

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOUTORADO EM QUÍMICA

Rafaella Ferreira Fernandes

Caracterização Espectroscópica de Líquens do Brasil e da Antártida

Juiz de Fora
2018

Rafaella Ferreira Fernandes

Caracterização Espectroscópica de Líquens do Brasil e da Antártida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração Físico-Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Afonso Spielmann

Juiz de Fora

2018

“Salve minha fia, tu tá boa?”

(Saudação comumente usada por um importante amigo de jornada)

Dedico este trabalho a todas as mulheres que vivem essa batalha que é ser
cientista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Pai de infinita misericórdia, e à minha família por ser abrigo fraterno de amor incondicional.

Ao professor Luiz Fernando por todos esses anos de trabalho em conjunto, e toda geração de amigos, estudantes e pesquisadores do NEEM. Em especial, à Lenize pelas inúmeras conversas regadas de café e pelo legado científico.

Ao professor Adriano Spielmann por ter aceitado o desafio de participar deste trabalho.

Aos professores Nanci Garden, Hélio Ferreira dos Santos, Charlane Cimini Corrêa, Maria Auxiliadora Costa Matos e Jair Adriano Kopke de Aguiar pelos trabalhos desenvolvidos em colaboração.

Aos amigos que ajudaram na concretização deste trabalho, Arthur Barra, Arthur Carpanez, Camila Almeida, Fausto Moreira e Gilson Rodrigues.

Aos amigos Felipe, Naiara, Fazza, Leonã e Jordana pela amizade sincera.

À Renatinha por toda luz que a sua presença emite. E por ter me ensinado que a lei do retorno nunca falha. Gratidão Bibi & amigos.

À Tattyana, minha melhor companhia, amiga e fiel escudeira. Obrigada pelo apoio pleno e ilimitado.

Aos professores do departamento de Química da UFJF.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho, a composição química dos líquens *Gondwania regalis*, *Teloschistes exilis*, *Xanthoria candelaria*, *Candelaria fibrosa*, *Pyxine coccifera*, *Usnea* sp e *Crocodia aurata* foi avaliada pela espectroscopia Raman. A análise não destrutiva proporcionou a identificação da antraquinona parietina e carotenoides das espécies *Gondwania regalis*, *Teloschistes exilis*, *Xanthoria candelaria*. Parietina foi identificada devido à presença das bandas Raman em 1671 e 1370 cm^{-1} atribuídas aos modos $\nu(\text{C}=\text{O})$ e $\nu(\text{C}-\text{O})$ - características da porção 9,10-dioxiantraceno e fenóis, respectivamente comuns a antraquinonas. Bandas em torno de 1527, 1158 e 1005 cm^{-1} foram atribuídas ao β - caroteno. Por outro lado, o estudo por espectroscopia Raman das espécies *Candelaria fibrosa* e *Pyxine coccifera* é inédito e a análise vibracional forneceu evidências que comprovam a presença de derivados de ácido pulvínico e carotenoides. A identificação de bandas características do ácido quiodectônico e dilactona pulvínica foi auxiliada pelos cálculos DFT de mecânica quântica. Pigmentos absorvedores de luz de diferentes classes químicas dos líquens *Usnea* sp. e *Crocodia aurata* também foram discutidos usando espectroscopia Raman suportada por cálculos de mecânica quântica. Espectros Raman foram obtidos diretamente dos tecidos liquênicos e de compostos químicos purificados a partir dos extratos brutos. O ácido úsnico, um quimiomarcador de *Usnea* spp foi relatado juntamente com um constituinte minoritário, o ácido estítico, o qual foi inequivocamente identificado por análises espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C . As estruturas dos pigmentos isolados calicina e dilactona pulvínica da *Crocodia aurata* foram confirmadas por difração de raios X de monocristal, bem como os carotenoides por FT- Raman e micro- imagem Raman nos tecidos de *Usnea* sp. e *C. aurata*, respectivamente. O mapeamento Raman revelou a presença de uma mistura de carotenoides distribuídos heterogeneamente na camada superior de *C. aurata*. Além de metabólitos secundários foram também investigados os polissacarídeos, visto que, espécies de fungos liquenizados são produtores de grande quantidade desse metabólito primário. Portanto, observando a relevância no estudo dos polissacarídeos liquênicos e na tentativa de estudar as propriedades vibracionais de tais compostos, os polissacarídeos de *Usnea* sp são isolados e caracterizados por métodos analíticos.

Palavras-chave: líquens, espectroscopia Raman, pigmentos, polissacarídeos.

ABSTRACT

In the present work, the chemistry of the lichens *Gondwania regalis*, *Teloschistes exilis*, *Xanthoria candelaria*, *Candelaria fibrosa*, *Pyxine coccifera*, *Usnea* sp e *Crocodia aurata* has been recorded by means of Raman spectroscopy. The non-destructive analysis provided the recognition of parietin anthraquinone and carotenes for the *Gondwania regalis*, *Teloschistes exilis*, *Xanthoria candelaria* species. Parietin has been identified by the Raman bands at 1671 and 1370 cm^{-1} , respectively assigned to the $\nu(\text{C}=\text{O})$ and $\nu(\text{C}-\text{O})$ - modes related to the anthracene-9,10-dione and phenyl groups of the anthraquinone compound. Bands at *ca.* 1527, 1158 and 1005 cm^{-1} are assigned to the β -carotene in the FT-Raman spectra. On the other hand, the main compounds of *Candelaria fibrosa* and *Pyxine coccifera* have been investigated for the first time using FT-Raman spectroscopy and the vibrational analysis provided evidence for the presence of pulvinic acid derivatives and carotenes. The identification of features arising from chiodectonic acid and pulvinic dilactone pigments was assisted by the quantum mechanical DFT calculations. Light-absorbing pigments from different chemical classes of the lichens *Usnea* sp. and *Crocodia aurata* have been also discussed using Raman spectroscopy supported by quantum mechanical DFT calculations. Raman spectra were obtained directly from the lichen tissues as well as from chemical compounds isolated from extracts. Usnic acid, a chemomarker of *Usnea* spp has been reported together with a minor constituent, stictic acid, which has been unambiguously identified by ^1H and ^{13}C NMR spectral analysis. The structures of calycin and pulvinic dilactone isolated from *Crocodia aurata* have been confirmed by single crystal X-ray diffraction, as well as carotenoids have been characterized by FT-Raman and Raman microimaging in the tissues of *Usnea* sp. and *C. aurata*, respectively. The Raman mapping has revealed the presence of a mixture of carotenoids heterogeneously distributed in the upper layer of *C. aurata*. In addition to secondary metabolites, polysaccharides were also investigated, since lichenized fungus species are producers of large quantities of this primary metabolite. Therefore, observing the relevance in studying the lichens polysaccharides and in attempting to study the vibrational properties of such compounds, polysaccharides from the *Usnea* sp are isolated and characterized by analytical methods.

Keywords: lichens, Raman spectroscopy, pigments, polysaccharides.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Estrutura geral de um líquen e sua organização em camadas: (A) Córtex superior (fungo), (B) Camada do fotobionte, (C) Medula (fungo) e (D) Córtex inferior (fungo).19
- Figura 1.2:** Principais talos liquênicos (A) Talo crostoso: *Ochrolechia parella*, Ilha Rei George, Antártica; (B) Talo filamentosos: *Dictyonema sericeum*, SP, Brasil; (C) Talo folioso: *Hypotrachyna* sp., MG, Brasil; (D) Talo fruticoso de *Teloschistes*, RS, Brasil.21
- Figura 1.3:** Estruturas químicas de alguns pigmentos liquênicos: (A) Antraquinona (Parietina, $R_1 = \text{OMe}$ e $R_2 = \text{Me}$), (B) Ácido quiodecônico, (C) Dilactona pulvínica e (D) Calicina.24
- Figura 1.4:** Estruturas químicas de alguns compostos fotoprotetores encontrados em líquens: (A) Ácido úsnico, (B) Ácido estético e (C) Carotenoide (em destaque, β - caroteno).26
- Figura 2.1:** Diagrama de *Jablonski* para detecção do oxigênio singlete. Legenda: A- absorção; F- Fluorescência e Fos – fosforescência.37
- Figura 2.2:** Representação esquemática das reações fotosensibilizadoras evidenciando o tipo de mecanismo pela qual podem ocorrer.38
- Figura 2.3:** Espectros FT-Raman *in situ* das espécies liquênicas a) *G. regalis*; b) *X. candelaria*; c) *T. exilis* com faixa espectral de $3400\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ 41
- Figura 2.4:** Espectro FT-Raman *in situ* da espécie *G. regalis* na faixa espectral de $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença do pigmento parietina. A foto do líquen destaca o ponto onde foi coletado o espectro.....44
- Figura 2.5:** Espectro FT-Raman *in situ* da espécie *T. exilis* na faixa espectral de $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença do pigmento parietina e do carotenoide. A foto do líquen destaca o ponto onde foi coletado o espectro.46

Figura 2.6: Espectro FT-Raman <i>in situ</i> da espécie <i>X. candelaria</i> na faixa espectral de 1800- 400 cm ⁻¹ indicando a presença do pigmento parietina e do carotenoide. A foto do líquen destaca o ponto onde foi coletado o espectro.	47
Figura 2.7: Espectro de RMN de ¹³ C (125MHz, CDCl ₃)	50
Figura 2.8: Espectro de RMN de ¹ H (MHz, 500 CDCl ₃).	51
Figura 2.9: Comparação dos espectros Raman da parietina extraída (preto) e da adquirida comercialmente (vermelho).	52
Figura 2.10: Decaimento do sinal de fosforescência de oxigênio singlete gerado após excitação (355 nm) de soluções com absorção equivalentes de perinaftenona e parietina.	53
Figura 2.11: Rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) para outras moléculas semelhantes à parietina: (A) Tetrametilbenzoquinona, (B) 2,6-dihidroxi-antraquinona, (C) 1,8-dihidroxi-antraquinona e (D) 1,2-dihidroxi-antraquinona	54
Figura 2.12: Gráfico de I ₀ /I versus [AQ] para o cálculo da constante de velocidade para supressão de oxigênio singlete.	56
Figura 3.1: Espectro FT-Raman <i>in situ</i> da espécie <i>P. coccifera</i> na faixa espectral de 1800- 400 cm ⁻¹ indicando a presença do ácido quiodectônico. A foto do líquen destaca o ponto onde foi coletado o espectro.	62
Figura 3.2: Espectros FT-Raman (A) Experimental para <i>P. coccifera</i> (B) Teórico para o ácido quiodectônico.	63
Figura 3.3: Espectro FT-Raman <i>in situ</i> da espécie <i>C. fibrosa</i> na faixa espectral de 1800- 400 cm ⁻¹ indicando a presença dos pigmentos dilactona pulvínica (preto) calicina (vermelho) e do carotenoide (azul). A foto do líquen destaca o ponto onde foi coletado o espectro.	65
Figura 4.1: Espectros FT-Raman da superfície da Usnea (a) e dos compostos químicos extraídos: ácido úsnico (b) e ácido estético (c) nas	

regiões vibracionais (A) 3600-2600 cm^{-1} e (B) 1900-400 cm^{-1} . (*) Bandas atribuídas ao carotenoide.	75
Figura 4.2: Representação ORTEP de (A) estrutura cristalina da calicina. A1 e A2 são anéis aromáticos e B1 e B2 são anéis furano, (B) estrutura cristalina da dilactona pulvínica. Código de simetria: $i = -x, -y, -z$. A1 e A2 são anéis aromáticos e B1 e B2 são anéis furano.	79
Figura 4.3: Expansão supramolecular das ligações de hidrogênio C-H...O ao longo do plano bc para a molécula de calicina.	80
Figura 4.4: Expansão supramolecular da molécula dilactona pulvínica.	81
Figura 4.5: (A) Espectros FT- Raman do líquen <i>Crocodia aurata</i> e suas camadas: medula (a) e córtex (b); (B) Espectros Raman na linha de excitação 785 nm do cristal de calicina (a) e de dilactona pulvínica (b). (*) Bandas atribuídas ao carotenoide.	83
Figura 4.6: (A) Imagem de luz branca da superfície de <i>Crocodia aurata</i> ; (B) mapeamento Raman monitorando a presença do pigmento carotenoide através da intensidade da banda $\nu(\text{C}=\text{C})$ em 1530-1500 cm^{-1} ; (C) Espectros Raman de pontos selecionados aleatoriamente da área mapeada.	84
Figura 5.1: Representação esquemática de homo e heteropolissacarídeos.	87
Figura 5.2: Representação de glucanas comumente encontradas em líquens.	91
Figura 5.3: Esquemas relacionados à metodologia adotada para a extração de polissacarídeos da espécie de <i>Usnea</i>	100
Figura 5.4: Eletrofluorograma dos monossacarídeos das frações extraídas e dos padrões marcados com fluoróforo 2-aminoacridona (AMAC). (A) 1: SW, 2: PW, 3: Glicose, 4: Galactose, 5: Ácido Galacturônico, 6: Ácido Glucurônico, 7: SK 2, 8: PK 2; (B) 1: PK 1, 2: SK 1, 3: Glicose, 4: Galactose, 5: Ácido Galacturônico, 6: Ácido Glucurônico, 7: SK 0,5, 8: PK 0,5. O: origem.	103

Figura 5.5: Representação do processo de purificação de congelamento e degelo.	103
Figura 5.6: Esquemas relacionados às metodologias adotadas para a hidrólise e derivatização dos polissacarídeos para análise por UFLC.	105
Figura 5.7: Sobreposição dos cromatogramas dos padrões não derivatizados (vermelho) e derivatizados (preto) com o reagente PABA para cada analito. (A) Ácido galacturônico, (B) Glicose e (C) Galactose na concentração de 0,5 mg/ mL, com detecção em 305 nm.	106
Figura 5.8: Sobreposição dos cromatogramas de uma mistura dos padrões de monossacarídeos na concentração de 0,5 mg/ mL (preto) e dos padrões ácido galacturônico (azul), galactose (verde) e glicose (vermelho) injetados individualmente.	108
Figura 5.9: Sobreposição dos cromatogramas das frações polissacarídicas PK 0,5 (vermelho), PK 1 (azul) e PK 2 (verde) com a devida identificação do analito glicose (tempo de retenção ~ 18 minutos).	109
Figura 5.10: Espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras SK 0,5, SK 1 e SK 2.	110
Figura 5.11: Espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras PK 0,5, PK 1 e PK 2 na região de 4000-400 cm ⁻¹	113
Figura 5.12: Espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras PK 0,5, PK 1 e PK 2 na região de 1800-400 cm ⁻¹	114
Figura 5.13: Espectros Raman das amostras PK 0,5, PK 1 e PK 2.	114
Figura 5.14: Resumo dos polímeros caracterizados pela espectroscopia vibracional.	116
Figura 5.15: Espectros vibracionais (A) Raman e (B) na região do infravermelho do precipitado PK 0,5 (preto) e do seu sobrenadante liofilizado de segundo ciclo de gelo/ degelo (vermelho).	117

Figura 5.16: Análises térmicas TG e DTG referentes às amostras polissacarídicas.	119
Figura 5.17: Análises térmicas (TG), região de 25 – 300 °C.	120
Figura 5.18: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras de polissacarídeos.	121
Figura 5.19: Espectros de RMN de ¹ H dos experimentos 1, 2, 3 e 4, (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 ou DMSO- <i>d</i> 6/D ₂ O).	125
Figura 5.20: Espectros de RMN de ¹ H dos experimentos 5, 6, 7 e 8.	129

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tentativa de atribuição vibracional (cm ⁻¹) para as principais bandas do pigmento parietina observadas nos espectros <i>in situ</i> das amostras de líquens <i>X. candelaria</i> , <i>T. exilis</i> e <i>G. regalis</i> , bem como para o pigmento extraído do líquen <i>G. regalis</i> e para a parietina padrão.	48
Tabela 2: Intensidade do sinal da fosforescência do oxigênio singlete de acordo com volumes adicionados da antraquinona.	55
Tabela 3: Tentativa de atribuição Raman (cm ⁻¹) para as principais bandas observadas nos espectros das amostras de líquens, bem como para os pigmentos encontrados.	64
Tabela 4: Tentativa de atribuição vibracional para as principais bandas observadas no espectro <i>in situ</i> da superfície do líquen <i>Usnea</i> sp e também para os espectros Raman, teórico e experimental, dos compostos químicos isolados ácido úsnico e estético.	76
Tabela 5: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para o ácido estético (δ em ppm).	77
Tabela 6: Dados cristalográficos da calicina e dilactona pulvínica.	78
Tabela 7: Atribuições espectrais das bandas observadas nos espectros Raman das substâncias isoladas calicina e dilactona pulvínica usando a linha	

de excitação em 785 nm e da medula e córtex do líquen <i>Crocodia aurata</i> na linha 1064 nm.	82
Tabela 8: Tipos de glucanas encontradas em líquens.	89
Tabela 9: Regiões vibracionais características para a deformação angular da ligação anomérica C1- H.	94
Tabela 10: Códigos das frações polissacarídicas obtidas e as extrações a qual se referem.	101
Tabela 11: Condição otimizada para análise dos monossacarídeos selecionados por UFLC.	105
Tabela 12: Ordem de eluição e tempos de retenção para separação por UFLC.	108
Tabela 13: Tentativa de atribuição vibracional para as frações SK 0,5, SK 1 e SK 2.	111
Tabela 14: Tentativa de atribuição vibracional para as frações PK 0,5, PK 1 e PK 2.	115
Tabela 15: Resultados de análise elementar para as frações PK 0,5, PK 1 e PK 2.	118
Tabela 16: Massas moleculares dos polímeros.	123
Tabela 17: Experimentos realizados para a obtenção de espectros de ¹ H de RMN.	124
Tabela 18: Principais sinais de ¹ H dos espectros de RMN dos experimentos 1, 2, 3 e 4. Prótons anoméricos em vermelho e em azul, prótons de H ₂ O.	128

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1	Líquens	19
1.2	Líquens e a astrobiologia	22
1.3	A Química dos líquens	23
1.4	Espectroscopia vibracional	27
1.4.1	Espectroscopia de absorção no infravermelho	27
1.4.2	Espectroscopia Raman	29
1.5	Espectroscopia Raman e os líquens	31
1.6	Objetivo geral	32
2.	ESPECTROSCOPIA RAMAN COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO <i>IN SITU</i> DE ESPÉCIES DE LIQUENS DA ANTÁRTIDA E DO BRASIL	33
2.1	<i>Gondwania regalis</i>, <i>Teloschistes exilis</i> e <i>Xanthoria candelaria</i>	34
2.2	Estudo Fotoquímico: supressão e formação de oxigênio singlete pelo pigmento parietina	35
2.3	Objetivos específicos	38
2.4	Experimental	38
2.4.1	Amostras de líquens	38
2.4.2	Materiais	39
2.4.3	Extração do pigmento parietina	39
2.4.4	Instrumentação	39
2.4.5	Parietina como gerador e supressor de oxigênio singlete	40
2.4.5.1	Rendimento quântico (Φ_{Δ}) para a formação de oxigênio singlete	40
2.4.5.2	Determinação da constante de velocidade de supressão do oxigênio singlete por parietina	40
2.5	Resultados e discussões	41
2.5.1	Caracterização espectroscópica dos líquens <i>Gondwania regalis</i> , <i>Teloschistes exilis</i> e <i>Xanthoria candelaria</i>	41
2.5.2	Estudo fotoquímico	52

2.5.2.1	Rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) para o pigmento extraído parietina	52
2.5.2.2	Determinação da constante de velocidade de supressão do oxigênio singlete por antraquinona padrão e parietina	54
2.6	Conclusões	57
3.	ESTUDO DOS ESPECTROS FT- RAMAN DAS ESPÉCIES DE LIQUENS CANDELARIA FIBROSA E PYXINE COCCIFERA	58
3.1	<i>Pyxine coccifera</i> e <i>Candelaria fibrosa</i>	60
3.2	Objetivos específicos	60
3.3	Experimental	60
3.3.1	Amostras de líquens	60
3.3.2	Instrumentação	60
3.3.3	Metodologia do cálculo teórico	61
3.4	Resultados e discussões	61
3.5	Conclusões	66
4.	CARACTERIZAÇÃO DOS PIGMENTOS ABSORVEDORES DE LUZ DE LIQUENS DO BRASIL POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	67
4.1	Mapeamento e Imagem Raman	68
4.2	<i>Usnea</i> sp e <i>Crocodia aurata</i>	70
4.3	Objetivos específicos	71
4.4	Experimental	71
4.4.1	Amostras de líquens	71
4.4.2	Extração e purificação dos compostos	71
4.4.3	Instrumentação	72
4.4.4	Metodologia do cálculo teórico	72
4.4.5	Difração de raios X por monocristal e refinamento estrutural	73
4.5	Resultados e discussões	73
4.5.1	Caracterização espectroscópica: <i>Usnea</i> sp.	73
4.5.2	Difração de raios X: Calicina e Dilactona pulvínica – compostos do líquen <i>Crocodia aurata</i>	78
4.5.3	Caracterização espectroscópica: <i>Crocodia aurata</i>	81

4.6	Conclusões	86
5.	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE UMA β- GLUCANA INSOLÚVEL EM ÁGUA DA ESPÉCIE DE USNEA	87
5.1	Polissacarídeos	88
5.2	Polissacarídeos liquênicos	89
5.3	Caracterização estrutural de polissacarídeos de líquens	92
5.4	Objetivos específicos	94
5.5	Experimental	94
5.5.1	Amostras de líquens	94
5.5.2	Extração dos polissacarídeos	94
5.5.3	Purificação dos polissacarídeos	96
5.5.4	Análise estrutural dos polissacarídeos	96
5.6	Resultados e discussões	99
5.6.1	Extração, composição monossacarídica e purificação dos polissacarídeos.....	99
5.6.2	Caracterização estrutural das frações polissacarídicas por espectroscopia vibracional	110
5.6.2.1	Caracterização dos sobrenadantes SK 0,5; SK 1 e SK 2	110
5.6.2.2	Caracterização dos precipitados PK 0,5, PK 1 e PK 2	112
5.6.3	Análise elementar (%CHN)	118
5.6.4	Análise termogravimétrica	119
5.6.5	Microscopia eletrônica de varredura	120
5.6.6	Determinação da massa molecular - <i>DLS</i>	121
5.6.7	Ressonância magnética nuclear	123
5.7	Conclusões	130
	CONCLUSÕES GERAIS	131
	PERSPECTIVAS	134
	REFERÊNCIAS	135
	ANEXOS	154

Apresentação

Esta tese é dividida em cinco capítulos, e, após um breve capítulo introdutório sobre características e propriedades de líquens e sobre espectroscopia vibracional – técnica esta utilizada em todo o trabalho, os demais capítulos descrevem estudos particulares desenvolvidos com espécies específicas de líquens, e englobam, portanto, artigos científicos já publicados em periódicos ou em fase de finalização e submissão.

Dessa forma, o capítulo 2 descreve o estudo por espectroscopia Raman *in situ* das espécies *Gondwania regalis*, *Teloschistes exilis* e *Xanthoria candelaria*, e, as espécies *Candelaria fibrosa* e *Pyxine coccifera* têm seus compostos químicos investigados pela espectroscopia vibracional no capítulo 3. O capítulo 4 envolve o estudo dos pigmentos absorvedores de luz das espécies *Usnea* sp e *Crocodia aurata*, e, o capítulo 5 descreve a análise da composição polissacarídica da espécie de *Usnea*.

Ao final destes capítulos, conclusões gerais sobre o tema são abordadas, além da breve descrição das perspectivas deste trabalho. O conjunto de referências usado para suportar este trabalho está listado em seção anterior aos anexos, e, nestes estão contidos os trabalhos provenientes desta tese, bem como os desenvolvidos paralelamente ao tema central; um resumo do estudo desenvolvido no estágio sanduíche no exterior encontra-se no final deste documento.

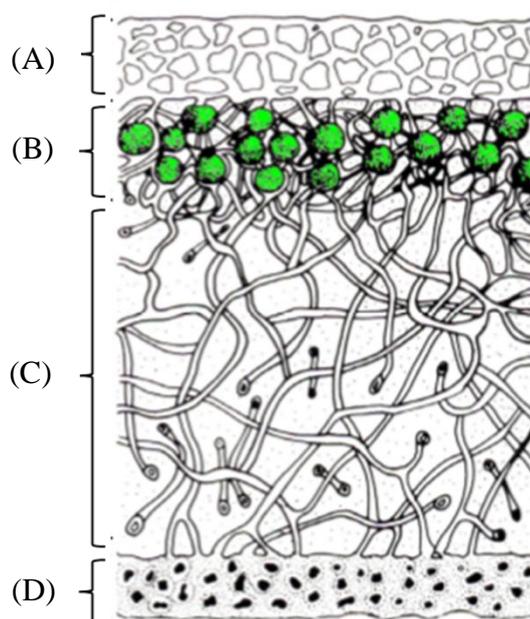
CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Líquens

Os líquens são associações simbióticas entre um organismo micobionte (fúngico) com um ou mais parceiros fotobiontes que resultam, dessa forma, em um talo (Figura 1.1). Assim, os fungos que formam os líquens são, em sua grande maioria, ascomicetos (98%) e o restante, basidiomicetos; as algas envolvidas nesta associação são as clorofíceas e cianobactérias (Ahmadjian, 1993).

Figura 1.1: Estrutura geral de um líquen e sua organização em camadas: (A) Córtex superior (fungo), (B) Camada do fotobionte, (C) Medula (fungo) e (D) Córtex inferior (fungo).



Fonte: REDÓN 1985, modificado.

O resultado desse processo de simbiose contribui substancialmente para uma propagação, tanto do fotobionte quanto do micobionte para os mais diversos habitats; fato este que na condição de organismos de vida livre não seria possível ou, no máximo, raro (Gargas *et al.*, 1995; Lutzoni *et al.*, 2001). O fungo beneficia-se dessa associação pelo fato da alga (responsável pela fotossíntese) fornecer carboidratos necessários para a respiração e crescimento, e, em contrapartida, recebe a hidratação que a liquenização proporciona evitando a sua dessecação e protegendo contra intensas luminosidades (Honda e Vilegas, 1999).

Os líquens podem ser encontrados nos mais variados habitats e microhabitats, característica esta que depende da disponibilidade de fatores físicos e climáticos para

que forneçam as condições necessárias para seu desenvolvimento. A capacidade de adaptação a condições drásticas, principalmente de temperatura, é um aspecto interessante dos organismos liquênicos, principalmente por serem encontrados na Antártida e nos desertos (Lindsay, 1978) onde a vida livre dificilmente estaria presente.

Estudos relatam que a simbiose liquênica é datada de 400 a 600 milhões de anos atrás, fato este justificado pela descoberta de fósseis envolvendo hifas filamentosas intimamente associadas a cianobactérias ou algas que foram encontradas preservadas em fosforita marinha na formação de *Doushantuo, Weng'an*, sul da China. A descoberta destes fósseis é forte indicativo de que os fungos desenvolveram parcerias simbióticas com fotoautótrofos antes da evolução das plantas vasculares (Yuan *et al.*, 2005).

Na natureza, a importância dos líquens é observada no desempenho de um papel pioneiro na colonização de substratos desprovidos de organismos vivos. Assim, como os musgos e cianobactérias, os líquens adaptam o habitat para que plantas e animais possam formar comunidades bem estabelecidas.

Os líquens, com sua quantidade limitada de clorofila - apenas de 10-25 % do que uma folha possui por unidade de área (Wilhelmsen, 1959), enfrentam processos incomuns quando comparado aos grupos de plantas. O córtex absorve 26-43 % da luz incidente, em comparação com 4-13 % da epiderme das folhas (Wilhelmsen, 1959). A quantidade e localização da clorofila nos líquens implicariam que elevadas intensidades de luz fossem necessárias a fim de atingir um ponto de compensação para a fotossíntese, o que não parece ser o caso.

Tem-se proposto que o meio que os líquens dispõem para aproveitarem ao máximo as baixas intensidades de luz disponíveis, seria a produção de substâncias fluorescentes, o que propiciaria um aumento da capacidade do fotobionte em usar a luz de comprimento de onda menor, e, assim, permitir uma utilização máxima das baixas intensidades de luz (Rao e Leblanc, 1965). Mecanismo este que seria de extrema importância para os organismos de vida polar devido às escassas fontes de energia térmica encontradas nestes desertos gélidos.

O talo de um líquen pode ter milhões de fotobiontes vivendo em simbiose com um micobionte, podendo até ser compreendido como uma minicomunidade onde vivem indivíduos de espécies e reinos diferentes (Y. Asahina e Shibata, 1971). Ressalta-se, porém, que o talo liquênico é uma estrutura autônoma, apresentando

morfologia e composição química características de determinada espécie sendo, então, o foco para a identificação de líquens. Os principais tipos de talos liquênicos são mostrados na Figura 1.2.

A genética e diversidade fenotípica dos organismos envolvidos na simbiose representam uma fonte valiosa para o comércio de interessantes compostos (Oksanen, 2006). A aplicação dos líquens é bastante ampla e engloba o seu uso na indústria de cosméticos (principalmente perfumes) (Daniel e Raphaël, 2009), em atividades antibióticas e antitumorais (Shrestha e St. Clair, 2013) e também na datação de determinados substratos (liquenometria) (Richard, 2016).

Figura 1.2: Principais talos liquênicos (A) Talo crostoso: *Ochrolechia parella*, Ilha Rei George, Antártida; (B) Talo filamentoso: *Dictyonema sericeum*, SP, Brasil; (C) Talo folioso: *Hypotrachyna* sp., MG, Brasil; (D) Talo fruticoso de *Teloschistes*, RS, Brasil.



(A)



(B)



(C)



(D)

Fonte: SPIELMANN, 2006.

Desde os anos 1950, os líquens são monitorados em muitos países com o intuito de avaliar as alterações ambientais, principalmente em relação aos efeitos da poluição do ar, já que a maioria dos líquens são altamente sensíveis ao SO₂ (Hawksworth e Rose, 1970; Seaward, 1993). Porém, outros estudos relatam que alterações observadas em longo prazo nas floras liquênicas parecem estar significativamente correlacionadas com o aumento da temperatura (Van Herk *et al.*, 2002; Aptroot e Van Herk, 2007).

