN, 1996; ELIX, 1996).

Nos últimos dez anos, diversos metabólitos procedentes desses organismos estão sendo utilizados na fabricação de produtos cosméticos, como protetores solares. (LEGAZ et al., 2006). Também é utilizado na indústria de perfumes, sendo as espécies *Evernia prunastri* e *Pseudevernia furfuraceae* usadas para preparar um extrato o qual é empregado como fixador de alguns perfumes (HONDA; VILEGAS, 1998).

Na medicina, as espécies *Lobaria pulmonaria* e *Cetraria islandica* têm sido descritas como medicamentos para a tuberculose pulmonar. A *Usnea barbata* no tratamento de doenças da pele e a *Usnea longissima* como expectorante. Além disso, antibióticos contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, são também encontrados nos líquens (GORIN et al., 1993).

Fungos liquenizados são usados como bioindicadores de poluição, devido à capacidade de absorverem e acumularem metais pesados, ao fato de que muitas espécies têm larga distribuição geográfica, e a constatação de que a morfologia não varia de maneira marcante ao longo das estações (HONDA; VILEGAS, 1998). Espécies contendo cianobactérias são de grande importância na fixação de nitrogênio no solo (PURVIS, 2000).

1.3 PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS FUNGOS LIQUENIZADOS

Os principais constituintes químicos encontrados nos fungos liquenizados são as substâncias liquênicas e os carboidratos (baixa e alta massa molar).

1.3.1 Substâncias Liquênicas

As substâncias liquênicas são produtos do metabolismo secundário do micobionte, e são encontradas no córtex ou na medula, raramente em ambas as camadas. A concentração pode variar de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo

liquênico, embora em alguns casos a concentração possa ser superior (HONDA; VILEGAS, 1998).

Os compostos provenientes do metabolismo secundário dos fungos liquenizados são ácidos alifáticos, *meta*- e *para*-depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico. Ainda que alguns desses compostos sejam também produzidos por fungos de vida livre e por plantas superiores, a maior parte é considerada exclusiva de fungos liquenizados (ELIX, 1996).

Até o momento, cerca de 700 dessas substâncias foram identificadas, sendo esses organismos as entidades biológicas mais estudadas do ponto de vista da produção de metabólitos secundários (MARCELLI, 2006a). Muitas delas vêm sendo utilizadas com propósitos taxonômicos, devido a grande especificidade de ocorrência nesses organismos (HONDA e VILEGAS, 1998).

1.3.2 Carboidratos de Fungos Liquenizados

Os carboidratos estão divididos em componentes de baixa e alta massa molar. Entre os carboidratos de baixa massa molar encontram-se os monossacarídeos redutores (pentoses, metilpentoses, hexoses e cetoses), polióis e os oligossacarídeos. Componentes dos polióis incluem glicerol, eritritol, ribitol, arabinitol, manitol, sorbitol, galactitol entre outros, e estão relacionados com a obtenção de energia (GORIN et al., 1993).

Os carboidratos de alta massa molar são os polissacarídeos, sendo as α -glucanas e β -glucanas (lineares ou com poucas substituições), galactomananas e galactoglucomananas os mais freqüentes em fungos liquenizados (GORIN et al., 1993; OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001).

Os primeiros estudos a respeito de polissacarídeos de fungos liquenizados iniciaram em 1815 quando Berzelius extraiu de *Cetraria islandica* (“Iceland moss”) uma glucana insolúvel em água fria, chamada liquenana [β -D-glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4)]

na proporção de 3:7 (BERZELIUS¹, citado por GORIN et al., 1993). Durante o processo de purificação da liquenana foi observada a presença de uma outra glucana solúvel em água. Utilizando-se de processos analíticos e quantitativos, o polissacarídeo foi identificado como sendo uma α -D-glucana linear composta por ligações (1→3) e (1→4) (3:2) sendo denominada isoliquenana (CHANDA et al., 1957).

A partir destes estudos com a *Cetraria islandica*, em que foram isolados os polissacarídeos liquenana e isoliquenana, outros trabalhos foram realizados com o objetivo de obtenção de polissacarídeos de diferentes espécies de fungos liquenizados. Até 2001, aproximadamente 100 espécies de líquens foram investigadas quanto ao seu conteúdo de polissacarídeos (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001).

1.3.2.1 Homopolissacarídeos de fungos liquenizados

As glucanas são os principais homopolissacarídeos encontrados em fungos liquenizados. A maioria apresenta uma estrutura linear com a presença de ligações glicosídicas na sua configuração α ou β (IACOMINI et al., 2006), sendo estas divididas segundo o tipo de ligação e a proporção molar. As principais glucanas observadas em fungos liquenizados estão representadas na Tabela 1.

Outro homopolissacarídeo descrito é a xilana, e por ser encontrada em baixa concentração, sugere-se que sua presença seja de responsabilidade do constituinte fotobionte (CORRADI DA SILVA, 1992).

No basidiolíquen *Dictyonema glabratum*, o qual se encontra associado à alga *Scytonema* sp. foi observado uma β -D-xilana linear ligada (1→4) e uma β -D-manana contendo ligações do tipo (1→6) (CARBONERO et al., 2002a).

¹ BERZELIUS, J.J. Versuche über die Mischung des Isländischen Mosses und Seine Anwendung als Nahrungsmittel. **J. Chem. Phys.**, v.7, p.317-353,1815.

TABELA 1 – Tipos de glucanas encontradas em fungos liquenizados

Tipos de glucanas	Denominação	Proporção das ligações	Características estruturais
α -D-Glucana (1→3), (1→4)	Nigerana	1:1	Linear; algumas possuem ligações (1→2)
		1,2:1	Linear
	Isoliquenana	3:1	Linear, distribuição irregular de ligações
		3,8:1	Apresenta ramificação em O-2 (5%)
		4:1	Linear
	AcrosCIFana	6:1	Possuem ligações (1→6)
2:3		Possuem ligações (1→6) (~ 6%)	
	2:5	Apresenta ramificação em O-3 (3%)	
α -D-Glucana (1→4), (1→6)	Pululana	1:1	Linear
α -D-Glucana (1→3)	Pseudonigerana		Linear
β -D-Glucana (1→3)	Laminarana		Linear
β -D-Glucana (1→6)	Pustulana		Podem apresentar grupamentos O-acetil
β -D-Glucana (1→3), (1→4)	Liquenana	1:2	Linear
		1:3	Linear
		3:1	Linear
		3:7	Linear
β -D-Glucana (1→3), (1→6)			Apresentam cadeia principal formada por unidades de β -D-Glcp (1→3), (1→6) ou unidades de β -D-Glcp (1→3) ligadas; Contém ramificação em O-6 (~ 20%)

1.3.2.2 Heteropolissacarídeos de fungos liquenizados

Os primeiros estudos a respeito de heteropolissacarídeos de fungos liquenizados foram realizados em 1906, por ULANDER e TOLLENS² (citado por GORIN e IACOMINI, 1984), quando detectaram manose, galactose e glucose no líquen *Cetraria islandica*. Entretanto, os polissacarídeos de fungos liquenizados que contêm manose foram somente descobertos em 1924 por KARRER & JOOS³ (citado por GORIN e IACOMINI, 1984), a partir de uma extração com água quente do líquen *Cetraria islandica* após complexação com cobre via solução de Fehling. O precipitado obtido

² ULANDER, A.; TOLLENS, B. Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 39, p. 401, 1906.

³ KARRER, J.; JOOS, B. Polysaccharide. XXX. Zur Kenntnis des Isolichenins. **Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chim.**, v. 141, p.311-315, 1924.

continha manose, galactose e glucose na proporção molar de 21:35:44, sugerindo uma possível mistura entre uma galactomanana e liquenana ou galactoglucomanana.

A partir de 1984, os trabalhos de GORIN e IACOMINI (GORIN; IACOMINI, 1984, 1985; IACOMINI; SCHNEIDER; GORIN, 1985) representaram um grande avanço no estudo dos heteropolissacarídeos de fungos liquenizados. Em 1984 estes autores determinaram a estrutura das galactomananas obtidas por tratamento com solução de Fehling dos extratos alcalinos da *Cetraria islandica* e *Ramalina usnea*. As estruturas das galactomananas obtidas a partir destes líquens foram estruturalmente diferentes. Análises químicas mostraram que ambas continham uma cadeia principal de α -D-Manp ligados (1→6), entretanto, a molécula obtida de *C. islandica* mostrou-se mais ramificada, com cadeias laterais de α -D-Galp e β -D-Galp ligadas em O-2 e O-4, respectivamente, enquanto que a molécula obtida da *R. usnea* era menos ramificada, com unidades de β -D-Galp ligados em O-4 às unidades de manose.

Estruturas similares foram obtidas a partir de *Peltigera aphthosa*, *Parmelia sulcata*, *Letharia vulpina*, *Stereocaulon paschale*, *Actinogyra muehlebergii* e *Usnea* sp., sendo a variação em relação ao grau e a seqüência que estas unidades eram ou não substituídos nas posições O-2, O-4 e/ou O-2,4 por unidades de α -D-Manp e α -D-Galp, β -D-Galp e β -D-Galf, respectivamente (GORIN e IACOMINI, 1985).

IACOMINI, SCHNEIDER e GORIN (1985) realizaram um estudo comparativo entre galactomananas de três espécies do gênero *Cladonia*. Observou-se que *C. alpestris* e *C. confusa* apresentavam galactomananas com cadeia principal α -D-Manp ligado (1→6), sendo algumas 2-O-substituídas por unidades de α -D-Manp, 4-O-substituídas por unidades de β -D-Galp, ou 2,4-di-O-substituídas por α -D-Manp e β -D-Galp, respectivamente, sendo que *C. amaurocraea* apresenta uma galactomanana com estrutura semelhante. A espécie *C. alpestris* mostrou uma galactomanana diferente, contendo cadeia principal de α -D-Manp ligado (1→2) e substituída em O-6 por unidades β -D-Galf.

No líquen *Parmotrema cetratum* foi obtida uma galactoglucomanana com cadeia principal formada por unidades de α -D-Manp ligadas (1→6) e 2-O-substituídas por unidades de α -D-Galp, 4-O-substituídas por unidades de β -D-Galp, ou 2,4-di-O-

substituídas por α -D-Galp e β -D-Galp, respectivamente (CORRADI DA SILVA; GORIN; IACOMINI, 1993). CARBONERO et al., (2005a) estudaram várias espécies dos gêneros *Parmotrema* e *Rimelia*, e todas apresentaram galactoglucomananas com diferenças típicas de espécies, apresentando cadeia principal α -Manp-(1→6), sendo não substituídas ou substituídas preferencialmente em O-2 e O-4 por terminais não redutores de α -D-Galp e β -D-Galp, respectivamente. As galactoglucomananas de 13 espécies de *Cladonia* também foram estudadas, sendo as estruturas obtidas constituídas por uma cadeia principal formada por unidades α -D-Manp-(1→6) ligadas e o padrão de substituição da cadeia principal das mesmas apresentou variações de acordo com a espécie (WORANOVICZ-BARREIRA, 1999d; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999c).

Galactomananas com cadeias laterais altamente complexas foram obtidas de *Lasallia pustulata*, a qual apresenta uma cadeia principal formada por unidades de α -Manp-(1→6), parcialmente substituídas por cadeias laterais, de diferentes tamanhos, constituídas por unidades de α -Manp-(1→2) e Galf (PEREYRA et al., 2003). Estruturas complexas (galactofuranomanana) também foi caracterizado no líquen *Umbilicaria mammulata* (*Trebouxia* sp.), sendo esta formada por uma cadeia principal de unidades de α -Manp-(1→6), sendo substituída em O-2, O-4 e O-2,4 por cadeias laterais contendo unidades α -Manp e β -D-Galf (CARBONERO et al., 2006).

A partir de *Leptogium azureum* foi caracterizado uma galactomana, contendo altos teores de manose, a qual contém uma cadeia principal α -D-Manp ligada (1→6), altamente substituída em O-2 por terminais não redutores de α -D-Manp ou β -D-Galp. As unidades de β -D-Galp substituem as unidades de α -D-Manp da cadeia principal em O-2 e não em O-4, como geralmente observado (CARBONERO et al., 2003). Estrutura similar, com alto nível de substituição e elevado teor de manose, foi encontrado também para o cianolíquen *Collema leptosporum* (PRADO et al., 1999), constituída de cadeia principal α -D-Manp (1→6) ligada, sendo substituída em O-2,4 por terminais não redutores de α -D-Manp e/ou β -D-Galp, respectivamente, sugerindo que estas estruturas similares podem ser típicas de fungos liquenizados da família Collemataceae.

Diferente da maioria das galactomananas já descritas, as quais contêm uma cadeia principal formada por unidades de α -Manp-(1→6), no líquen *Roccella decipiens* (CARBONERO et al., 2005b) foram isolados dois heteropolímeros contendo cadeia principal formada por unidades α -Manp-(1→4), o qual encontra-se parcialmente substituído em O-2 por cadeias laterais de unidades de β -Galf e α -Manp 2-O e 6-O- substituídas. Nestas estruturas, as unidades de galactose estão ligadas nas extremidades das unidades de Manp das cadeias laterais, podendo estas estarem presentes como β -Galf ou β -Galf 5-O-, 6-O- e 5,6-di-O- substituídas.

TEIXEIRA e colaboradores (1995) caracterizaram os heteropolissacarídeos de 23 espécies diferentes de fungos liquenizados os quais estão compreendidos em 13 gêneros. De acordo com os dados obtidos, os autores classificaram os líquens, de acordo com o padrão observado para a região de C-1 dos espectros de RMN-¹³C, em 5 grupos diferentes, desta maneira, os autores sugerem que esses padrões possam ser utilizados como uma possível base para quimiotaxonomia (TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1995).

Estudos comparativos utilizando polissacarídeos também foram realizados com os gêneros *Cladina* e *Cladonia*. Os autores verificaram a presença de galactomanoglucanas semelhantes para a maioria das espécies de *Cladonia* (com exceção da *Cladonia furcata*), com cadeia principal constituída de unidades de β -D-Glcp (1→3) ligadas, sendo substituídas em O-2,6. As ramificações são constituídas principalmente por β -D-Galf, β -D-Galp, β -D-Galf 6-O-substituídas, e unidades de α -D-Manp 2-O, 4-O, 6-O e 2,3-di-O-substituídas. (WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999b; WORANOVICZ-BARREIRA, 1999d). Estudos semelhantes foram realizados para galactoglucomananas e galactomanoglucanas isoladas de três espécies do gênero *Cladina*, dessa maneira, os autores sugerem que a química destes heteropolímeros possam auxiliar na classificação de espécies dos gêneros *Cladina* e *Cladonia* (CARBONERO et al., 2002b).

Em *Tornabenia intricata* foi isolado um heteropolissacarídeo contendo apenas manose e glucose (glucomanana) formada por uma cadeia principal de α -Manp-

(1→6), parcialmente substituída em O-2 e O-4 por α -Manp, α -Manp 2-O- substituídas e, com menores quantidades, α -Glc p (TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992).

Além dos heteropolímeros já descritos, no basidiolíquen *Dictyonema glabratum* foi observado a presença de uma xilomanana com cadeia principal contendo unidades de α -D-manopiranosose ligadas (1→3), sendo 10% não substituída, 4-O- (10%) e 2,4-di-O-substituída (10%) por unidades de β -D-xilopiranosose (IACOMINI et al., 1987). Recentemente foi observado um heteropolissacarídeo diferente, thamnolana, isolada do *Thamnia subuliformis*, sendo uma ramnogalactofuranana com cadeia principal constituída por β -D-Galf-(1→3), com substituição em O-6, por diferentes tipos de cadeias laterais (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001).

Os heteropolissacarídeos descritos na literatura são mostrados, de maneira geral, na Tabela 2. Nesta, pode ser observado os diferentes tipos de estruturas, sendo as galactomananas e as galactoglucomananas as mais comumente encontradas. Estas apresentam uma cadeia principal formada por unidades de α -Manp-(1→6), substituídas, principalmente, em O-2, O-4 e/ou O-2,4 por unidades de α - ou β -Galp, α -Manp, Glc p e, mais raramente, por β -Galf (Figura 2).

FIGURA 2 - Principais estruturas observadas em galactomananas de fungos liquenizados

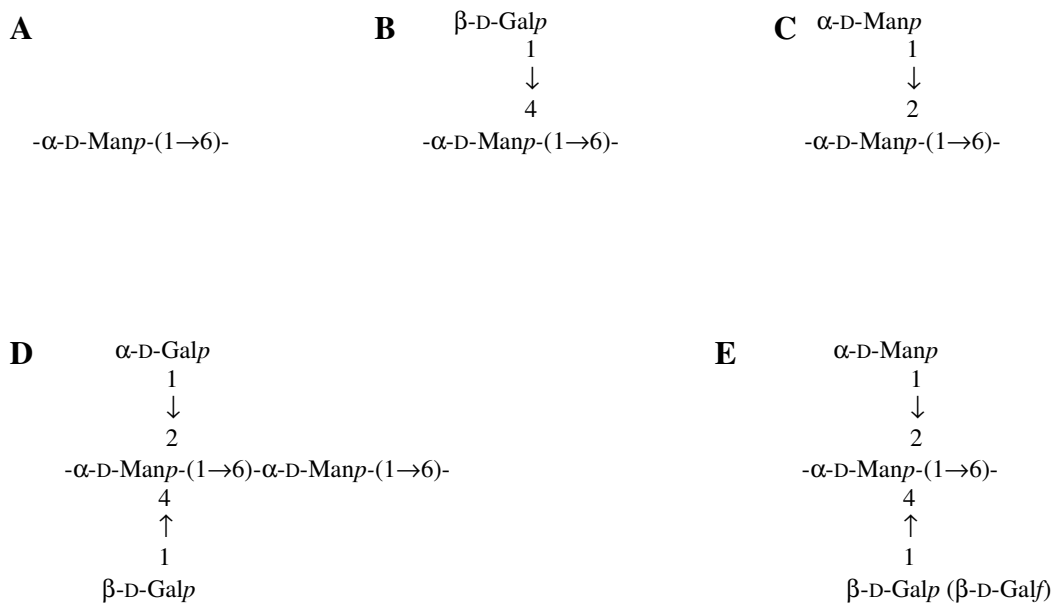


TABELA 2 – Tipos de heteropolissacarídeos encontrados em fungos liquenizados

Heteropolissacarídeos	Composição Monossacarídica	Cadeia principal	Principais características estruturais
Galactomananas e/ou Galactoglucomananas	Man:Gal:Glc com proporções variáveis, sendo Man e Gal sempre em maior proporção	α -D-Manp (1→6)	Apresentam diferentes padrões de substituição principalmente em O-2, O-4 e/ou O-2,4 por unidades de α - ou β -Galp ou α -Manp ou Glcp, mais raramente por β -Galf.
Glucomanana	Man: Glc (93: 07)	α -D-Manp (1→6)	Substituída, principalmente, em O-2 por cadeias laterais de α -D-Manp e menor proporção de α -D-Glcp
Galactofuranomananas	Man:Gal com proporções variáveis	α -D-Manp (1→4)	Apresentam substituição principalmente em O-2 e O-6 por unidades de α -Manp, e diferentes padrões de substituição β -Galf.
Xilomanana	Gal:Rha:Glc:Xyl:Man:Fuc (17:04:08:32:29:10)	α -D-Manp (1→3)	Não substituídas (10%) ou 4-O- (10%) e 2,4-di-O-substituídas (10%) por unidades de β -D-Xylp
Galactomanoglucanas	Glc: Gal: Man com proporções variáveis	β -D-Glcp (1→3)	Substituídas, principalmente, em O-2 e O-6 sob diferentes modelos por unidades D-Manp e D-Galp substituídas e ainda unidades de D-Galf terminal não redutora
Arabinogalactomanoglucana	Ara:Gal:Man:Glc 12:34:40:14	β -D-Glcp (1→3)	Apresentam substituição em O-2 e O-6 por cadeias laterais altamente ramificadas
Ramnogalactofuranana (Thamnolana)	Gal:Rha:Glc:Xyl:Man 40:31:13:10:06	β -D-Galf-(1→3)	Apresenta substituição em O-6 por diferentes tipos de cadeias laterais

1.4 IMPORTÂNCIA DA CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS LIQUÊNICOS

1.4.1 Quimiotaxonomia

A identificação de fungos liquenizados em gêneros e espécies baseia-se tradicionalmente na análise e descrição de caracteres morfológicos do talo liquênico e apotécios (NASH, 1996). Porém, a presença de metabólitos vem sendo utilizada como um recurso adicional para caracterizar fungos liquenizados. A análise química para

fins taxonômicos, a quimiotaxonomia, faz uso de reações de coloração no talo, de procedimentos de microcristalização e cromatografia, análise por fluorescência e espectrometria de massa de metabólitos secundários (HONDA, N. K., 2006). Também foi sugerido para essa finalidade o uso de dados de RMN de polissacarídeos (TAKAHASHI et al., 1981; GORIN et al., 1993; TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1995). Dessa maneira, os avanços das técnicas de biologia molecular em conjunto com a caracterização estrutural fina de macromoléculas, são uma importante ferramenta na classificação taxonômica de fungos liquenizados, pois, na maioria das vezes, dados relativos apenas à análise morfológica não elucidam a identificação de um dado espécime (HONDA; VILEGAS, 1998).

O estudo de polissacarídeos, evidenciados por análises químicas e espectroscópicas de RMN, auxiliam na taxonomia, uma vez que tanto as glucanas quanto as galactomananas apresentam uma grande variedade de estruturas. Como as estruturas destes polímeros mostram-se típicas, estas podem ser utilizadas como ferramenta na identificação e na taxonomia de fungos liquenizados (GORIN et al., 1993; TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1995; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b,c; CARBONERO et al., 2001, 2002b; CARBONERO, 2005).

Os polissacarídeos obtidos dos diferentes fungos liquenizados apresentam um padrão de distribuição. A pustulana é característica para a família Umbilicariaceae, a liquenana é encontrado em Parmeliaceae, nigerana e pustulana são as glucanas presentes em Cladoniaceae, enquanto que nigerana, laminarana e isoliquenana são características em Ramalinaceae, sugerindo que as glucanas desempenham um importante papel como marcadores taxonômicos para gênero e família. Da mesma maneira, os heteropolissacarídeos também vêm sendo utilizados na classificação, podendo, em alguns casos, diferenciar entre gêneros e até mesmo entre espécies (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001).

1.4.2 Polissacarídeos com Atividades Biológicas

Polissacarídeos de plantas e outras fontes naturais exercem atividade antitumoral, imunomodulatória, anticoagulante, entre outras. Os estudos com as atividades biológicas dos polissacarídeos de fungos liquenizados iniciaram-se no final da década de 60 e vários trabalhos têm mostrado que polissacarídeos de fungos liquenizados possuem atividades biológicas similares e com menor toxicidade, sendo estes cada vez mais usados na medicina (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSOTTIR, 2001; ASSEF et al., 2002).

Vários estudos foram realizados com os polissacarídeos de fungos liquenizados isolados pelo grupo de Química de Carboidratos de Líquens da UFPR. Foi investigada a atividade antitumoral de uma α -D-glucana com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) com relação molar (3:1) (isoliquenana) do líquen *Ramalina celastri*, sendo demonstrado a atividade citotóxica *in vitro* desta glucana nativa e modificada quimicamente por sulfatação, resultando na morte celular de células tumorais (HeLa) (LEÃO et al., 1997). Continuando os estudos com esta mesma glucana *in vivo*, usando o tumor Sarcoma 180 (S-180), os resultados mostram que esta pode inibir o crescimento do tumor, além de possuir atividade imunoestimulante sobre macrófagos, induzindo um aumento no número de células e na ação fagocitária (ASSEF et al., 2002; STUELP-CAMPELO et al., 2002).

Uma glucana β -(1 \rightarrow 6) ligada isolada do líquen *Parmotrema mantiqueirense*, e uma galactoglucomanana, isolada do líquen *Cladonia ibitipocae*, foram sulfatadas e mostraram atividades anticoagulante e antritrombótica, demonstrando que a derivatização química de polissacarídeos, como a sulfatação, podem exibir tais atividades (MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005a, 2005b).

Dentre as 17.000 espécies de líquens, não mais que 100 foram estudados quanto aos seus polissacarídeos (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSOTTIR, 2001). Como na família Physciaceae apenas o líquen *Tornabenia intricata* foi estudado quanto ao seu conteúdo em polissacarídeos, e a família Parmeliaceae necessita de mais estudos neste aspecto, pois esta é muito extensa, e devido a muito dos polissacarídeos de líquens

serem únicos, possuindo atividade farmacológica e importância taxonômica, o presente trabalho visa estudar os polissacarídeos dos líquens *Heterodermia obscurata* (família Physciaceae) e *Punctelia constantimontium* (família Parmeliaceae) dando continuidade aos trabalhos realizados pelo grupo de Química de Carboidratos de Líquens da UFPR.

1.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS LIQUENIZADOS ESTUDADOS

Neste trabalho, foram estudadas 2 espécies de fungos liquenizados quanto aos seus componentes polissacarídicos. Estes são *Heterodermia obscurata* e *Punctelia constantimontium*.

1.5.1 *Heterodermia obscurata*

Este fungo liquenizado pertence à classe dos Ascomicetos, ordem Lecanorales, subordem Lecanorineae, família Physciaceae (TEHLER, 1996), apresenta morfologia do talo do tipo folioso e a alga verde *Trebouxia* como fotobionte. O gênero *Heterodermia* consiste de aproximadamente 80 espécies, de distribuição tropical e subtropical (COHEN; TOWERS, 1995), sendo cerca de 42 espécies de *Heterodermia* citadas para o Brasil e 6 para o Paraná (MARCELLI, 2006b).

1.5.2 *Punctelia constantimontium*

Este fungo liquenizado pertence à classe dos Ascomicetos, ordem Lecanorales, subordem Lecanorineae, família Parmeliaceae (TEHLER, 1996). É um gênero facilmente reconhecido pela presença de pseudocifelas (pequenos poros) na superfície superior, talo verde-acinzentado (atranorina no córtex), superfície inferior negra e ausência de cílios (SPIELMANN, 2005).

São conhecidas atualmente cerca de 29 espécies de *Punctelia*, das quais 16 são citadas para o Brasil e 7 para o Paraná (MARCELLI, 2006b), sendo a alga verde *Trebouxia* sp. o fotobionte presente neste gênero.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo geral a análise estrutural dos polissacarídeos presentes nos fungos liquenizados *Heterodermia obscurata* e *Punctelia constantimontium*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o cumprimento do objetivo geral, têm-se como objetivos específicos:

- a) Extrair e purificar os polissacarídeos dos fungos liquenizados *Heterodermia obscurata* e *Punctelia constantimontium*;
- b) Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos obtidos, utilizando técnicas químicas e analíticas de RMN e GC-MS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL DE ESTUDO

Os fungos liquenizados *Punctelia constantimontium* e *Heterodermia obscurata* (Figura 3 e 4, respectivamente) foram coletados no mês de maio de 2006, em troncos de árvores situadas em área próxima a Universidade Federal do Paraná (Centro Politécnico), Curitiba-Pr. Os fungos liquenizados foram coletados e identificados pela Profa. Dra. Sionara Eliasaro do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-Pr.

FIGURA 3 – Foto do fungo liquenizado *Punctelia constantimontium* (A) vista face superior (B) vista face inferior.

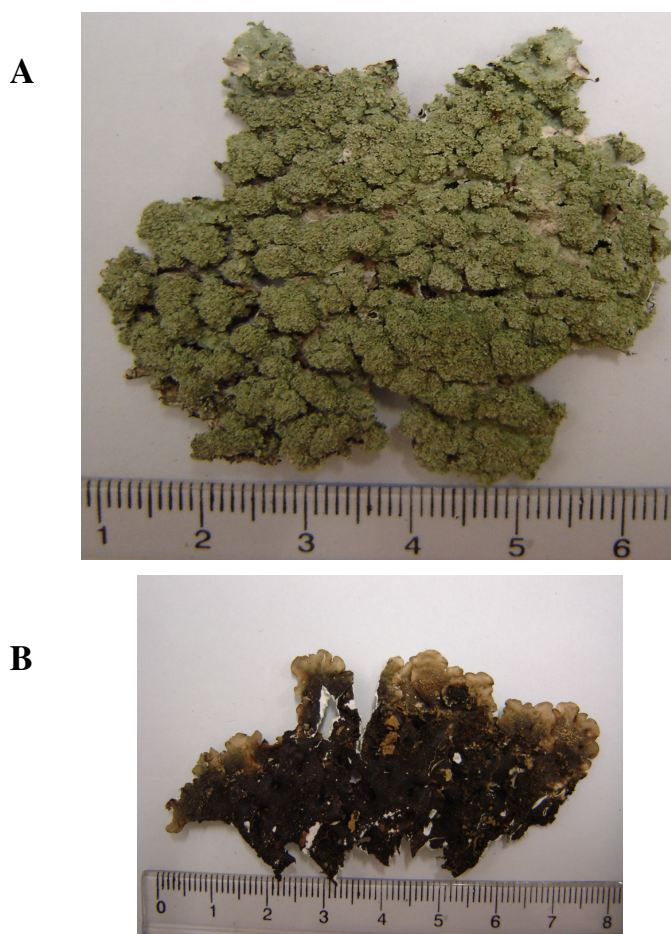


FIGURA 4 – Foto do fungo liquenizado *Heterodermia obscurata*



3.2 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.2.1 Extrações

Os talos liquênicos (*Punctelia constantimontium* e *Heterodermia obscurata*) limpos, secos e moídos foram pesados e submetidos, separadamente, a quatro processos de extração, como descrito a seguir:

3.2.1.1 Extração com Acetona

Os talos liquênicos foram primeiramente submetidos a sucessivas extrações com acetona a 50°C sob refluxo, por períodos de 6 horas (2 x). Após cada extração, os extratos acetônicos foram filtrados ainda quentes e evaporados até *secura* em temperatura ambiente, para que os rendimentos pudessem ser calculados. Os materiais residuais foram submetidos ao próximo processo extrativo.

3.2.1.2 Extração Etanólica

Os resíduos liquênicos da extração anterior foram submetidos à extração com etanol, sob refluxo, por 6 horas a 60°C (1 x), sendo filtrado após extração. Os extratos foram reunidos e evaporados até *secura* em temperatura ambiente, para calcular o rendimento.

3.2.1.3 Extração Aquosa

Os materiais residuais, resultantes da extração etanólica, foram submetidos à extração aquosa, sob refluxo a 100°C, por 6 horas (3x para *H. obscurata* e 4x para *P. constantimontium*). Após cada etapa, o extrato aquoso foi filtrado a quente, concentrado em rotaevaporador até pequeno volume e precipitado com etanol (3:1, v/v), com a finalidade de separar as moléculas de alta massa molar (precipitado) dos componentes de baixa massa molar (sobrenadante). Os precipitados etanólicos obtidos foram dialisados em água corrente por 48 horas e liofilizados.

3.2.1.4 Extração alcalina

Os resíduos das extrações aquosas foram extraídos com soluções aquosas de KOH a 2% (5x para *H. obscurata* e 6x para *P. constantimontium*) e 10% (2x para ambas as espécies), sob refluxo em banho com H₂O fervente, durante 6 horas. A esta solução foi adicionado boroidreto de sódio (NaBH₄) para evitar a degradação das cadeias polissacarídicas. Os extratos alcalinos a 2 e 10% obtidos foram filtrados, neutralizados com ácido acético, dialisados, concentrados em rotaevaporador e liofilizados.

3.3 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos obtidos pelos processos de extrações aquosas e alcalinas a 2 e 10% foram purificados através de diversas técnicas, como de congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984) e tratamento com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). A purificação foi acompanhada pelo perfil de eluição obtido por meio de análises de HPSEC-MALLS.

3.3.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

As frações obtidas através das extrações aquosas e alcalinas foram submetidas, separadamente, ao processo de purificação por congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984). Cada fração foi solubilizada em água destilada e submetida ao processo de congelamento e posterior degelo à temperatura ambiente, centrifugação (8500 rpm, 20 min, 25°C), resultando em frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis em água fria (precipitado). Este processo de purificação foi repetido diversas vezes, até que os sobrenadantes aquosos não apresentassem mais precipitado.

3.3.2 Purificação dos Polissacarídeos com Solução de Fehling

Os sobrenadantes do processo de congelamento e descongelamento foram submetidos à purificação com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução é preparada a partir de outras duas (A e B), sendo a solução A composta por tartarato de potássio e KOH, enquanto que a B consiste de sulfato de cobre.

À fração sobrenadante, que foi dissolvida em volume de água suficiente para solubilizá-la, adicionou-se igual volume da solução de Fehling: A+B (1:1) e após vigorosa agitação manual, o material foi mantido sob refrigeração por 12 horas.

Os precipitados e os sobrenadantes foram separados por centrifugação (9000 rpm, 15 min, 25°C), neutralizados com ácido acético (HOAc) e dialisados contra água corrente (~ 48 horas). Após a diálise, ambos foram tratados com resina catiônica

(Dowex 50x8, forma Na⁺) com o objetivo de retirar o cobre, e novamente dialisados. Em seguida, os materiais foram concentrados sob pressão reduzida, congelados e liofilizados, e seus rendimentos calculados.

3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

3.4.1 Composição Monossacarídica

A composição monossacarídica dos polissacarídeos foi realizada em GC-MS após hidrólise, redução e acetilação. Os monossacarídeos foram identificados pelos seus respectivos valores de tr (tempo de retenção) e perfis de fragmentação.

3.4.1.1 Hidrólise Ácida Total

Amostras de polissacarídeos de aproximadamente 1 mg foram tratadas com 1,0 ml de TFA (ácido trifluoroacético) 2 M, durante 8 horas a 100°C ou TFA 1 M a 100°C, *overnight* (12-15h). Após este tempo, o ácido foi eliminado das amostras hidrolisadas por evaporação à secura, 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 NaBH₄ (boroidreto de sódio) ou NaB²H₄ (boroidreto de sódio deuterado) (WOLFROM; THOMPSON, 1963a) em temperatura ambiente, pH 9-10, por 15 horas. Após este período, os materiais foram neutralizados (pH 7,0) com resina catiônica (forma H⁺). A solução foi filtrada em algodão e levada a secura em rotaevaporador. O ácido bórico formado foi eliminado na forma de borato de trimetila, por meio de co-evaporação com metanol.