1.2 Líquens e a astrobiologia

A astrobiologia aborda os mistérios que envolvem o estudo da origem, evolução, distribuição e futuro da vida no universo. Geralmente, os experimentos em astrobiologia focam na demonstração da existência ou extinção da vida em outros planetas ou ainda na possibilidade da existência de vida especialmente adaptada para a sobrevivência em longos períodos no espaço (Sancho *et al.*, 2008).

É aceito que a vida na Terra iniciou-se por volta de 3,8 bilhões de anos atrás no momento em que as condições ambientais na superfície do planeta se tornaram propícias para tal, e, ao mesmo tempo é possível imaginar que Marte possuísse condições semelhantes às apresentadas aqui, possibilitando pensar que a vida também poderia ter aparecido por lá em período similar (Davis e Mckay, 1996; Mckay, 1997; Cockell *et al.*, 2000; Holm e Andersson, 2005). Desertos gélidos como na Antártida ou Ártico têm sido propostos como os análogos marcianos da Terra (Cockell *et al.*, 2000) – as baixas temperaturas, atmosferas secas, baixa disponibilidade de alimentos ou longos períodos sem luz do sol, não têm sido obstáculos para a adaptação e proliferação dos organismos liquênicos. Essas adaptações devem-se às estratégias orgânicas e inorgânicas (Jorge Villar *et al.*, 2002; Edwards, Moody, *et al.*, 2005; Jorge Villar *et al.*, 2005) especialmente envolvidas no uso de uma ampla variedade de pigmentos fotoprotetores (Mueller *et al.*, 2005; Jorge Villar *et al.*, 2006).

Neste contexto, as estratégias de sobrevivência desenvolvidas por líquens e cianobactérias estão recebendo atenção devido às suas implicações para a exobiologia, bem como para a detecção da extinção ou existência da vida nas superfícies planetárias (Edwards *et al.*, 1997; Edwards e Newton, 1999; Edwards *et al.*, 2000).

As condições terrestres mais hostis para a sobrevivência dos organismos vivos é descrita em *Dry Valleys*, Antártida, que tem sido descrito como o análogo mais

próximo do ambiente encontrado em Marte (Wynn-Williams, 1999). Assim, é possível que algumas colônias de musgos e líquens, consigam sobreviver em temperaturas ambientes de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, a múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento, a extremos índices de dessecação com umidade relativas que se aproximam de 0 % e ao aumento da exposição à radiação ultravioleta devido à depleção do ozônio em latitudes elevadas (Friedmann, 1982), já que produzem metabólitos secundários (Huneck e Yoshimura, 1996) que fornecem esta fotoproteção (Solhaug e Gauslaa, 1996; Nybakken *et al.*, 2004; Kranner *et al.*, 2005). Essa adaptação permite aos líquens a colonização de vários biomas na Terra onde se encontram condições ambientais adversas - desertos, alpes, regiões polares -, sendo possível, ocasionalmente, formarem uma biodiversidade dominante (Kappen *et al.*, 1996; Kappen e Schroeter, 1997; Kappen, 2000; Sadowsky e Ott, 2012).

Devido a estas características, os líquens recebem grande atenção como modelo para as pesquisas de cunho astrobiológico (De Vera *et al.*, 2002; De Vera *et al.*, 2004; De La Torre, 2007; Stöffler *et al.*, 2007; Sancho *et al.*, 2008; Raggio *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2014). Pode-se citar, como exemplo, um estudo recente (Brandt *et al.*, 2014) em que é investigada a viabilidade da manutenção das características morfológicas e químicas da espécie líquênica *Xanthoria elegans*, após a exposição às condições ambientais que simulam o ambiente marciano, a fim de estender o entendimento dos mecanismos de proteção específica do líquen.

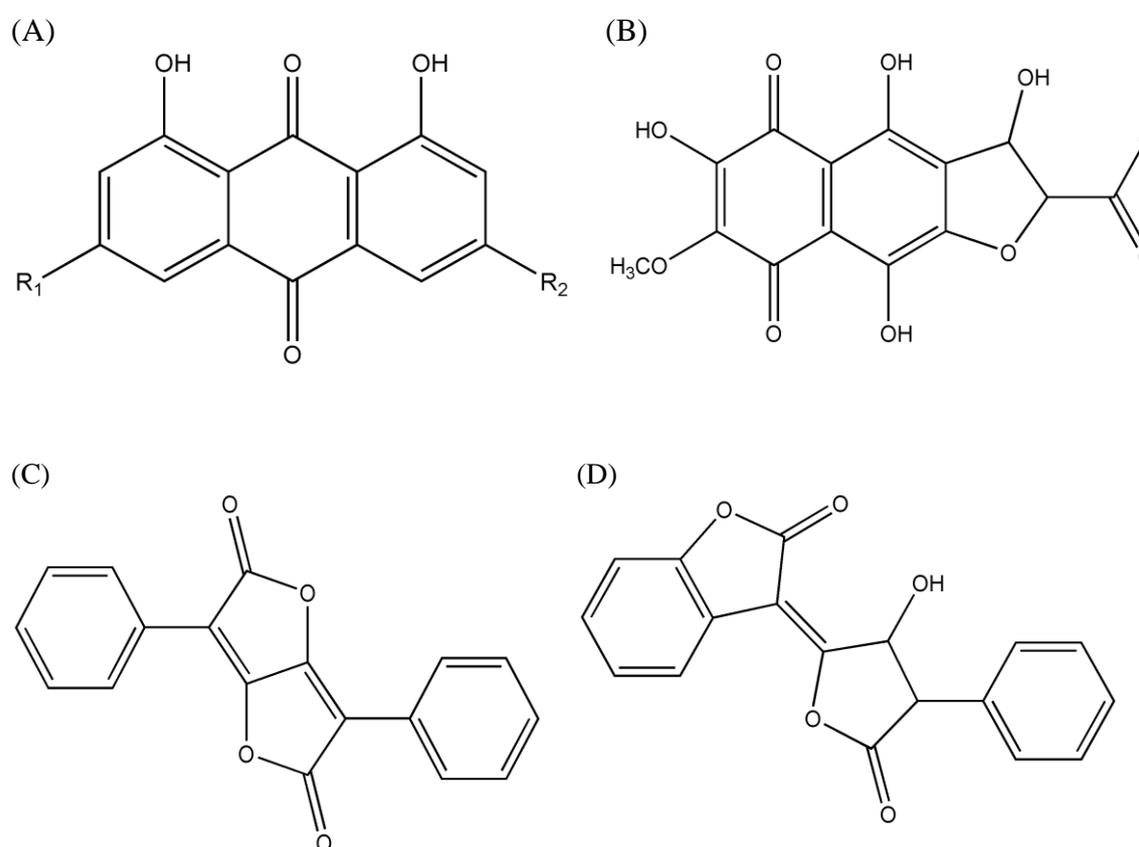
1.3 A Química dos líquens

Os líquens foram historicamente identificados com base na cor do talo, decorrente da produção de pigmentos. No entanto, atualmente é sabido que vários metabólitos importantes são incolores (Lichen Biology, 2008) e que a cor do talo é muitas vezes dependente do tipo de ambiente em que o organismo se fixa, proporcionando dificuldades quanto à taxonomia e criação de um banco de dados espectroscópicos (Edwards, Newton e Wynn-Williams, 2003; Edwards, Newton, Wynn-Williams, *et al.*, 2003).

As substâncias químicas produzidas por líquens são agrupadas, de acordo com a localização no talo, em produtos intracelulares e extracelulares (Honda e Vilegas, 1999). Sendo o talo líquênico uma estrutura simbiótica, alguns desses produtos são sintetizados pelo fungo e outros pela alga (Hale, 1983).

Os produtos intracelulares (carboidratos, carotenoides, vitaminas, aminoácidos e proteínas) estão ligados na parede celular e no protoplasto, e não ocorrem somente em líquens, mas em fungos, algas de vida livre e em plantas superiores (Hale, 1983). Os produtos extracelulares, também chamados de metabólitos secundários, são encontrados na medula ou no córtex, e podem ser exemplificados como as substâncias que apresentam cor, como a maior parte das antraquinonas, ácido quiodectônico e seus derivados, bem como os derivados do ácido pulvínico (Figura 1.3).

Figura 1.3: Estruturas químicas de alguns pigmentos líquênicos: (A) Antraquinona (Parietina, $R_1 = \text{OMe}$ e $R_2 = \text{Me}$), (B) Ácido quiodectônico, (C) Dilactona pulvínica e (D) Calicina.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

As antraquinonas são bastante disseminadas na natureza, sendo encontradas em várias famílias de plantas, fungos, bactérias e insetos; e estão envolvidas em uma série de etapas do ciclo da vida geralmente relacionadas à transferência de elétrons entre diversas espécies químicas (Nelson *et al.*, 2008). Neste contexto, a antraquinona mais comumente encontrada nas famílias das espécies de Teloschistaceae, Brigantiaceae,

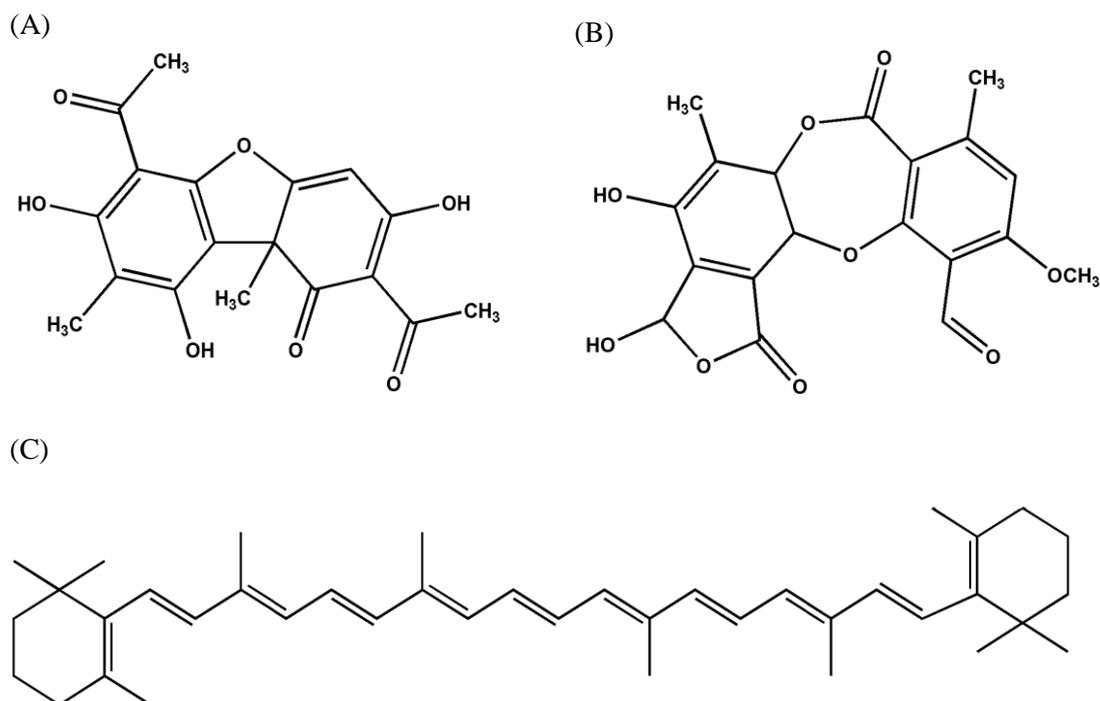
Letroutiaceae e Psoraceae (Solhaug e Gauslaa, 1996; Johansson *et al.*, 2005), e também em fungos e plantas superiores, é chamada de parietina (1,8-di-hidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona) (Figura 1.3A), um pigmento amarelo que também age como forte absorvedor de radiação UV.

O ácido úsnico (Figura 1.4A) é um conhecido e amplamente estudado derivado do dibenzofurano encontrado, principalmente, em líquens (Ingólfssdóttir, 2002). Estudos anteriores mostraram que este ácido possui várias propriedades interessantes, tais como atividades antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e anti-proliferativa (Cocchietto *et al.*, 2002). Recentemente, tem-se estudado as suas atividades anti-tumorais em várias células cancerígenas, incluindo tecidos do pulmão, cólon, fígado e ovário (Mayer *et al.*, 2005; Einarsdóttir *et al.*, 2010; Tomczyk *et al.*, 2010). Além disso, outro trabalho (Bačkorová *et al.*, 2012) confirma que o ácido úsnico também iniciou a apoptose em células do câncer de mama, apesar do mecanismo de indução não ter sido totalmente esclarecido.

O composto ácido estítico (Figura 1.4B) – proveniente da ciclização do orselinato, é uma depsidona isolada pela primeira vez da espécie de líquen *Lobaria pulmonaria* em 1846 (Knop e Schnedermann, 1846). Derivados de ácido estítico têm sido encontrados em muitas famílias de líquens, em particular na Parmeliaceae, além de estarem envolvidos na proteção contra os efeitos da radiação UV pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Lohézic-Le Dévéhat *et al.*, 2007).

Um papel biológico primário para os pigmentos aromáticos em líquens é a de absorver e filtrar a radiação solar (Wynn-Williams *et al.*, 2002) já que o sistema de elétrons π é um dos absorvedores de radiação UV mais eficazes, justificado pelo fato de que a sobreposição dos orbitais π terem máximos de absorção na região UV. No caso dos carotenoides, exemplificado na Figura 1.4C pelo β -caroteno – um carotenoide comum nas espécies de líquens – e outros pigmentos aromáticos conjugados, a elevada deslocalização dos elétrons através das conjugações dos cromóforos indica que o estado eletrônico excitado é relativamente de menor energia de modo que, em geral, a absorção da luz visível é suficiente para promover as transições eletrônicas.

Figura 1.4: Estruturas químicas de alguns compostos fotoprotetores encontrados em líquens: (A) Ácido úsnico, (B) Ácido estético e (C) Carotenoide (em destaque, β -caroteno).



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

As espécies líquênicas estudadas neste trabalho, bem como o local de coleta, assim são listados:

✓ *Gondwania regalis* (Vainio) Søchting, Frödén & Arup

Origem: Antártida, South Shetland Islands, Deception Island.

✓ *Teloschistes exilis* (Michaux) Vainio

Origem: Brasil, Rio Grande do Sul, Município de Piratini, Cerro do Sandi.

✓ *Xanthoria candelaria* (L.) Th. Fr.

Origem: Antartida, South Shetland Islands, Deception Island.

✓ *Pyxine coccifera* (Fée) Nyl.

Origem: Brasil, Mato Grosso do Sul, Município de Campo Grande.

✓ *Candelaria fibrosa* (Fr.) Müll. Arg.

Origem: Brasil, Rio Grande do Sul, Município de Piratini, Cerro do Sandi.

✓ *Crocodia aurata* e *Usnea* sp.

Origem: Brasil, Minas Gerais, Município Conceição de Ibitipoca.

1.4 Espectroscopia vibracional

A espectroscopia molecular concentra-se nos fenômenos que envolvem a interação entre a radiação eletromagnética e matéria visando à determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Os espectros fornecem as transições - diferença de energia entre os níveis - sendo que, no caso de moléculas, a região espectral onde as transições ocorrem depende da energia dos níveis envolvidos: eletrônico, rotacional ou vibracional (Sala, 2008).

O espectro vibracional de moléculas poliatômicas pode ser compreendido pela aproximação do oscilador harmônico, onde o ponto chave para este entendimento é a introdução do conceito de coordenadas normais. Neste caso, consideram-se as propriedades de simetria e teoria de grupo para a predição do número de modos normais de vibração correspondentes à molécula.

Em uma molécula contendo N átomos, a sua completa especificação no espaço requer $3N$ coordenadas (três coordenadas cartesianas para cada átomo) ou $3N$ graus de liberdade. Destas $3N$ coordenadas, três podem ser usadas para especificar o centro de massa do sistema, e o movimento ao longo destas três coordenadas corresponde à translação do centro de massa da molécula - graus de liberdade translacionais. A molécula linear requer duas coordenadas para especificar a rotação sobre seu centro de massa e três coordenadas para orientar uma molécula não linear; denominados graus de liberdade rotacionais. As coordenadas remanescentes ($3N-5$ para a molécula linear e $3N-6$ para a molécula não linear) especificam os graus de liberdade oriundos do movimento vibracional.

Para o estudo das transições vibracionais duas técnicas se destacam: a espectroscopia de absorção na região do infravermelho e espectroscopia Raman, e com estas é possível obter informações sobre as ligações químicas através das constantes de força e os valores das frequências de vibração.

1.4.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho

A espectroscopia de absorção no infravermelho consiste no aniquilamento de um fóton com energia igual à energia de uma transição vibracional da molécula, após a interação da radiação policromática com a matéria (Harris e Bertolucci, 1989). Em outras palavras, para que ocorra a transição vibracional é necessário que a energia do

fóton absorvido seja igual à diferença de energia entre dois estados vibracionais da molécula, como mostra a equação (1):

$$h\nu = E_2 - E_1 \quad (1)$$

A equação 1 envolve uma aproximação estabelecida pelo modelo do oscilador harmônico, situação na qual o tratamento quântico impõem que as transições permitidas, em princípio, envolvam os níveis de energia vibracionais separados por $\Delta v = \pm 1$.

A absorção ou emissão de radiação por um sistema é devido à variação periódica do seu momento de dipolo elétrico, assim, quando uma molécula vibra seu momento de dipolo pode sofrer variações.

As componentes do momento de dipolo ao longo dos eixos de um sistema de coordenadas cartesianas (x, y e z) é, em geral, função das coordenadas normais Q. A utilização das coordenadas normais permite fazer uma expansão em série de Taylor como segue na Equação 2.

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dQ} \right)_0 q + \dots \quad (2)$$

onde μ_0 é o vetor do momento de dipolo permanente e a derivada é considerada na posição de equilíbrio.

A equação 2 demonstra a primeira condição para haver absorção no infravermelho: o momento de dipolo deve variar, ao menos, em um dos eixos das coordenadas (x, y e z), ou seja:

$$\frac{d\mu}{dQ_i} \neq 0$$

onde Q_i é a coordenada normal associada ao i-ésimo modo normal da molécula

Pela mecânica quântica, a transição entre dois estados, caracterizados pelos estados vibracionais inicial (Ψ_n) e final (Ψ_m), é descrita pelo momento de transição de dipolo elétrico (μ):

$$\mu_{mn} = \sum_{i=x,y \text{ ou } z} \int_n^m \Psi_n \mu_i \Psi_m d\tau \quad (3)$$

O valor dessa integral está relacionado com a intensidade da absorção no infravermelho, e, este é proporcional à probabilidade de transição ($|\mu_{mn}|^2$). Assim, para que uma transição seja permitida é necessário que a integral da equação 3 seja diferente de zero, pelo menos para uma das dimensões (x, y ou z).

1.4.2 Espectroscopia Raman

Uma forma de obter os espectros vibracionais é através do espalhamento Raman, ou seja, do espalhamento inelástico de radiação eletromagnética monocromática que interage com as moléculas. As frequências vibracionais são determinadas pelas diferenças entre as frequências das radiações espalhadas e a da radiação incidente.

O efeito Raman foi previsto teoricamente por Smekal (1923) e descrito experimentalmente por Raman (1928), e logo despertou interesse no meio científico. Mas, somente a partir da década de 1980, com a superação de alguns problemas fundamentais como a baixa intensidade do sinal e interferência da fluorescência, que a técnica Raman surge como uma poderosa ferramenta analítica (McCreery, 2005).

O campo elétrico da radiação incidente promove uma polarização induzida na molécula, conseqüentemente esse dipolo induzido irradia a luz espalhada, com ou sem mudança de energia da mesma. A intensidade da polarização induzida, P , é um produto vetorial da polarizabilidade, α , e do campo elétrico incidente, E :

$$\vec{P} = \vec{\alpha} \vec{E} \quad (4)$$

Ambos os tratamentos, clássico e quântico, do Espalhamento Raman são baseados na equação acima, e, o primeiro, é correlacionado aos efeitos das vibrações moleculares a respeito da polarizabilidade, α , na equação (4). Considerando que o campo elétrico incidente é regido pela equação:

$$E = E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) \quad (5)$$

onde ν_0 é a frequência do laser.

As vibrações moleculares são usualmente compostas de modos normais, Q_j , ao qual existem em $3N-6$ (ou $3N-5$ para uma molécula linear) em uma molécula com N átomos:

$$Q_j = Q_j^0 \cos(2\pi \nu_j t) \quad (6)$$

onde ν_j é a frequência característica do j -ésimo modo normal.

A polarizabilidade será modulada pela vibração molecular, de modo que:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}\right) Q_j + \dots \quad (7)$$

A partir da equação 4, tem-se que a polarização é um produto escalar das equações 5 e 7:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + E_0 Q_j^0 \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}\right) \frac{\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_j)t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_j)t}{2} \quad (8)$$

Posteriormente, assumindo, classicamente, que os elétrons polarizados irão irradiar luz na frequência de suas oscilações, a eq. (8) explicita que a luz será espalhada em três frequências:

- ✓ Espalhamento Rayleigh: refere-se ao primeiro termo da equação 8, de mesma frequência do laser e a magnitude proporcional à α_0 , a polarizabilidade inerente da molécula;
- ✓ Espalhamento Anti-Stokes: ocorre em $\nu_0 + \nu_j$;
- ✓ Espalhamento Stokes: ocorre em $\nu_0 - \nu_j$.

Embora a equação 8 tenha sido obtida classicamente, a mesma fornece informações importantes:

- ✓ Polarização e Espalhamento são linearmente dependentes com a intensidade do laser.
- ✓ Apenas vibrações que alteram a polarizabilidade, $\left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}\right) \neq 0$, ocasionam o espalhamento Raman;
- ✓ O deslocamento Raman pode ser positivo e negativo; a origem do sinal é a frequência do laser, sendo assim possível medir valores positivos ou negativos em relação à origem;
- ✓ $\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}$ pode variar significativamente para diferentes moléculas, ocasionando amplas variações na intensidade do espalhamento Raman;

- ✓ Embora possa não aparentar, $\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}$ é geralmente muito menor do que α_0 , e o Espalhamento Raman é menos intenso do que o Espalhamento Rayleigh.

1.5 Espectroscopia Raman e os líquens

A espectroscopia Raman apresenta diversas vantagens em relação a outros métodos quando se trata da caracterização de compostos químicos; os resultados fornecem informações detalhadas e abrangentes com relação aos componentes químicos de líquens que, por exemplo, podem ser avaliados com sucesso tanto *in situ* quanto em extratos brutos e substâncias puras. Considerada uma técnica não destrutiva, em comparação com os métodos analíticos em que, predominantemente, são destrutivos ao material biológico e exigem a preparação das amostras; vantagem de particular importância para materiais biológicos.

Ao longo dos anos, alguns estudos foram realizados no âmbito da caracterização de líquens pela espectroscopia Raman (Oliveira *et al.*, 2002; Edwards, Newton e Wynn-Williams, 2003; Edwards, Newton, *et al.*, 2003; Edwards, Newton, Wynn-Williams, *et al.*, 2003; Edwards, Seaward, *et al.*, 2003; Edwards, De Oliveira, *et al.*, 2005; Jorge-Villar *et al.*, 2011). Entre diversos objetivos, a técnica tem sido utilizada para a elucidação dos compostos majoritários através de métodos químicos de extração. Particularmente no estudo de líquens, a grande perspectiva para o uso da técnica Raman se encontra na viabilidade da mesma para o auxílio da classificação taxonômica das espécies líquênicas com base nas características espectrais dos principais quimiomarcadores.

A disponibilidade atual de espectrômetros Raman portáteis visa a facilitação dos estudos para análises de campo, porém a miniaturização necessária para o equipamento pode vir a comprometer respostas instrumentais, como por exemplo, resolução ou faixa espectral. Neste sentido, pode permitir a identificação de apenas um composto ou ainda ser prejudicial por fornecer atribuições equivocadas em amostras complexas.

Contudo, a caracterização espectroscópica Raman *in situ* de líquens e, assim, seu uso como ferramenta auxiliar para estudos taxonômicos ainda é pouco difundida, mesmo que as evidências para a elucidação dos componentes químicos produza respostas eficazes, rápidas e precisas para os estudos químicos de diversos sistemas.

1.6 Objetivo geral

Pretende-se estudar as propriedades vibracionais, principalmente através da espectroscopia Raman, dos compostos químicos presentes em alguns espécimes de líquens do Brasil e da Antártida a fim de contribuir com importantes informações a respeito da composição química dos líquens, e, assim, propor a técnica Raman como uma possível ferramenta de auxílio taxonômico para uso *in situ*.

CAPÍTULO 2

ESPECTROSCOPIA RAMAN COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO *IN SITU* DE ESPÉCIES DE LIQUENS DA ANTÁRTIDA E DO BRASIL

2.1 *Gondwania regalis*, *Teloschistes exilis* e *Xanthoria candelaria*

A família dos líquens *Teloschistaceae* é uma das maiores famílias de fungos liquenizados. Atualmente, inclui um gênero heterogêneo muito amplo, *Caloplaca*, com cerca de 1000 espécies de grande variação morfológica, anatômica e na composição química (Ulf *et al.*, 2013).

A revisão mais abrangente da família, baseada em caracteres morfológicos e anatômicos, foi realizada por Kärnefelt (1989) reconhecendo 10 gêneros: *Apatoplaca*, *Caloplaca*, *Cefalofisia*, *Fulgensia*, *Ioplaca*, *Seirophora*, *Teloschistes*, *Xanthodactylon*, *Xanthopeltis* e *Xanthoria* (Kärnefelt, 1989). Entretanto, o líquen *Caloplaca regalis* (Vain.) Zahlbr., catalogado em 1931, passou a ser identificado como *Gondwania regalis* (Vainio) Søchting, Frödén & Arup, após a sua identificação em 2013 (Arup *et al.*, 2013).

Os aspectos mais importantes relacionados à adaptação do líquen à radiação UVB (280-315 nm) e UVA (315-400 nm) e outras estratégias de proteção, dependem de fatores como forma do talo, espessura do córtex e o estado de hidratação dos líquens (Nguyen *et al.*, 2013). Assim, a produção de alguns compostos como ácido úsnico, antraquinonas, xantonas e ácido pulvínico, pode ser considerada como um papel biológico primário de pigmentos aromáticos de líquens a fim de descrever sua capacidade de absorver e filtrar a radiação solar (Wynn-Williams *et al.*, 2002).

Os carotenoides podem ser encontrados em muitas espécies botânicas e microbiológicas, sendo responsáveis pelas estratégias de sobrevivência de líquens expostos ao fotoestresse ambiental e à oxidação (Cockell e Knowland, 1999), particularmente a zeaxantina, violaxantina e astaxantina (Kappen, 1973). Alguns estudos têm sido desenvolvidos revelando novas informações sobre alguns compostos químicos de origem liquênica - como o ácido lecanórico, ácido úsnico, antraquinonas, xantonas, derivados de ácido pulvínico e depsídeos (Oliveira *et al.*, 2002; Edwards, Newton, Wynn-Williams, *et al.*, 2003; Edwards, Seaward, *et al.*, 2003; De Oliveira *et al.*, 2009).

Na maioria dos casos, os líquens são identificados de acordo com a cor do talo, o que sugere a produção de algum tipo de pigmento. No entanto, vários metabólitos liquênicos importantes são incolores (Nash, 1996), e, tipicamente dependentes do habitat da espécie; fator este que pode criar problemas para a construção de bancos de dados espectroscópicos. Muitas espécies de líquens produzem um composto típico

chamado antraquinona como metabólito secundário. Mais especificamente, o pigmento amarelo chamado parietina (Figura 1.3A) é a antraquinona mais estudada em líquens por atuar como forte absorvedor de radiação UV (Solhaug e Gauslaa, 1996; Rosso *et al.*, 2003) e por possuir algumas atividades biológicas importantes, tais como antibacteriana e antifúngica (Agarwal *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2010), e, também ser relatada como capaz de inibir a proliferação de células do câncer humano (Bačkorová *et al.*, 2011).

Ao observar a relevância do estudo dos pigmentos liquênicos, em especial os carotenoides e parietina, e na tentativa de estudar as propriedades vibracionais dos produtos liquênicos, foi realizada uma análise por espectroscopia Raman de algumas espécies coletadas na Antártida (*Gondwania regalis* (Vainio) Søchting, Frödén & Arup e *Xanthoria candelaria* (L.) Th. Fr.) e do Brasil (*Teloschistes exilis* (Michaux) Vainio).

A técnica Raman como ferramenta de estudos *in situ* fornece uma comparação da composição química de líquens provenientes de diferentes habitats, e, apesar do estudo Raman *in situ* das espécies de *Xanthoria* já ser descrito na literatura (Edwards *et al.*, 1998), este foi reexecutado neste trabalho com o objetivo de auxiliar a caracterização das espécies de *Teloschistes* e *Gondwania*.

2.2 Estudo Fotoquímico: supressão e formação de oxigênio singlete pelo pigmento parietina

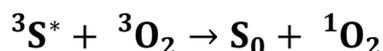
As metodologias baseadas na espectroscopia de fluorescência e fosforescência são aquelas nas quais a excitação da molécula é proporcionada pela absorção e emissão de fótons. Dessa forma, a molécula é excitada para um estado eletrônico de maior energia, cujo retorno ao estado fundamental é acompanhado pela emissão de radiação eletromagnética. Contudo, destaca-se que para a emissão do fóton em fluorescência e fosforescência há o envolvimento de transições eletrônicas diferentes (Sotomayor *et al.*, 2008).

A energia eletrônica responsável pela transição fluorescente não envolve uma mudança no número quântico de spin eletrônico, caracterizando transições entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade com conseqüente emissão de radiação até os níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental. Por outro lado, uma mudança no número quântico de spin eletrônico acompanha as emissões fosforescentes,

envolvendo transições proibidas de elétrons provenientes de um estado excitado com spin diferente do original para o estado fundamental (Figura 2.1).

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) foi observado pela primeira vez em 1924 (Raymond *et al.*, 1968) e, em seguida, foi definido como a forma mais reativa do oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 1989), cujo principal método de produção é por meio de reações de fotossensibilização (Kearns, 1971). No decorrer desses estudos, têm-se mostrado que o $^1\text{O}_2$ é uma espécie prejudicial e intermediária na oxidação de biomoléculas, e, demonstrou-se ainda que o oxigênio singlete pode reagir com muitos tipos de moléculas biológicas, tais como DNA, proteínas e lipídeos (Berneburg *et al.*, 1999).