Os alditóis formados foram acetilados com anidrido acético e piridina (1:1, v/v), *overnight*, à temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). A reação foi

interrompida pela adição de gelo 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%. Após completa remoção da piridina, o clorofórmio foi evaporado e os acetatos de alditol analisados por GC-MS (Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa).

3.4.2 Metilação dos Polissacarídeos

As frações polissacarídicas que se mostraram puras foram metiladas pelo método de CIUCANU e KEREK (1984) e/ou HAWORTH (1915).

No primeiro método, a amostra (2-5 mg) a ser analisada foi dissolvida (1%, p/v) em dimetilsulfóxido (Me_2SO), e após foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) seco e triturado (4:1 NaOH:carboidrato). A solução foi mantida sob agitação e, então, foi adicionado iodeto de metila (CH_3I) na proporção recomendada ($\text{CH}_3\text{I}/\text{NaOH}/\text{carboidrato}$ 1:200:50). Após 24 horas, a amostra foi neutralizada com HOAc, dialisada exaustivamente contra água corrente, liofilizada e o processo foi repetido novamente. Terminada a metilação por este método, foi realizada a extração dos produtos per-*O*-metilados com CHCl_3 .

No segundo método, os polissacarídeos (10-20 mg) foram primeiramente tratados com boroidreto de sódio (pH 9-10), dialisados contra água corrente e liofilizados. Após foram solubilizados em 3 ml de uma solução de NaOH 40% (p/v), mantidos sob agitação magnética constante e adicionados 0,5 ml de dimetilsulfato (DMS), por 6 vezes. O material foi deixado sob agitação *overnight*, sendo o processo repetido novamente.

Os polissacarídeos parcialmente *O*-metilados foram hidrolisados com H_2SO_4 50% (v/v; 0,5 ml) por 1 hora a 0°C, seguido por diluição até 5,5% (v/v; adição de 4,0 ml de água destilada), sendo então mantido a 100°C por um período de 12-18 horas, seguido por neutralização com BaCO_3 (SAEMAN et al., 1954). Em seguida, estes materiais foram derivatizados de acordo com o item 3.4.1.2 e analisados por GC-MS.

3.4.3 Dosagem de ácidos urônicos dos heteropolissacarídeos

A dosagem de ácido urônico foi realizada pelo método colorimétrico descrito por FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Em 400 µl de amostra foram adicionados 40 µl de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6), e 2,4 ml de solução de tetraborato de sódio 75 mM, em H₂SO₄ concentrado. Após aquecimento em banho com H₂O fervente por 20 min, esta mistura foi resfriada e adicionados 80 µl da solução de *m*-hidroxi-bifenil (Sigma) a 0,15% em NaOH 0,5% para a produção do complexo colorido.

A coloração, estável até 1 hora após sua formação, foi lida em 525 nm. A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido glucurônico (Sigma) dentro da sensibilidade do método (0,97 a 38,8 µg de ácido urônico).

3.4.4 Carboxi-redução do heteropolissacarídeo de *P. constantimontium*

O processo de carboxi-redução foi realizado segundo TAYLOR e CONRAD (1972). O polissacarídeo (200 mg) foi dissolvido 3ml de tampão MES [ácido 2-(*N*-morfolina)-etanosulfônico] (0,2 M) e a este se adicionou, pouco a pouco e sob agitação, 385 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida]. A mistura de reação ficou sob agitação por duas horas. Decorrido este tempo, o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de tampão TRIS/HCl (2 M, pH 7,0; 1 ml). A amostra foi então reduzida com NaBH₄ ou NaB²H₄ até uma concentração final de 2 M, durante 16 h, e depois foi neutralizada com ácido acético (HOAc). Finalmente, o material foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 8 kDa durante 48 horas, concentrado e liofilizado. O processo de carboxi-redução foi novamente realizado, sendo posteriormente analisado por espectroscopia de RMN e metilação.

3.4.5 Hidrólise Ácida Parcial

A glucomanana e a galactoglucomanana (~ 100mg) obtidas do fungo liquenizado *H. obscurata* e *P. constantimontium*, respectivamente, foram submetidas a

hidrólises ácidas parciais com H_2SO_4 0,16 M, por 4, 6 e 10 h. Decorrido o tempo, as soluções, separadamente, foram dialisadas em membranas com limite de exclusão de 2 kDa e então liofilizadas. Uma amostra (2mg) foi hidrolisada e seus monossacarídeos analisados quanto aos seus derivados acetatos de alditol, por GC-MS. O restante foi examinado por RMN- ^{13}C e metilação.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3.300, acoplado a um espectrômetro de massa de marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, e Varian Saturn 2000R, ambos equipados com colunas capilares de sílica fundida (30m x 0,25 mm d.i.) revestidas DB-225 e DB23. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50°C (mantida por 1 minuto), seguindo-se um aumento gradual de 40°C.min⁻¹, até 215°C (acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados), ou 220°C (acetatos de alditóis), sendo mantida constante até o final da análise. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 ml.min⁻¹.

3.5.2 Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS)

As amostras foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio (0,1 mol.l⁻¹ contendo azida de sódio (NaN₃) 0,2 g.l⁻¹, para uma concentração final de 1 mg.ml⁻¹, sendo filtradas através de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro equivalente a 0,22 µm. Em seguida, as amostras foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) Waters equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo Waters 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos Wyatt technology, modelo DAWN DSP-F. Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel permeação Waters com limites de exclusão de 1 x 10⁶, 4 x 10⁵, 8 x 10⁴,

5×10^3 . O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ contendo azida de sódio (NaN_3) $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, com fluxo de $0,6 \text{ ml min}^{-1}$, monitorado por bomba peristáltica Waters 515.

3.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As amostras de polissacarídeos foram solubilizadas em água deuterada (D_2O) ou dimetilsulfóxido deuterado ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$) e analisadas em tubos de quartzo de 20 cm de comprimento por 5 mm de diâmetro interno. Os experimentos de ^{13}C e ^1H , mono e bidimensionais foram realizados em um espectrômetro Bruker, modelo Advance DRX 400 MHz. A temperatura de cada análise foi estabelecida de acordo com a solubilidade de cada amostra.

Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D_2O foram expressos em δ (ppm) relativos aos sinais de ^{13}C e ^1H da acetona em δ 30,20 e 2,22, respectivamente, e aos sinais do $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ em δ 39,70 (^{13}C) e 2,40 (^1H), para as amostras solúveis no mesmo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presente pesquisa foram estudadas duas espécies de fungos liquenizados, *Punctelia constantimontium* e *Heterodermia obscurata*, quanto aos seus componentes polissacarídicos.

Conforme descrito anteriormente na seção Material e Métodos, para cada espécie de fungo liquenizado realizou-se os processos de extração e purificação, sendo adotadas as siglas HO para *H. obscurata* e PC para *P. constantimontium* (Figura 5). Os fungos liquenizados estudados foram deslipidificados e submetidos aos procedimentos de extrações e purificações dos carboidratos de alta massa molar.

4.1 DESLIPIDIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO ETANÓLICA

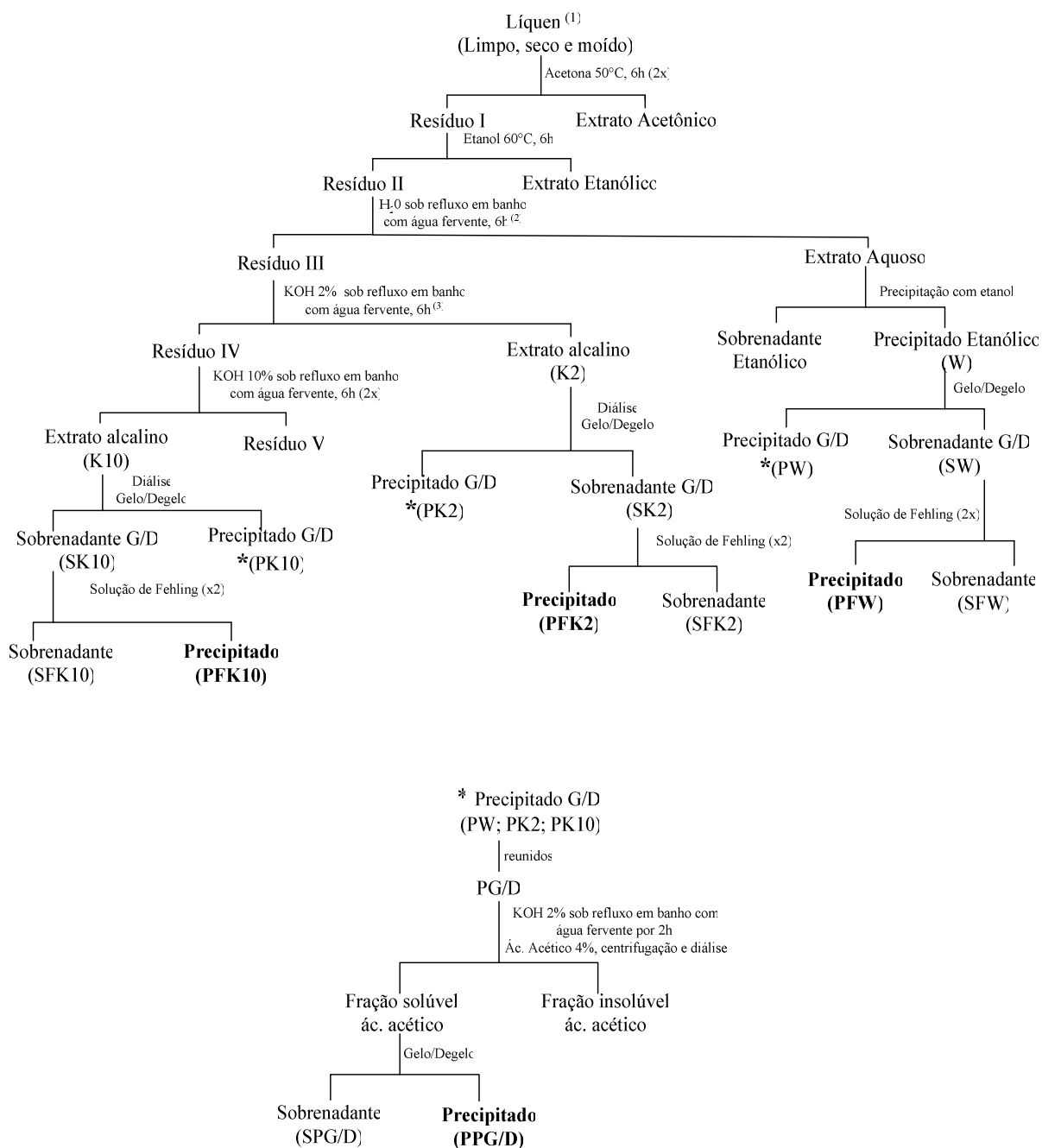
O talo liquênico dos fungos liquenizados *Punctelia constantimontium* (53,0 g) e *Heterodermia obscurata* (30,3 g), após triturados, foram submetidos a extrações com acetona (2 x). Os extratos acetônicos apresentaram um rendimento de 12,2% para o fungo liquenizado *H. obscurata* e de 11,4% para *P. constantimontium*, como mostra a tabela 3. Esses extratos foram reservados para avaliações posteriores.

TABELA 3 - Rendimento das frações obtidas das extrações dos fungos liquenizados *H. obscurata* e *P. constantimontium*.

FRAÇÕES	Rendimento (em g%) ⁽¹⁾	
	<i>H. obscurata</i>	<i>P. constantimontium</i>
Extrato acetônico	12,2	11,4
Extrato etanólico	3,9	5,1
Extrato aquoso	4,0	12,1
Extrato alcalino 2%	26,0	24,2
Extrato alcalino 10%	4,0	3,6

(1) Rendimento calculado com base no peso seco do fungo liquenizado (*H. obscurata*, 30,3g e *P. constantimontium*, 53,0 g).

FIGURA 5 – Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos dos fungos liquenizados *Heterodermia obscurata* e *Punctelia constantimontium*.



(1) Líquens: *Heterodermia obscurata*-HO (30,3g) e *Punctelia constantimontium*-PC (53,0g)

(2) Extração aquosa: 3 x para *H. obscurata* e 4 x para *P. constantimontium*

(3) Extração alcalina 2%: 5 x para *H. obscurata* e 6 x para *P. constantimontium*

Os materiais residuais foram posteriormente extraídos com etanol para obtenção de carboidratos de baixa massa molar. Os rendimentos dessa extração foram de 3,9% e 5,1% para *H. obscurata* e *P. constantimontium*, respectivamente (Tabela 3).

Os extratos etanólicos obtidos foram acondicionados e reservados para investigações posteriores.

4.2 EXTRAÇÕES AQUOSAS E ALCALINAS

O material deslipidificado foi submetido a sucessivas extrações aquosas e alcalinas (solução aquosa de hidróxido de potássio a 2% e 10%) com a finalidade de extrair os polissacarídeos. Primeiramente, foram realizadas extrações aquosas sob refluxo em banho com água fervente (3 x para *H. obscurata* e 4 x para *P. constantimontium*), sendo os polissacarídeos extraídos recuperados por precipitação etanólica (3:1, v/v) e os precipitados etanólicos dialisados contra água corrente, originando as frações W-HO e W-PC, para *H. obscurata* e *P. constantimontium*, respectivamente (Figura 5).

Os materiais residuais (Resíduo III) obtidos após extrações aquosas foram submetidos a extrações alcalinas com solução de KOH 2%, com adição de boroidreto de sódio (NaBH_4), sob refluxo em banho com água fervente, durante 6 horas (5 x para *H. obscurata* e 6 x para *P. constantimontium*). O mesmo procedimento foi realizado com solução aquosa de KOH a 10% durante 6 horas (2 x). Os extratos alcalinos a 2% e 10% (K2-HO, K2-PC, K10-HO e K10PC) obtidos foram, separadamente, neutralizados com ácido acético glacial (HOAc), dialisados contra água corrente e liofilizados.

Pode-se observar que em ambos os líquens, o maior rendimento obtido foi para a extração alcalina a 2% (Tabela 3), sendo os rendimentos das extrações aquosas e alcalinas (2% e 10%) de 4,0%, 26,0% e 4,0% para *H. obscurata* e 12,1%, 24,2% e 3,6% para *P. constantimontium*, respectivamente.

4.3 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

Os extratos obtidos, de ambos os fungos liquenizados, a partir das extrações aquosas (W-HO e W-PC) e alcalinas a 2% (K2-HO, K2-PC) e 10% (K10-HO e K10-PC) foram, separadamente, ressuspensos em água, congelados e então descongelados a temperatura ambiente (purificação por congelamento e degelo), resultando em frações insolúveis (PW-HO, PW-PC, PK2-HO, PK2-PC, PK10-HO e PK10PC) e solúveis em água fria (SW-HO, SW-PC, SK2-HO, SK2-PC, SK10-HO e SK10PC) (Figura 5).

As frações sobrenadantes do processo de gelo/degelo foram submetidas ao processo de purificação por precipitação com solução de Fehling (2 x), resultando na formação de precipitados (PFW-HO, PFW-PC, PFK2-HO, PFK2-PC, PFK10-HO e PFK10-PC) e sobrenadantes de Fehling (SFW-HO, SFW-PC, SFK2-HO, SFK2-PC, SFK10-HO e SFK10PC) (Figura 5).

4.4 POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO PRECIPITADO CONGELAMENTO/DEGELO

As frações insolúveis em água fria, obtidas do processo de congelamento-degelo (PW-HO, PW-PC, PK2-HO, PK2-PC, PK10-HO e PK10-PC) de ambos os fungos liquenizados foram avaliadas quanto aos seus respectivos rendimentos e as suas composições monossacarídicas. Estas apresentaram glucose como principal componente monossacarídico (Tabelas 4 e 5), indicando a presença de glucanas insolúveis em água fria nestas frações, porém provavelmente contaminadas com polissacarídeos da fração solúvel em água fria.

TABELA 4 – Composição monossacarídica e rendimento das frações precipitado gelo/degelo obtidos a partir de extrações aquosas, alcalinas a 2% e 10% do fungo liqüenizado *H. obscurata*.

FRAÇÕES	(g%) ⁽¹⁾	Monossacarídeos (mol%) ⁽²⁾		
		Man	Gal	Glc
PW-HO	0,7	12,3	5,3	82,4
PK2-HO	5,3	15,3	8,4	76,3
PK10-HO	0,9	14,5	8,1	77,4
PPG/D-HO	0,6	1,4	1,2	97,4

(1) Rendimento em relação ao peso seco do fungo liqüenizado (30,3g).

(2) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

TABELA 5 – Composição monossacarídica e rendimento das frações precipitado gelo/degelo obtidos a partir de extrações aquosas, alcalinas a 2% e 10% do fungo liqüenizado *P. constantimontium*.