O oxigênio molecular em seu estado fundamental é um tripleto ($^3\Sigma_g^-$) possuindo dois estados singletes conhecidos como $^1\Delta_g$ (primeiro estado excitado) e $^1\Sigma_g^+$ (segundo estado excitado), cujas energias de excitação são de aproximadamente 23 e 38 kcalmol⁻¹ respectivamente (Turro, 1991). Assim, moléculas excitadas, que possuam energia menor ou igual a 23 kcal mol⁻¹, podem ter sua luminescência suprimida através da transferência de energia para o oxigênio tripleto, produzindo o oxigênio singlete ($^1\Delta_g$). Por outro lado, o oxigênio singlete pode ser facilmente formado a partir do processo de transferência de energia de um doador adequado, normalmente um sensibilizador no seu estado excitado tripleto, por meio da reação genérica:



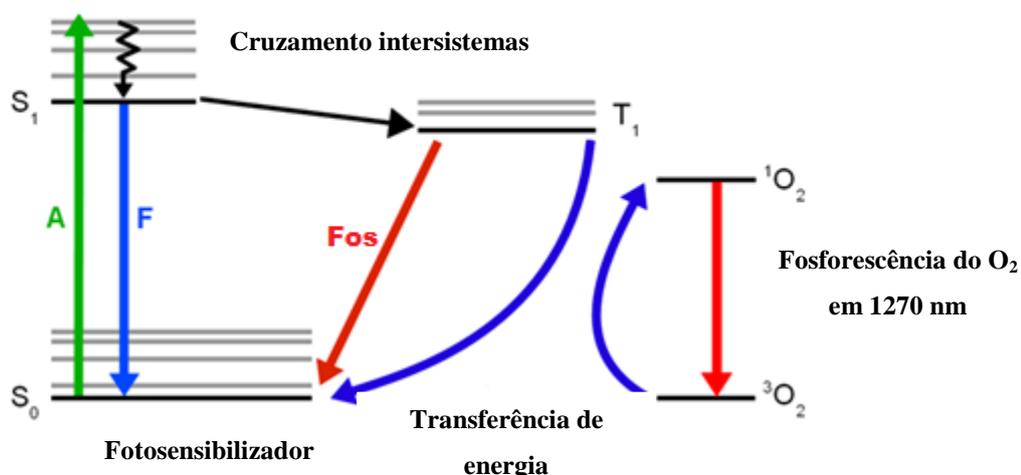
A fotoquímica orgânica, enquanto investigação de reações químicas promovidas pela radiação de luz (visível e ultravioleta), apesar de iniciar-se em meados do séc. XIX avançou, principalmente, a partir dos anos 1960 com o advento de técnicas analíticas, quantitativas e qualitativas, rápidas e com exigência de apenas pequenas quantidades de amostra. Após algumas décadas, as novas técnicas com resolução temporal e identificação de intermediários instáveis, permitiram estudos mecanísticos mais apurados das reações (De Lucas *et al.*, 2015).

As quinonas e hidroxiquinonas pertencem a uma classe de grande importância biológica e comercial devido ao fato de que estão envolvidas em muitos processos de transferência de elétrons em sistemas enzimáticos (Gutiérrez *et al.*, 1997). Neste sentido, Gollnick e Held (Gollnick e Held, 1993) publicaram um estudo de

hidroxiantraquinonas como sensibilizadores para formação de oxigênio singlete molecular, e, mais tarde reportaram as propriedades dos mesmos compostos como sensibilizadores para reações de transferências de elétrons. Já as antraquinonas, que são sensibilizadoras comumente encontradas no ambiente marinho, são empregadas como mimetizadores naturais dos processos de fotooxidação neste tipo de habitat (Ehrhardt e Petrick, 1985).

As reações fotosensibilizadoras, por definição, podem ocorrer via reações do Tipo I ou do Tipo II (Foote, 1991). A primeira etapa para ambas as reações é a absorção de luz pelo fotosensibilizador (Sen) (antraquinonas, por exemplo), para a sua excitação a um estado eletrônico singlete (S_1) de maior energia – estado este que pode ser rapidamente convertido para um estado tripleto (T_1) por mecanismos de cruzamento de intersistemas (Figura 2.1).

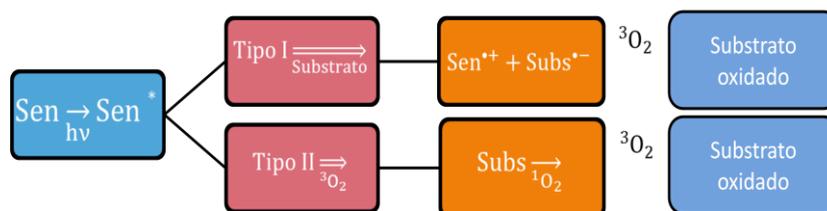
Figura 2.1: Diagrama de *Jablonski* para detecção do oxigênio singlete. Legenda: A- absorção; F- Fluorescência e Fos – fosforescência.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

O mecanismo I ocorre pela reação do estado tripleto excitado com um substrato redutor pela transferência de um átomo de hidrogênio ou um elétron, e, então o radical sensibilizado resultante pode reagir com O_2 para produzir as espécies reduzidas do O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ou OH^{\cdot} . No mecanismo do tipo II, o estado tripleto excitado pode transferir energia diretamente para o O_2 gerando o estado singlete excitado 1O_2 . Os mecanismos do tipo I e II estão representados, esquematicamente, na Figura 2.2.

Figura 2.2: Representação esquemática das reações fotosensibilizadoras evidenciando o tipo de mecanismo pela qual podem ocorrer.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

A produção de $\cdot\text{O}_2^-$ pode ser detectada por uma relação fotobiológica indireta que mede a redução do nitrozul de tetrazólio pelo $\cdot\text{O}_2^-$ quando a antraquinona está presente, enquanto que a habilidade de gerar $^1\text{O}_2$ pode ser determinada pela medição da fosforescência do $^1\text{O}_2$ gerado quando a antraquinona é excitada pela radiação do laser pulsado, metodologia esta que foi adotada neste trabalho.

2.3 Objetivos específicos

A caracterização espectroscópica inequívoca dos compostos químicos presentes nos líquens *Gondwania regalis*, *Teloschistes exilis* e *Xanthoria candelaria* é ferramenta fundamental para o estudo, e, para tal, compostos químicos devem ser isolados e purificados a partir de extratos em diferentes solventes.

O estudo fotoquímico via captação e supressão de oxigênio singlete será usado como suporte ferramental para a compreensão das propriedades antioxidantes dos produtos obtidos via extração.

2.4 Experimental

2.4.1 Amostras de líquens

Os líquens foram obtidos através da cessão da coleção obtida pelo Prof. Dr. Adriano Spielmann e estão depositados no herbário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, e, foram devidamente identificadas por análise taxonômica.

✓ *Gondwania regalis* (Vainio) Søchting, Frödén & Arup

Origem: Antártida, South Shetland Islands, Deception Island, 15.II.2011.

Coordenadas: 63°00'00.5"S, 60°34'55.0"W. Altitude: 30 m.

Coletores: A.A. Spielmann & B. Resck 9107, 9113.

✓ *Teloschistes exilis* (Michaux) Vainio

Origem: Brasil, Rio Grande do Sul, Município de Piratini, Cerro do Sandi, 31.V.2013.

Coordenadas: 31°28'58.9"S, 53°11'54.9"W. Altitude: 495 m.

Coletores: A.A. Spielmann, E.S. Lacerda & J. Pedrosa 11019.

✓ *Xanthoria candelaria* (L.) Th. Fr.

Origem: Antártida, South Shetland Islands, Deception Island, 12.II.2011.

Coordenadas: 62°59'59.6"S, 60°33'49.6"W. Altitude: 125 m.

Coletores: A.A. Spielmann & B. Resck 9061.

2.4.2 Materiais

Todos os solventes foram obtidos da Merck® e o padrão do pigmento Parietina foi obtido da Sigma-Aldrich®, sendo especificado como de alto teor de pureza. Foi utilizado o aparato de Soxhlet para a extração do líquen *G. regalis* e placas cromatográficas de sílica gel Sigma-Aldrich® para determinação do número de componentes no extrato obtido.

2.4.3 Extração do pigmento parietina

A extração do pigmento parietina presente no líquen *G. regalis* foi realizada através do extrator de Soxhlet. Adicionou-se 150 mL de acetona em um balão de uma via conectado a um condensador, e 3,4 g do líquen em um cartucho de papel filtro. Manteve-se o banho a uma temperatura de 100 °C durante 3 h de extração. Após secagem completa do material extraído, o mesmo foi recristalizado em hexano. Obtiveram-se 15 mg de produto final nesta metodologia de extração descrita por Solhaug e Gauslaa (Solhaug e Gauslaa, 1996).

2.4.4 Instrumentação

Os espectros Raman foram obtidos através do espectrômetro Bruker RFS 100, com um laser de Nd³⁺/YAG operando em 1064 nm e detector de germânio resfriado com N₂. As medidas foram feitas com resolução de 4 cm⁻¹ e faixa espectral de 3500 a

400 cm^{-1} . A potência do laser usada está entre 80-100 mW e 1024 acumulações foram realizadas. Estes parâmetros foram previamente ajustados para obter a melhor relação sinal-ruído possível sem que a integridade física e química das amostras fosse alterada.

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido em um espectrômetro Alpha Bruker FT-IR, na região de 4000-400 cm^{-1} , com a amostra suportada em pastilha de KBr e resolução espectral de 4 cm^{-1} com uma média de 64 acumulações.

A emissão da fosforescência do oxigênio singlete foi detectada utilizando-se um Fluorímetro FS920 da Edinburgh Instruments acoplado a um detector no infravermelho próximo e uma fotomultiplicadora modelo H1033-45 da Hamamatsu. Como fonte de excitação utilizou-se uma lâmpada de Xe.

Os espectros de RMN ^{13}C e ^1H foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III HD 500, onde 12 mg da amostra foram dissolvidas em 300 μL de CDCl_3 .

Toda a instrumentação citada pertence ao Departamento de Química da UFJF, exceto o Fluorímetro utilizado para o estudo fotoquímico; este pertencente ao Instituto de Química da UFRJ (IQ/ UFRJ).

2.4.5 Parietina como gerador e supressor de oxigênio singlete

2.4.5.1 Rendimento quântico (Φ_{Δ}) para a formação de oxigênio singlete

O Φ_{Δ} de formação do oxigênio singlete pela parietina foi determinado pelo monitoramento da fosforescência em 1270 nm de soluções com absorções equivalentes em 355 nm ($A=0,2$) em relação à solução padrão (perinaftenona, $\Phi_{\Delta}=1$) (Nonell *et al.*, 1993) em acetonitrila. Como fonte de excitação utiliza-se um laser CryLas Nd:YAG HP 355 nm com pulso de 1.0 ns e energia <150 mJ. Os valores de Φ_{Δ} foram determinados pela inclinação de gráficos de intensidade do sinal de fosforescência do oxigênio singlete *versus* intensidade da luz de excitação.

2.4.5.2 Determinação da constante de velocidade de supressão do oxigênio singlete por parietina

A constante de velocidade de supressão do oxigênio singlete, em 1270 nm, foi medido na ausência (I_0) e na presença de diferentes concentrações de parietina (I). Uma solução estoque do supressor (parietina) foi preparada de modo que fosse

necessária a adição de poucos microlitros desta solução em 3 mL de uma solução de azul de metileno, a fim de obter a concentração apropriada do supressor. A constante de velocidade de supressão da emissão do oxigênio singlete por parietina foi obtida a partir do gráfico de Stern-Volmer.

As medidas fotoquímicas para supressão e formação de oxigênio singlete para a antraquinona parietina foram feitas através de uma parceria com o Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ) através da Profa. Dra. Nanci Câmara de Lucas Garden.

2.5 Resultados e discussões

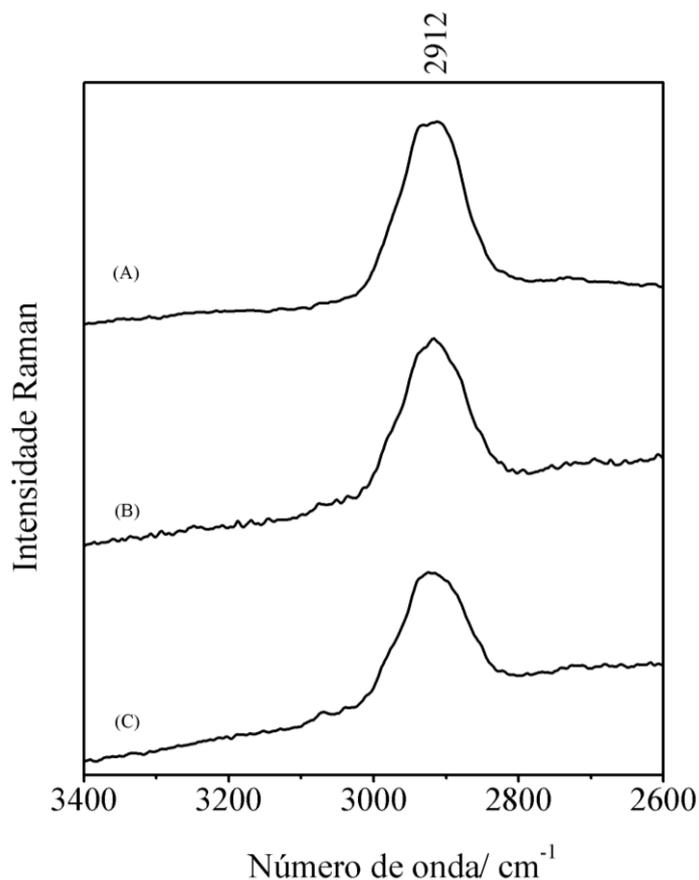
2.5.1 Caracterização espectroscópica dos líquens *Gondwania regalis*, *Teloschistes exilis* e *Xanthoria candelaria*.

Em estudos anteriores (Juliani *et al.*, 1968) foi relatado que alguns metabólitos secundários do líquen *T. exilis* coletados em *Sierras Grandes* (Argentina) foram identificados como parietina ($C_{16}H_{12}O_5$) e teloschistina ($C_{16}H_{12}O_6$) por técnicas de espectroscópicas UV-VIS, absorção no infravermelho e ressonância magnética nuclear. Neste sentido, a espectroscopia Raman também tem sido utilizada para caracterizar a antraquinona parietina por meio dos métodos de extração em outras espécies liquênicas (Edwards, Newton, *et al.*, 2003).

Neste atual estudo, a análise dos espectros FT-Raman realizados *in situ* fornecem algumas informações valiosas sobre os principais compostos identificados em *G. regalis*, *T. exilis* e *X. candelaria*. Os espectros FT-Raman das amostras podem ser vistos nas Figuras 2.3 a 2.6, bem como as tentativas de atribuições vibracionais apresentadas na Tabela 1.

A Figura 2.3 mostra os espectros dos líquens na faixa espectral de 3400-2600 cm^{-1} , em que de acordo com a atribuição vibracional para o pigmento parietina proposta por Edwards e colaboradores (2003), as principais informações que podem ser observadas são as bandas vibracionais em 3069 cm^{-1} referente aos modos $\nu(CH)_{aromático}$, 3036 cm^{-1} para $\nu(CH)_{aromático}$, 2919 atribuído ao $\nu(CH_3)_{assimétrico}$ e $\nu(CH_3)_{simétrico}$ em 2845 cm^{-1} para os líquens *T. exilis* e *X. candelaria*. Experimentalmente, apesar desta região no espectro apresentar bandas pouco intensas, o espectro dos líquens evidencia apenas uma banda forte com máximo em 2912 cm^{-1} .

Figura 2.3: Espectros FT-Raman *in situ* das espécies líquênicas a) *G. regalis*; b) *X. candelaria* e c) *T. exilis* na faixa espectral de 3400-2600 cm^{-1} .



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Os espectros Raman em uma região mais rica em informações vibracionais, entre 1800-400 cm^{-1} , são mostrados nas Figuras 2.4 a 2.6.

A presença da banda de média intensidade relativa em 1674 cm^{-1} deve-se ao estiramento do grupamento carbonila intensamente conjugado, bem como a banda mais fraca em 1634 cm^{-1} também está relacionada ao modo estiramento C=O. As bandas em 1614, 1596 e 1554 cm^{-1} podem ser descritas como provenientes do estiramento carbono-carbono (C=C) dos anéis aromáticos.

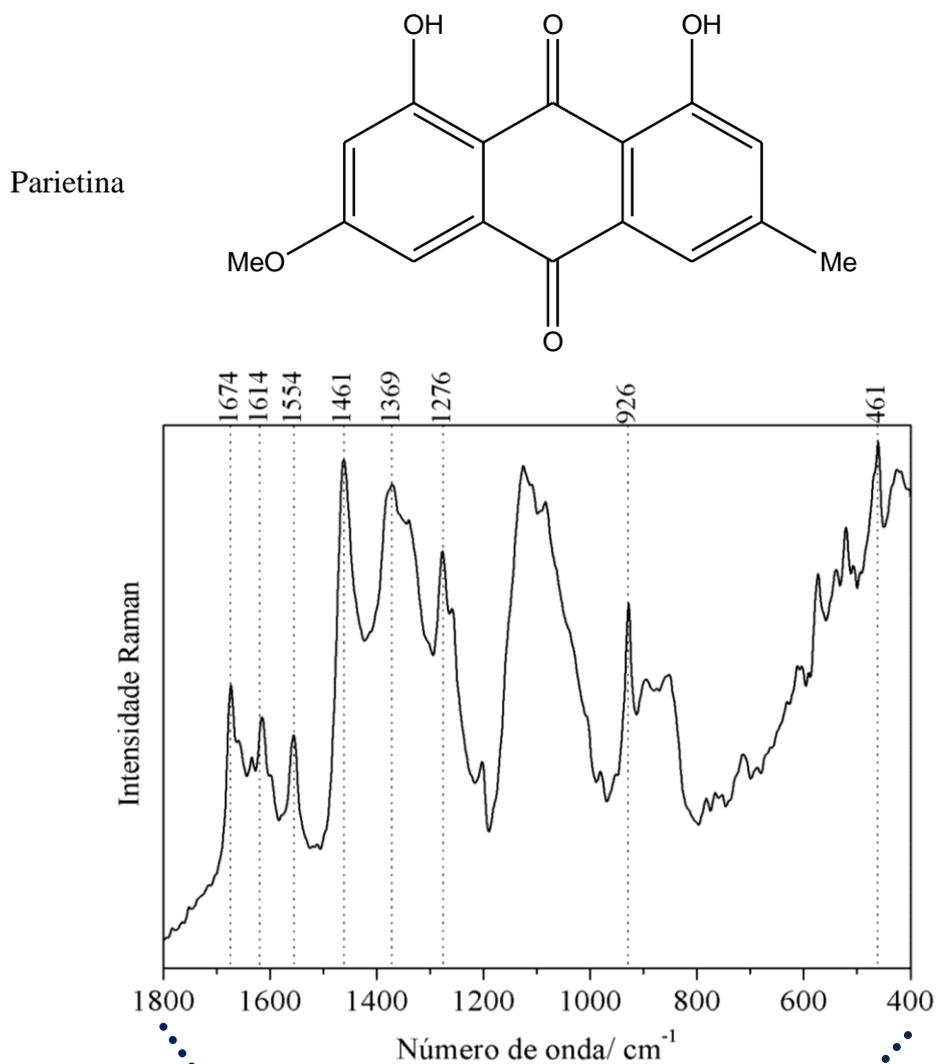
As bandas fracas entre 1460-1430 cm^{-1} são características do estiramento do anel aromático, bem como a banda 1369 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento (C-O) do grupo fenil. Por outro lado, uma banda de forte intensidade relativa em 1276 cm^{-1} deve-se ao estiramento de anel e uma banda de média intensidade em 1287 cm^{-1} pode ser associada ao estiramento (C-O) da metoxila ligada ao anel aromático. As outras

bandas de baixas intensidades relativas podem ser atribuídas às deformações do esqueleto e respiração dos anéis aromáticos.

De acordo com esta análise preliminar e *in situ*, pode-se propor a presença do pigmento parietina nestas espécies; posteriormente, a extração química deste pigmento do líquen *G. regalis*, e comparação com o composto padrão adquirido comercialmente, complementam tal afirmativa.

Através da análise destes espectros (Figuras 2.4, 2.5 e 2.6), pode-se observar que apenas para as amostras de *T. exilis* e *X. candelaria* foi possível constatar as principais bandas relacionadas à presença do pigmento carotenoide. Este tipo de polieno conjugado pode ser caracterizado vibracionalmente por meio da atribuição dos modos $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}-\text{C})$ e $\delta(\text{C}-\text{CH}_3)$; nestes líquens as bandas relativas a estas atribuições vibracionais estão presentes, respectivamente em, 1527, 1158 e 1005 cm^{-1} , o que é um indício de que o mesmo carotenoide está presente em ambos os líquens. Entretanto, a caracterização estrutural do tipo de carotenoide presente no material, quando analisado no modo *in situ*, pode não ser precisa visto que dependendo da maneira com que estas moléculas estejam arranjadas ou associadas a outras moléculas no tecido ou dentro da célula, podem apresentar deslocamento significativo das bandas marcadoras; essa variação espectral tem sido denominada de efeito da matriz biológica (De Oliveira *et al.*, 2011). Estudos anteriores (Edwards *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2004), relatam a espectroscopia Raman como ferramenta de caracterização onde é observada a presença de β -caroteno em espécies *Xanthoria*; pode-se indicar que este carotenoide também está presente nas espécies estudadas.

Figura 2.4: Espectro FT-Raman *in situ* da espécie *G. regalis* na faixa espectral de 1800- 400 cm^{-1} indicando a presença do pigmento parietina. A foto do líquen destaca o ponto onde foi coletado o espectro.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.



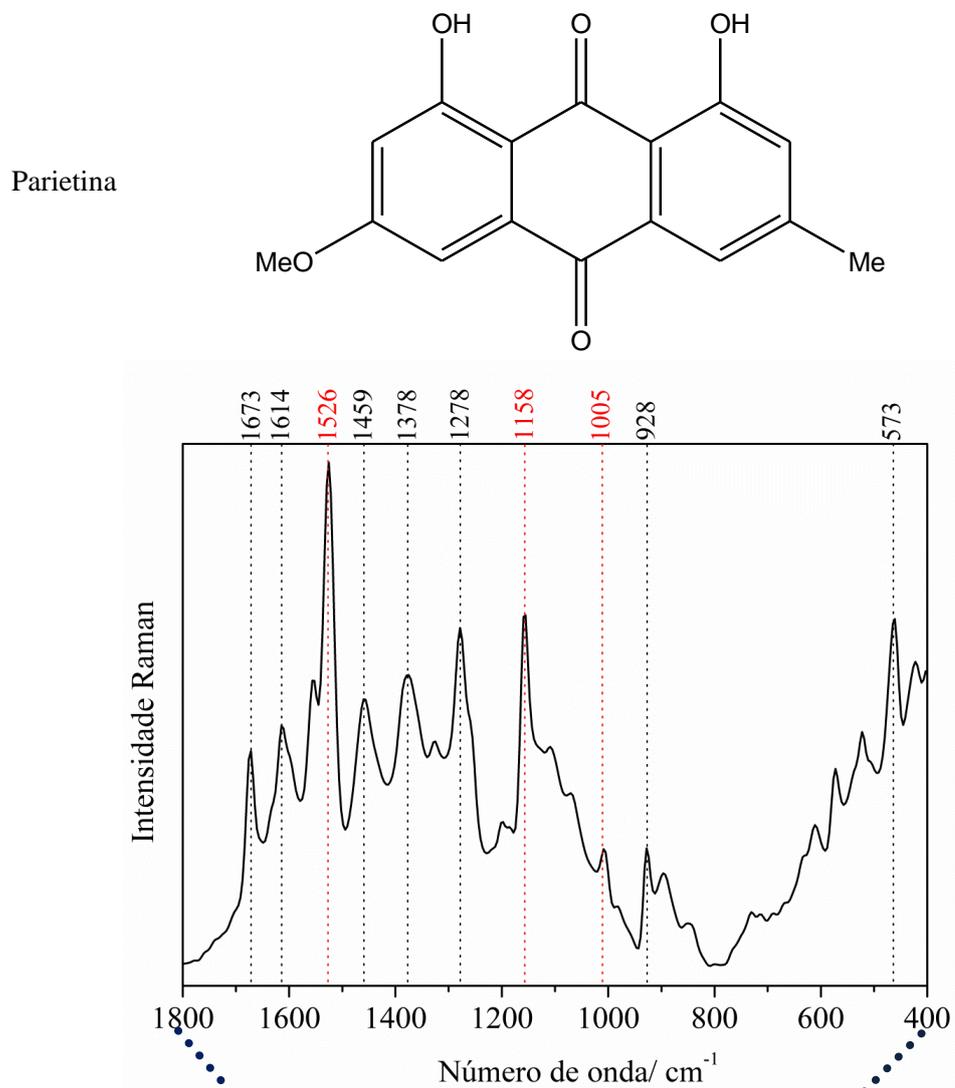
Fonte: SPIELMANN, 2011.

A espectroscopia Raman tem sido considerada uma ferramenta poderosa para a investigação de moléculas conjugadas como os carotenoides e poliacetilenos não substituídos (Veronelli *et al.*, 1995; Stenner, 2005; Schmitt e Popp, 2006). No caso dos carotenoides, as duas bandas de maior intensidade relativa observadas no espectro são os modos $\nu(\text{C}=\text{C})$ e $\nu(\text{C}-\text{C})$ da cadeia poliênica principal, cujo número de insaturações está relacionado ao deslocamento Raman. Um estudo recente (Fernandes *et al* 2015) revelou que a banda em torno de 1005 cm^{-1} é uma importante evidência para a presença de carotenoides, enquanto que a mesma banda deslocada para maiores números de onda (cerca de 1020 cm^{-1}) seria uma característica do modo $\delta(\text{C}-\text{CH}_3)$ de polienos desmetilados (parrodienos).

Analisando os espectros Raman *in situ* apresentados nas Figuras 2.3 a 2.6, bem como a atribuição vibracional descrita na Tabela 1, é possível confirmar a presença do pigmento parietina em *T. exilis* e *X. candelaria*, bem como de um carotenoide possivelmente sendo o β -caroteno; ambos os espectros são muito semelhantes. No entanto, o espectro de *G. regalis* não é conclusivo quanto à presença da parietina, uma vez que a atribuição de alguns modos vibracionais não está presente ou mostrou algum deslocamento no espectro.

A fim de caracterizar e contribuir com os escassos dados espectroscópicos dos líquens estudados, a Tabela 1 mostra as tentativas de atribuição para os espectros de absorção na região do infravermelho e Raman da parietina obtida por extração, e também para os espectros obtidos *in situ*, onde é possível observar mais claramente as bandas vibracionais características da antraquinona parietina, assim como elucidados para *T. exilis* e *X. candelaria*.

Figura 2.5: Espectro FT-Raman *in situ* da espécie *T. exilis* na faixa espectral de 1800-400 cm^{-1} indicando a presença do pigmento parietina e do carotenoide. A foto do líquen destaca o ponto onde foi coletado o espectro.

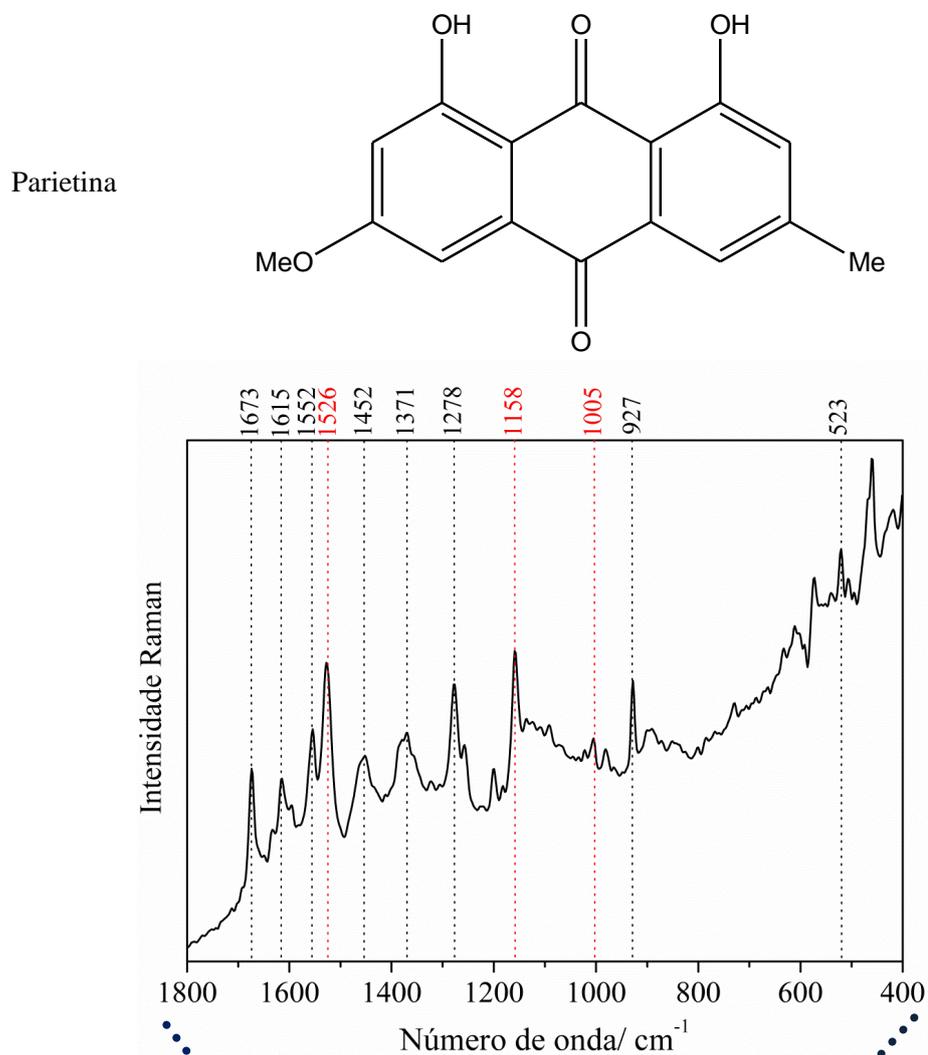


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.