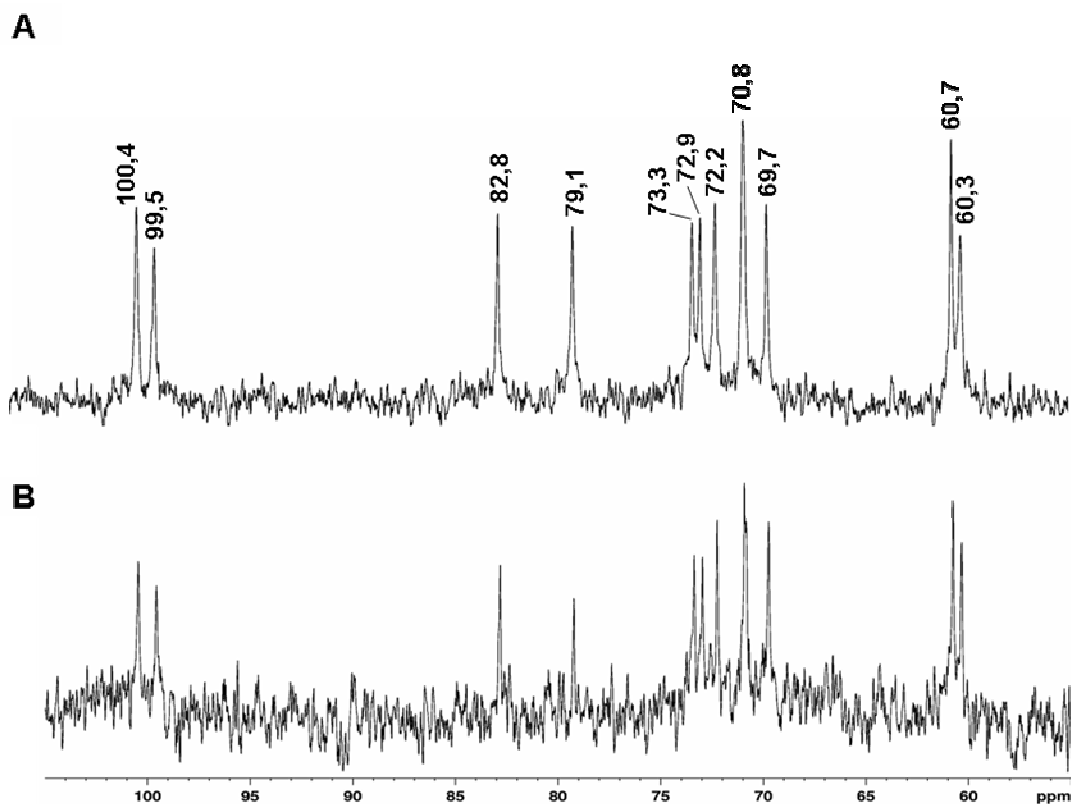
FRAÇÕES	(g%) ⁽¹⁾	Monossacarídeos (mol%) ⁽²⁾		
		Man	Gal	Glc
PW-PC	2,4	5,9	5,6	88,3
PK2-PC	3,5	17,6	14,5	67,8
PK10-PC	1,5	15,5	12,4	72,1
PPG/D-PC	1,9	1,6	1,3	97,1

(1) Rendimento em relação ao peso seco do fungo liqüenizado (53,0 g).

(2) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

Os espectros de RMN-¹³C das frações PW obtidas para ambos os fungos liqüenizados, *H. obscurata* e *P. constantimontium* (Figura 6 A e B, respectivamente), foram similares e apresentaram 11 sinais característicos de uma α-glucana, alternada, com ligações (1→3) e (1→4). Esta similaridade também pode ser observada para as frações precipitados de gelo/degelo obtidas a partir de extrações alcalinas (PK2 e PK10), desta maneira estas frações foram reunidas, resultando nas frações PG/D-HO e PG/D-PC, para *H. obscurata* e *P. constantimontium*, respectivamente.

FIGURA 6 – Espectros de RMN-¹³C das frações precipitado de congelamento e degelo (PW) obtidas de *Punctelia constantimontium* (A) e *Heterodermia obscurata* (B).

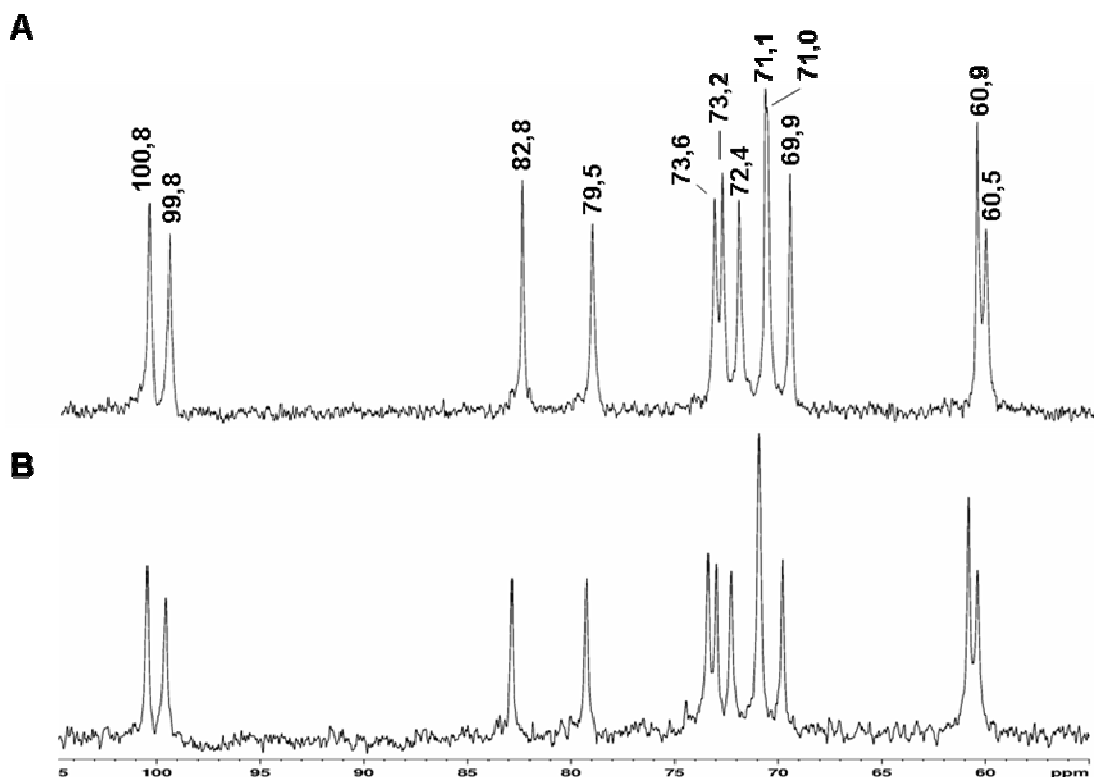


Com a finalidade de eliminar possíveis contaminantes, as frações PG/D-HO e PG/D-PC foram submetidas a mais um processo de purificação, que consistiu, primeiramente, na solubilização das frações em KOH 2%, sob refluxo em banho com água fervente por 2 horas, sendo estas neutralizadas e então tratadas com ácido acético (HOAc) a 4%, sob refluxo a 80°C por 30 minutos. Este processo resultou na formação de frações insolúveis e solúveis em ácido acético, as quais foram neutralizadas e dialisadas contra água corrente (~ 48 h). Após diálise, as frações solúveis em ácido acético foram submetidas a um novo processo de congelamento e degelo, originando frações solúveis (SPG/D-HO e SPG/D-PC) e insolúveis em água fria (PPG/D-HO e PPG/D-PC) (Figura 5).

Como pode ser observado (Tabelas 4 e 5), este procedimento foi eficiente para a obtenção de glucanas purificadas (PPG/D-HO e PPG/D-PC), pois o conteúdo de

glucose, após o tratamento, aumentou para ~ 97% para ambas frações, além de melhor definição nos sinais observados no espectro de RMN-¹³C (Figura 7 A e B, respectivamente).

FIGURA 7 – Espectro de RMN-¹³C da fração PPG/D obtida de *Heterodermia obscurata* (A) e *Punctelia constantimontium* (B).



Os espectros de RMN-¹³C foram comparados com os dados da literatura (YOKOTA et al., 1979; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a; CARBONERO et al., 2005c) e foi possível assinalar todos os carbonos (Tabela 6). O sinal na região de carbono anomérico em δ 100,8 foi atribuído ao C-1 das unidades de α -Glc_p 4-*O*-substituídas enquanto que o sinal δ 99,8 corresponde ao C-1 das unidades de α -Glc_p 3-*O*-substituídas, sendo confirmado pelos sinais em δ 79,5 e 82,8 referente ao C-4 e C-3 das unidades de Glc_p 4-*O*- e 3-*O*-substituídas, respectivamente. Os sinais em δ 72,4, 69,9 e 71,0 correspondem ao C-2, C-4 e C-5 das unidades 3-*O*-substituídas, e

com relação as unidades 4-*O*-substituídas, os sinais δ 71,1, 73,2 e 73,6 correspondem ao C-2, C-3 e C-5, respectivamente. O sinal δ 60,9 refere-se ao C-6 não substituído das unidades de Glcp 4-*O*-substituídas, e em δ 60,5 ao C-6 não substituído das unidades 3-*O*-substituídas. A configuração α , bem como os sinais referentes às substituições em *O*-3 e *O*-4 sugerem a presença de glucanas com ligações (1→3) e (1→4) nas frações insolúveis em água fria obtidas a partir dos líquens estudados.

TABELA 6 – Deslocamentos químicos de ^{13}C obtidos da α -D-glucana isolada de *H. obscurata* e *P. constantimontium*.

^{13}C	α -D-Glcp	
	3- <i>O</i> -substituído	4- <i>O</i> -substituído
C-1	99,8	100,8
C-2	72,4	71,1
C-3	82,8	73,2
C-4	69,9	79,5
C-5	71,0	73,6
C-6	60,5	60,9

Os resultados de metilação (PPG/D-HO e PPG/D-PC) obtidos concordaram com as análises espectroscópicas, sendo possível observar a presença de unidades de glucose 3-*O*- (2,4,6-Me₃Glc) e 4-*O*- substituídas (2,3,6-Me₃Glc) (Tabela 7). Embora os espectros de RMN- ^{13}C destas frações sejam similares, através dos dados de metilação pode ser observado que a relação molar entre as ligações do tipo (1→3) e (1→4) foi diferente entre os líquens estudados, sendo de 1,3:1 para *P. constantimontium* e de 1,07:1 para *H. obscurata*.

TABELA 7 - Análise por metilação da glucana isolada na fração precipitado gelo/degelo PPG/D-HO e PPG/D-PC

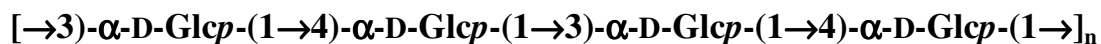
Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ⁽¹⁾	Proporção relativa (%)		Tipo de Ligação ⁽²⁾
	PPG/D-HO <i>H. obscurata</i>	PPG/D-PC <i>P.constantimontium</i>	
2,3,4,6-Me ₄ Glc	0,9	1,6	Glc _p -(1→
2,4,6-Me ₃ Glc	51,4	56,5	→3)-Glc _p -(1→
2,3,6-Me ₃ Glc	47,7	41,9	→4)-Glc _p -(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

De acordo com os dados obtidos, a fração insolúvel em água fria obtida a partir dos líquens estudados, *H. obscurata* e *P. constantimontium*, consiste em uma α -D-glucana contendo, alternadamente, ligações do tipo (1→3) e (1→4), numa relação molar de 1,07:1 e 1,3:1, respectivamente, sendo denominadas de nigeranas (Figura 8).

FIGURA 8 – Estrutura proposta para nigerana obtida por precipitado gelo/degelo *H. obscurata* e *P. constantimontium*



As nigeranas com relação molar de 1:1 são polissacarídeos amplamente conhecidos em fungos liquenizados, como na Família Cladoniaceae (WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a; CARBONERO et al., 2002b) e Ramalinaceae (STUELP et al., 1999; CORDEIRO et al., 2003). Na família Parmeliaceae, a maioria das nigeranas descritas também apresentam relação molar de 1:1, como àquelas dos gêneros *Parmotrema* e *Rimelia* (CARBONERO et al., 2005c) e em algumas espécies de

Parmelia (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001). Por outro lado, há exceções, como no líquen *Letharia vulpina* (família Parmeliaceae), onde a relação molar encontrada foi de 1,2:1 (IACOMINI et al., 1988).

Com relação à nigerana com relação molar de 1,3:1 encontrada em *P. constantimontium*, estrutura similar foi encontrada apenas para o líquen da família Parmeliaceae, *Parmelia saxatilis* (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001).

4.5 POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO PRECIPITADO DE FEHLING (PF)

4.5.1 Polissacarídeo do Fungo Liquealizado *Heterodermia obscurata*

Os precipitados de Fehling (PFW-HO, PFK2-HO e PFK10-HO) obtidos a partir das extrações aquosas e alcalinas (KOH a 2% e 10%) de *Heterodermia obscurata* mostraram-se similares, contendo manose e glucose como principais componentes monossacarídicos (Tabela 8). Os espectros de RMN-¹³C dessas frações (PFK2-HO, PFK10-HO e PFW-HO) também apresentaram-se similares (Figura 9 A, B e C, respectivamente), indicando possuírem o mesmo heteropolissacarídeo. Devido ao maior rendimento da fração PFK2-HO, as análises complementares foram realizadas com esta fração, a qual apresentou perfil de eluição homogêneo quando analisada por HPSEC-MALLS (Dado não mostrado).

TABELA 8 – Composição monossacarídica e rendimento das frações precipitado de Fehling do fungo liquealizado *H. obscurata*.

Frações	Rendimento (g%) ⁽¹⁾	Monossacarídeos (mol%) ⁽²⁾		
		Man	Gal	Glc
PFW-HO	0,6	77,5	6,0	16,5
PFK2-HO	8,2	81,7	-	18,3
PFK10-HO	0,2	76,2	5,8	18,0

(1) Rendimento em relação ao peso seco do líquen (30,3g).

(2) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

Os espectros de RMN- ^{13}C (Figura 9) e HMQC (Figura 10) desta fração apresentaram sinais na região anomérica que correspondem aos C-1/H-1 das unidades de α -D-Manp ligadas-(1 \rightarrow 4) e terminais não redutores de α -D-Manp (δ 102,0/5,09), terminal não redutor de α -D-Glcp (δ 100,1/5,32) e de unidades de α -D-Manp da cadeia principal 2,6-di-*O*-substituída (δ 98,7;98,5;98,4/5,12) (TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992). Observa-se, na análise de HMQC (Figura 10), que os valores de H-1 das unidades de manose e glucose possuem sinais anoméricos em campo baixo, caracterizando ligações do tipo α .

As configurações glicosídicas foram confirmadas pelos valores de constante de acoplamento $J_{\text{C-1,H-1}}$ observadas no espectro de HMQC acoplado (Figura 11). As unidades de Manp ligadas-(1 \rightarrow 4) e terminais não redutores de D-Manp (δ 102,0), as unidades terminais não redutoras de Glcp (δ 100,1), além das unidades de manose da cadeia principal 2,6-di-*O*-substituídas (δ 98,7;98,5;98,4) apresentam configuração do tipo α em virtude do valor $J_{\text{C-1,H-1}} = 174,3$ Hz para o primeiro sinal e 173,8 Hz para os demais sinais observados (PERLIN; CASU, 1969).

Outros sinais também puderam ser atribuídos e assinalados de acordo com alguns já descritos e caracterizados por outros autores (TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992), como àqueles em δ 78,7, 78,5, 78,3 e 78,1 correspondentes ao C-2 das unidades de α -Manp 2,6-di-*O*-substituídas, bem como o correspondente ao C-4 das unidades de α -Manp 4-*O*-substituídas (δ 75,7) (Figura 9).

FIGURA 9 – Espectro de RMN- ^{13}C das frações do precipitado de Fehling, PFK2 (A) PFK10 (B) PFW (C), obtidas de *Heterodermia obscurata*, em D_2O a 70°C .