Fonte: SPIELMANN, 2013.

Figura 2.6: : Espectro FT-Raman *in situ* da espécie *X. candelaria* na faixa espectral de 1800- 400 cm^{-1} indicando a presença do pigmento parietina e do carotenoide. A foto do líquen destaca o ponto onde foi coletado o espectro.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.



Fonte: SPIELMANN, 2011.

Tabela 1: Tentativa de atribuição vibracional (cm^{-1}) para as principais bandas do pigmento parietina observadas nos espectros *in situ* das amostras de líquens *X. candelaria*, *T. exilis* e *G. regalis*, bem como para o pigmento extraído do líquen *G. regalis* e para a parietina padrão.

<i>X. cand.</i>	<i>T. exilis</i>	<i>G. regalis</i>			Parietina		Modo Vibracional
Raman		Raman		IV	Raman	IV	
<i>in situ</i>		<i>in situ</i>	Extração	Extração			
			3070 w		3069 w		ν (C=CH) arom
			3038 w		3036 w		ν (CH) arom
2917 s	2920 s	2912 s	2919 w	2927 w	2919 w	2937 w	ν (CH ₃) assim
2854 s	2850 s		2847 w	2854 w	2845 w	2845 w	ν (CH ₃) sim
1673 s	1673 s	1674 m	1673 s		1671 s	1675 m	ν (C=O) conjugado
1633 w	1630 w	1634 w	1631 m	1631 s	1631 w	1630 s	ν (C=O) conjugado
1615 s	1615 s	1614 w	1614 s	1611 w	1613 s	1614 s	ν (C=C) arom
1595 w	1598 w	1596 m	1597 s		1594 w	1594 m	ν (C=C) arom
1554 m	1555 m	1554 m	1554 s	1572 w	1553 s	1569 m	ν (C=C) arom
1527 m	1526 s						ν (C=C) carotenoide
			1482 w	1479 w	1479 w	1478 s	Estiramento do anel
1452 m	1459 m	1460 s	1451 w	1451 w	1449 w	1452 m	Estiramento do anel
1434 w	1431 w		1432 w	1440 w	1428 w	1437 m	Estiramento do anel
1384 m	1387 m	1376 s	1381 s	1385 s	1387 s	1386 s	ν (C–O) fenil
1371 m	1378 m	1369 s	1369 s	1369 m	1370 s	1367 s	ν (C–O)fenil
1324 w	1326 w		1316 w	1324 m	1321 w	1325 s	Estiramento do anel, no plano
1278 m	1278 s	1278 s	1278 s	1273 s	1277 s	1272 s	Estiramento do anel, no plano
1257 m	1257 m	1258 s	1257 s	1258 sh	1255 m	1256 m	ν (C–O) metoxila arom
				1228 s		1227 s	ν (C–O); δ (OH) fenil, no plano
			1217 w		1216 w		Estiramento do anel
1200 w	1201 w	1202 w	1200 w	1200 w	1198 w	1200 w	Estiramento do anel
1182 w	1183 w		1181 w		1180 w	1186 w	Estiramento do anel
1158 m	1158 s						ν (C–C) carotenoide
			1161 w	1164 m	1160 w	1163 s	δ (OH) fenil, no plano

1136 w	1140 w		1138w		1137 w	1137 w	δ (C–CH), no plano
1107 w	1106 w	1108 w	1106 w	1102 sh	1104 w	1102 w	δ (C–CH) no plano
				1035 m		1035 w	ν (C–O) metoxila arom
1005 w	1005 w						δ (C–CH ₃) carotenoide
981 w	983 w	980 w	981 w	979 w	979 w	976 w	Respiração do anel; δ (C–H) fora do plano
928 m	928 s	926 s	927 s	927 w	926 s	926 w	δ (C–H) fora do plano
		765 w	767 w	760 m	765 w	757 s	ν (=C–H) arom, fora do plano
732 w			729 w		729 w	715 m	δ (OH) fenil, fora do plano
636 w			632 w	632 w	631 m	631 m	Deformação do esqueleto
612 w	612 w	611 w	611 w	611 w	612 m	612 m	Deformação do esqueleto
573 w	573 m	573 m	573 m		571 m	561 w	Deformação do esqueleto
520 m	523 m	521 m	520 m		519 m	518 m	Deformação do esqueleto
461 m	460 m	461 m	461 s		458 s	458 w	Deformação do esqueleto
401 w	401 w		397 m		398 m	401 w	Deformação do esqueleto

Abreviações: s, *strong* (forte); m, *medium* (médio); w, *weak* (fraco); sh, *shoulder* (ombro).

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

A avaliação da presença da parietina em *G. regalis* se deu por meio da extração química da mesma. Tal procedimento foi realizado apenas nesta espécie, já que apenas esta possui biomassa em quantidade suficiente para tal. Dessa forma, foi realizada extração exaustiva com acetona por meio do extrator de Soxhlet; o solvente foi completamente removido e os cristais observados foram recristalizados em hexano. Inicialmente, o produto obtido foi identificado qualitativamente por métodos químicos de coloração bem como caracterizado por espectroscopia de absorção no infravermelho, ressonância magnética nuclear e Raman para a correta elucidação e identificação da estrutura. Obteve-se 15 mg de produto a partir de 3,4 g do material bruto.

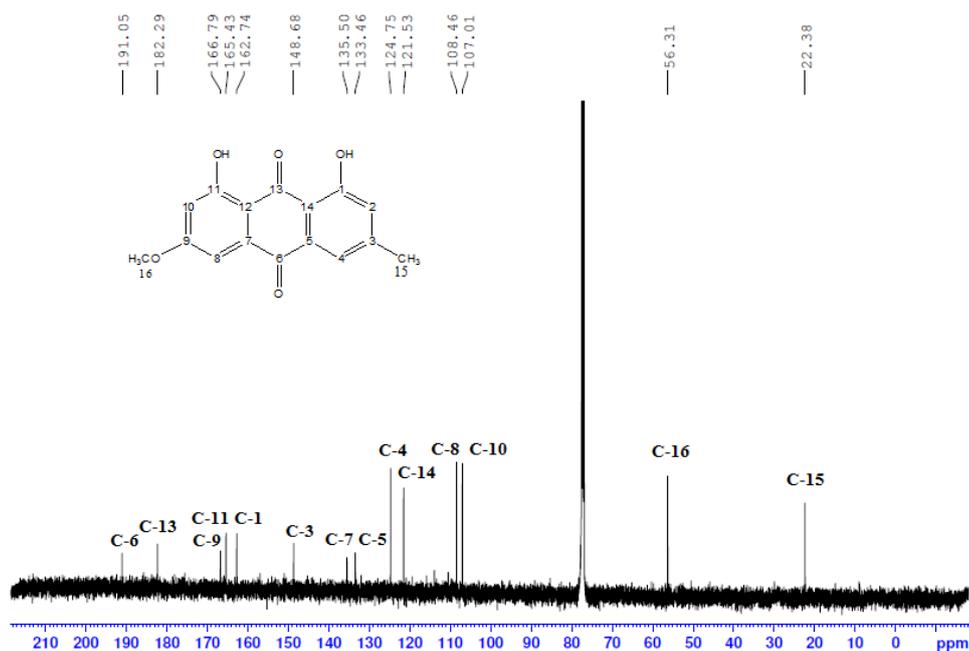
A reação de coloração foi baseada na reação de *Bornträger* direta, onde colocou-se 0,5 mg do produto extraído em um tubo de ensaio e adicionou-se 1 mL de uma solução de NH₄OH. A reação positiva para antraquinonas se dá pela observação da colocação rósea ou vermelha. A partir do resultado positivo para antraquinonas,

utilizou-se dos métodos espectroscópicos para a correta e mais precisa identificação de quais substituintes se fazem presentes na antraquinona obtida.

O espectro de RMN de ^{13}C para o produto obtido (Figura 2.7) mostra os sinais referentes aos grupos carbonílicos C-6 e C-13 em δ 191,05 e 182,29 ppm, e, exceto para os sinais referentes aos carbonos C-12 e C-2, que não foram observados, todos os outros carbonos da molécula foram assinaladas – destacando-se, principalmente, os carbonos dos grupos substituintes C-15 em δ 22,38 referente a um carbono metilado, e C-16 em δ 56,31 ppm que pode ser atribuído ao carbono do grupo metoxila.

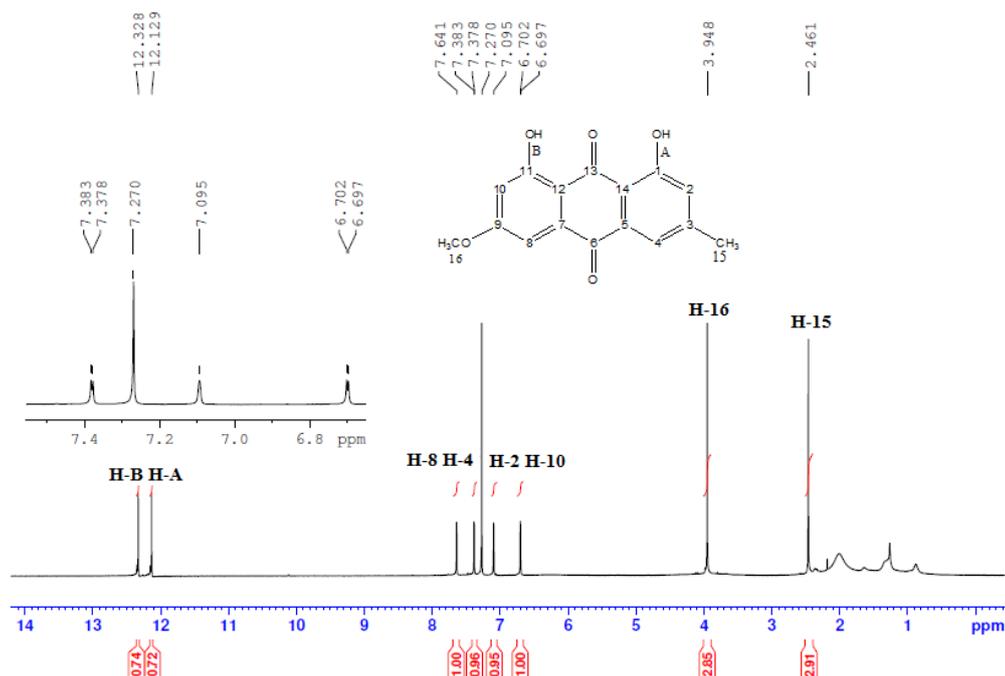
O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.8) corrobora presença do pigmento parietina. É possível observar a presença de um simpleto em δ 2,46 ppm que pode ser atribuído aos hidrogênios H-15 referente aos hidrogênios metilênicos, bem como outro simpleto de H-16 em δ 3,94 ppm referente aos hidrogênios do grupo $-\text{OCH}_3$. Os hidrogênios dos anéis podem ser atribuídos pelo duplete em δ 6,69 e 6,70 ppm referente ao H-10, simpleto em δ 7,09 de H-2, bem como em δ 7,64 ppm de H-4. Outro duplete em δ 7,37 e 7,38 ppm para H-8, e, por fim, os hidrogênios da hidroxila H-A e H-B em δ 12,12 e 12,32 ppm, respectivamente. Os sinais obtidos para valores menores que δ 2,00 devem-se, exclusivamente, a permanência do solvente hexano na amostra analisada.

Figura 2.7: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Figura 2.8: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3).



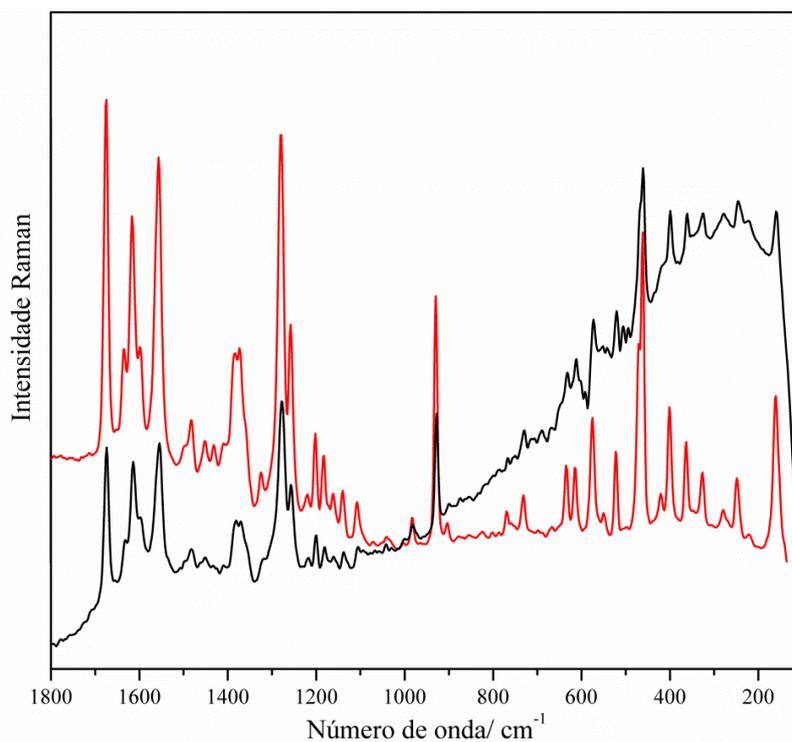
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H concordam para que o pigmento parietina puro tenha sido extraído de forma eficiente. A pureza do composto extraído também pôde ser comprovada pela técnica de cromatografia de camada delgada (CCD), em que foi possível observar apenas um produto após as revelações pela lâmpada UV e ácido sulfúrico. O sistema de eluição empregado foi acetato de etila e tolueno (7:3).

Para elucidar por completo a caracterização da parietina, os espectros Raman do produto obtido via extração e do adquirido comercialmente, dito com alto grau de pureza, foram comparados. A Figura 2.9 mostra que há concordância entre os espectros da parietina, e que, por meio do uso de técnicas espectroscópicas foi possível elucidar com maior clareza a estrutura química do pigmento fotoprotetor presente no líquen *G. regalis*.

Com o pigmento corretamente caracterizado e constatado o seu grau de pureza após a extração, o estudo fotoquímico foi realizado para formação e supressão do oxigênio singlete, com o intuito de avaliar o seu poder antioxidante.

Figura 2.9: Comparação dos espectros Raman da parietina extraída (preto) e da adquirida comercialmente (vermelho).



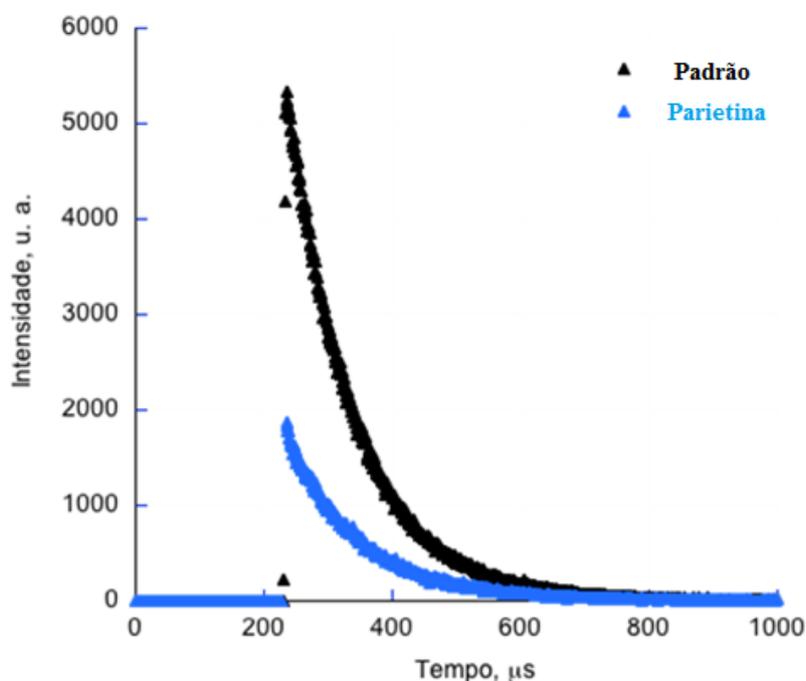
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

2.5.2 Estudo fotoquímico

2.5.2.1 Rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) para o pigmento extraído parietina

Oxigênio singlete emite na região do infravermelho próximo, com máximo em 1270 nm e, apesar de ser uma emissão fraca, pode ser observada utilizando-se um detector apropriado, sendo este o método mais fácil e direto de detecção de oxigênio singlete. Este tipo de emissão é denominado de fosforescência e corresponde ao decaimento do estado singlete do oxigênio ao seu estado fundamental triplete. A Figura 2.10 mostra o decaimento com o tempo do sinal de fosforescência de oxigênio singlete gerado após excitação em 355 nm quando comparado ao padrão perinaftenona.

Figura 2.10: Decaimento do sinal de fosforescência de oxigênio singlete gerado após excitação (355 nm) de soluções com absorção equivalentes de perinaftenona e parietina.

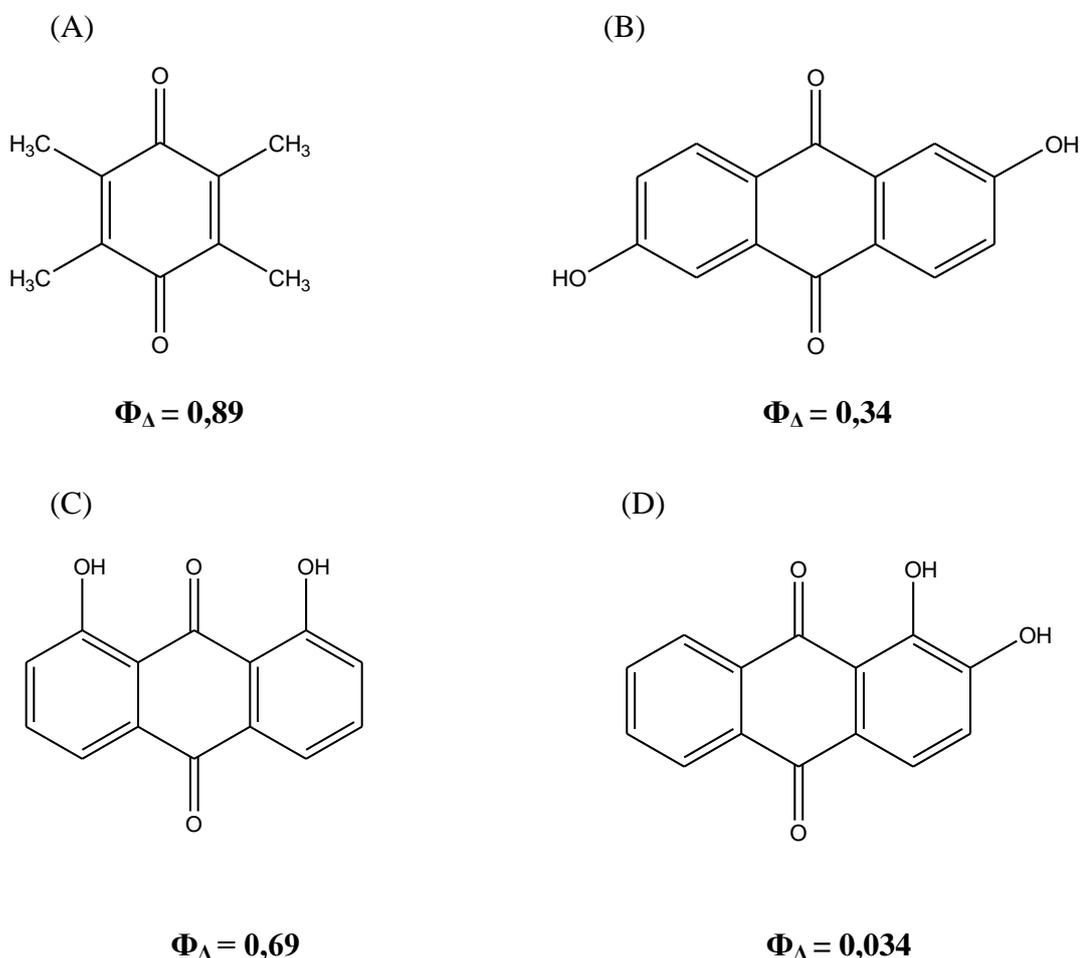


Fonte: ELABORADO PELO GRUPO DE FOTOQUÍMICA/ IQ- UFRJ

Para o cálculo do rendimento quântico, foram construídos gráficos lineares a partir da intensidade do sinal de fosforescência para soluções de perinaftenona - padrão, $\phi=1,0$ (Nonell *et al.*, 1993) e de parietina em acetonitrila, *versus* intensidade da luz de excitação. Analisando a Figura 2.10, é nítido observar que a intensidade do sinal da fosforescência do oxigênio singlete para a parietina é menor quando comparado ao padrão. Em contrapartida, com base nas inclinações das retas ajustadas dos gráficos obtidos (intensidade da fosforescência *vs* intensidade da luz de excitação), pode-se determinar o valor de 0,62 para o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete para a parietina, valor este considerado ótimo para antraquinonas.

O rendimento quântico de formação do oxigênio singlete é dado pela soma das contribuições do sequestro de oxigênio singlete pela antraquinona, e o valor obtido para a parietina está de acordo com o encontrado para o rendimento quântico da 1,8-dihidroxi antraquinona, bem como é possível dizer que, em comparação com outras antraquinonas já estudadas (Gutiérrez *et al.*, 1997), o seu rendimento quântico pode ser considerado elevado (Figura 2.11).

Figura 2.11: Rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) para outras moléculas semelhantes à parietina: (A) Tetrametilbenzoquinona, (B) 2,6-dihidroxi-antraquinona, (C) 1,8-dihidroxi-antraquinona e (D) 1,2-dihidroxi-antraquinona



Fonte: ADAPTADO DE GUTIÉRREZ, 1997.

2.5.2.2 Determinação da constante de velocidade de supressão do oxigênio singlete por antraquinona padrão e parietina.

O tempo de vida do oxigênio singlete, em 1270 nm, foi medido na ausência (I_0) e na presença de diferentes concentrações de parietina (I).

A constante de velocidade de supressão da emissão do oxigênio singlete pela amostra foi obtida a partir do gráfico de Stern-Volmer, de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_q \tau_0 [AQ]$$

Os gráficos baseados na eq. de I_0/I se mostraram lineares, permitindo facilmente a determinação de k_q .

Em uma cubeta de quartzo, adicionou-se o sensibilizador azul de metileno em clorofórmio e também volumes de uma solução estoque da antraquinona padrão, no mesmo solvente, de acordo com a Tabela 2. Os espectros de fosforescência do oxigênio singlete foram registrados a cada adição, e, com o sinal obtido construiu-se o gráfico de I_0/I versus $[AQ]$ para o devido cálculo da constante de supressão do oxigênio singlete.

Tabela 2: Intensidade do sinal da fosforescência do oxigênio singlete de acordo com volumes adicionados da antraquinona.

Volume adicionado (μL)	$[AQ]$ mol. L^{-1}	I_0 (u.a.)	I (u.a.)
0	0	652,70	652,70
1	$2,56 \cdot 10^{-6}$	652,70	630,90
5	$1,28 \cdot 10^{-5}$	630,90	628,10
10	$2,56 \cdot 10^{-5}$	628,10	614,40
20	$5,12 \cdot 10^{-5}$	614,40	603,20
40	$1,03 \cdot 10^{-4}$	603,20	594,10
50	$1,28 \cdot 10^{-4}$	594,10	569,90
100	$2,56 \cdot 10^{-4}$	569,90	535,90
150	$3,84 \cdot 10^{-4}$	535,90	515,50

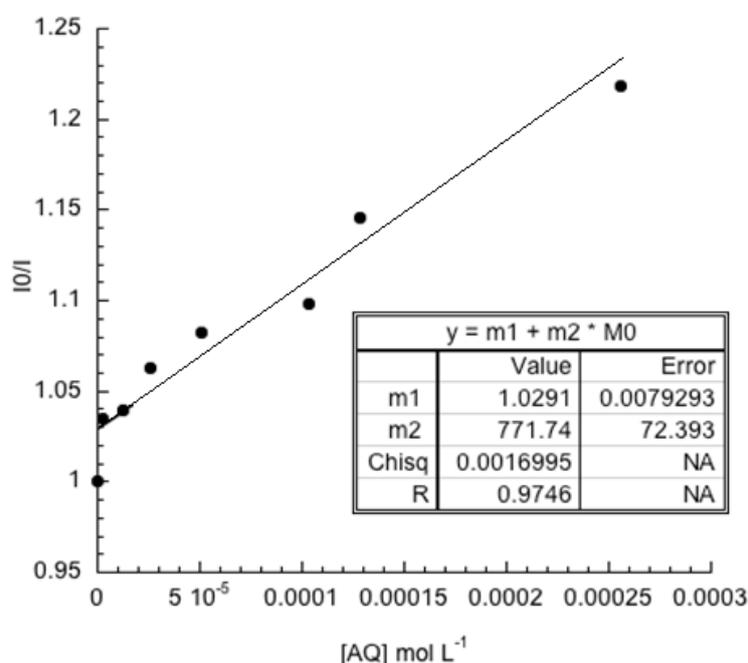
Fonte: ELABORADO PELO GRUPO DE FOTOQUÍMICA/ IQ- UFRJ

A partir dos volumes adicionados, e, conseqüente observação da diminuição da intensidade do sinal no espectro de fosforescência do oxigênio singlete, tornou-se possível a construção do gráfico I_0/I da Figura 2.12

Com os dados obtidos e também com a equação de Stern-Volmer já mencionada, a constante de supressão do oxigênio singlete encontrada é $4,6 \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, valor este que se enquadra nos valores obtidos para outras quinonas já estudadas embora muito menor do que os valores encontrados para outras moléculas como os carotenoides, por exemplo.

Nos últimos anos, há um aumento no interesse no que se diz respeito ao entendimento do papel do oxigênio singlete e radicais livres nos processos de doenças induzidos pela inativação enzimática, clivagem da cadeia de DNA e oxidação da membrana lipídica, por exemplo. (Sies e Menck, 1992; Stief, 2003; Hirakawa *et al.*, 2007; Rand e Barclay, 2009; Agnez-Lima *et al.*, 2012).

Figura 2.12: Gráfico de I_0/I versus [AQ] para o cálculo da constante de velocidade para supressão de oxigênio singlete.



Fonte: ELABORADO PELO GRUPO DE FOTOQUÍMICA/ IQ- UFRJ

Em geral, uma das funções biológicas dos carotenoides é a sua capacidade de sequestrar o oxigênio singlete bem como os radicais livres (Naguib, 2000) através de processos físicos e/ou químicos. Em um estudo recente (Maia *et al.*, 2014), a constante de sequestro total (k_q) para a reação com o 1O_2 foi medida para β -caroteno e astaxantina onde se observou valores de $1,63 \times 10^{10}$ e $2,18 \times 10^{10}$ $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, respectivamente. Como comparação, os flavonoides - pigmentos polifenólicos amplamente presentes nas plantas, também são reportados como sequestradores de várias espécies oxidantes e possuem a constante de sequestro de 1O_2 na ordem de 10^6 $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ (Tournaire *et al.*, 1993). Estes valores comprovam o elevado poder antioxidante destas moléculas bem como explicam a habilidade dos carotenoides em ser o mecanismo de defesa de diversos organismos.

Desta forma, comparando os dados obtidos para supressão e formação de oxigênio singlete, pode-se sugerir que a antraquinona parietina tem como característica predominante a geração de oxigênio singlete, e, em menor escala a supressão, ou seja, a sua capacidade antioxidante como é observada em carotenoides não é dominante.

O processo de sequestro de oxigênio singlete, exclusivamente de natureza física, desativa as espécies de oxigênio excitado sem qualquer outra destruição do núcleo quinona. Em quinonas substituídas, a interação $^1\text{O}_2$ - quinona é impulsionada pelo radical quinona, apesar dos substituintes nucleares serem potencialmente ativos, e, mesmo quando a capacidade das quinonas atuarem como receptores de elétrons é um fato reconhecido, evidências experimentais indicam que o mecanismo de sequestro pode envolver um intermediário reversível de transferência de carga e o composto quinoide atuando como um doador de elétrons. Neste contexto, o mecanismo de sequestro puramente físico concorda com os baixos valores de k para a antraquinona estudada quando comparado com os dados observados para supressores doadores de elétrons (Wilkinson *et al.*, 1995).

2.6 Conclusões

Os registros dos espectros FT-Raman *in situ* da parietina e do carotenoide para os líquens *X. candelaria* e *T. exilis* e parietina para *G. regalis*, forneceu importantes dados espectroscópicos para a identificação de biomarcadores liquênicos. A estrutura química da antraquinona parietina foi investigada pela técnica FT-Raman; no entanto, este composto é altamente fluorescente – característica que pode ser um fator limitante à aplicação da espectroscopia Raman como ferramenta de caracterização.

A extração química do pigmento parietina no líquen *G. regalis* propiciou o seu estudo fotoquímico a partir de experimentos que avaliaram a sua capacidade de gerar ou suprir a formação do oxigênio singlete. Verificou-se que a parietina apresenta atividade geradora de oxigênio singlete a qual co-ocorre com carotenoides, amplamente descrito como supressor do mesmo. Esses resultados são bastante intrigantes do ponto de vista biológico, já que cada parceiro do sistema simbiótico parece contribuir diferentemente para o equilíbrio e manutenção do holobionte.