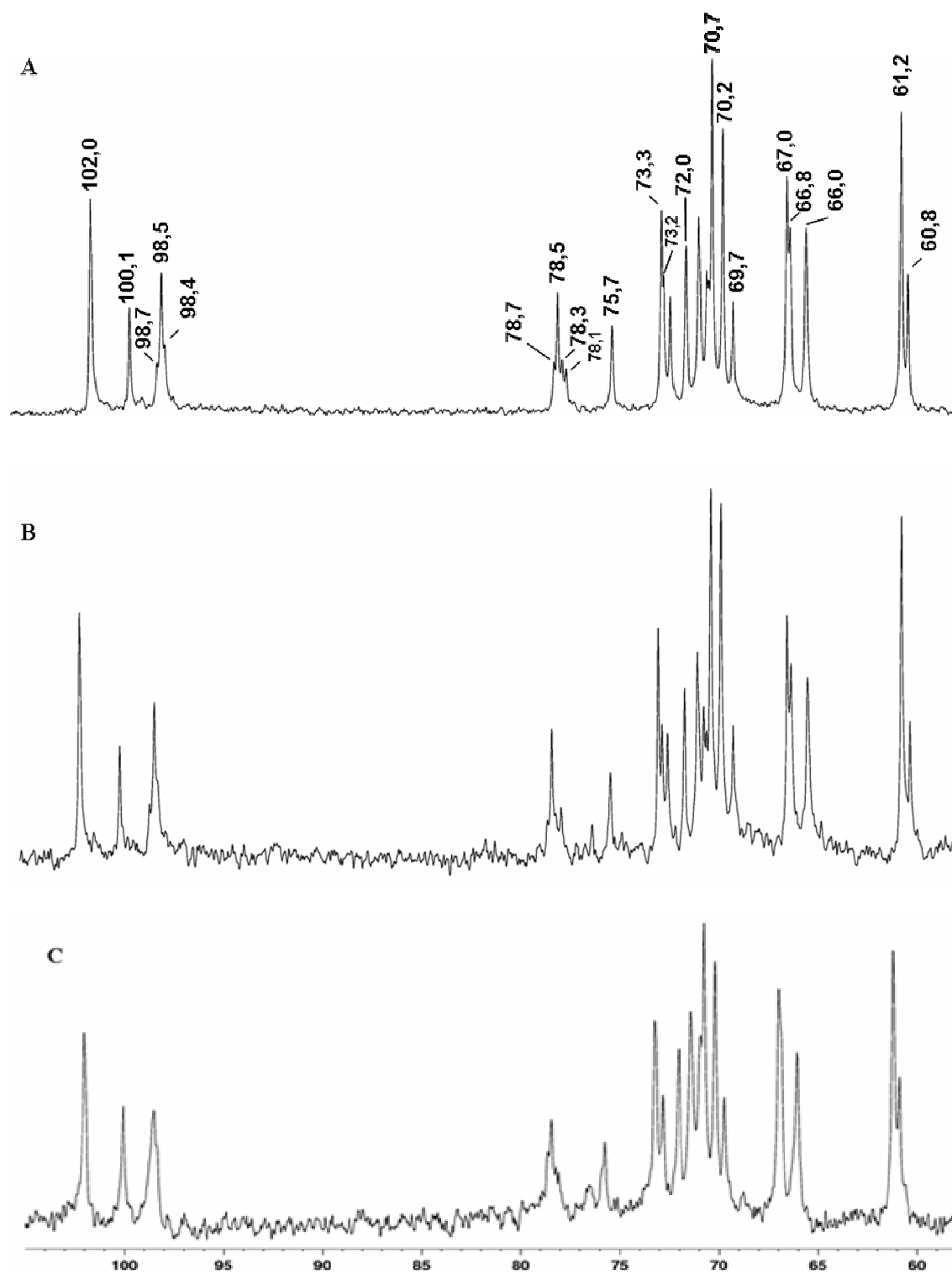


FIGURA 10 – Espectro 2D ^1H , ^{13}C HMQC da fração precipitado de Fehling (PFK2; glucomanana) obtida de *Heterodermia obscurata* (D_2O , 70°C).

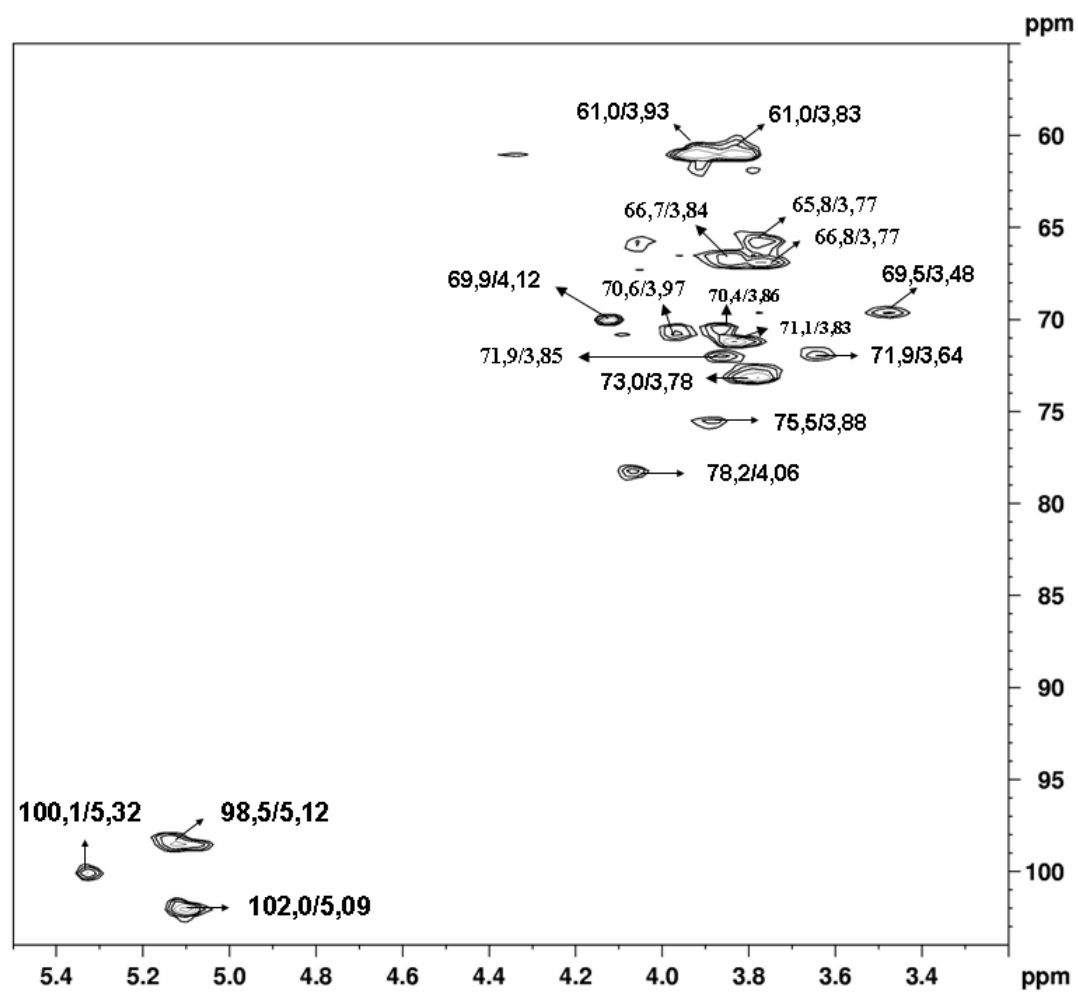
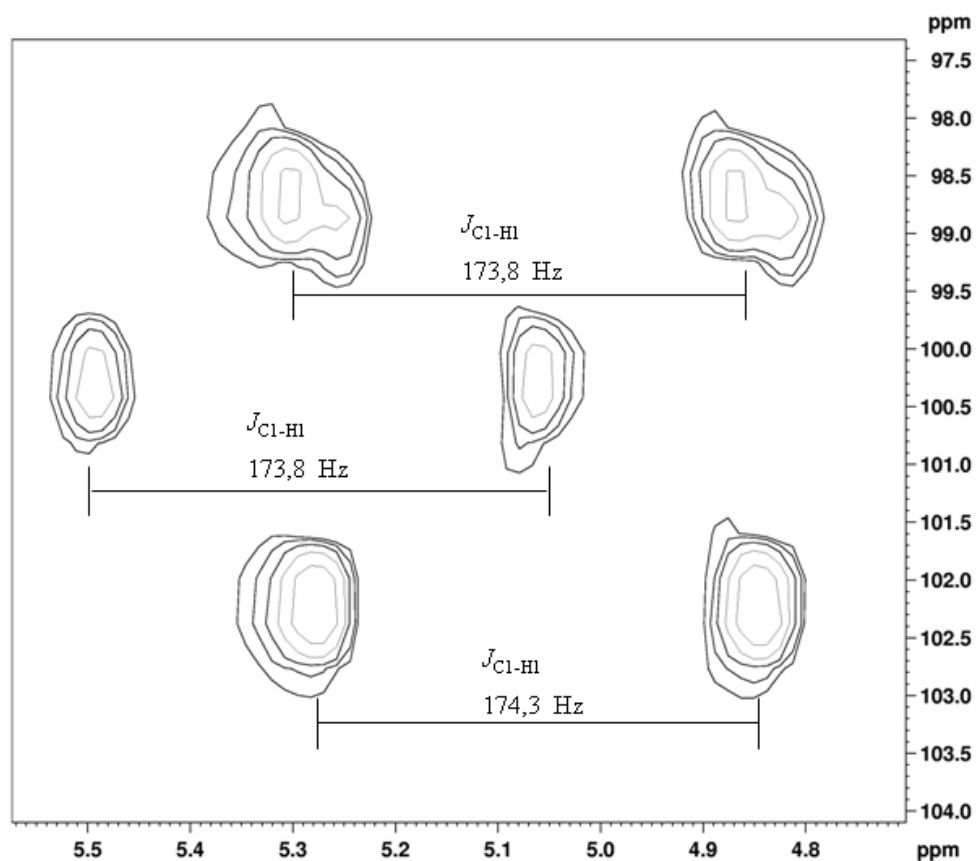
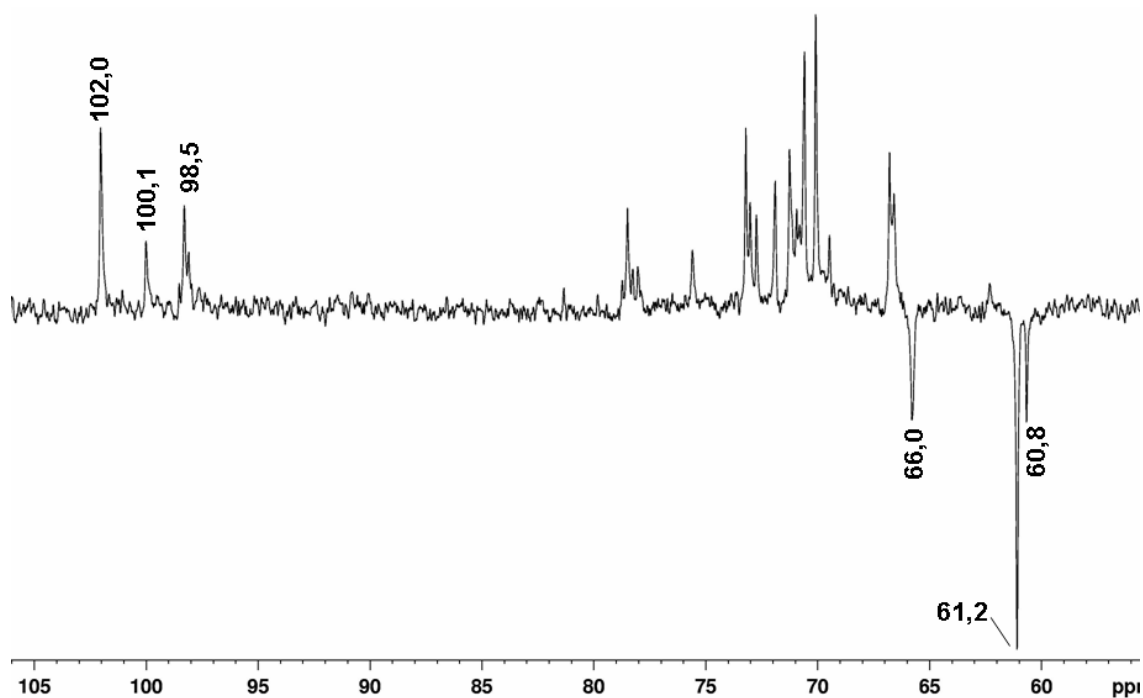


FIGURA 11 – Região anomérica do espectro de HMQC acoplado da fração precipitado Fehling (PFK2; glucomanana) obtida da *Heterodermia obscurata* (em D₂O, 70°C).



O sinal de ^{13}C em δ 66,0 refere-se ao C-6 substituído das unidades de Manp 2,6-*O*-substituídas e os sinais δ 61,2 e 60,8 ao C-6 não substituído dos terminais não redutores de Manp, Glcp e unidades de manose 4-*O*-substituídas. Esses resultados foram confirmados por DEPT (Figura 12) através da inversão dos respectivos sinais.

FIGURA 12 – Espectro de DEPT da fração precipitado de Fehling (PFK2; glucomanana) obtida de *Heterodermia obscurata*, em D₂O a 70°C.



A análise de metilação confirmou os resultados apresentados pelos espectros de RMN, a qual, baseada nos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (Tabela 9), indicou uma estrutura polissacarídica bastante ramificada, contendo unidades de Manp (18,2%) e Glcp (19,8%) como terminais não redutores. Além disso, também foram observados os derivados 3,4-Me₂Man (42,4%) e 2,3,4-Me₃Man (3,8%) correspondentes as unidades da cadeia principal, a qual é constituída por unidades de α -Manp (1→6) ligadas, sendo a maioria substituídas em O-2. Unidades de α -Manp-(1→4) também foram observadas, devido à presença do derivado 2,3,6-Me₃Man (12,7%), possivelmente fazendo parte da cadeia lateral.

TABELA 9 - Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFK2; glucomanana) obtida de *Heterodermia obscurata* e de suas subfrações obtidas por hidrólise parcial.

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> - metilados ⁽¹⁾	Fração (mol %)				Tipo de ligação ⁽²⁾
	PFK2	PFK2-HP4	PFK2-HP6	PFK2- HP10	
2,3,4,6-Me ₄ Man	18,2	21,0	24,2	26,7	Manp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ Glc	19,8	4,8	2,9	1,9	Glc p-(1→
3,4,6-Me ₃ Man	1,9	2,3	2,2	2,7	→2)-Manp-(1→
2,3,6-Me ₃ Man	12,7	2,6	2,1	1,2	→4)-Manp-(1→
2,3,4-Me ₃ Man	3,8	28,6	29,3	43,5	→6)-Manp-(1→
2,3-Me ₂ Man	1,2	0,9	1,3	1,0	→4,6)-Manp-(1→
3,4-Me ₂ Man	42,4	39,8	37,8	22,9	→2,6)-Manp-(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

Com a finalidade de verificar a cadeia principal deste polissacarídeo, o mesmo foi submetido à hidrólise ácida parcial, de acordo com a metodologia descrita na seção Material e Métodos, item 3.4.5. Os materiais resistentes às hidrólises ácidas parciais, após diálises em membrana com limite de exclusão de 2 kDa, foram denominadas PFK2-HP4, PFK2-HP6 e PFK2-HP10 referentes aos tempos de hidrólise de 4, 6 e 10 horas, respectivamente. Estas frações foram analisadas quanto à sua composição monossacarídica (Tabela 10), e pode ser observado um aumento significativo da quantidade de manose, bem como redução no percentual de glucose.

TABELA 10 – Composição Monossacarídica da Fração PFK2-HO e suas subfrações após hidrólises ácidas parciais do fungo liquenizado *Heterodermia obscurata*.

FRAÇÕES	Monossacarídeos (mol%) ⁽¹⁾	
	Man	Glc
PFK2-HO	81,7	18,3
PFK2-HP4	94,7	5,3
PFK2-HP6	95,2	4,8
PFK2-HP10	95,7	4,3

(1) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

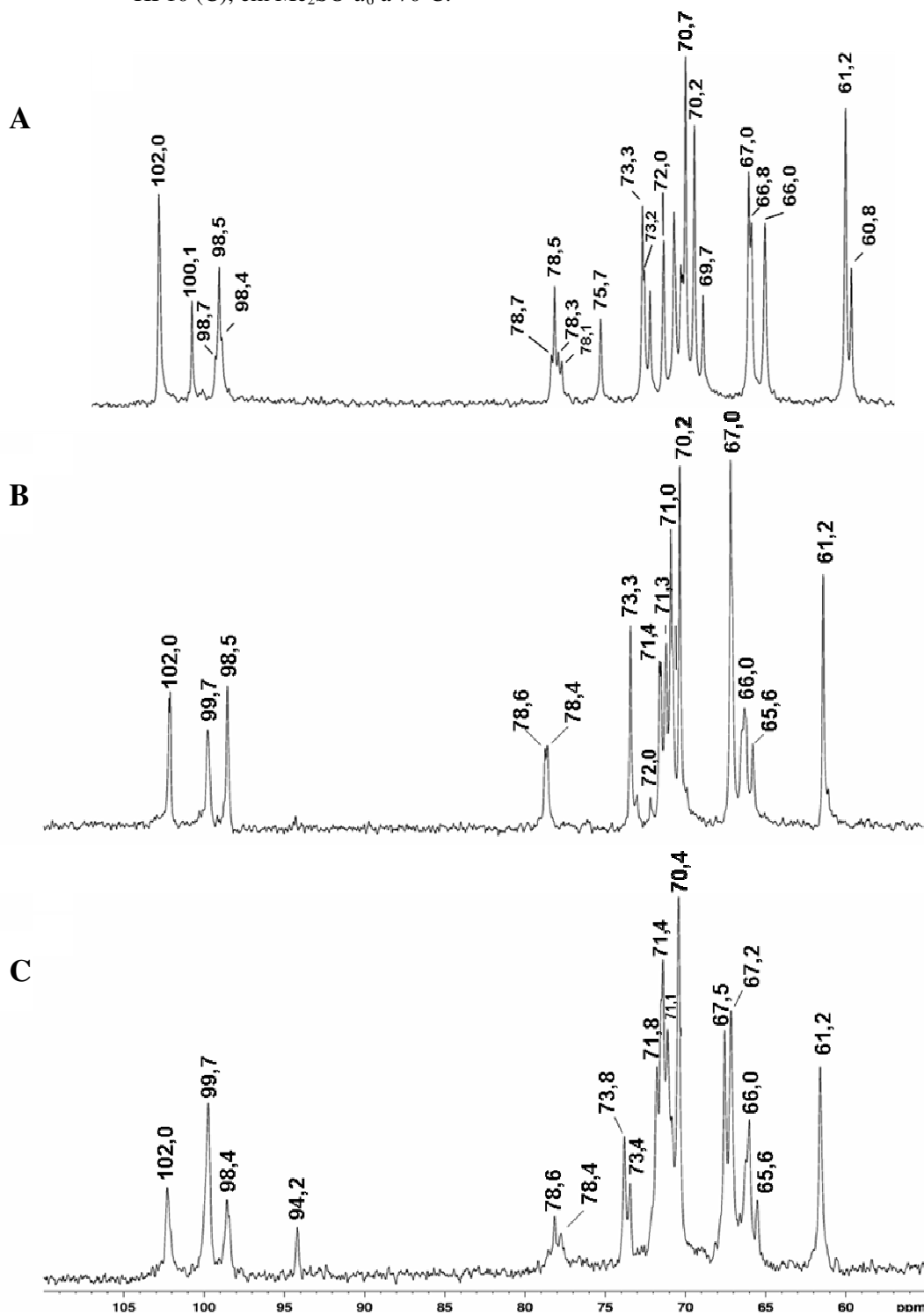
Análises de metilação das frações PFK2-HP4, PFK2-HP6 e PFK2-HP10 (Tabela 9), mostraram um aumento do derivado 2,3,4-Me₃Man, sugerindo uma cadeia principal constituída de unidades de manose (1→6)- ligadas. Além disso, também foi observado um decréscimo dos derivados 3,4-Me₂Man_p (o qual tornou-se o derivado 2,3,4-Me₃Man da cadeia principal) e 2,3,4,6-Me₄Glc_p, indicando a remoção das unidades terminais não redutoras de glucose, as quais possivelmente possam estar substituindo as unidades de manose da cadeia principal em O-2.

Os espectros de RMN-¹³C destas frações, PFK2-HP4 e PFK2-HP10 (Figura 13 B e C, respectivamente), apresentaram sinais de C-1 correspondentes aos terminais não redutores de α-D-Manp (δ 102,0), unidades de α-D-Manp da cadeia principal 6-O (δ 99,7) e 2,6-di-O-substituída (δ 98,5) (TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992).

Também pode ser observado nestes espectros, a ausência dos sinais em δ 100,1 e 75,7 atribuído ao C-1 dos terminais não redutores de α-D-Glc_p e ao C-4 das unidades de Manp 4-O-substituídas, respectivamente, bem como a presença do sinal de C-1 (δ 99,7) das unidades de Manp (1→6) ligadas, referentes a cadeia principal, e a redução da intensidade dos sinais de C-2 substituídos (δ 78,6 e 78,4) das unidades de α-D-Manp a medida que aumenta o tempo de hidrólise. O sinal δ 94,2 corresponde aos terminais redutores de manose.

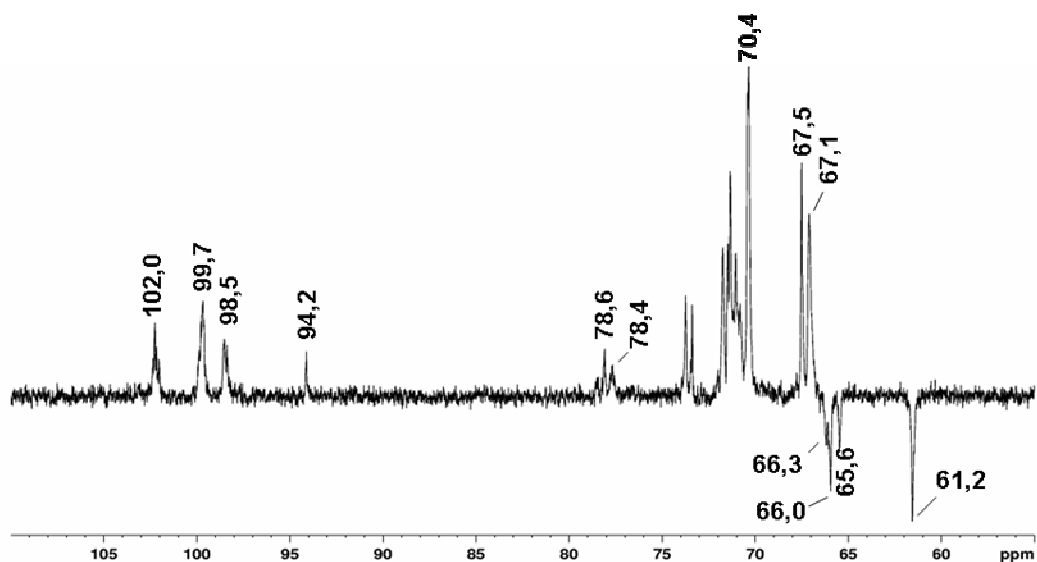
Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por análises de metilação (Tabela 9), onde foi possível observar a remoção das unidades de glucose e das unidades de manose 4-O-substituídas, além do aumento do percentual do derivado correspondente as unidades da cadeia principal (2,3,4-Me₃Man).

FIGURA 13 – Espectros de RMN-¹³C das frações PFK2-HO (nativa) (A), PFK2-HP4 (B) e PFK2-HP10 (C), em Me₂SO-*d*₆ a 70°C.

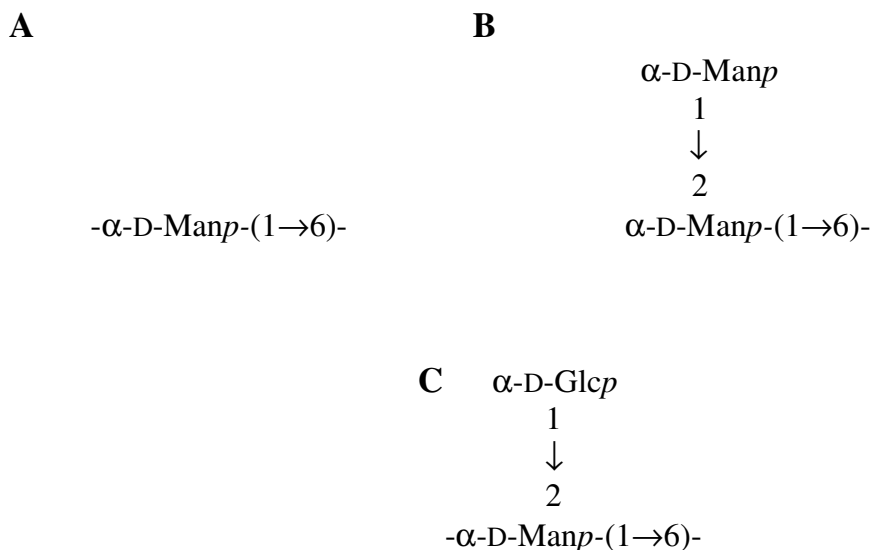


Os sinais de ^{13}C em δ 66,3, 66,0 e 65,6 referem-se ao C-6 substituído de α -D-Manp da cadeia principal e o sinal δ 61,2 ao C-6 não substituído dos terminais não redutores de Manp, Glcp e unidades de manose 4-*O*-substituídas. Esses dados foram confirmados através da inversão dos respectivos sinais no experimento DEPT (Figura 14).

FIGURA 14– Espectro de RMN- ^{13}C -DEPT para HP10-HO, em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70°C .



A partir dos dados obtidos, as frações precipitadas de Fehling (PFW-HO, PFK2-HO e PFK10-HO) mostram resultados consistentes que sugerem uma glucomanana altamente ramificada, com uma cadeia principal composta por unidades de α -D-Manp ligadas-(1 \rightarrow 6), sendo a maioria substituídas em O-2, principalmente, por unidades terminais não redutoras de α -D-Glcp, α -D-Manp e, possivelmente, por cadeias laterais constituídas por unidades de α -D-Manp 4-*O*-substituídas (Figura 15).

FIGURA 15 – Estrutura proposta para glucomanana obtida do líquen *H. obscurata*.

Com relação aos heteropolissacarídeos presentes em fungos liquenizados, a maioria destes consistem em galactomananas, galactoglucomananas e/ou galactomanoglucanas, sendo estas compostas por significantes percentuais de galactose, além de manose e glucose.

Relatos anteriores de estrutura similar (glucomanana) à encontrada no presente estudo foi descrita apenas para o fungo liquenizado *Tornabenia intricata* (TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992) a qual pertence à mesma família (Physciaceae), porém esta apresenta diferenças na sua estrutura. A glucomanana de *T. intricata* possui menor percentual de glucose (*T. intricata*: 7% e *H. obscurata*: 18,3%), além de unidades de Manp 2,4-di-*O*-substituídas (14%), as quais não foram observadas em *H. obscurata*.

Avaliando os resultados obtidos, observou-se que a glucomanana é um polissacarídeo típico da família Physciaceae, desta forma, os dados obtidos reforçam a utilização de polissacarídeos como uma ferramenta adicional para a quimiotaxônomia, porém, estudos adicionais com fungos liquenizados desta mesma família deverão ser realizados.

4.5.2 Polissacarídeo do Fungo Liquealizado *Punctelia constantimontium*

Os sobrenadantes de gelo/degelo obtidos a partir das extrações aquosas e alcalinas (KOH a 2% e 10%) foram submetidos ao processo de purificação por precipitação com solução de Fehling (Figura 5), originando as frações precipitados (PFW-PC, PFK2-PC e PFK10-PC) e sobrenadantes de Fehling (SFW-PC, SFK2-PC e SFK10-PC). Como podemos observar na Tabela 11, os precipitados de Fehling (PFW-PC, PFK2-PC e PFK10-PC) mostraram-se similares, apresentando manose, galactose e glucose como componentes monossacarídicos. A fração PFK2-PC apresentou além dos monossacarídeos neutros, 6% ácidos urônicos, determinadas por método colorimétrico (FILISETTI-COZZI; CARPITA, 1991).

Devido à presença desses grupamentos ácidos, a fração PFK2-PC foi submetida ao processo de carboxi-redução pelo método de TAYLOR e CONRAD (1972), resultando na fração CRPFK2-PC. Esta foi analisada em GC-MS (Tabela 11), e conclui-se que o ácido urônico é o glucurônico, pois na fração PFK2-PC obteve-se 4,4% de glucose, e após este sofrer carboxirredução (CRPFK2-PC), a porcentagem de glucose aumentou para 8,9%. Além dessa evidência no aumento nos teores de glucose, foi observado os fragmentos com relação m/z 219 e 147 devido a presença de 2 núcleos de deutério em C-6, na fração que, após carboxiredução, foi reduzida com NaB^2H_4 .

Os espectros de RMN- ^{13}C da frações precipitados de Fehling das extrações aquosas e alcalinas 2 e 10% (PFK2-PC, PFK10-PC e PFW-PC) mostraram-se similares (Figura 16 A, B e C, respectivamente), indicando possuírem o mesmo heteropolissacarídeo. Devido ao maior rendimento apresentado pela fração PFK2-PC (Tabela 11), a qual apresentou-se homogênea quando analisada por HPSEC-MALLS (dado não mostrado), esta foi submetida aos demais processos de caracterização estrutural.

TABELA 11 – Composição monossacarídica e rendimento das frações precipitado de Fehling do fungo liquenizado *Punctelia constantimontium*.

FRAÇÕES	Rendimento (g%) ⁽¹⁾	Monossacarídeos (mol%) ⁽²⁾			Ácido urônico ⁽³⁾ (%)
		Man	Gal	Glc	
PFW-PC	2,7	58,5	35,6	5,9	nd
PFK2-PC	8,7	48,5	47,1	4,4	6
CRPFK2-PC	-	47,6	43,5	8,9	-
PFK10-PC	0,5	55,6	37,0	7,4	nd

(1) Rendimento em relação ao peso seco do líquen (53,0 g).

(2) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

(3) Determinado pelo método colorimétrico FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991)

(nd) não determinado

Os espectros de RMN-¹³C (Figura 16 A, B e C) e HMQC (Figura 17) da fração PFK2 apresentou sinais na região anomérica que correspondem aos C-1/H-1 referentes a terminais não redutores de β -D-Galp-(1→4)- α -D-Manp (δ 104,4/4,63), β -D-Galp-(1→2)- α -D-Manp (δ 102,9/4,47), e de unidades de α -D-Manp da cadeia principal 6-O- (δ 101,2/5,21), 2,6-di-O- (δ 100,3/5,00) e 2,4,6-tri-O-substituídas (δ 98,3/5,19) (GORIN; IACOMINI, 1984, 1985; TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1995; CARBONERO et al., 2005a).

As configurações glicosídicas (α e β) foram determinadas pelos deslocamentos de ¹H (HMQC: Figura 17) e constantes de acoplamento ($J_{C-1,H-1}$) observadas no espectro de HMQC acoplado (Figura 18). Os terminais não redutores de Galp apresentam configuração do tipo β em virtude dos sinais de H-1 em campo alto em δ 4,63 (104,4) e δ 4,47 (102,9), os quais estão de acordo com os valores $J_{C-1,H-1}$ de 164,0 e 163,8 Hz, respectivamente. Os sinais de H-1 em campo baixo a δ 5,21 (101,2, $J_{C-1,H-1}$ = 173,3), 5,00 (100,3, $J_{C-1,H-1}$ = 172,0 Hz) e 5,19 (98,3; $J_{C-1,H-1}$ = 174,5 Hz) indicam que as unidades de Manp apresentam configuração glicosídica do tipo α , de acordo os valores de $J_{C-1,H-1}$ obtidos (PERLIN; CASU, 1969).

FIGURA 16 – Espectro de RMN-¹³C das frações do precipitado de Fehling, PFK2 (A) PFK10 (B) PFW (C), obtidas de *Punctelia constantimontium*, em D₂O a 70°C.

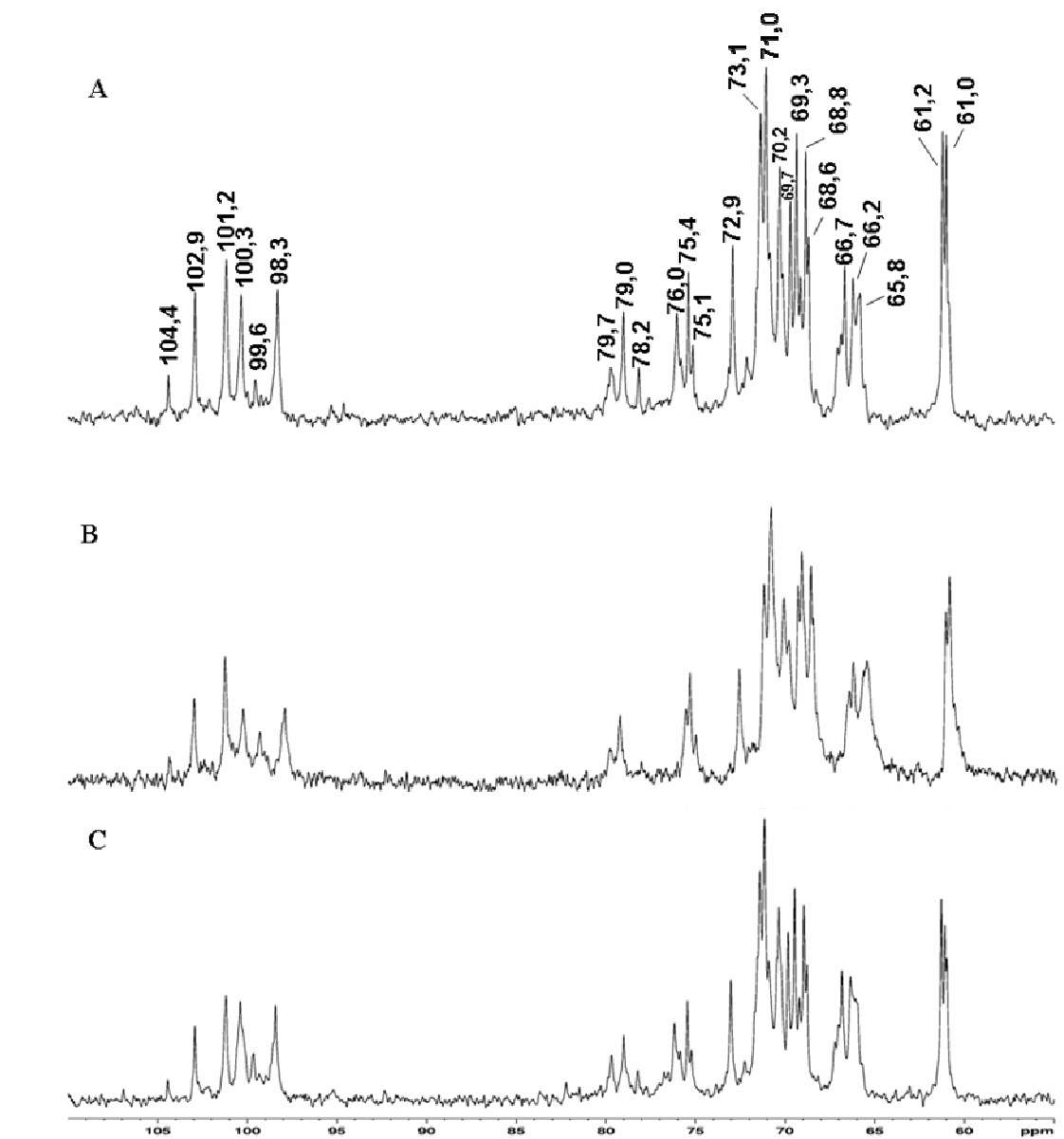


FIGURA 17 – Espectro 2D ^1H , ^{13}C HMQC da fração precipitado de Fehling (PFK2; galactoglucomanana) obtida de *P. constantimontium* (em D_2O , 70°C)