A identificação de carotenoides *in situ* é dificultada pelo efeito da matriz biológica, onde o ambiente químico é responsável por mudanças no deslocamento Raman, principalmente, da banda referente ao estiramento C=C da cadeia principal dos carotenoides. Nesse sentido, uma caracterização completa desse pigmento exigiria um processo de extração e uma eventual comparação com os espectros de alguns pigmentos puros, apesar de estudos anteriores, com a mesma família de líquens, mostrarem que o pigmento é o β -caroteno.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DOS ESPECTROS FT- RAMAN DAS ESPÉCIES DE LIQUENS *CANDELARIA FIBROSA* *E PYXINE COCCIFERA*

3.1 *Pyxine coccifera* e *Candelaria fibrosa*

O gênero *Pyxine* pode ser considerado predominantemente tropical no grupo *Physciaceae*, que tem cerca de 70 espécies atualmente aceitas e bem descritas. No Brasil, este gênero liquênico tem sido estudado há mais de um século (Malme, 1897) e, recentemente, quatro novas espécies foram identificadas (Jungbluth e Marcelli, 2011; Jungbluth *et al.*, 2011) - no total, 34 espécies, são tipicamente brasileiras (Aptroot, 1987; Kalb, 1987).

A *Candelariaceae* compreende quatro gêneros liquênicos que juntos formam o que é considerado um grupo homogêneo de fungos liquenizados (Hakulinen, 1954; Poelt, 1974; Hawksworth e Division, 1994). Hakulinen descreveu a família, que incluiu *Candelaria*, *Candelariella* e *Placomaronea*, e, é primariamente caracterizada pela química dos derivados do ácido pulvínico e pelos seus caracteres anatômicos uniformes (Hakulinen, 1954; Poelt J. e B.V., 1969; Poelt, 1974).

Os derivados do ácido pulvínico, como calicina e dilactona pulvínica (Figura 1.3), possuem um grupo cromóforo carbonil-oxolano caracterizado por duas bandas de absorção UV de alto coeficiente de absorção (Nguyen *et al.*, 2013), sendo que alguns estudos têm revelado as propriedades fotoquímicas destes compostos como sendo excelentes filtros para a radiação UVA e UVB (Hidalgo *et al.*, 2002; Lohézic-Le Dévéhat *et al.*, 2013). Já o ácido quiodectônico (Figura 1.3), que também é um pigmento fotoprotetor, teve seu espectro Raman estudado pela única vez por Edwards e de Oliveira (2005) no líquen *Cryptothecia rubrocincta* (Ehrenb.:Fr.) Thor através de métodos de extração química - apesar da investigação do espectro no infravermelho ser relatada por Kuneck e Yoshimura desde 1996 (Huneck e Yoshimura, 1996).

Os espectros Raman dos carotenoides têm sido caracterizados por meio de uma análise detalhada das bandas vibracionais atribuídas aos modos ν (C=C), ν (C-C) e δ (C-CH₃) (Fernandes *et al.* 2014). Um importante papel dos carotenoides é a capacidade de sequestrar a oxigênio singlete (Cardoso, 1997; Maia, Lenize F. *et al.*, 2014), função esta que pode ser atribuída às ligações duplas conjugadas na cadeia carbônica principal. Além das atividades biológicas (Stevenson *et al.*, 2002; Cockell e Horneck, 2007; Cazzonelli, 2011), em vários casos eles são responsáveis pelas estratégias de sobrevivência de líquens expostos ao fotoestresse ambiental (Cockell e Knowland, 1999; De Oliveira *et al.*, 2010).

3.2 Objetivos específicos

Fornecer a identificação não destrutiva dos principais pigmentos liquênicos dos líquens *Pyxine coccifera* e *Candelaria fibrosa* através da espectroscopia Raman;

Realização de cálculos teóricos de mecânica quântica para auxiliar a identificação dos pigmentos e atribuições das bandas Raman.

3.3 Experimental

3.3.1 Amostras de líquens

Os líquens foram obtidos através da cessão da coleção obtida pelo Prof. Dr. Adriano Spielmann e estão depositados no herbário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, e, foram devidamente identificadas por análise taxonômica.

✓ *Pyxine coccifera* (Fée) Nyl.

Origem: Brasil, Mato Grosso do Sul, Município de Campo Grande, 09.IV.2010.

Coordenadas: 20°32'36.7"S, 54°23'57.8"W. Altitude: 555 m.

Coletores: A.A. Spielmann, G.A. Damasceno Junior, S.N Moreira & S.S Lima.

✓ *Candelaria fibrosa* (Fr.) Müll. Arg.

Origem: Brasil, Rio Grande do Sul, Município de Piratini, Cerro do Sandi, 31.V.2013.

Coordenadas: 31°28'58.9"S, 53°11'54.9"W. Altitude: 495 m.

Coletores: A.A. Spielmann, E.S Lacerda & J. Pedroso.

3.3.2 Instrumentação

Os espectros FT - Raman foram obtidos no instrumento Bruker RFS 100 com laser Nd: YAG, equipado com detector de germânio. Os espectros foram registrados com resolução espectral de 4 cm^{-1} e em 1024 acumulações, e obtidos diretamente de partes específicas das amostras de líquens, onde os pigmentos investigados estão claramente contidos; o que significa que as partes coloridas das estruturas liquênicas foram investigadas.

Para cada espectro, os parâmetros experimentais foram ajustados para obter a melhor relação sinal-ruído, do mesmo modo que a integridade física e química das amostras fosse mantida, ou seja, a posição e intensidade de cada uma das bandas do espectro não foram alteradas.

3.3.3 Metodologia do cálculo teórico

Os cálculos teóricos foram realizados através de uma parceria com Núcleo de Estudos em Química Computacional (NEQC-UFJF) com o uso do programa Gaussian 09. As estruturas calicina, dilactona pulvínica e ácido quiodectônico, foram otimizadas em fase gasosa ao nível B3LYP usando a base 6-311 ++ G (d, p). Tais estudos foram feitos em colaboração com o Dr. Gilson Rodrigues Ferreira, do Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular da UFJF.

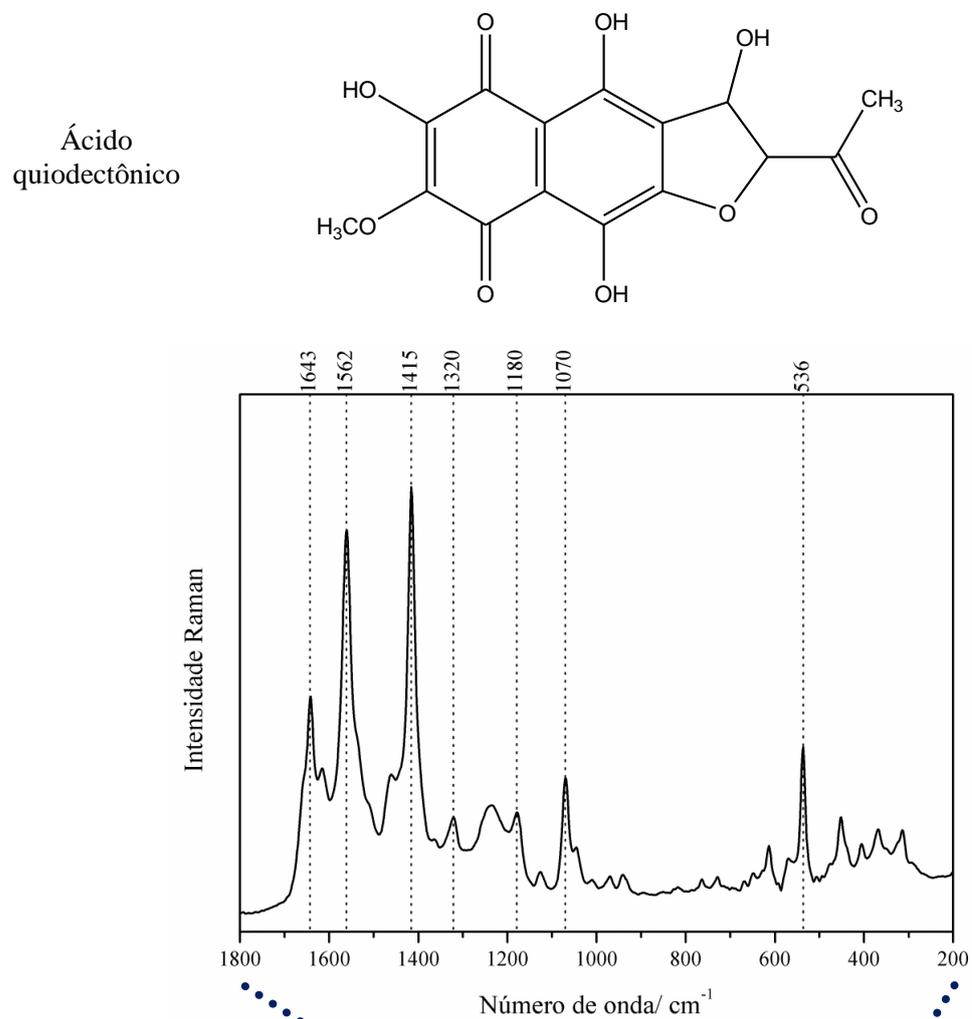
3.4 Resultados e discussões

Nesta investigação, a análise FT-Raman *in situ* fornece informações valiosas sobre os principais compostos químicos de *Candelaria fibrosa* e *Pyxine coccifera*. Os espectros FT-Raman dessas amostras podem ser vistos nas Figuras 3.1, 3.2 e 3.3 e as tentativas de atribuição vibracionais estão apresentados na Tabela 3.

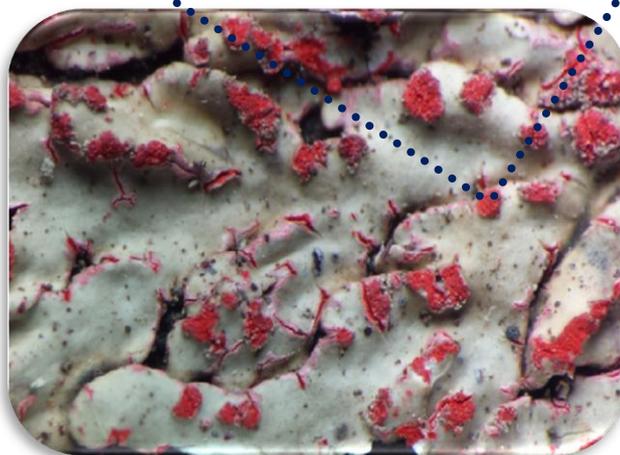
A Figura 3.1 mostra o espectro FT-Raman obtido *in situ* para espécie *Pyxine coccifera* (Fée) Nyl com faixa espectral de 1800-200 cm^{-1} . A falta de dados na literatura para as devidas conclusões a respeito dos espectros Raman sugere a necessidade de complementar os dados com cálculos teóricos. Para isso, uma pesquisa detalhada sobre os líquens e habitat foi realizada para que alguns compostos químicos fossem pontos de partida para a simulação teórica.

Dessa forma, na Figura 3.2 têm-se o espectro experimental (A) e teórico (B) para o qual o pigmento ácido quiodectônico é sugerido na composição química do líquen *P. coccifera*. Tal fato é justificado pelo perfil espectral bem semelhante entre ambos, baseado, principalmente, na intensidade relativa e valores dos deslocamentos das bandas Raman.

Figura 3.1: Espectro FT-Raman *in situ* da espécie *P. coccifera* na faixa espectral de 1800- 400 cm^{-1} indicando a presença do ácido quiodectônico. A foto do líquen destaca o ponto onde foi coletado o espectro.



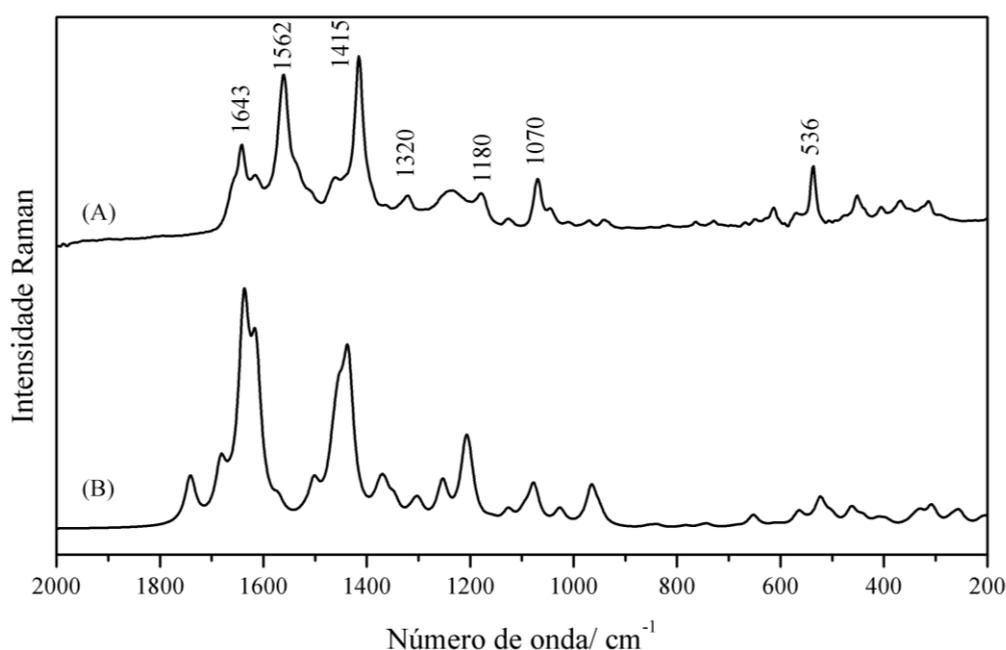
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.



Fonte: SPIELMANN, 2010.

As principais bandas observadas nos espectros (experimental e simulado) que confirmam a presença do ácido quiodectônico são referentes aos modos $\nu(\text{C}=\text{O}) + \delta(\text{CH}_3)$ em 1643; $\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O}) + \delta(\text{OH})$ em 1616; $\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O})$ em 1562; $\nu(\text{C}=\text{C}) + \delta(\text{CH}_3)$ em 1461; $\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O})$ em 1415, $\nu(\text{C}-\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{C}-\text{CH}_3)$ em 1128 e $\nu(\text{C}-\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{O}-\text{CH}_3)$ em 1070 cm^{-1} .

Figura 3.2: Espectros FT-Raman (A) Experimental para *P. coccifera* (B) Teórico para o ácido quiodectônico.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Por outro lado, a análise espectroscópica Raman do líquen *C. fibrosa* (Figura 3.3) revelou a presença de três pigmentos diferentes que em conjunto atuam como filtros UV, nomeados calicina, dilactona pulvínica e um carotenoide. Este último foi caracterizado pela análise das bandas vibracionais atribuídas aos modos $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}-\text{C})$ e $\delta(\text{C}-\text{CH}_3)$ que estão presentes em 1525, 1158 e 1003 cm^{-1} no líquen estudado.

Através do espectro Raman da *C. fibrosa* é possível verificar as bandas características da dilactona pulvínica, destacadas em preto, calicina em vermelho e para um carotenoide, marcadas em azul. As bandas em 1675, 1407 e 505 cm^{-1} são caracterizados como marcadores da dilactona pulvínica no espectro Raman, de atribuições referentes aos anéis das lactonas, respectivamente atribuídos aos modos de estiramento C=C, C-C da junção entre os anéis e respiração do anel.

Por outro lado, o pigmento calicina pode ser identificado através da banda em 1716 cm^{-1} assinalado ao modo de estiramento da carbonila da lactona. O modo vibracional em 1632 cm^{-1} é característico da vibração $\nu(\text{C}=\text{C})$ entre os carbonos vizinhos aos anéis lactônicos e o modo de deformação do anel lactônico foi observado em 960 cm^{-1} .

Ressalta-se que estes pigmentos derivados do ácido pulvínico, calicina e dilactona pulvínica têm sido relatados em estudos que envolvem os líquens *Acarospora* spp e *Candelariella* genus de origem no Deserto do Atacama, Chile (Villar *et al.*, 2005), bem como em na espécie *Candelariella concolor* encontrada em lavas vulcânicas em *Kilauea*, Havaí (Jorge-Villar e Edwards, 2010).

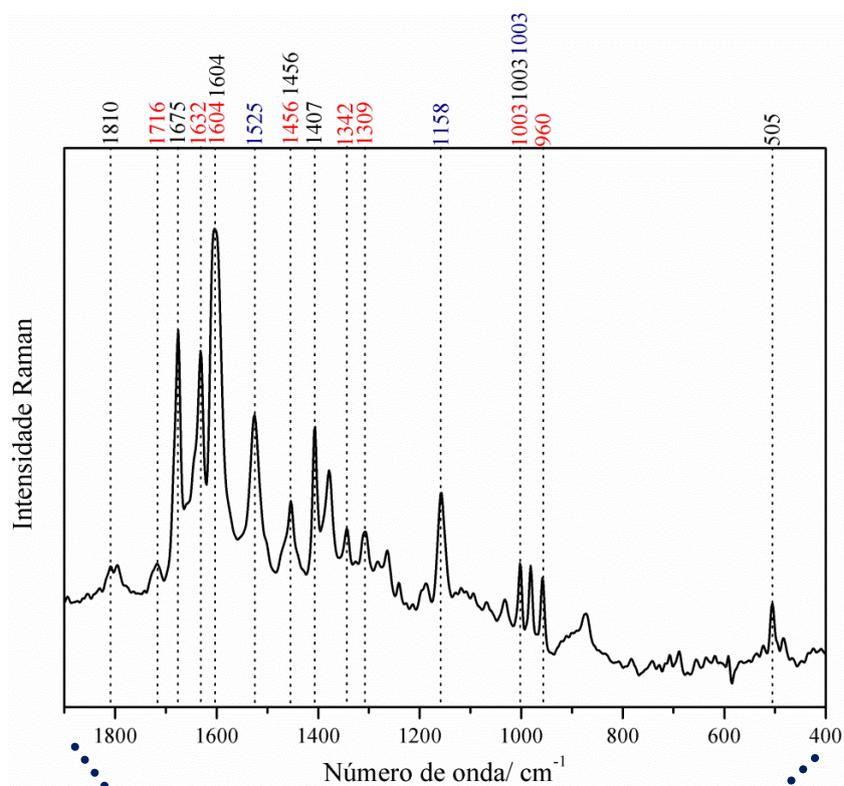
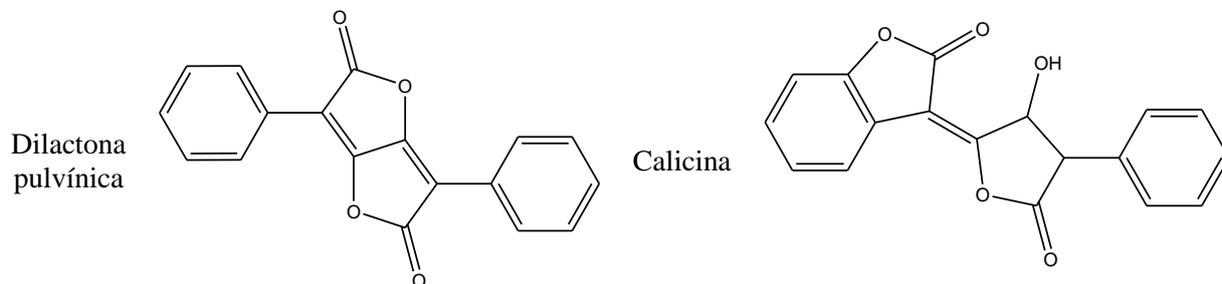
Tabela 3: Tentativa de atribuição Raman (cm^{-1}) para as principais bandas observadas nos espectros das amostras de líquens *C. fibrosa* e *P. coccifera*, bem como para os pigmentos encontrados.

<i>Candelaria fibrosa</i>				<i>Pyxine coccifera</i>		
Calicina	Dilactona pulvínica			Ácido quiodectônico		
Exp.	Exp.	Teo.	Atribuições	Exp.	Teo.	Atribuições
	1810 w	1827	$\nu(\text{C}=\text{O})$	1643 m	1739	$\nu(\text{C}=\text{O}) + \delta(\text{CH}_3)$
1716 w		1756	$\nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{CC})$	1616 w	1684	$\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O})$
1632 s	1675 s	1658	$\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}-\text{C})$	1562 s	1638	$\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O})$
1604 s	1604 s	1619	$\nu(\text{C}=\text{C})$	1461 w	1573	$\nu(\text{C}=\text{C}) + \delta(\text{CH}_3)$
1456 m	1456 m	1449	$\delta(\text{CH})$	1415 s	1503	$\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O})$
	1407 m	1390	$\nu(\text{C}=\text{C}) + \delta(\text{CH})$	1320 w	1437	$\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}-\text{C})$
1342 w		1347	$\nu(\text{C}=\text{C})$	1180 w	1253	$\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}-\text{C})$
1309 w		1304	$\delta(\text{CH})$	1128 w	1207	$\nu(\text{C}-\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{C}-\text{CH}_3)$
1003 m	1003 m	992	$\delta(\text{C}-\text{C}-\text{C})$	1070 m	1077	$\nu(\text{C}-\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{O}-\text{CH}_3)$
960 w		973	Deformação do anel	613 w	649	$\delta(\text{C}-\text{C})$
	505 m	495	Respiração do anel dilactona	570 w	565	$\nu(\text{C}-\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{C})$
				536 m	523	$\nu(\text{C}-\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{C})$

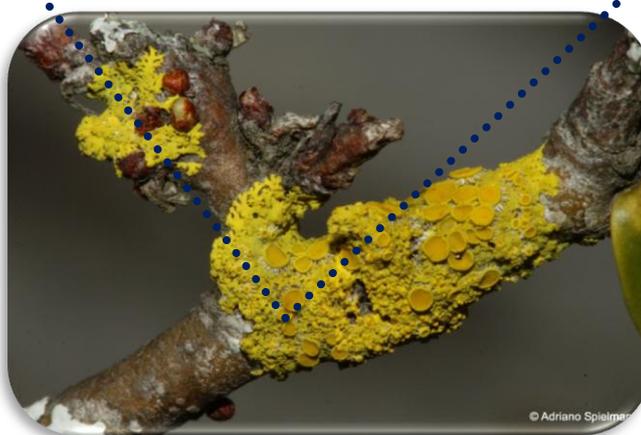
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Abreviações: s, *strong* (forte); m, *medium* (médio); w, *weak* (fraco).

Figura 3.3: Espectro FT-Raman *in situ* da espécie *C. fibrosa* na faixa espectral de 1800- 400 cm^{-1} indicando a presença dos pigmentos dilactona pulvínica (preto) calcicina (vermelho) e do carotenoide (azul). A foto do líquen destaca o ponto onde foi coletado o espectro



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.



Fonte: SPIELMANN, 2013.

Em suma, neste trabalho, a química dos líquens *Candelaria fibrosa* e *Pyxine coccifera* foi investigada pela primeira vez utilizando espectroscopia FT- Raman com o auxílio de cálculos DFT de mecânica quântica, fato este justificado pela falta de dados espectroscópicos que envolvem estas espécies. Tal estudo mostrou a presença de diferentes pigmentos nos líquens *Candelaria fibrosa* e *Pyxine coccifera*, podendo ser descritos como calicina e dilactona pulvínica para o primeiro, e ácido quiodectônico para o segundo líquen estudado.

3.5 Conclusões

O estudo dos espectros vibracionais de derivados do ácido pulvínico, tais como dilactona pulvínica e calicina, é inédito para estes líquens e demonstrou, pela primeira vez, que a espectroscopia FT-Raman com o auxílio de cálculos DFT como suporte para as atribuições espectrais, podem fornecer dados espectroscópicos importantes para o uso da técnica como ferramenta taxonômica.

A obtenção de espectros Raman *in situ* é de cunho valioso para a identificação de vários pigmentos liquênicos e, portanto, o potencial de utilização da técnica como forma de investigar a "impressão digital" destas moléculas, pode ser considerado como de importante ajuda para a classificação taxonômica das espécies de líquens.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO DOS PIGMENTOS ABSORVEDORES DE LUZ DE LIQUENS DO BRASIL POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

4.1 Mapeamento e Imagem Raman

Os objetivos fundamentais da bioquímica, biofísica e biologia molecular são compreender as complexas interações das moléculas biológicas nas interfaces, e, para o estudo destes mecanismos tem-se usado a imagem celular *in vivo* e detecção de ensaios *in vitro* (Fernández-Friera *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2018). Metodologias baseadas na obtenção de imagens moleculares de células, tecidos e órgãos são capazes de monitorar várias estruturas ou mecanismos bioquímicos (Fass; Olsen e Gøtzsche, 2001; Armstrong *et al.*, 2007).

A imagem obtida por meio da espectroscopia Raman tem emergido como uma técnica poderosa no estudo de vários processos químicos de cunho biológico, principalmente por ser uma técnica não invasiva, livre da necessidade de marcadores e capaz de fornecer com precisão a identidade molecular do material de interesse (Krafft *et al.*, 2017).

A imagem Raman visa compreender e visualizar a composição química do material estudado, bem como pode ser dita como uma ferramenta para análise das estruturas moleculares. A obtenção de dados no modo de imagem maximiza a compreensão da constituição química da amostra visto que cada pixel de imagem recolhida contém dados químicos específicos para o objeto de estudo (Stewart *et al.*, 2012).

O conhecimento da distribuição de componentes químicos é fundamental para o monitoramento de processos bioquímicos de diversos sistemas vivos, e o objetivo principal para tal é o uso de uma ferramenta que seja altamente sensível e específica bem como traga pouco ou nenhum dano à amostra. Atualmente, as técnicas que são utilizadas para este fim são a espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (EPR) (Savitsky e Möbius, 2009) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (Li *et al.*, 2008). Em contrapartida, nenhum deles preenche todos os critérios necessários para elucidar completamente um estudo, e, assim, a espectroscopia Raman é tida como uma excelente opção para obtenção do “*fingerprint*” de uma molécula.

A análise de regiões devidamente selecionadas das amostras por microespectroscopia vibracional pode ser realizada de duas maneiras distintas, mapeamento ou imagem. O mapeamento envolve a obtenção sequencial dos espectros em regiões adjacentes da amostra por meio da movimentação do feixe focal; a

medição é repetida até que toda a região de interesse tenha sido analisada (Griffiths, 2009).

A imagem vibracional exige que uma imagem da amostra seja focalizada para o arranjo de detectores cuja intensidade da radiação que atravessa cada região da amostra é medida em cada pixel. Existem algumas variações de métodos de imagem para o caso de duas variáveis espaciais, x e y. O perfil ponto-a-ponto é uma sequência de aquisições de um único ponto cujo espectro completo para cada ponto é armazenado para análise subsequente. Na imagem em linha, o laser é focalizado em uma linha e então o espalhamento é projetado contra um detector, gerando um conjunto de dados bidimensionais constituídos por intensidade *versus* deslocamento Raman e posição ao longo da linha. Assim como o mapeamento ponto-a-ponto, a imagem em linha fornece os espectros completos de todos os pontos analisados ao longo da linha. A imagem global, ou imagem direta, é uma técnica em que se ilumina uma área relativamente grande da amostra, coletando espectros resolvidos espacialmente por toda a área selecionada.

Em contrapartida com os variados trabalhos realizados em células e tecidos (Matthäus *et al.*, 2006; Hartsuiker *et al.*, 2010; Palonpon *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2014; Qi e Shih, 2014), o estudo da imagem Raman em líquens é extremamente escasso. Recentemente (Liao *et al.*, 2010), um estudo baseado em três espécies do líquen *Cladonia* foi feito usando Imagem FTIR e Microscopia Raman. A assinatura espectral do ácido úsnico foi detectada nas estruturas produtoras de esporos dos apotécios do líquen *C. uncialis*, bem como em torno das algas na parede apical, e, conseqüentemente, as imagens confirmaram os locais em que comumente é encontrado o ácido úsnico e ainda revelou outros locais; principalmente no talo circundante às algas que até então não tinham sido identificadas.

Dessa forma, o uso da Imagem Raman é uma ferramenta promissora para a observação da distribuição de diversas moléculas nos seus tecidos e células, e a escassez de dados espectroscópicos provenientes desta técnica pode fornecer uma gama de possibilidades para o estudo dos componentes dos líquens no que se diz respeito aos seus pigmentos constituintes, bem como elucidar as estratégias de sobrevivência adotadas por essas espécies. Além disso, a distribuição de pigmentos nas superfícies do líquen não é homogênea, sendo particularmente importante no que diz respeito à influência de fatores como altitude e umidade, em relação à distribuição dos pigmentos.

4.2 *Usnea* sp e *Crocodia aurata*

O ácido úsnico (Figura 1.4) é um pigmento amarelo biossintetizado por meio da ciclização da fluoroacetofenona, isolado pela primeira vez em 1844 e encontrado nos gêneros *Usnea*, *Lecanora*, *Cladonia* e *Ramalina* (Ingólfssdóttir, 2002).

O ácido úsnico tem sido descrito como um bom filtro UV, sendo um dos compostos liquênicos mais estudados devido à capacidade de absorver amplamente a luz nas regiões espectrais de UVA (315-400 nm) e UVB (280-315 nm) (Cocchietto *et al.*, 2002). A localização deste ácido na superfície do líquen, seguida por suas características químicas parece ser uma resposta para reduzir os efeitos da luz solar.

Essa molécula tem sido extensivamente estudada devido às suas poderosas propriedades biológicas (Ingólfssdóttir, 2002), como atividade antimicrobiana com relevância dermatológica (Weckesser *et al.*, 2007), larvicida para os mosquitos *A. aegypti* (Moreira *et al.*, 2016) e antiprotozoária demonstrado por experimentos *in vivo* e *in vitro* (Fournet *et al.*, 1997). O ácido úsnico também tem sido sugerido como um agente antitumoral efetivo contra as células do câncer de mama (Zuo *et al.*, 2015), bem como para o melanoma e câncer de próstata (Galanty *et al.*, 2017).

Por outro lado, o ácido estítico (Figura 1.4) que vem da ciclização do orselinato, é uma depsidona p-orcinol isolada pela primeira vez por Knop e Schnedermann em 1846 da espécie *Lobaria pulmonaria* (Knop e Schnedermann, 1846). Derivados do ácido estítico têm sido encontrados em muitas famílias de líquens, em particular nas Parmeliaceae (Gomez-Serranillos *et al.*, 2014), envolvidas na proteção contra os efeitos da radiação UV (Lohézic-Le Dévéhat *et al.*, 2007).