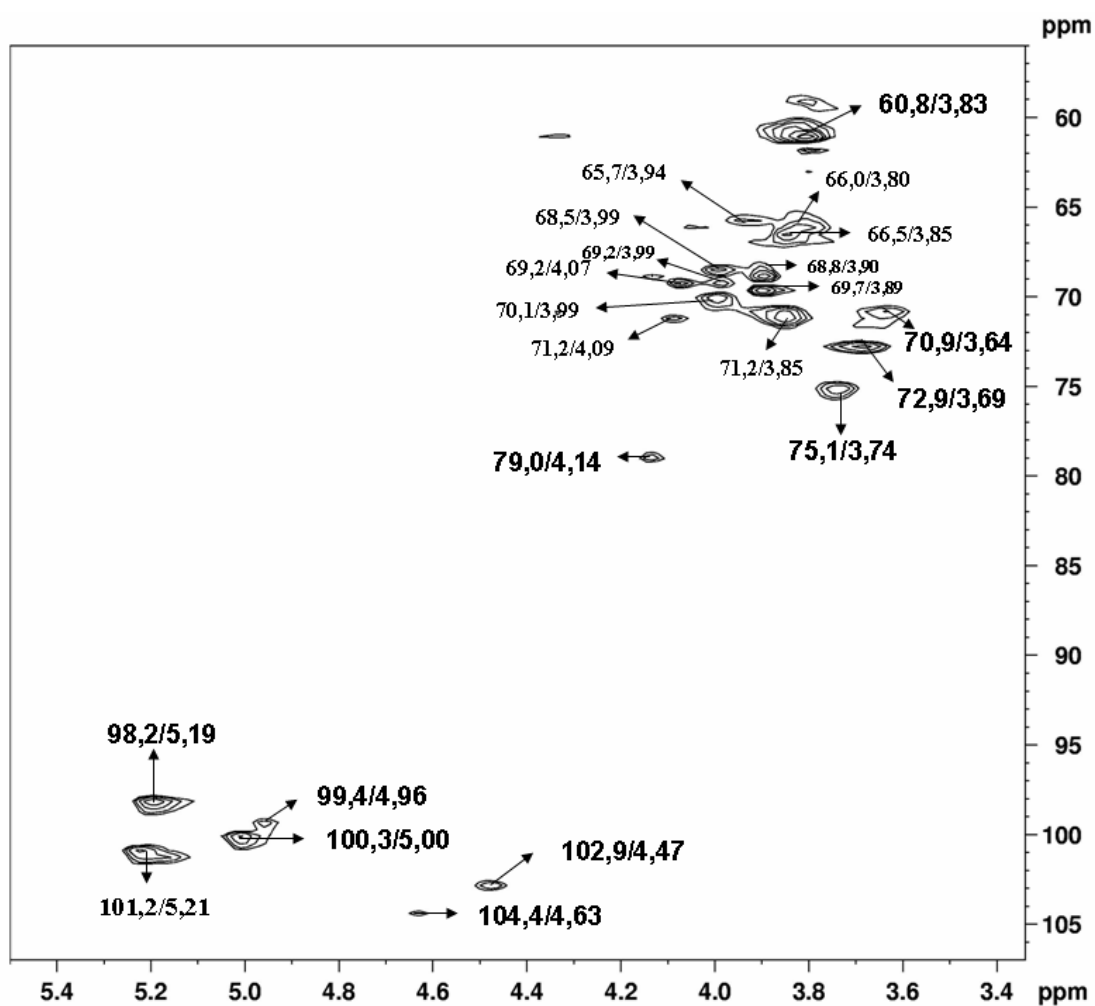
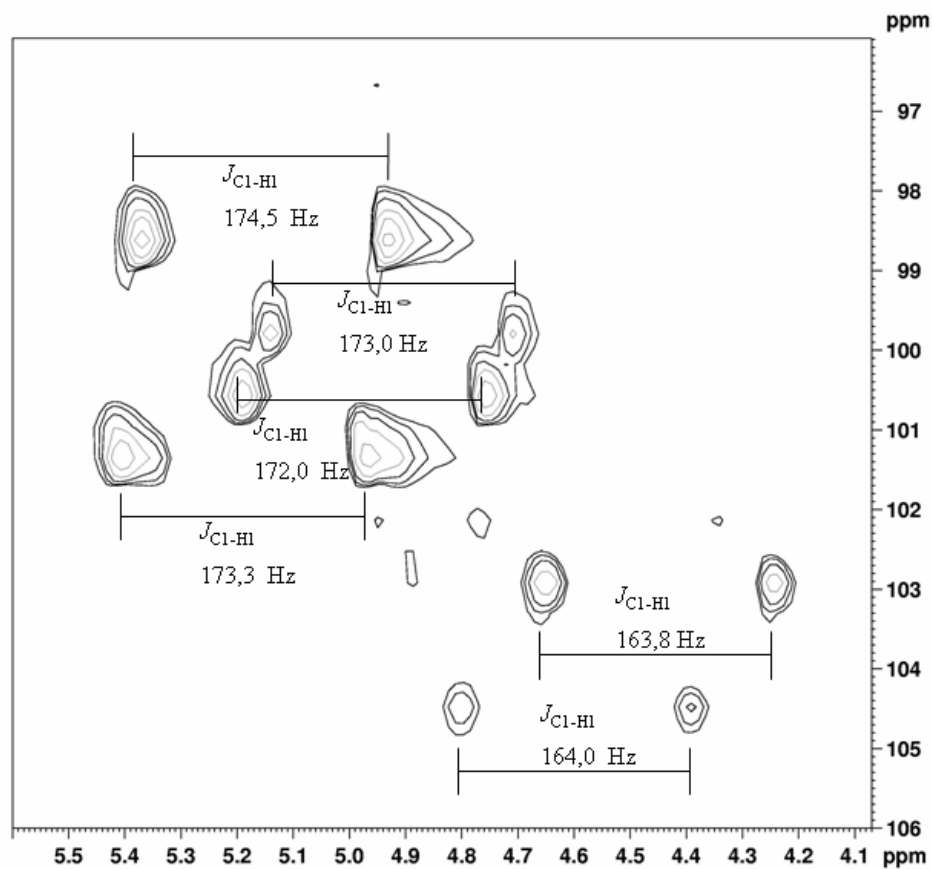
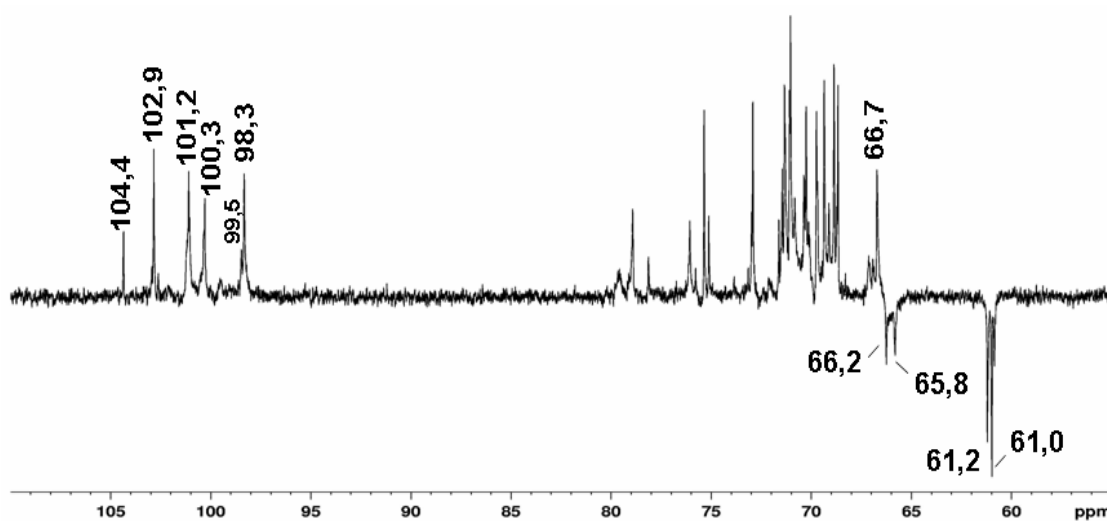


FIGURA 18 – Região anomérica do espectro de HMQC acoplado da fração precipitado Fehling (PFK2; galactoglucomanana) obtida da *P. constantimontium* (em D₂O, 80°C).



Os sinais de ^{13}C em δ 66,2 e 65,8 correspondem ao C-6 substituídos das unidades de $\alpha\text{-Manp-(1}\rightarrow\text{6)}$ ligadas, enquanto que os sinais em δ 61,2 e 61,0 são referentes, principalmente, aos grupos $-\text{CH}_2$ não substituídos das unidades terminais não redutoras de Galp. Estes assinalamentos foram confirmados pela inversão dos referidos sinais no experimento DEPT (Figura 19).

FIGURA 19 – Espectro de RMN- ^{13}C -DEPT da fração precipitado de Fehling (PFK2; galactoglucomanana) obtida de *Punctelia constantimontium* em D_2O a 70°C .



A complexidade da estrutura, observada no espectro de RMN- ^{13}C (Figura 16) foi confirmada pela análise de metilação, devido à presença de vários derivados parcialmente *O*-metilados. Conforme pode ser observado (Tabela 12), esta fração mostrou-se altamente ramificada, contendo consideráveis proporções de unidades terminais não redutores de Galp, além de pequenas porcentagens de Manp e Glcp. Também foram observados os derivados 2,3,4-Me₃Man, 3,4-Me₂Man e 3-MeMan, correspondentes às unidades da cadeia principal a qual é constituída por unidades de $\alpha\text{-Manp-(1}\rightarrow\text{6)}$, substituídas em O-2 ou disubstituídas em O-2,4, além de unidades não substituídas. Substituições em O-3, O-4 e O-6 foram observadas para as unidades de Galp. As unidades de Glcp apresentaram-se como terminais não redutores e 3-*O*-substituídas.

TABELA 12 - Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFK2) obtida de *Punctelia constantimontium* e de suas subfrações obtidas por hidrólise parcial.

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> - metilados ⁽¹⁾	Fração (mol %)				Tipo de ligação ⁽²⁾
	PFK2	PFK2-HP4	PFK2-HP6	PFK2- HP10	
2,3,4,6-Me ₄ Man	0,8	3,9	4,9	6,1	Manp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ Glc	0,8	0,8	0,8	0,3	Glc p-(1→
2,3,4,6-Me ₄ Gal	28,9	16,4	10,4	4,1	Galp-(1→
2,4,6-Me ₃ Glc	2,1	-	-	-	→3)-Glc p-(1→
2,4,6-Me ₃ Gal	0,4	1,7	3,1	3,1	→3)-Galp-(1→
2,3,6-Me ₃ Gal	4,2	1,1	1,4	3,4	→4)-Galp-(1→
2,3,4-Me ₃ Man	26,1	52,6	56,7	65,5	→6)-Manp-(1→
2,3,4-Me ₃ Gal	0,7	0,6	0,8	-	→6)-Galp-(1→
3,6-Me ₂ Man	0,5	0,4	0,4	-	→2,4)-Manp-(1→
3,4-Me ₂ Man	16,9	16,6	16,0	13,6	→2,6)-Manp-(1→
3-MeMan	18,5	5,9	5,5	3,9	→2,4,6)-Manp-(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

Com o objetivo de elucidar a estrutura deste polímero, esta fração foi submetida a hidrólises ácidas parciais (H₂SO₄ 0,16 M, 100°C, por 4, 6 e 10 h), e após foram dialisadas em membrana com limite de exclusão de 2 kDa, sendo denominadas PFK2-HP4, PFK2-HP6 e PFK2-HP10, de acordo com o tempo de hidrólise de 4, 6 e 10 horas, respectivamente. Após hidrólise parcial, estas apresentaram, quando analisadas por GC-MS, um aumento dos teores de manose e uma diminuição de galactose (Tabela 13).

TABELA 13 – Composição monossacarídica da fração precipitado Fehling (PFK2-PC; galactoglucomanana) após hidrólises ácidas parciais do fungo liquenizado *Punctelia constantimontium*.

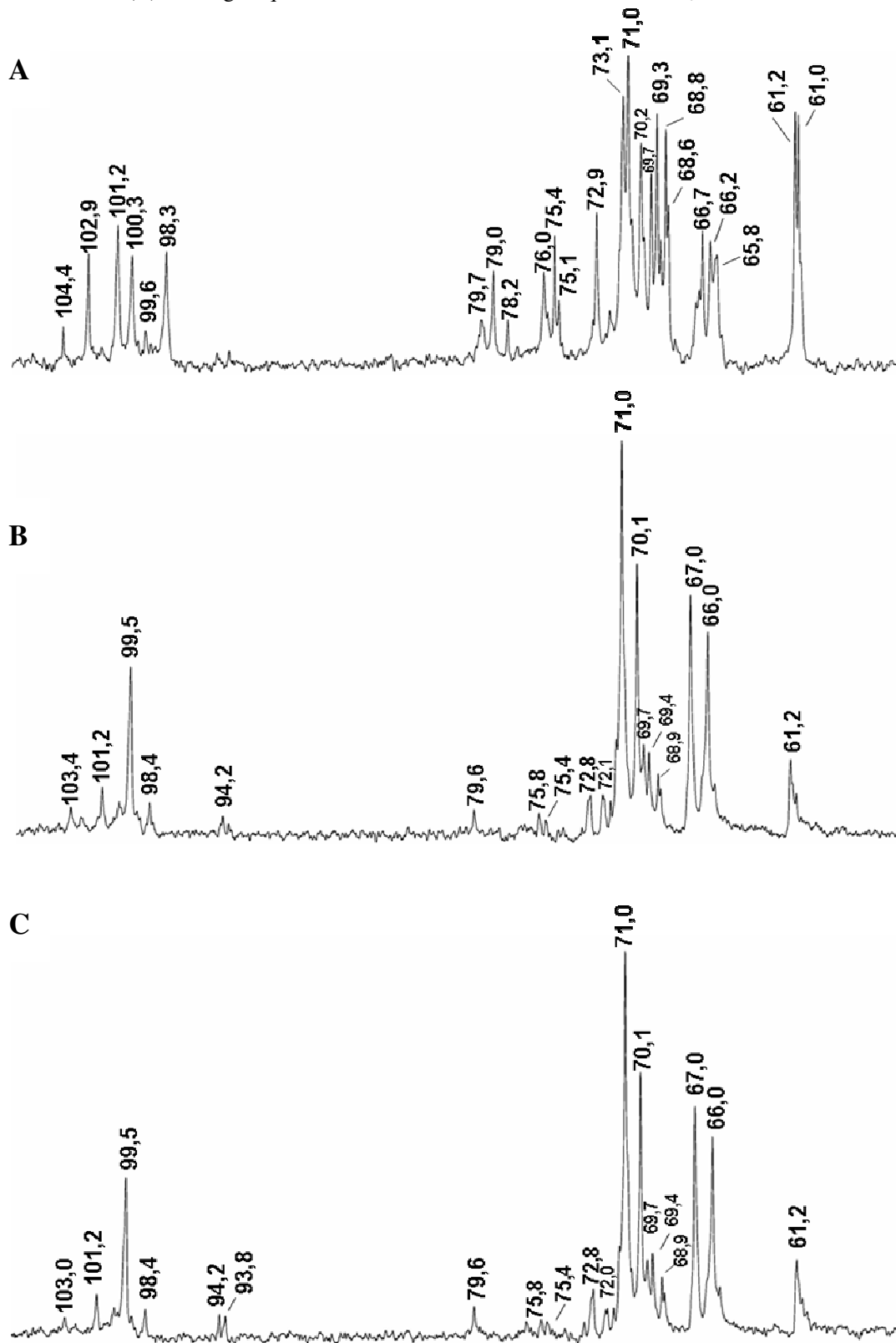
FRAÇÕES	Monossacarídeos (mol %) ⁽¹⁾		
	Man	Gal	Glc
PFK2-PC	48,5	47,1	4,4
PFK2-HP4	78,0	17,1	4,9
PFK2-HP6	80,7	15,3	4,0
PFK2-HP10	83,6	11,6	4,7

(1) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

Por meio das análises de metilação das frações PFK2-HP4, PFK2-HP6 e PFK2-HP10 (Tabela 12) pode ser verificado que a hidrólise ácida parcial foi eficiente na remoção das unidades de Galp devido à diminuição do derivado 2,3,4,6-Me₄Galp. Além disso, um aumento de 2,3,4-Me₃Man juntamente com um decréscimo de 3-MeMan reforça a idéia de que a cadeia principal seja constituída por unidades de α -D-Man ligadas (1→6), podendo apresentar, principalmente, substituições em O-2 ou O-2,4.