A fotoproteção e diversas atividades biológicas também são correlacionadas aos derivados do ácido pulvínico (Stéphane *et al.*, 2005), como a calicina e a dilactona pulvínica (Figura 1.3), que são pigmentos de cor laranja e amarelo identificados em espécies de *Candelaria fibrosa* (Fernandes, *et al.*, 2015) e *Crocodia aurata* (Moncada *et al.*, 2014). Além de dibenzofuranos, depsidona e derivados pulvínicos, os líquens são uma rica fonte de carotenoides (Czeczuga *et al.*, 1988; Czeczuga e Lallemand, 1993), pigmentos que fazem parte dos sistemas de captação de luz e uma série de outras funções (Echavarri-Erasun e Johnson, 2002).

Em nossos trabalhos anteriores, demonstramos a eficácia da espectroscopia Raman na identificação de pigmentos das espécies *Teloschistes exilis*, *Gondwania regalis*, *Xanthoria candelaria*, *Candelaria fibrosa* e *Pyxine coccifera* (Fernandes, *et*

al. 2015a; Fernandes, *et al.* 2015b). Continuando com estudos sobre líquens, apresentamos os resultados de uma caracterização estrutural abrangente do ácido úsnico e estítico para uma espécie de *Usnea*, bem como calicina e dilactona pulvínica em *Crocodia aurata*, e carotenoides em ambas as espécies.

4.3 Objetivos específicos

Caracterização das estruturas químicas majoritárias das espécies liquênicas por espectroscopia Raman com auxílio de cálculos teóricos, bem como pela técnica de difração de raios X de monocristais. Rastrear os compostos fotoprotetores no talo do líquen através do uso da análise Raman *in situ* da espécie de *Usnea*, e, também imageamento Raman da espécie *C. aurata* para investigar a localização e distribuição de carotenoides e derivados de ácidos pulvínicos em todo o talo liquênico.

4.4 Experimental

4.4.1 Amostras de líquens

Crocodia aurata e *Usnea* sp. foram coletados pelo Prof. Dr. Adriano A. Spielmann e Rafaella F. Fernandes no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil (21°42'36,8"S, 43 ° 53'44.7"W, 1346m).

4.4.2 Extração e purificação dos compostos

O líquen *Usnea* sp. (14,9 g) foi extraído com CHCl₃: MeOH (2:1) por três vezes consecutivas. Após remoção dos solventes sob pressão reduzida, obteve-se 1,30 g de um sólido amarelo. Uma alíquota do extrato bruto (400 mg) foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com éter, e, posteriormente, CH₂Cl₂: CH₃OH com proporções de 1: 0 a 0: 1. A combinação das frações resultou em duas frações principais: F1 que foi recristalizada a partir de éter gerando o ácido úsnico (90 mg) e F2 recristalizado com hexano, purificando o ácido estítico (10 mg).

O ácido úsnico foi identificado com base na comparação do espectro Raman com dados da literatura e cálculos DFT para a atribuição das bandas vibracionais Raman. Já o ácido estítico foi identificado pela comparação dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C com os relatados na literatura (Ismed *et al.*, 2017), bem como por espectroscopia Raman e cálculos DFT.

O líquen *Crocodia aurata* (8,7 g) foi extraído com CHCl_3 : MeOH (2: 1) e após remoção parcial do solvente obteve-se um resíduo de pó cristalino (245 mg) e amorfo (713,2 mg). Ambas as frações, pó cristalino e amorfo, produziram calicina e dilactona pulvínica que foram caracterizadas por difração de raios X, espectroscopia Raman e cálculos teóricos de mecânica quântica.

4.4.3 Instrumentação

Os espectros Raman dos líquens foram obtidos pelo modo macro usando um instrumento Bruker RFS 100 com um laser Nd^{+3} : YAG operando em 1064 nm com a potência nominal máxima do laser de 90 mW; 1024 varreduras espectrais foram acumuladas com resolução espectral de 4 cm^{-1} .

As imagens Raman foram realizadas através da aquisição de espectros Raman consecutivos, ponto a ponto, em diferentes locais da amostra, usando um instrumento Renishaw inVia Reflex com a linha laser em 532 nm e detector CCD; foram acumuladas 1036 aquisições com 5s de tempo de exposição no modo de alta resolução.

Os espectros vibracionais das estruturas cristalinas de calicina e dilactona pulvínica foram obtidos utilizando um espectrômetro Senterra Bruker Raman acoplado a um microscópio Olympus. A linha de laser de 785 nm foi usada com uma potência de 50 mW nas amostras, assim como uma objetiva de 50x de longa distância de trabalho ($\text{NA} = 0,50$) e uma resolução de $3\text{--}5 \text{ cm}^{-1}$ para a aquisição dos dados. Os sinais Raman foram obtidos com um tempo de integração de 2s.

Os espectros de RMN ^{13}C e ^1H do ácido estítico foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III HD 500, onde 10 mg da amostra foram dissolvidas em $300 \mu\text{L}$ de $\text{DMSO} - d_6$.

4.4.4 Metodologia do cálculo teórico

Os cálculos de otimização de geometria, frequências harmônicas e atividade do espalhamento Raman foram realizados no nível da teoria do funcional de densidade (DFT), estabelecendo o B3LYP funcional e a base 6-31 + G (2d, p). Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa Gaussian 09 Rev. A.02. Os espectros

simulados foram ajustados usando uma função de Lorentz com meia largura a meia altura de 10 cm^{-1} .

4.4.5 Difração de raios X por monocristal e refinamento estrutural

A medida de difração de raios X por monocristais, para as estruturas calicina e dilactona pulvínica, foi realizada usando um difratômetro Supernova Agilent com detector CCD usando radiação $\text{MoK}\alpha$ e $\text{CuK}\alpha$ na temperatura ambiente. A coleta de dados, refinamento de célula unitária e correção de absorção foram obtidos usando o software CrysAlis RED (Oxford Diffraction Ltda, versão 171.38.41). As estruturas foram resolvidas e refinadas usando o pacote de programas SHELX-14 e as figuras foram produzidas usando ORTEP 3 para Windows e MERCURY .

Os cálculos teóricos foram realizados em parceria com o Núcleo de Estudos em Química Computacional (NEQC), e, as elucidações estruturais por difração de raios X pelo Grupo de Pesquisa em Química de Materiais Porosos, ambos do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.5 Resultados e discussões

4.5.1 Caracterização espectroscópica: *Usnea* sp.

O gênero ascomiceto *Usnea* é uma fonte rica de ácido úsnico, um derivado da fluoroacetofenona que parece ser um metabólito secundário exclusivo de líquens e comumente presente em grandes quantidades no córtex de todas as espécies de *Usnea*. De fato, a análise feita pela espectroscopia Raman confirmou a presença do ácido úsnico, e, além disso, é descrita pela primeira vez a caracterização vibracional do ácido estítico, um composto que geralmente ocorre em baixa concentração nas espécies de *Usnea* (Llansola-Portoles *et al.*, 2017).

O espectro Raman do ácido úsnico (Figura 4.1), obtido como cristal amarelo, mostrou bandas principais em $3093 \nu(\text{C-H})_{\text{ar}}$, $1697 \nu(\text{C=O}$, cetona cíclica), $1630 \nu(\text{C=O}$, cetona aromática), $1610 \nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$, $1446 \delta(\text{CH})$, $1375 \nu(\text{CCO})$, $1325 \nu(\text{CC})_{\text{ar}}$, $1290 \delta(\text{CC})_{\text{ar}}$, $994 \nu(\text{CO})$ e 541 cm^{-1} referente ao modo $\tau(\text{C=O})$ (Tabela 4). Os resultados obtidos experimentalmente foram comparados com dados já descritos na

literatura para a molécula do ácido úsnico (Edwards, Newton e Wynn-Williams, 2003) e com parâmetros geométricos e frequências vibracionais calculados.

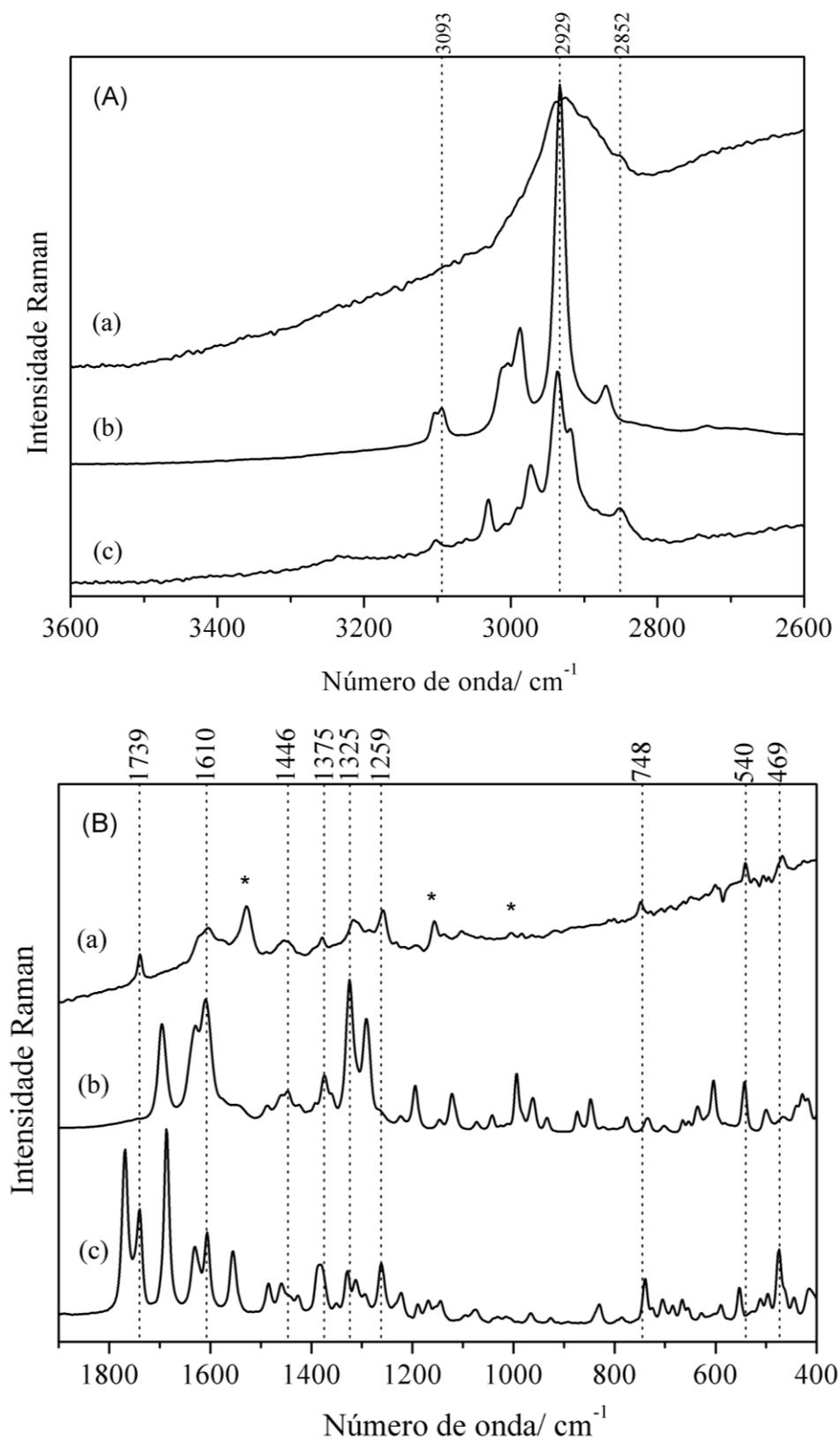
O sólido branco amorfo caracterizado como ácido estítico e isolado como um componente minoritário do extrato bruto mostrou, no espectro Raman, bandas características em 3101 $\nu(\text{C-H})_{\text{ar}}$, 2852 $\nu(\text{C-H, aldeído})$, 1768 $\nu(\text{C=O, lactona de 5 membros})$, 1739 $\nu(\text{C=O, lactona de 7 membros})$, 1687 $\nu(\text{C=O, aldeído aromático})$, 1630 $\nu(\text{C=C})$, 1605 $\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$, 1485 $\delta(\text{C-H, CH}_3)$, 1383 $\delta(\text{C-H, CH}_3)$, 1262 $\nu(\text{C-C})$ e 475 cm^{-1} $\delta(\text{esqueleto})$ (Figura 4.1). Os cálculos DFT foram realizados para suportar as atribuições experimentais, observando-se uma boa correlação entre o espectro calculado e o obtido experimentalmente (Tabela 4).

A seletividade da espectroscopia Raman na análise de sistemas conjugados permitiu a identificação dos ácidos úsnico e estítico pela análise *in situ* da espécie de *Usnea* sp. na superfície do córtex (Figura 4.1). O espectro mostrou bandas características de carotenoides em 1529 $\nu(\text{C=C})$, 1157 $\nu(\text{C-C})$ e 1005 cm^{-1} referente ao modo $\delta(\text{C-CH}_3)$, bem como bandas relacionadas a ambos os compostos a 1739 $\nu(\text{C=O})$, 1640 a 1590 cm^{-1} $\nu(\text{C=O, C=C})$, 1379 $\nu(\text{CCO})$, 1318 $\nu(\text{CC})$, 1286 $\delta(\text{CC})$, 1259 $\nu(\text{CC})$, 541 $\tau(\text{C=O, cetona})$, 468 cm^{-1} $\delta(\text{esqueleto})$.

A identificação do ácido úsnico deve-se à presença de bandas na faixa de 1640 a 1590 cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações duplas carbono-carbono e carbono-oxigênio, 1325 $\nu(\text{CC})_{\text{ar}}$ como uma banda larga, 1286 $\delta(\text{CC})_{\text{ar}}$ e 541 $\tau(\text{C=O, cetona})$. Por outro lado, o sinal em 1739 cm^{-1} pode ser atribuído à lactona de sete membros presente do ácido estítico, juntamente com as bandas em 1383 $\delta(\text{CH})$, 1262 $\nu(\text{CC})$, 475 cm^{-1} $\delta(\text{esqueleto})$ e bandas na faixa de 1640 a 1590 cm^{-1} $\nu(\text{C=O, C=C})$ também comuns ao ácido úsnico (Tabela 4).

A estrutura do ácido estítico também foi identificada por análises espectrais de RMN de ^{13}C e ^1H (Tabela 5), e, as atribuições para os principais sinais da molécula concordam para que o ácido estítico tenha sido extraído de forma eficiente. As atribuições para o produto obtido foram feitas por comparação com os sinais obtidos na literatura (Ismed *et al.*, 2017) e mostram os sinais referentes aos grupos carbonílicos das lactonas de 5 e 7 membros em δ 166,5 e 160,8 ppm, respectivamente; a carbonila do grupo aldeído (C8) é assinalada em 186,6 ppm. Destacam-se os sinais dos carbonos dos grupos substituintes O-CH₃ em δ 56,8 e CH₃ em δ 9,6.

Figura 4.1: Espectros FT-Raman da superfície da Usnea (a) e dos compostos químicos extraídos: ácido úsnico (b) e ácido estético (c) nas regiões vibracionais (A) 3600-2600 cm^{-1} e (B) 1900-400 cm^{-1} . (*) Bandas atribuídas ao carotenoide.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Tabela 4: Tentativa de atribuição vibracional para as principais bandas observadas no espectro *in situ* da superfície do líquen *Usnea* sp e também para os espectros Raman, teórico e experimental, dos compostos químicos isolados ácido úsnico e estético.

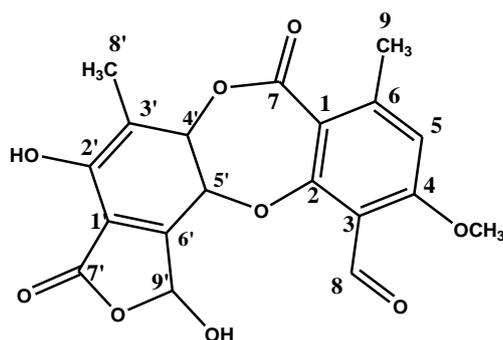
Tentativa de atribuição Raman para as principais bandas/ cm ⁻¹						
<i>Usnea</i> sp.	Ácido úsnico			Ácido estético		
<i>in situ</i>	Extração	Teo.	Atribuição vibracional	Extração	Teo.	Atribuição vibracional
	3093 w	3100	$\nu_{\text{ass}}(\text{CH})_{\text{ar}}$	3101 w	3120	$\nu(\text{C-H})_{\text{ar}}$
2925 m	2929 s	2954				
				2852 w	2915	$\nu(\text{C-H, aldeído})$
				1768 s	1758	$\nu(\text{C=O, lactona de 5 membros})$
1739 m				1739 s	1750	$\nu(\text{C=O, lactona de 7 membros})$
	1697 s	1579	$\nu(\text{C=O, cetona cíclica})$	1687 s	1720	$\nu(\text{C=O, aldeído aromático})$
1630-1583 s	1630 s	1628	$\nu(\text{C=O, cetona aromática})$	1630 m	1628	$\nu(\text{C=C})$
1630-1583 s	1610 s	1595	$\nu(\text{C=O, C=C})_{\text{ar}}$	1605 m	1595	$\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$
1528 s*						
				1485 w	1464	$\delta(\text{C-H, O-CH}_3)$
1447 m	1446 m	1463	$\delta(\text{CH})$			
				1383 m	1386	$\delta(\text{C-H, CH}_3)$
1379 m	1375 m	1380	$\nu(\text{C-C-O})$			
1318 m	1325 s	1335	$\nu(\text{C-C})_{\text{ar}}$			
	1286 s	1292	$\delta(\text{C-C})_{\text{ar}}$			
1259 m				1262 m	1247	$\nu(\text{C-C})$
1157 m*						
1006 w*						
	994 m	1000	$\nu(\text{C-O})$			
540 m	541 m	542	$\tau(\text{C=O})$			
469 m				475 m	467	$\delta(\text{esqueleto})$

Abreviações: s, *strong* (forte); m, *medium* (médio); w, *weak* (fraco).

* Bandas atribuídas ao caroteno.

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para o ácido estítico (δ em ppm).



Ácido estítico				
ISMED, 2017			Experimental	
DMSO – d₆				
Posição	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	113,3	-	113,1	-
2	163,0	-	163,1	-
3	114,6	-	114,4	-
4	162,6	-	162,1	-
5	112,9	7,08 (1H, s)	112,8	7,12 (1H, s)
6	150,8	-	150,9	-
7	160,8	-	160,7	-
8	186,7	10,47 (1H, s)	186,6	10,48 (1H, s)
9	21,5	2,5 (3H, s)	21,5	2,5 (3H, s)
1'	109,3	-	109,1	-
2'	152,0	-	151,9	-
3'	120,8	-	120,8	-
4'	148,1	-	148,1	-
5'	137,6	-	137,5	-
6'	135,9	-	136,0	-
7'	166,5	-	166,4	-
8'	9,6	2,19 (3H, s)	9,6	2,21 (3H, s)
9'	95,4	6,62 (1H, s)	95,1	6,63 (1H, s)
OCH ₃ -4	56,8	3,91 (3H, s)	56,8	3,93 (3H, s)
OH	-	8,19 (1H, s)	-	8,22 (1H, s)
OH	-	10,11 (1H, s)	-	10,11 (1H, s)

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

O espectro de RMN de ^1H também evidencia a presença do ácido estítico. É possível observar a presença de um simpleto em δ 7,12 ppm que pode ser atribuído ao hidrogênio H-5 do anel aromático, bem como outro simpleto de H-8 em δ 10,48 ppm referente ao hidrogênio do grupo aldeído. Os três hidrogênios dos grupos CH_3 podem ser atribuídos pelo simpleto em δ 2,5 e 2,21 ppm. O hidrogênio H-9' da lactona de 5 membros é assinalado em δ 6,63 ppm.

4.5.2 Difração de Raios X: Calicina e Dilactona pulvínica – compostos do líquen *Crocodia aurata*

O pigmento calicina foi isolado como cristais laranja e dilactona pulvínica como de cor amarela, ambos em formato de agulha. A elucidação das estruturas foi realizada por análise de difração de raios X por monocristal suportada por dados Raman experimentais e teóricos.

A fração cristalina obtida por meio dos processos de extração química de *C. aurata* forneceu uma mistura de dois cristais morfologicamente distintos. A coleta de dados dessas duas estruturas cristalinas e os detalhes de refinamento está resumida na Tabela 6. A calicina e a dilactona pulvínica cristalizam no sistema ortorrômbico (não-centrosimétrico; grupo espacial $P2_12_12_1$) e no grupo monoclinico (centrosimétrico; grupo espacial $P2_1/c$), respectivamente.

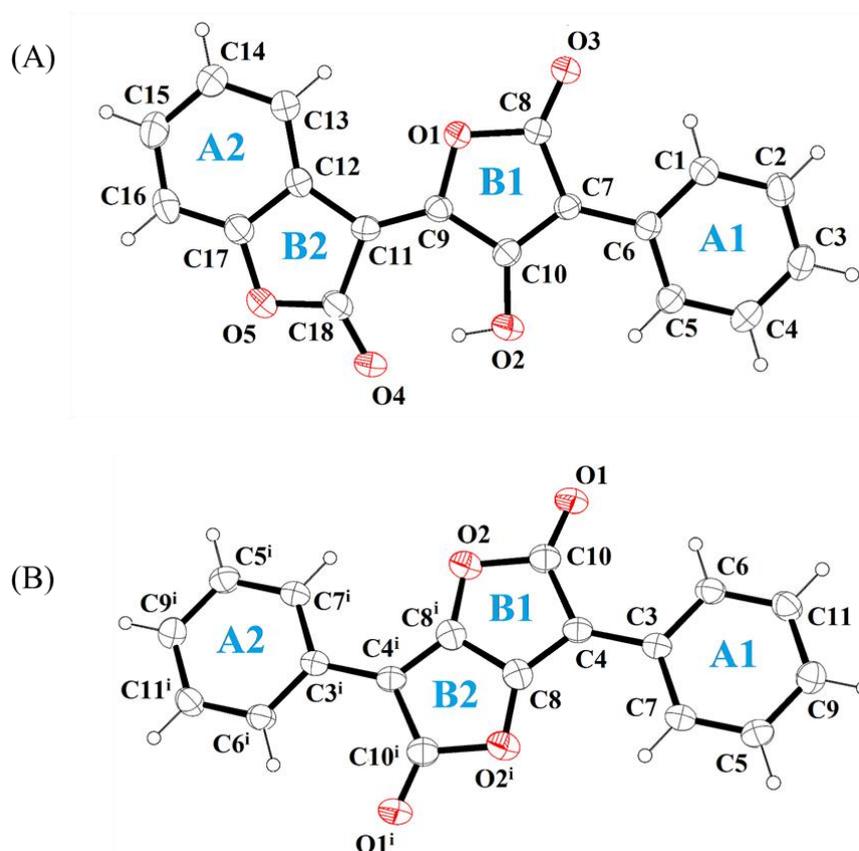
Tabela 6: Dados cristalográficos da calicina e dilactona pulvínica.

	Calicina	Dilactona pulvínica
Fórmula molecular	$C_{18}H_{10}O_5$	$C_{18}H_{10}O_4$
Massa molecular/g mol ⁻¹	306.26	290.26
Temperatura/K	293.3 (5)	292.3 (7)
Número de onda/Å	Mo K α	Cu K α
Sistema cristalino	Ortorrômbico	Monoclinico
Grupo espacial	$P2_12_12_1$	$P2_1/c$
a/Å	6.7968 (3)	5.5582 (3)
b/Å	13.0770 (5)	5.3039 (2)
c/Å	15.2363 (6)	22.2426 (9)
V/Å ³	1354.23 (10)	655.49 (5)
Z	4	2
	0.060 x 0.088 x	0.062 x 0.323 x
Tamanho/mm	0.218	0.388

Fonte: ELABORADO PELO GRUPO GPQMAP – Grupo de Pesquisa em Química de Materiais Porosos.

As estruturas cristalinas da calicina e dilactona pulvínica são mostradas na Figura 4.2. O empacotamento da unidade assimétrica da calicina possui quatro moléculas discretas na célula unitária ($Z = 4$), enquanto que a dilactona pulvínica tem duas moléculas discretas na célula unitária ($Z = 2$). Em ambas as estruturas cristalinas, os anéis furano têm seus grupos carbonila posicionados em C8-O3 (calicina) e C10-O1 (dilactona pulvínica) conjugados com C6-C7 e C3-C4, respectivamente.

Figura 4.2: Representação ORTEP de (A) estrutura cristalina da calicina. A1 e A2 são anéis aromáticos e B1 e B2 são anéis furano, (B) estrutura cristalina da dilactona pulvínica. Código de simetria: $i = -x, -y, -z$. A1 e A2 são anéis aromáticos e B1 e B2 são anéis furano.

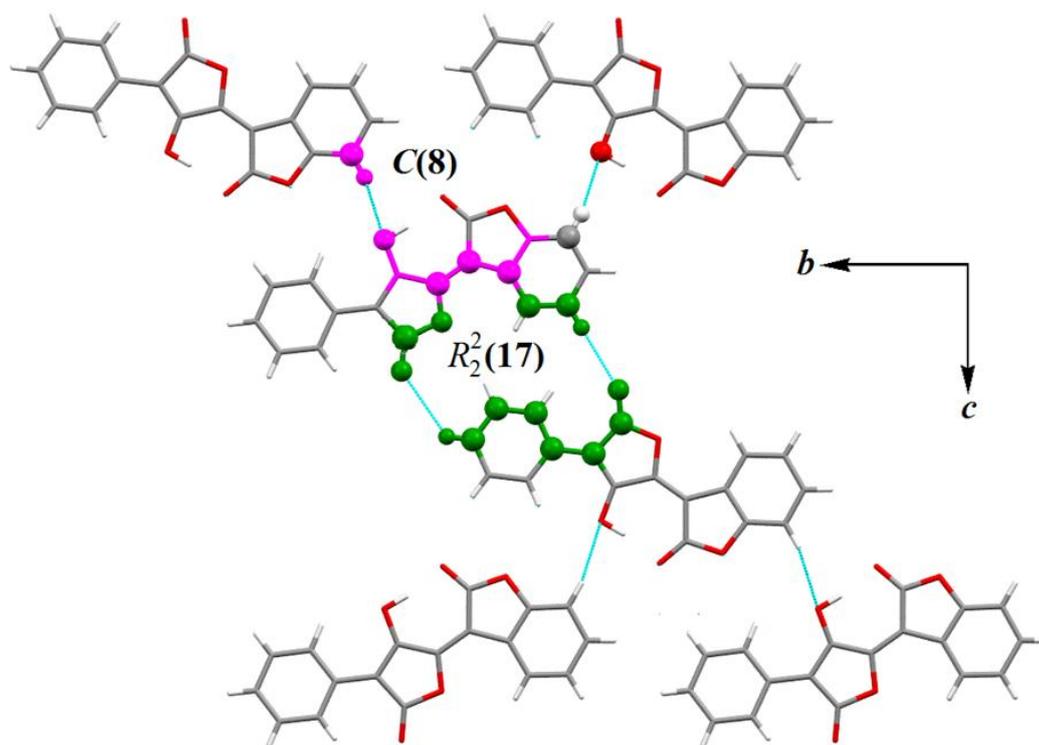


Fonte: ELABORADO PELO GRUPO GPQMAP – Grupo de Pesquisa em Química de Materiais Porosos.

Além de informações locais sobre as estruturas cristalinas orgânicas, a análise supramolecular forneceu uma melhor compreensão sobre a construção da rede, bem como mostra algumas evidências a respeito das interações de contato fracas. A presença de grupos carbonila, O-furano e hidroxila favoreceu a formação de ligações

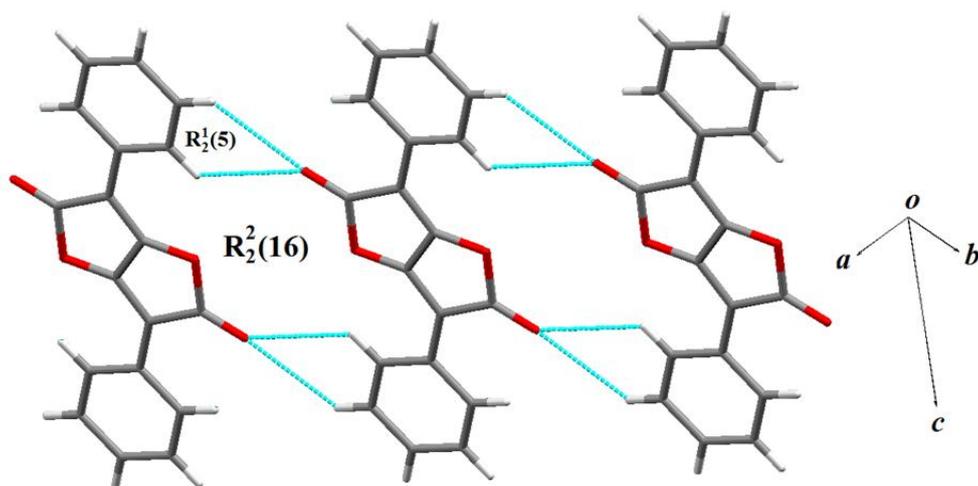
de hidrogênio intermoleculares C-H...O não convencionais em ambos os compostos. Desiraju (Desiraju, 1991) sugeriu que os contatos C-H...O devem ser considerados nas estruturas cristalinas de compostos orgânicos para uma compreensão completa do arranjo de empacotamento. A expansão supramolecular bidimensional na estrutura cristalina da calicina ao longo do plano bc (Figura 4.3) envolve contatos C-H...O descritos como $C(8)R_2^2(17)$. Por outro lado, a expansão supramolecular unidimensional das ligações de hidrogênio C-H...O na dilactona pulvínica (Figura 4.4) envolvem redes $R_2^1(5)$ e $R_2^2(16)$.

Figura 4.3: Expansão supramolecular das ligações de hidrogênio C-H...O ao longo do plano *bc* para a molécula de calicina.



Fonte: ELABORADO PELO GRUPO GPQMAP – Grupo de Pesquisa em Química de Materiais Porosos.

Figura 4.4: Expansão supramolecular da molécula dilactona pulvínica.



Fonte: ELABORADO PELO GRUPO GPQMAP – Grupo de Pesquisa em Química de Materiais Porosos.

4.5.3 Caracterização por espectroscopia Raman: *Crocodia aurata*

As medidas FT-Raman obtidas diretamente na camada superior da superfície de *C. aurata* (*in situ*) mostraram bandas típicas de carotenoides em 1527 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 1158 $\nu(\text{CC})$, 1005 cm^{-1} $\delta(\text{C}-\text{CH}_3)$ e bandas marcadoras relacionadas aos derivados pulvínicos: 1799 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1722 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1678 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 1631 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 1603 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 1408 $\nu(\text{CC})$, 1003 $\nu(\text{CCO})$, 981 $\delta(\text{CC})$ e 507 cm^{-1} (respiração dilactona) (Figura 4.5A). A comparação das bandas Raman da amostra *in situ* com os compostos extraídos quimicamente (Figura 4.5B) mostrou boa correlação espectral, indicando que as análises Raman realizadas diretamente na superfície líquênica podem identificar, inequivocamente, derivados pulvínicos no líquen *C. aurata*.

O deslocamento do sinal Raman observado entre os espectros pode ser devido ao efeito matriz, pois as propriedades físicas e químicas da complexa e heterogênea matriz biológica podem influenciar na posição das bandas Raman, comprometendo a correlação das atribuições (De Oliveira *et al.*, 2010; De Oliveira *et al.*, 2011).

A calicina e a dilactona pulvínica são derivados do ácido pulvínico, e, são estruturalmente correlacionados com grupos funcionais semelhantes, porém com arranjos distintos. Dessa forma, espera-se, pela análise Raman, a presença de bandas vibracionais comuns para ambos e atribuídos aos anéis aromáticos na faixa de 3070-

3060 $\nu(\text{CH})$, 1600-1615 $\nu(\text{C}=\text{C})\text{ cm}^{-1}$ e na região típicas das lactonas na faixa de 1800-1700 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$).

A Figura 4.5B mostra os espectros Raman obtidos na linha laser de 785 nm para um cristal laranja em formato de agulha com bandas Raman em 1793 $\nu(\text{C}=\text{O} + \text{C}=\text{C})$, 1706 $\nu(\text{CO} + \text{C}=\text{C})$, 1636 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 1613 $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}$, 1380 $\delta(\text{CH})$, 999 $\delta(\text{CC})$ e 960 cm^{-1} $\delta(\text{CC})$ atribuídos, dessa forma, à calicina (Tabela 7).

Tabela 7: Atribuições espectrais das bandas observadas nos espectros Raman das substâncias isoladas calicina e dilactona pulvínica usando a linha de excitação em 785 nm e da medula e córtex do líquen *Crocodia auratan* na linha 1064 nm.

Tentativa de assinalamento das principais bandas Raman/ cm^{-1}

Calicina			Dilactona pulvínica				
Extração	<i>in situ</i>		Atribuição	Extração	<i>in situ</i>		Atribuição
785 nm	1064 nm			785 nm	1064 nm		
	medula	córtex			medula	córtex	
1793 w	1812w	1813w	$\nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{C}=\text{C})$	1799w	1797w	1799w	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1706 w	1723w	1720w	$\nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{C}=\text{C})$	1675s	1675s	1678s	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1636 s	1631m	1631m	$\nu(\text{C}=\text{C})$	1629w	1631m	1631m	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1613 s	1601s	1601s	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}$	1408s	1408w	1408s	$\nu(\text{C}-\text{C})$
1380 m	1380w	1378w	$\delta(\text{C}-\text{H})$	1003 w	981 m	981 m	$\nu(\text{C}-\text{C}-\text{O})$
999 m	1003 w	1003 m	$\delta(\text{C}-\text{C})$	409 m	505 w	510 w	Respiração do anel
960 s	958w	958vw	$\delta(\text{C}-\text{C})$				

Abreviações: s, *strong* (forte); m, *medium* (médio); w, *weak* (fraco).

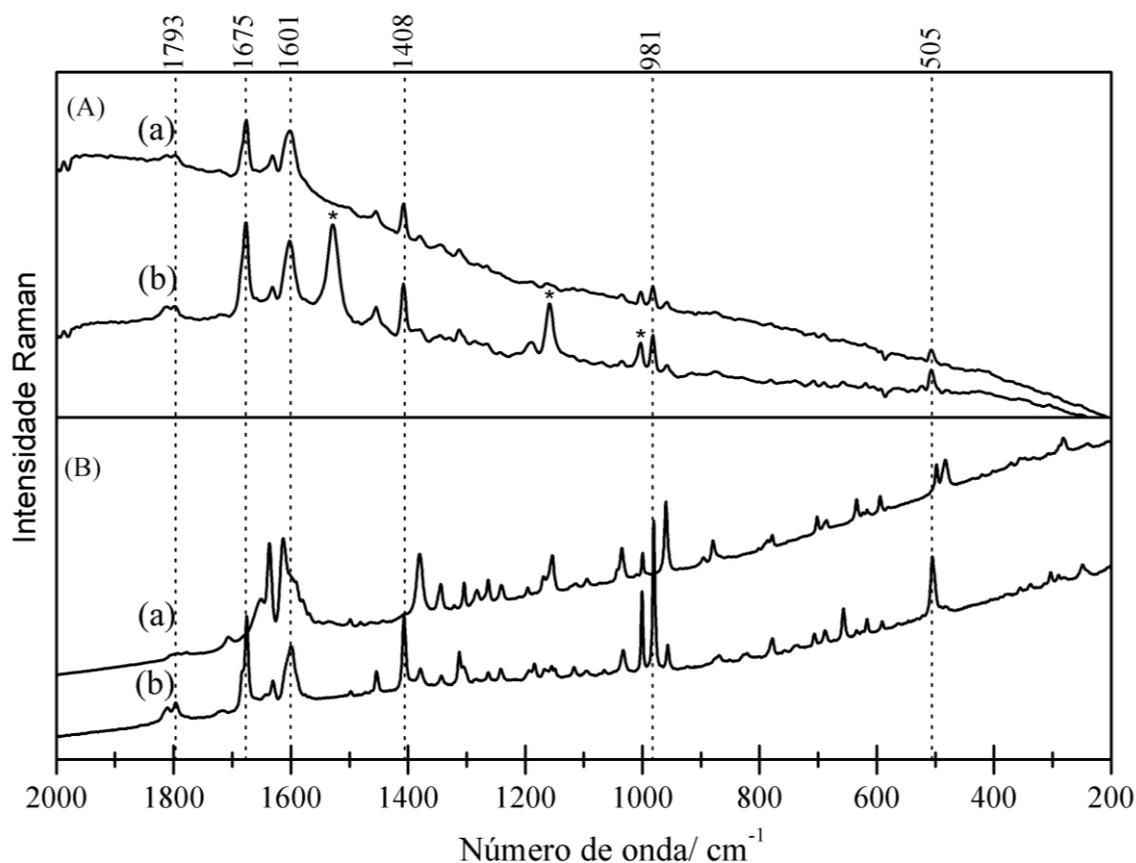
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

O cristal amarelo, também em formato de agulha, foi identificado como dilactona pulvínica devido às bandas assinaladas em 1799 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1675 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 1601 $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}$, 1408 $\nu(\text{CC})$, 1000 $\nu(\text{CCO})$, 980 $\nu(\text{CCO})$ e 505 cm^{-1} (respiração do anel da dilactona) (Tabela 7). Bandas menos intensas também foram observadas nos espectros de ambos os compostos, que podem pertencer a análogos biossintéticos com

estruturas intimamente relacionadas e que frequentemente co-ocorrem com essas moléculas (Stocker-Worgotter, 2008; Dias e Urban, 2009). As atribuições espectrais foram propostas com base em cálculos teóricos e comparação com dados da literatura (Edwards, Newton e Wynn-Williams, 2003; Jorge-Villar e Edwards, 2010; Ropret *et al.*, 2012).

O talo de *C. aurata*, como muitos outros líquens, é morfologicamente dividido em córtex superior, camada formada pela alga, medula e córtex inferior (Moncada *et al.*, 2014) (Figura 1.1). Esta espécie apresenta colorações distintas em relação a duas camadas: verde no córtex superior e amarelo brilhante na medula. (Figura 4.6A). O espectro FT-Raman obtido em um único ponto, porém em triplicata, da camada superficial superior, mostrou a presença de bandas Raman atribuídas a carotenoides e derivados pulvínicos, em contrapartida, a camada medular apresentou apenas derivados pulvínicos (Figura 4.5A).

Figura 4.5: (A) Espectros FT- Raman do líquen *Crocodia aurata* e suas camadas: medula (a) e córtex (b); (B) Espectros Raman na linha de excitação 785 nm do cristal de calcicina (a) e de dilactona pulvínica (b). (*) Bandas atribuídas ao carotenoide.

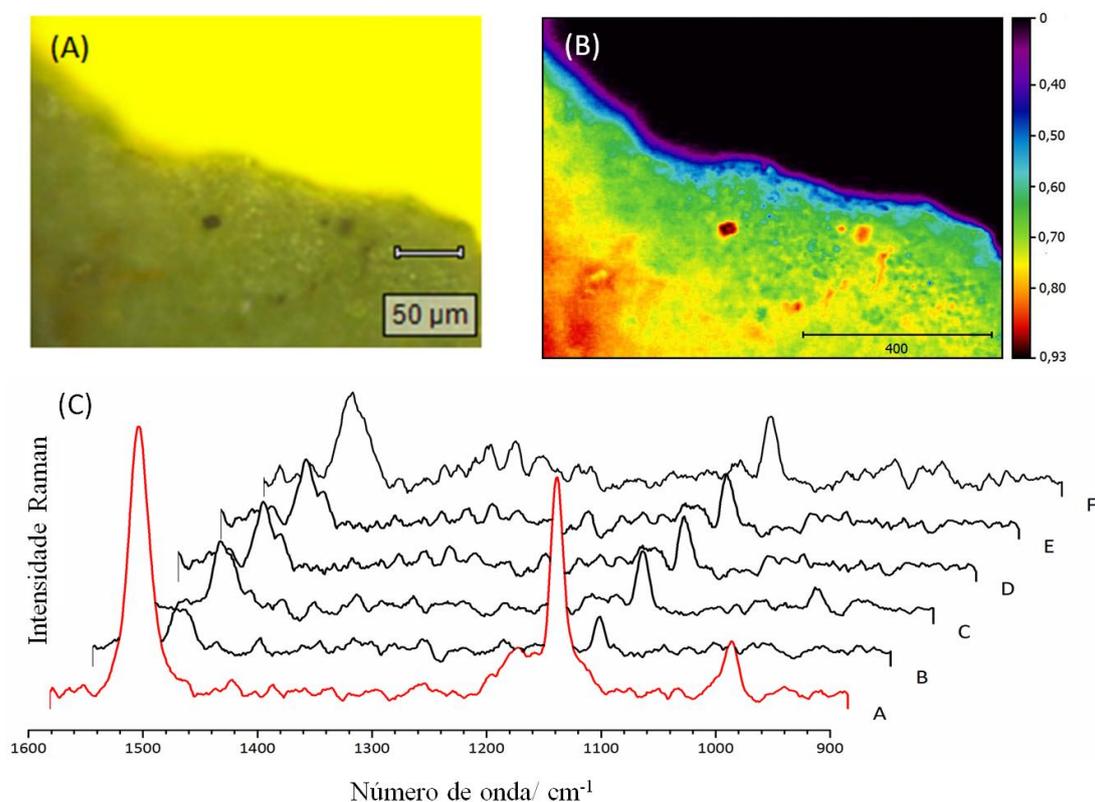


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Para investigar a distribuição dos compostos nas diferentes camadas, aplicamos a técnica de mapeamento Raman na linha de excitação de 532 nm em um fragmento do talo onde é possível observar uma camada externa (verde acastanhada) e uma interna (amarela) (Figura 4.6A). O gradiente de coloração no mapa Raman (Figura 4.6B) foi correlacionado com a intensidade da banda Raman na faixa de 1530 a 1500 cm^{-1} atribuída aos carotenoides, a fim de demonstrar a distribuição do pigmento na superfície.

A intensidade espectral integrada dentro da região do marcador mostrou que a distribuição de carotenoides não é uniforme ao longo das camadas da amostra, bem como foram observados apenas no córtex superior. Além disso, o mapeamento Raman do córtex superior revelou perfis espectrais que poderiam sugerir a presença de uma mistura de carotenoides ao longo da área mapeada (Figura 4.6C).

Figura 4.6: (A) Imagem de luz branca da superfície de *Crocodia aurata*; (B) mapeamento Raman monitorando a presença do pigmento carotenoide através da intensidade da banda $\nu(\text{C}=\text{C})$ em 1530-1500 cm^{-1} ; (C) Espectros Raman de pontos selecionados aleatoriamente da área mapeada.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Diferente dos dados obtidos com medição de um único ponto e na linha de excitação em 1064 nm, onde a banda $\nu(\text{C}=\text{C})$ ocorre em 1527 cm^{-1} , a Figura 4.6C apresenta espectros Raman na linha de laser 532 nm, selecionados em pontos aleatórios (de A a F), mostrando uma banda larga em 1522 cm^{-1} e um ombro em menor número de onda (cerca de 1510 cm^{-1}).

A alta seletividade da linha laser em 532 nm para carotenoides corroborou com a complexidade do padrão vibracional destes pigmentos em líquens descritos na literatura (Czeczuga *et al.*, 1988; Czeczuga e Lallemant, 1993). Entretanto, a observação de pelo menos duas bandas atribuídas ao modo $\nu(\text{C}=\text{C})$ pode ser endereçada a diferentes fatores: presença de carotenoides com diferentes ligações duplas conjugadas (Baranski *et al.*, 2005; Maia *et al.*, 2014), arranjos conformacionais diferentes de um ou mais componentes (Llansola-Portoles *et al.*, 2017) ou efeito microambiente (efeito matriz) (Papaioannou *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2011).

Sabe-se que os carotenoides presentes em ambas às espécies estudadas neste trabalho estão envolvidos na transferência de energia nos sistemas fotossintéticos, sequestro do oxigênio singlete e de espécies reativas de oxigênio (Britton, 1995; Echavarri-Erasun e Johnson, 2002). Nos líquens são metabólitos comuns produzidos por algas (Adams *et al.*, 1993) envolvidas por hifas de fungos (Ahmadjian, 1993) ou pelos fungos em si (Echavarri-Erasun e Johnson, 2002). A atividade fotossintética do parceiro algal fornece o carbono necessário para a biossíntese dos metabólitos secundários (Stocker-Worgotter, 2008), indicando um processo cooperativo. Independentemente da fonte de carotenoides, sejam elas algas ou fungos, mostramos que no líquen *C. aurata* os derivados da dilactona pulvínica são encontrados no córtex superior e na camada da medula, ao passo que os carotenoides ocorrem exclusivamente no córtex superior do talo exposto à luz solar.

A espécie de *Usnea* estudada possui os carotenoides presentes no talo, e, os ácidos úsnico e estítico foram identificados apenas no córtex. O ácido úsnico é geralmente encontrado em alta concentração no córtex, no entanto, pode variar de acordo com o grau de exposição à luz (Philippe, 1987). A ocorrência do ácido estítico tem sido descrita em outras espécies nas quais uma variação quantitativa de seus derivados é dito como dado taxonômico de fundamental importância.

Como os líquens são uma fonte particular de antioxidantes, é interessante usar uma técnica de fácil manipulação de amostras para a identificação de diferentes classes de compostos presentes em seus tecidos. A caracterização por espectroscopia

Raman tem como objetivo atingir esse propósito e a utilização de cálculos teóricos para prever as estruturas de ácido úsnico e estético, calicina, dilactona pulvínica tem sido realizada a fim de suportar as tarefas experimentais. Os cálculos DTF forneceram informações valiosas na descrição dos modos vibracionais para as moléculas quimiomarcadoras presentes nos líquens estudados, e, a análise por difração de raios X dos monocristais de calicina e dilactona pulvínica identificou inequivocamente estas moléculas que ocorrem, frequentemente, como uma mistura, ou outras vezes com outros compostos de mesma via biossintética.

4.6 Conclusões

Cinco pigmentos absorvedores de luz foram identificados inequivocamente por espectroscopia Raman, suportada por técnicas de ressonância magnética nuclear e cristalografia, bem como por cálculos teóricos, e, que forneceram informações adicionais sobre os ácidos estético e úsnico, calicina e dilactona pulvínica. A análise Raman confirmou a ocorrência esperada de ácido úsnico em *Usnea* sp. Por outro lado, a caracterização da estrutura do ácido estético foi descrita pela primeira vez por espectroscopia Raman, apesar de ocorrer como um composto minoritário na biomassa líquênica.

Em *C. aurata* identificamos a calicina e seu precursor, a dilactona pulvínica, distribuída ao longo do córtex e da medula. As estruturas cristalinas desses compostos foram determinadas por difração de raios X e estão de acordo com todas as análises e atribuições vibracionais.

Além de pigmentos aromáticos, identificamos carotenoides no córtex superior de ambas as espécies e seu padrão de distribuição foi revelado por imagens de espectroscopia Raman. O mapa Raman mostrou a presença de uma mistura de carotenoides que não são distribuídos uniformemente nos tecidos de *C. aurata*.

Neste trabalho demonstramos o poder da técnica Raman para a caracterização *in situ* de produtos naturais. No caso dos líquens, foi possível identificar as moléculas alvo antes e depois de extrações químicas da amostra. Com base nesses resultados, podemos concluir que a análise *in situ* é adequada para caracterizar e monitorar pigmentos da espécie *C. aurata* e do gênero *Usnea*.

CAPÍTULO 5

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE UMA β - GLUCANA INSOLÚVEL EM ÁGUA DA ESPÉCIE DE *USNEA*

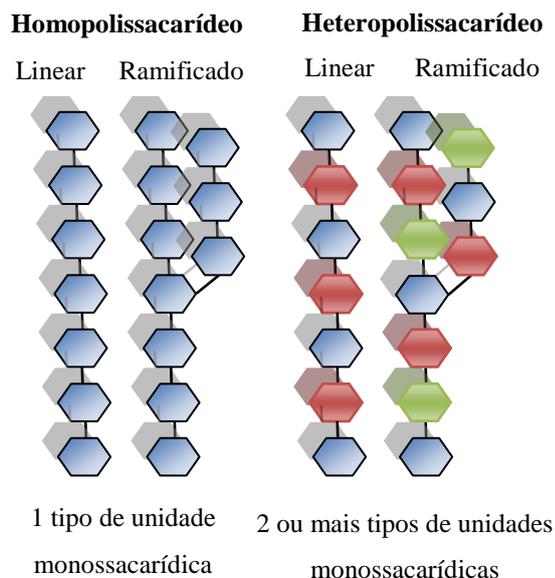
5.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em vários e nos mais distintos organismos vivos, sendo denominado como um grupo de compostos dos mais abundantes e importantes da biosfera - por exemplo, a celulose e amido nas plantas e glicogênio nos animais (de Lourdes, 2006).

Este tipo de material polimérico é constituído por unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas, onde alguns fatores são relevantes para a sua classificação, como por exemplo, a sua unidade básica de formação e o grau de ramificação destas, o tipo de ligações que as conectam e o comprimento das suas cadeias.

Os polissacarídeos podem ser classificados em homopolímeros ou heteropolímeros (Pazur, 1986) - os quais se diferem na natureza da unidade monossacarídica ou ainda em ramificados e lineares ao avaliarem-se as ligações entre tais unidades (Figura 5.1). O primeiro grupo possui um único tipo de unidade monomérica, como por exemplo, os polímeros de glicose, celulose e amido. Os heteropolissacarídeos contêm duas ou mais unidades monoméricas distintas, como os peptidoglicanos, que fazem parte da camada rígida da parede celular das células bacterianas.

Figura 5.1: Representação esquemática de homo e heteropolissacarídeos.



Fonte: ADAPTADO DE CAMPBELL, Bioquímica, Artmed, 2000.

Algas, bactérias e fungos, bem como as plantas, produzem diferentes polissacarídeos de importantes aplicações biotecnológicas. As algas produzem o ágar, usado como agente gelificante e que tem sido usado para modificar a viscosidade de fluidos, estabilizar suspensões, flocular partículas, encapsular materiais e produzir emulsões (Sutherland, 1998). Além disso, são ainda empregados como agentes de troca iônica, filtros moleculares e agentes de recuperação de óleos (Glazer e Nikaido, 1995).

5.2 Polissacarídeos liquênicos

Os carboidratos podem ser divididos em componentes de baixa e alta massa molar, dessa forma, entre os carboidratos de baixa massa molar encontram-se os monossacarídeos redutores (pentoses, metilpentoses, hexoses e cetoses), polióis e os oligossacarídeos. Em contrapartida, 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 frequentes em fungos liquenizados (Gorin *et al.*, 1993; Olafsdottir e Ingolfsson, 2001).

Os primeiros estudos a respeito de polissacarídeos de fungos liquenizados iniciaram em 1815 quando Berzelius extraiu de *Cetraria islandica* uma glucana chamada liquenana [β -D-glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4)]. Desde então, os avanços das técnicas de biologia molecular em conjunto com a caracterização estrutural de macromoléculas, tem sido uma importante ferramenta na taxonomia de fungos liquenizados, pois, na maioria das vezes, dados relativos apenas à análise morfológica não elucidam por completo a identificação das espécies (Honda e Vilegas, 1999).

Polissacarídeos encontrados em plantas e outros organismos vivos exercem importantes atividades de interesse biológico, principalmente antitumoral e anticoagulante. Os mesmos estudos baseados nas atividades biológicas de polissacarídeos liquênicos têm mostrado que as propriedades biológicas são similares e vem sendo cada mais utilizadas no âmbito da medicina (Olafsdottir e Ingolfsson, 2001).

Após os estudos iniciais a espécie *Cetraria islandica*, em que foram isolados os polissacarídeos liquenana e isoliquenana, muitos outros trabalhos hoje descrevem a composição polissacarídica das mais diversas espécies (Cordeiro *et al.*, 2003; Carbonero, E. R. *et al.*, 2006; Omarsdottir *et al.*, 2006).

Dentre os polissacarídeos liquênicos, as glucanas são os homopolímeros comumente encontrados. A Tabela 8 resume as glucanas atualmente conhecidas e caracterizadas, onde é possível verificar que a maioria destas apresenta estruturas lineares com ligações glicosídicas diferentes, sendo pertencentes às séries denominadas α ou β .

Tabela 8: Tipos de glucanas encontradas em líquens.

Glucanas	Denominação	Proporção entre as ligações
α -glucana (1→3), (1→4)	Nigerana	1:1
		1.2:1
	Isoliquenana	3:1
		3.8:1
		4:1
		6:1
		Acroscifana
		2:5
α -glucana (1→4), (1→6)	Pustulana	1:1
β -glucana (1→3)	Laminarana	
β -glucana (1→6)	Pustulana	
β -glucana (1→3), (1→4)	Liquenana	1:2
		1:3
		3:1
		3:7
β -glucana (1→3), (1→6)		

Fonte: Adaptado de CARBONERO, 2005.

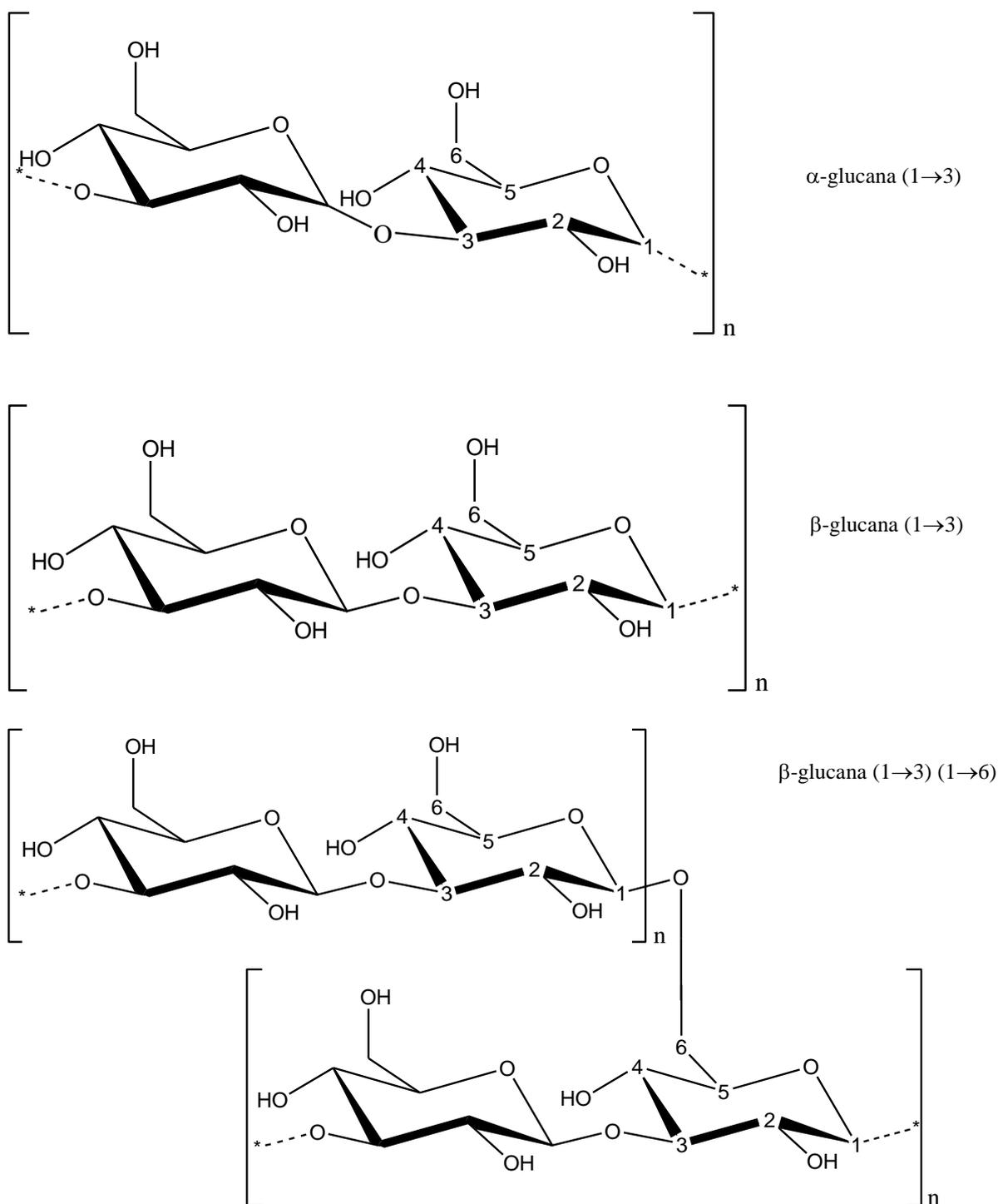
As glucanas são polímeros de estruturas variáveis de d-glicopiranosose (d-Glcp), e, apesar da simplicidade da sua composição de monossacarídeos - de acordo com a definição, contêm apenas glicose - pode ser encontrado um conjunto diverso de estruturas devido às diferentes configurações anoméricas das unidades de d-Glcp, posição e sequência das ligações glicosídicas ao longo de uma cadeia, grau de ramificação e conformação de cadeia. Glucanas ramificadas podem conter várias cadeias, com uma ou mais unidades monossacarídicas em diferentes posições.

De acordo com a estrutura anomérica das unidades de d-Glcp, é possível distinguir três grupos principais destes polissacarídeos: α -d-glucana, β -d-glucana e glucanas mistas α e β . Uma discriminação adicional pode ser feita com base nas posições da ligação glicosídica ou massa molecular, ou seja, glucanas lineares ou ramificadas e de alta, média ou baixa massa molecular. Os polissacarídeos isolados de líquens são, principalmente, lineares ou pouco substituídos dos tipos α - ou β - glucanas (Figura 5.2), e, em segundo lugar, várias estruturas do tipo galactomananas foram relatadas (Woranovicz *et al.*, 1997; Carbonero, Cordeiro, *et al.*, 2005; Omarsdottir *et al.*, 2006).

As glucanas são os principais polissacarídeos encontrados em líquens e os mais difundidos na natureza, e existe uma grande diversidade na massa molar do polímero de acordo com a fonte original. Este tipo de polissacarídeo também possui propriedades biológicas interessantes, e em uma revisão que abrange os 30 anos anteriores a ela, Olafsdottir e Ingolfsson (Olafsdottir e Ingolfsson, 2001) mostraram que os polissacarídeos liquênicos, incluindo as glucanas, podem ter atividades antitumoral, antiviral e imunológica em um baixo nível de toxicidade.

Além disso, as glucanas também são importantes para a taxonomia de líquens ao nível de gênero e família; como por exemplo, a glucana pustulana é característica da família Umbilicariaceae, e as do tipo liquenanas são encontradas nas Parmeliaceae apenas como β -glucanas. Em contrapartida, a única α - glucana isolada de Cladoniaceae é do tipo nigerana (Carbonero, Montai, *et al.*, 2005).

Figura 5.2: Representação de glucanas comumente encontradas em líquens.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

5.3 Caracterização estrutural de polissacarídeos de líquens

Muitos métodos têm sido aplicados para a determinação exata das estruturas das glucanas líquênicas, porém a espectroscopia de ressonância magnética nuclear é o

método não destrutivo mais eficaz para este tipo de análise estrutural, e, é amplamente utilizado na caracterização de glucanas das mais variadas fontes (Gonzaga *et al.*, 2013; Kono *et al.*, 2017; Rieder *et al.*, 2018). Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento de ^1H e ^{13}C são capazes de identificar as formas anoméricas dos resíduos d-Glcp e indicar as posições de ligações glicosídicas ou dos substituintes (Mulloy, 1996).

A análise estrutural de polissacarídeos é extremamente complexa devido à alta variedade da composição de monossacarídeos, das distinções das ligações glicosídicas, conformação do anel e da massa molecular (Ruthes *et al.*, 2015). A caracterização de carboidratos requer conhecimento químico e bioquímico especializado, além de técnicas caras, complexas e de resposta demorada. Especificamente no caso de glucanas, a análise estrutural é impulsionada, principalmente, pelo uso de ferramentas como cromatografia gasosa e/ ou líquida, espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (Jiang e Vasanthan, 2000; Kono *et al.*, 2017; Rong *et al.*, 2017).