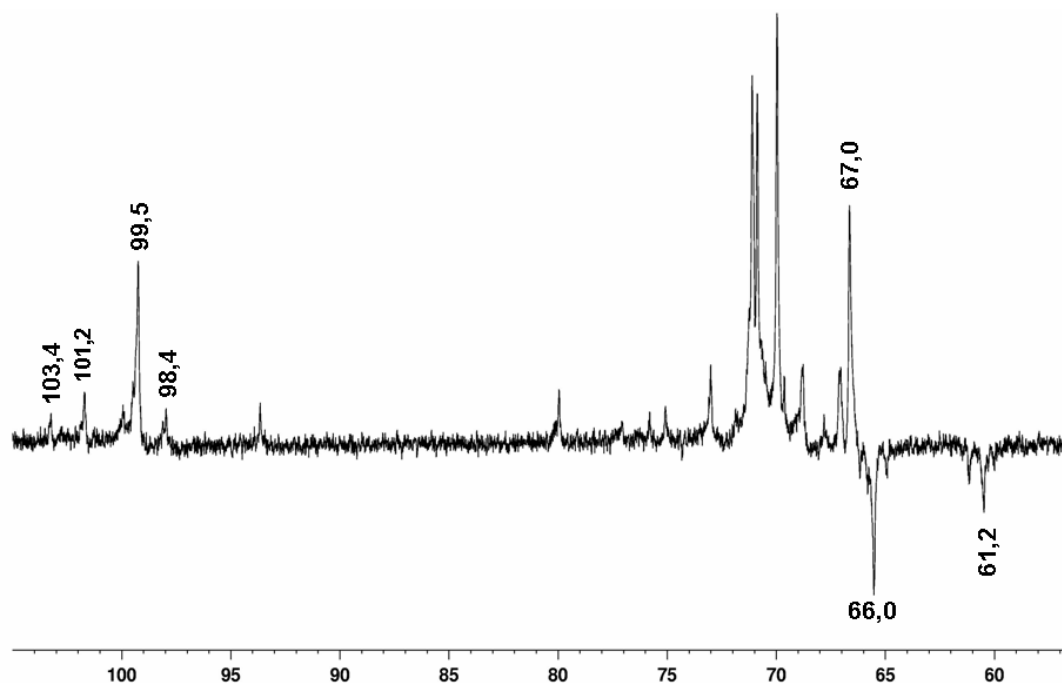
As análises espectroscópicas concordaram com os derivados parcialmente O-metilados (Tabela 12). O espectro de RMN-¹³C das frações PFK2-HP4 e PFK2-HP6 (Figura 20 B e C, respectivamente) contém sinais na região anomérica correspondentes aos C-1 dos terminais não redutores de β -D-Galp-(1→4)- α -D-Manp (δ 103,4) e β -D-Galp-(1→2)- α -D-Manp (δ 101,2) e de unidades de α -D-Manp da cadeia principal 6-O- (δ 99,5) e 2,6-di-O-substituída (δ 98,4). Além disso, apresenta sinais referente aos terminais redutores de manose (δ 94,2 e 93,8).

FIGURA 20 – Espectro de RMN-¹³C das Frações PFK2-PC (nativa) (A) PFK2-HP4 (B) e PFK2-HP6 (C) do fungo liquenizado *P. constantimontium*, em Me₂SO-*d*₆ a 70°C.

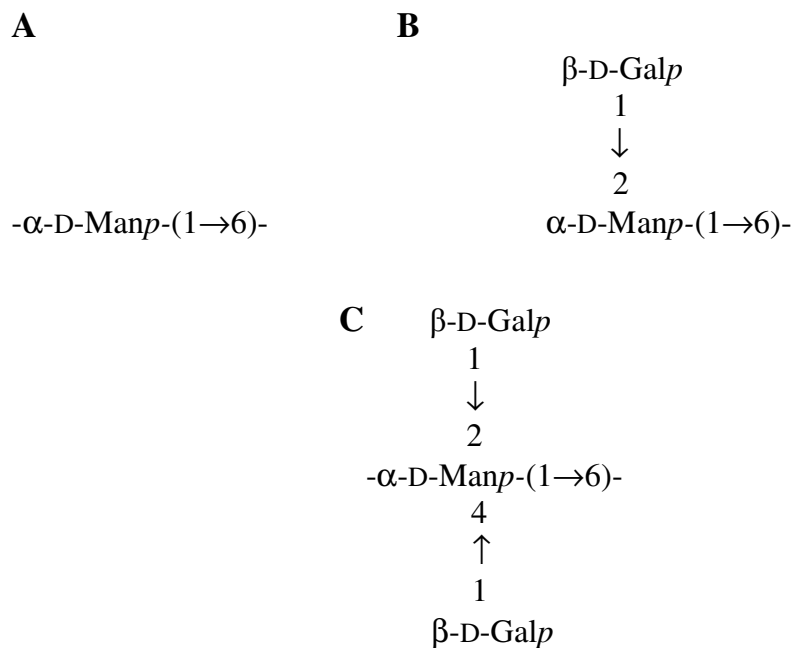


Os sinais de ^{13}C em δ 66,0 referem-se ao C-6 substituído das unidades de Man α -(1 \rightarrow 6) ligadas, enquanto os sinais em δ 61,2 são atribuídos, principalmente, aos grupos $-\text{CH}_2$ não substituídos das unidades terminais não redutoras de Gal β . Estes assinalamentos foram confirmados por DEPT (Figura 21) por meio da inversão dos respectivos sinais no experimento.

FIGURA 21– Espectro de RMN- ^{13}C -DEPT para HP4-PC, em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70°C.



De acordo com os dados apresentados, a fração precipitado de Fehling (PFK2) corresponde a uma galactoglucomanana, constituída por uma cadeia principal de unidades de α -D-manopiranosose ligadas (1 \rightarrow 6), sendo parcialmente substituídas em O-2, e/ou O-2,4 por unidades de β -Gal β (Figura 22), sendo confirmadas pelos sinais em δ 104,4 e 102,9 e por suas constantes de acoplamento características de configuração do tipo β , $J_{\text{C-1,H-1}} = 164,0$ e 163,8 Hz, respectivamente.

FIGURA 22 – Estrutura proposta para galactoglucomanana obtida do líquen *P. constantimontium*

Comparando estes dados com àqueles obtidos de *Rimelia* spp. e *Parmotrema* spp. (CARBONERO et al., 2005a), verificou-se que o heteropolissacarídeo isolado apresenta um maior grau de ramificação, possuindo maior teor de unidades de manose 2,6-di-*O*-substituídas. Além disso, em *P. constantimontium* foi observado que as unidades de $\beta\text{-Galp}$ encontram-se substituindo as unidades de $\alpha\text{-Manp}$ da cadeia principal em O-4 e O-2, e não apenas em O-4, como geralmente observado. O mesmo padrão de substituição foi descrito para o gênero *Leptogium*, com a diferença de que neste líquen as unidades $\beta\text{-Galp}$ substituem as unidades de $\alpha\text{-Manp}$ da cadeia principal somente em O-2, e não em O-2 e O-2,4 como observado no líquen em estudo (CARBONERO et al., 2003).

Este polissacarídeo também apresenta 6% de ácido glucurônico, concordando com os dados obtidos por TEIXEIRA (1993), onde o autor relata que os líquens *E. prunastri*, *Parmotrema araucaria*, *Usnea meridionalis* e *Usnea* sp., todos pertencentes a mesma família do líquen *P. constantimontium*, Parmeliaceae, apresentavam uma concentração de 8,4% de ácido glucurônico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos a partir das extrações aquosas e alcalinas a 2 e 10% dos fungos liquenizados *Heterodermia obscurata* e *Punctelia constantimontium* sugerem as seguintes estruturas:

- a) Uma α -D-glucana contendo, alternadamente, ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4), numa relação molar de 1,07:1 para *H. obscurata* e 1,3:1 para *P. constantimontium*, sendo denominadas nigeranas.
- b) Uma glucomanana altamente ramificada encontrada no líquen *H. obscurata*, com cadeia principal composta por unidades de α -D-Manp ligadas-(1 \rightarrow 6), sendo a maioria substituída em O-2, por unidades terminais não redutoras de α -D-Glcp, α -D-Manp e, possivelmente, por cadeias laterais constituídas por unidades de α -D-Manp 4-O-substituídas. A maioria dos heteropolissacarídeos presentes em fungos liquenizados consiste em galactomananas, galactoglucomananas e/ou galactomanoglucanas, sendo que estrutura similar à encontrada no presente estudo foi descrita apenas para o fungo liquenizado *Tornabenia intricata* (TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992), a qual pertence à mesma família (Physciaceae).
- c) Uma galactoglucomanana (*P. constantimontium*), apresentando uma cadeia principal de unidades de α -D-manopiranosose ligadas (1 \rightarrow 6), sendo parcialmente substituídas em O-2, e/ou O-2,4 por unidades de β -Galp. Foi observado que as unidades de β -Galp encontram-se substituindo as unidades de α -Manp da cadeia principal em O-4 e O-2, e não apenas em O-4, como geralmente observado. Este polissacarídeo apresenta ainda 6% de GlcAp, da mesma maneira que os líquens *E. prunastri*, *Parmotrema araucaria*, *Usnea meridionalis* e *Usnea* sp., todos pertencentes a mesma família (Parmeliaceae), apresentam uma concentração de 8,4% de ácido glucurônico.

De acordo com os dados obtidos, observa-se que as nigeranas aparentemente representam uma estrutura comum nos gêneros *Punctelia* e *Heterodermia* (com diferença nas suas relações molares). Com relação aos polissacarídeos isolados da Fração Precipitado de Fehling dos dois líquens estudados, glucomanana e galactoglucomanana, estes podem auxiliar a caracterizar os membros desses gêneros.

REFERÊNCIAS

- AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. New York: John Wiley & Sons, 250 p. 1993.
- ASSEF, M. L. M.; LEÃO, A. M. C.; MORETÃO, M. P.; AZAMBUJA, A. P.; IACOMINI, M.; BUCHI, D. F. Histological and Immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in Mice after treatment with an α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri*. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 19, n. 2, p. 49-54, 2002.
- BÜDEL, B.; SCHEIDEGGER, C. Thallus morphology and anatomy. In: NASH III, T.H. **Lichen Biology**. Cambridge: University press, p. 37-64, 1996.
- CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; STUERP, P.; GORIN, P. A. J.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 194, p. 65-69, 2001.
- CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A (1→6)-linked β -mannopyranan, pseudonigeran, and a (1→4)-linked β -xylan, isolated from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 206, n. 2, p.175 - 178, 2002(a).
- CARBONERO, E. R.; 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(b).
- CARBONERO, E. R.; TISCHER, C. A.; COSENTINO, C.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization of a galactomannan from the cyanolichen *Leptogium azureum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 53, p. 469 - 473, 2003.
- CARBONERO, E. R. **Estudo Comparativo de Polissacarídeos de Fungos Liquezados contendo diferentes fotobiontes**. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 121p., 2005.
- CARBONERO, E. R.; MELLINGER, C. G.; ELIASARO, S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemotypes significance of lichenized fungi by structural characterization of heteropolysaccharides from the genera *Parmotrema* and *Rimelia*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 246, p. 273-278, 2005(a).

CARBONERO, E. R.; CORDEIRO, L. M. C.; MELLINGER, C. G.; SASSAKI, G. L.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Galactomannans with novel structures from the lichen *Roccella decipiens* Darb. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 1699-1705, 2005(b).

CARBONERO, E. R.; 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(c).

CARBONERO, E. R., SMIDERLE, F. R.; GRACHER, A. H. P.; MELLINGER, C. G., AHTEI, T.; GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. Structure of two glucans and a galactofuranomannan from the lichen *Umbilicaria mammulata* (Ach.) Tuck. Gier Kendrick. **Carbohydr. Polym.**, v. 63, p. 13-18, 2006.

CHANDA, N. B.; HIRST, E. L.; MANNERS, D. J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland moss (*Cetraria islandica*). **J. Chem. Soc.**, p.1951-1958, 1957.

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

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

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

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

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

CZEZUGA, B.; XAVIER FILHO, L. Investigations on carotenoids in lichens. VII. Some lichens from Brazil. **Rev. Bras. Biol.**, v. 47, p. 243-246, 1987.

CZEZUGA, B.; SKULT, H. Carotenoids in lichens of Southern Finland. **Ann. Bot. Fennici**, v. 25, p. 229-232, 1988.

ELIX, J.A. Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH III, T.H. **Lichen Biology**. Cambridge: University press, p. 154-180, 1996.

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

GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr Res**, v. 128, 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.**, v. 142, p. 253-267, 1985.

GORIN, P. A. J.; BARON, M.; SILVA, M. L. C.; TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciência Cultura**, v. 45, n. 1, p. 27-36, 1993.

HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. **J. of Chem. Soc.**, v. 107, p. 8-16, 1915.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 110-125, 1988.

HONDA, N. K. Técnicas Químicas Aplicadas à Taxonomia de Fungos Liqueinizados. In: XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. p. 391-400.

HONEGGER, R. Functional Aspects of the Lichen Symbiosis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 553-578, 1991.

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

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.**, v. 142, p. 237-251, 1985.

IACOMINI, M.; ZANIN, S. M. W.; FONTANA, J. D.; HOGGE, J.; GORIN, P. A. J. Isolation and characterization of β -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the lichen *Cora pavonia*. **Carbohydr. Res.**, v. 168, p. 55-65, 1987.

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

IACOMINI, M.; REIS, R. A.; SASSAKI, G. L. Polissacarídeos de Fungos Liquezados. In: XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. p. 317-337.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 36-38, 1965.

LEÃO, A. M.; BUCHI, D. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. Cytotoxic effect against *HeLa* cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 29, n. 4, p. 503-509, 1997.

LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C.V.; PEREIRA, E. C.; XAVIER-FILHO, L.; RODRIGUES, S. A. Importância Econômica dos Líquens para o Homem. In: XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006. p.581-619.

MARCELLI, M. P. Fungos Liquezados. In: XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006(a). p.25-74.

MARCELLI, M. P. **Checklist of lichens and lichenicolous fungi of Brazil**. Disponível em: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/checklists/brazil_1.htm> Acesso em: 05 nov. 2006(b).

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 mantiqueirense* Hale. **Carbohydr. Polym.**, v. 60, p. 7-13, 2005(a).

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*. **Intern. Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, p. 97-102, 2005(b).

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

OLAFSDOTTIR, E. S.; INGÓLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. **Planta Medica**, v. 67, p. 99-208, 2001.

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

PERLIN, A. S.; CASU, B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-¹³C. **Tetrahedron Lett.** 34, 2919-2924, 1969.

PRADO, S. R. T.; GORIN, P. A. J.; STUELP, P. M.; HONDA, N. K.; IACOMINI, M. An unusual juxtaposition of polysaccharide components of *Collema leptosporum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 40, 271-276, 1999.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHLORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 206-210, 1996.

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

SASSAKI, G.L.; REIS, A.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. The Glucans of Lichenized Fungi. **Mitt. Inst. Allg. Bot.(Hamburg)**, v. 30, p. 195-211, 2002.

SPIELMANN, A. A. **A família Parmeliaceae (fungos liquenizados) nos barrancos e peraus da encosta da Serra Geral, Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente: São Paulo, p. 233, 2005.

STUELP, P. M.; CARNEIRO-LEÃO; A. M. C.; 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.; OLIVEIRA, M. B. M.; LEÃO, A. M. A. C.; 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**, v. 2, p. 691-698, 2002.

TAKAHASHI, K.; KON, K.; YOKOTA, I.; SHIBATA, S. Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of Stereocaulaceous lichens. **Carbohydr. Res.**, v. 89, p. 166-173, 1981.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochem.**, v. 11, n. 8, p. 1383-1388, 1972.

TEHLER, A. Systematics, phylogeny and classification. In: NASH III, T.H. **Lichen biology**. Cambridge: University Press, p. 217-239, 1996.

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

TEIXEIRA, A. Z. A. **Uma possível Quimiotaxonomia dos Líquens Baseada nos Espectros de RNM-13C de seus Heteropolissacarídeos**. Tese de Doutorado em Bioquímica-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 162 p., 1993.

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.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-67, 1963(a).

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

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, 1999(a).

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, 1999(b).

WORANOVICZ, S. M.; PINTO, B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 51, p. 395-402, 1999(c).

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M. **Estudo comparativo de polissacarídeos e oligossacarídeos de líquens do gênero *Cladonia***. Curitiba, 1999(d). 170 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

YOKOTA, I.; SHIBATA, S.; SAITÔ, H. A. ^{13}C -n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. **Carbohydr. Res.**, v. 69, p. 252-258, 1979.