Apesar do estudo de polissacarídeos ter-se limitado, basicamente, ao uso das técnicas citadas, a espectroscopia vibracional (Raman e de absorção na região do infravermelho) tem sido utilizada na caracterização de polissacarídeos ao longo dos anos e nos mais diversos sistemas (Synytsya *et al.*, 2003; Agarwal, 2006; Choi *et al.*, 2006; Szymanska-Chargot *et al.*, 2011; Chylinska *et al.*, 2014)

A espectroscopia vibracional, como dito anteriormente, é uma ferramenta poderosa para a análise de polissacarídeos por ser sensível à configuração anomérica dos mais diversos materiais – cogumelos (Zhang *et al.*, 2018), caules de alface (Nie *et al.*, 2018), algas (Pereira, 2017) e esponjas marinhas (Maia *et al.*, 2016), sementes de cominho (Trigui *et al.*, 2018), entre outros.

Duas regiões espectrais são importantes para a elucidação estrutural dos polissacarídeos: a faixa espectral de 1200 a 950 cm^{-1} que é típica das vibrações de açúcares – estiramento das ligações C-OH, C-O-C e C-C das unidades monoméricas, e, a região anomérica na faixa de 950 a 750 cm^{-1} que contém bandas de baixa intensidade, mas que envolvem vibrações importantes relacionadas à estrutura anomérica (Zhang, 1994). A Tabela 9 resume dados retirados da literatura onde a espectroscopia vibracional é utilizada para caracterizar ligação C1-H da estrutura anomérica de monossacarídeos.

Tabela 9: Regiões vibracionais características para a deformação angular da ligação anomérica C1- H.

Monossacarídeo	δ/ cm^{-1}
α -D-glicose	855-833
β -D-glicose	905-876
α -D-galactose	839-810
β -D-galactose	914-866
α -D-manose	843-818
β -D-manose	898-888
α -D-xilose	760-740
β -D ou β -L-arabinose	855-830

Adaptado de ZHANG, 1994.

5.4 Objetivos específicos

Objetiva-se a caracterização espectroscópica de polissacarídeos presentes na espécie de *Usnea* sp, principalmente as glucanas, devido às suas aplicações biotecnológicas e para tal, os mesmos devem ser isolados e purificados através das metodologias tradicionais já descritas na literatura.

5.5 Experimental

5.5.1 Amostras de líquens

Usnea sp. foi coletada pelo Prof. Dr. Adriano A. Spielmann e Rafaella F. Fernandes no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil (21°42'36,8"S, 43 ° 53'44.7"W, 1346 m).

5.5.2 Extração dos polissacarídeos

O líquen foi submetido aos processos sequenciais de extração e purificação, conforme os itens descritos a seguir. A metodologia adotada é uma adaptação da proposta por Carbonero, 2005:

Extração Diclorometano

Ao líquen limpo e seco adicionou-se diclorometano, e, sob refluxo manteve-se a extração por 24 horas na temperatura de 40 °C. Após este procedimento, o extrato foi obtido por filtração e evaporado em rotaevaporador até *secura*. O resíduo liquênico foi seco e submetido ao próximo passo de extração.

Extração Diclorometano: Metanol

O resíduo da extração anterior foi submetido à extração com uma mistura de solventes de diclorometano: metanol (2:1, v/v), sob refluxo, durante 24 horas, na temperatura de 50 °C. Decorrido o tempo, os extratos foram obtidos por filtração e evaporados em rotaevaporador.

Extração Metanol

A extração com metanol ocorreu também sob refluxo na temperatura de 50 °C por 24 horas. O material liquênico residual, filtrado e seco, é submetido a próxima etapa de extração.

Extração Aquosa

O material residual do líquen *Usnea* sp foi submetido à extração aquosa, sob refluxo a 60 °C por 24 horas, e, ao extrato aquoso filtrado a quente, adicionou-se 10% de ácido tricloroacético para remoção de proteínas, que precipitam nesta etapa. Após centrifugação, ao sobrenadante obtido adicionou-se etanol (3:1, % v/v) para separar as moléculas de alta massa molar (precipitado) dos componentes de baixa massa molar (sobrenadante). O precipitado obtido foi dialisado em água corrente por 48 horas e liofilizado.

Extração alcalina

O líquen residual da extração anterior foi extraído com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH 0,5%, 1% e 2%, sucessivamente), e, extratos obtidos

foram submetidos ao mesmo processo para remoção de proteínas, filtrados por algodão e precipitados com etanol, e, então, dialisados e liofilizados.

5.5.3 Purificação dos polissacarídeos

As amostras obtidas através das extrações aquosa e alcalinas foram submetidas, ao processo de purificação de gelo e degelo (Gorin e Iacomini, 1984). Separadamente, cada amostra foi resuspendida em água destilada e congelada com posterior degelo à temperatura ambiente. Após centrifugação (7000 rpm por 30 minutos), têm-se frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis em água fria (precipitado). Este processo de gelo e degelo foi repetido até o momento em que os sobrenadantes não apresentassem mais precipitado após a liofilização.

5.5.4 Análise estrutural dos polissacarídeos

Hidrólise ácida e derivatização dos monossacarídeos

As amostras de polissacarídeos foram hidrolisadas, em capilares, com HCl 6 M a 100 °C por 2 horas. Após a hidrólise, 40 µg de cada amostra, seca e neutralizada, foram derivatizadas com 5 µL de solução de 2-aminoacridona (AMAC) 50 mM em DMSO: ácido acético (85:15). Após 15 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 5 µL de solução de cianoborohidreto de sódio 1 M, e as frações foram incubadas em banho a 37 °C por 16 horas que, em seguida, foram adicionados 5 µL de glicerol 60%.

Os padrões escolhidos de monossacarídeos – frutose, manose, glicose, galactose, ácido glucurônico e ácido galacturônico foram submetidos às mesmas condições de derivatização com AMAC e cianoborohidreto que as amostras de polissacarídeos.

FACE (*Fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis*)

A FACE foi realizada em sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell com lâminas de 7,2 cm com espaçadores de 0,75 mm. A corrida eletroforética foi realizada em gel de acrilamida-bisacrilamida 25%, preparados em sistema-tampão tris-borato pH 7,0 e 6,8 e a corrida em tampão tris-Glicina-borato pH 8,3. Solução para dois géis de separação dos monossacarídeos (resolving gel) foi

preparada a partir de 6,25 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida (38% de acrilamida e 2% de bisacrilamida), 2,5 mL de tampão tris-borato pH 7,0 (0,75 M de tris e 0,5 M de ácido bórico) e 1,25 mL de água destilada. Para iniciar a polimerização dos géis foram adicionados 70 µL de solução de persulfato de amônio 10% (APS) e 7 µL de N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamino (TEMED). Ver-teu-se a solução para o conjunto de lâminas do sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell e foi adicionado butanol ao topo para total polimerização. Os géis de entrada (stacking gel) foram preparados com 2,20 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida (9,75% de acrilamida e 0,25 % de bisacrilamida), 1,0 mL de tampão tris-borato pH 6,8 (0,5 M de tris e 0,5 M de ácido bórico) e 0,8 mL de água destilada. Depois que o butanol foi removido, adicionou-se 50 µL de APS 10% e 10 µL de TEMED a solução do stacking gel, e em seguida, ver-teu-se a mesma sobre o resolving gel, colocando os pentes de amostra para total polimerização do stacking gel. Decorrido a polimerização dos géis, 150 mL de tampão de corrida tris- Glicinaborato pH 8,3 (0,12 M tris/ 0,1 M Glcina/ 0,1 M borato) foi adicionado no anodo, em seguida, os pentes de amostra foram removidos e 2-4 µL das amostras e padrões foram aplicados. O catodo foi preenchido com aproximadamente 500 mL de tampão de corrida Tris-Glcina-borato e a corrida eletroforética foi realizada sob uma diferença de potencial de 100 V por cerca de 20 minutos, em seguida, aumentada para 220 V até o fim da corrida. A migração dos monossacarídeos foi acompanhada utilizando luz UV 320-400 nm (luz negra). Após a corrida, as imagens foram digitalizadas em GelDoc-It Imaging System (transluminador UV com filtro em 365 nm e Câmara Scientific Grade CCD GelCam 310), em diferentes tempos de exposição.

As análises de hidrólise e derivatização de monossacarídeos, bem como a *FACE* foram realizadas no Laboratório de Glicoconjugados no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob a supervisão do Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar.

UFLC (*Ultra- fast liquid chromatography*)

As análises dos monossacarídeos foram realizadas em um cromatógrafo líquido ultra rápido (Prominence UFLC da Shimadzu), equipado com o software LC Solution, empregando uma coluna de fase reversa C-18 ZORBAX ODS (150,0 x 4,6 mm, 5 µm), com coluna de guarda C-18 ZORBAX ODS (12,5 x 4,6 mm, 5µm). Equipado

com autoamostrador (SIL-20ACHT UFLC) e detector fotométrico UV-VIS (SPD-20A UFLC) operando em 305 nm.

As análises de cromatografia líquida foram realizadas no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Instrumentação e Separações Analíticas (NUPIS), no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos.

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho e Raman

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrômetro FT-IR Alpha Bruker utilizando o modo transmissão suportado por pastilhas de KBr. Os espectros foram registrados na região espectral de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} e uma média de 256 acumulações. As medidas Raman foram realizadas em um equipamento Bruker RFS 100 com laser $\text{Nd}^{+3}/\text{YAG}$ operando em 1064 nm; os parâmetros utilizados foram resolução espectral de 4 cm^{-1} , média de 1024 acumulações e com potência nominal do laser variando de 80 mW.

Análise elementar dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio

As medidas dos teores percentuais de C, H e N foram realizadas no aparelho Perkin Elmer model 2400.

Análise termogravimétrica

Análise termogravimétrica foi realizada em um equipamento Mettler Toledo TGA/SDTA 851e com acurácia de 10^{-6} g . Em atmosfera de nitrogênio, as amostras foram aquecidas de 25 a $800 \text{ }^\circ\text{C}$ com uma taxa constante de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ e fluxo de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

As medidas de análises de análise elementar e termogravimétrica foram realizadas na faculdade de Química da *Jagiellonian University*, Polônia.

MEV

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em placas de silício com posterior revestimento com ouro através de um microscópio FEI, modelo Quanta 250 e trabalhando com 30 kV.

Determinação da Massa Molar

As análises para determinação da massa molecular foram realizadas utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano-ZS com comprimento de onda de laser em 633nm (laser de 4mW He-Ne) e um termostato 50 com estabilização de temperatura. Utilizou-se uma cela de vidro quadrada padrão com um volume de 4,5mL para leitura da massa molecular, e as amostras foram medidas a 25,2°C e a dispersão de luz foi detectada a 90°.

As análises para determinação da massa molecular foram realizadas no Laboratório de Nanotecnologia – Embrapa Gado de Leite sob a supervisão do dr. Humberto de Mello Brandão.

RMN

Os espectros de RMN ^{13}C e ^1H da glucana extraída foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III HD 500, onde 10 mg da amostra foram dissolvidas em 400 μL de DMSO – d_6 , e, experimentos envolvendo adição de D_2O também foram realizados.

5.6 Resultados e discussões

5.6.1 Extração, composição monossacarídica e purificação dos polissacarídeos

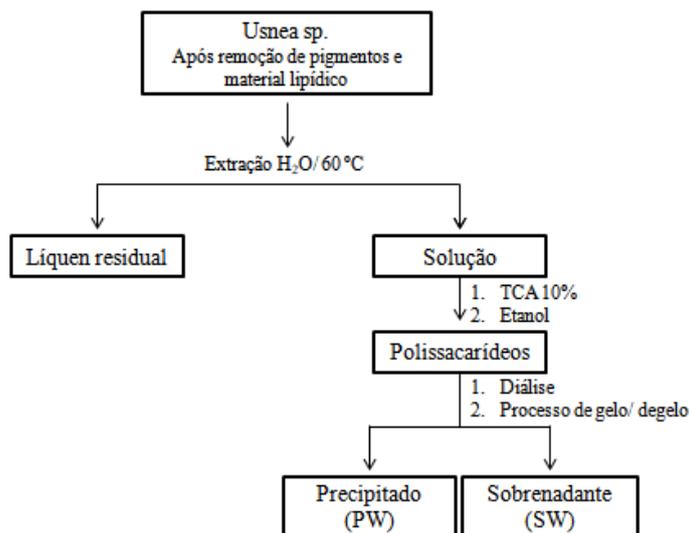
Neste trabalho, a espécie de *Usnea* sp foi estudada quanto aos seus componentes polissacarídicos. Conforme descrito anteriormente na parte experimental, o líquen foi submetido ao processo de extração e purificação que, em geral, envolve a remoção de pigmentos, ácidos graxos e proteínas para uma melhor identificação dos carboidratos de alta massa molar.

A amostra (34 g) foi tratada, de forma sucessiva e exaustiva, com solventes orgânicos e o material residual submetido às extrações aquosa e alcalina com soluções de KOH 0,5; 1 e 2 % sob refluxo em banho com água fervente, durante 3 horas. Possíveis frações proteicas foram removidas nos extratos aquoso e alcalinos através da adição de ácido tricloroacético 10 %. Os polissacarídeos foram obtidos por precipitação com etanol (3:1 % v/v) e dialisados contra água corrente para remoção de

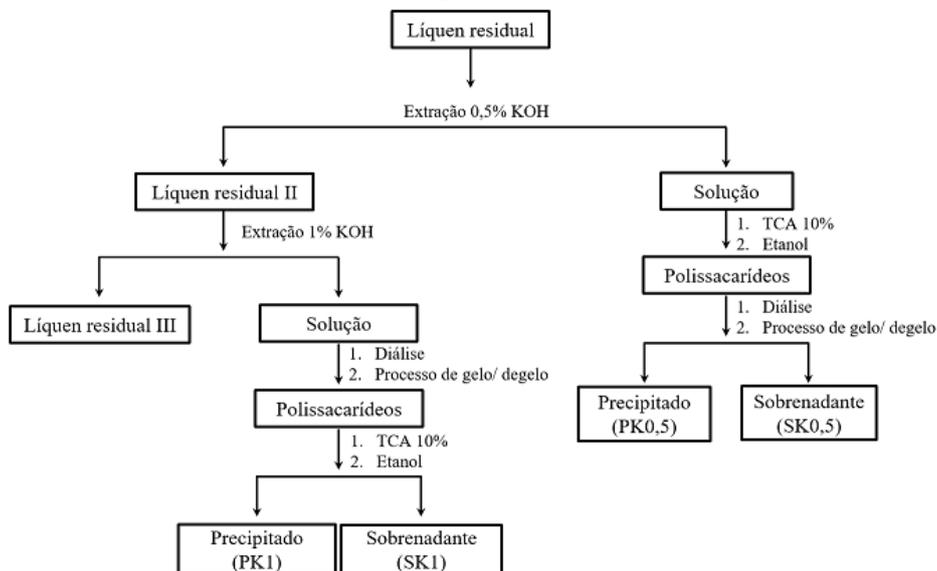
componentes de baixa massa molecular. A Figura 5.3 resume todos esses processos de extrações químicas, e, os códigos dados às amostras estão sumarizados na Tabela 10.

Figura 5.3: Esquemas relacionados à metodologia adotada para a extração de polissacarídeos da espécie de Usnea.

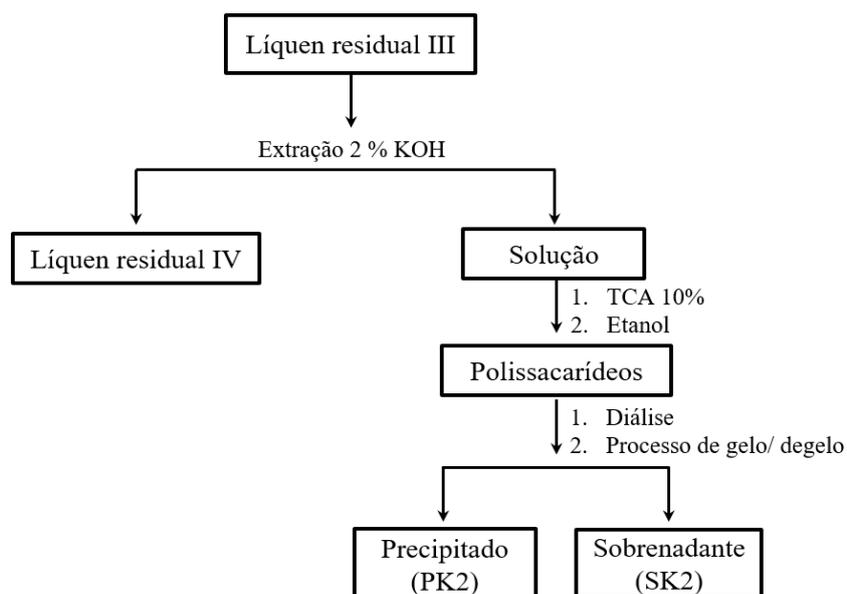
Esquema I



Esquema II



Esquema III



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Tabela 10: Códigos das frações polissacarídicas obtidas e as extrações a qual se referem.

Códigos das frações	Extração Aquosa		Extrações Alcalinas		
	Precipitado PW	Sobrenadante SW	% KOH	Precipitados	Sobrenadantes
			0,5	PK 0,5	SK 0,5
			1	PK 1	SK 1
			2	PK 2	SK 2

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

As extrações com solventes orgânicos facilitam a separação completa dos polissacarídeos de outros compostos que podem estar presentes na biomassa líquênica (Carbonero, Elaine R. *et al.*, 2006; Smiderle *et al.*, 2006; Guerra Dore *et al.*, 2007; Klaus *et al.*, 2011). A extração de polissacarídeos é, tradicionalmente, realizada com água, e, após precipitação com etanol e centrifugação, o sobrenadante é separado do resíduo.

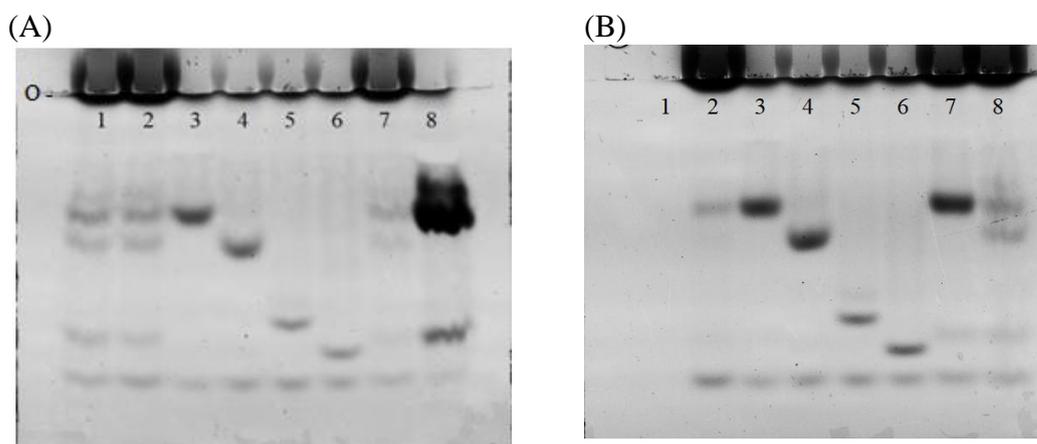
O resíduo liquênico remanescente da extração aquosa é, subsequentemente, extraído com soluções aquosas básicas de KOH de concentrações 0,5%, 1% e 2%. Estas concentrações podem variar de acordo com o objetivo do estudo (Smiderle *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2008; Synytsya *et al.*, 2009; Maity *et al.*, 2014). Mas, neste trabalho, tais condições foram propostas a fim de verificar se concentrações distintas de soluções alcalinas são necessárias para a extração de diferentes cadeias poliméricas.

A composição monossacarídica das frações SW, SK 0,5, SK 1, SK 2 e PW, PK1, PK2 foi avaliada por *Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE)* conforme já descrito na literatura (Da Cunha *et al.*, 2015). Após a hidrólise dos polissacarídeos, a derivatização ocorre com o fluoróforo AMAC (2-aminoacridona) sensível à detecção de monossacarídeos; AMAC é um composto aromático altamente fluorescente, que contém uma amina primária capaz de reagir com um grupo aldeído da extremidade reductora do carboidrato, e pode detectar níveis picomolares de monossacarídeos.

Os eletrofluorogramas (Figura 5.4) mostram que as frações do precipitado (PK 0,5, PK 1 e PK 2) e do sobrenadante (SK 0,5, SK 1 e SK 2) apresentam composição monossacarídica similar, com migração eletroforética correspondente aos padrões de glicose, galactose e pequenas porções de ácido urônico; este não identificado uma vez que o padrão de migração é intermediário aos ácidos urônicos usados como padrões. As amostras obtidas por meio da extração aquosa apresentaram um tempo de hidrólise muito baixo quando comparado às demais frações, representando frações de baixa massa molecular, não sendo, dessa forma, o foco da continuidade deste trabalho.

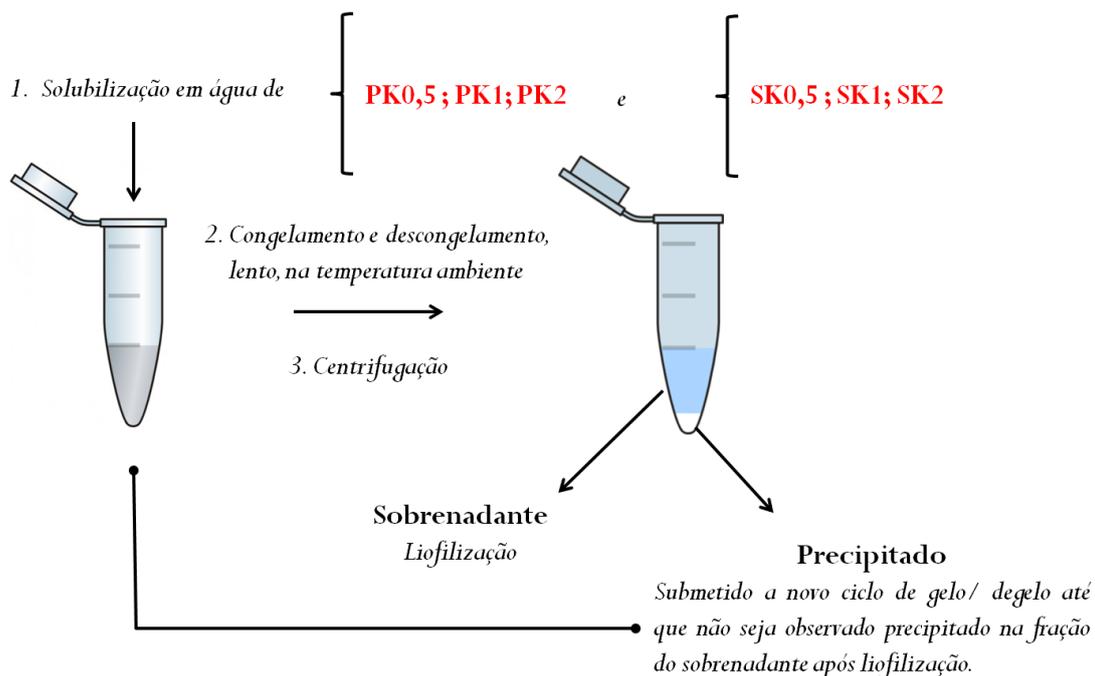
Etapas de purificação adicionais devem ser realizadas para que sejam obtidas frações polissacarídicas puras. Para a purificação de glucanas, o processo mais comum é o de gelo/ degelo das amostras. Neste processo, a fração bruta é congelada e, lentamente, descongelada à temperatura ambiente (Gorin e Iacomini, 1984), e, após a centrifugação, o precipitado é mais uma vez congelado e descongelado até que não é observada, através do processo de liofilização do sobrenadante, a formação de novos precipitados (Figura 5.5).

Figura 5.4: Eletrofluorograma dos monossacarídeos das frações extraídas e dos padrões marcados com fluoróforo 2-aminoacridona (AMAC). (A) 1: SW, 2: PW, 3: Glicose, 4: Galactose, 5: Ácido Galacturônico, 6: Ácido Glucurônico, 7: SK 2, 8: PK 2; (B) 1: PK 1, 2: SK 1, 3: Glicose, 4: Galactose, 5: Ácido Galacturônico, 6: Ácido Glucurônico, 7: SK 0,5, 8: PK 0,5. O: origem.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Figura 5.5: Representação do processo de purificação de congelamento e degelo.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Após os ciclos de gelo/ degelo, as massas obtidas para cada fração polissacarídica seguem:

SK0,5 (35,8 mg); PK0,5 (835, 2 mg)
SK1 (68,7 mg); PK1 (800, 2 mg)
SK2 (16,3 mg); PK2 (184, 6 mg)

O princípio deste método baseia-se nas diferenças entre os graus de ramificação das cadeias poliméricas; as moléculas lineares ou com poucas ramificações tendem a permanecer nos precipitados de gelo/ degelo, enquanto que aquelas com maior grau de ramificação permanecem solúveis no sobrenadante (Ruthes *et al.*, 2013).

As glucanas são, geralmente, encontradas na fração precipitada, e, dessa forma, as amostras PK 0,5, PK 1 e PK 2 passam a ser investigadas de forma mais contundente à respeito da presença de glucanas e suas características estruturais – ligação glicosídica, conformação estrutural, ramificações, morfologia e massa molecular.

A metodologia para a análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida ultra rápida (*Ultra fast liquid chromatography* - UFLC) foi otimizada baseando-se no método descrito por Dornellas (Dornellas, 2009), o qual determinou glicose, xilose e arabinose em amostras de forrageiras usadas na alimentação de ruminantes.

Os padrões de glicose, galactose e ácido galacturônico (ácido urônico) – composição monossacarídica revelada pela eletroforese em gel (*FACE*) antes do processo de purificação de gelo/ degelo – foram derivatizados com PABA (Ácido 4-aminobenzóico); a identificação dos monossacarídeos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção obtidos pela injeção de soluções padrões individuais de cada um dos monossacarídeos derivatizados, com os sinais obtidos para injeção das soluções padrões em uma mistura, bem como das amostras. O reagente PABA, assim como o AMAC utilizado na *FACE*, também permite a formação de grupos cromóforos nos monossacarídeos, e, é amplamente utilizado para a análise de carboidratos por cromatografia líquida (Meyer *et al.*, 2001; Sanz e Martínez-Castro, 2007; Dornellas, 2009; Silva *et al.*, 2013).

A condição otimizada para a análise simultânea por UFLC de glicose, galactose e ácido galacturônico, bem como das amostras poliméricas com derivatização com PABA para detecção no UV, está descrita na Tabela 11.

Para a determinação da composição monossacarídica por UFLC, as amostras foram hidrolisadas, e, os padrões de glicose, galactose e ácido galacturônico, e também as amostras de polissacarídeos foram derivatizadas com PABA de acordo com os esquemas da Figura 5.6.

Tabela 11: Condição otimizada para análise dos monossacarídeos selecionados por UFLC.

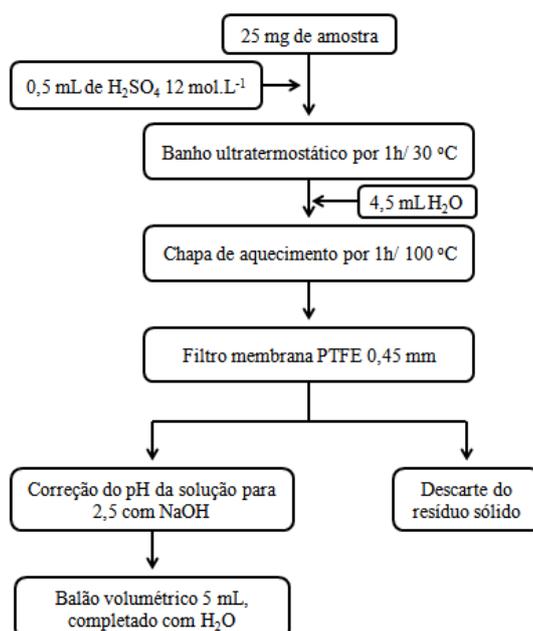
Condições estabelecidas	
Coluna	Fase reversa C-18
Coluna de guarda	Fase reversa C-18
Modo de eluição	Isocrática
Fase móvel	ACN/ Solução de H ₃ PO ₄ pH = 2,10 (0,1: 99,9)
Fluxo da fase móvel	1,9 mL. min ⁻¹
Tempo total da análise	22 minutos
Deteção	Comprimento de onda de 305 nm

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

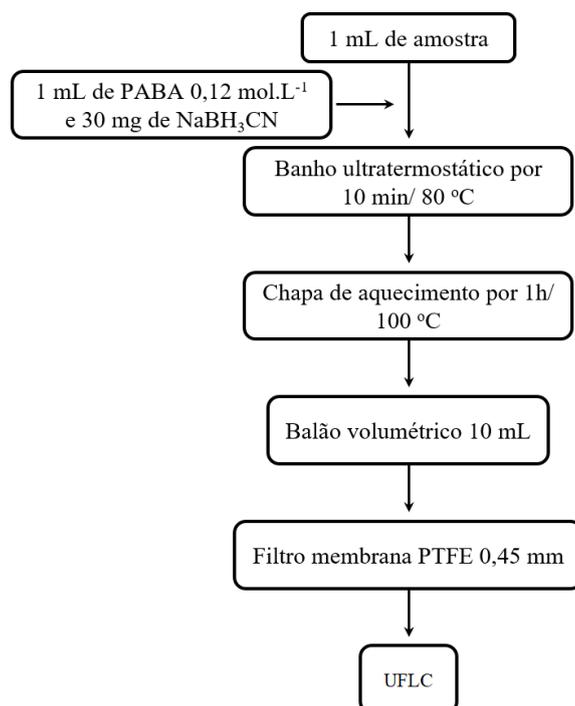
A derivatização é uma etapa crucial para a identificação dos monossacarídeos por UFLC. Através deste processo os monômeros podem ser detectados devido à sua absorção na região UV (305 nm). A eficácia da derivatização dos padrões e das amostras PK 0,5, PK 1 e PK 2 pode ser comprovada pela Figuras 5.7; nela é claro observar que a derivatização ocorre após a reação com o PABA, e, assim, a identificação dos monossacarídeos torna-se viável para as amostras.

Figura 5.6: Esquemas relacionados às metodologias adotadas para a hidrólise e derivatização dos polissacarídeos para análise por UFLC.

Esquema I: Hidrólise das amostras de polissacarídeos

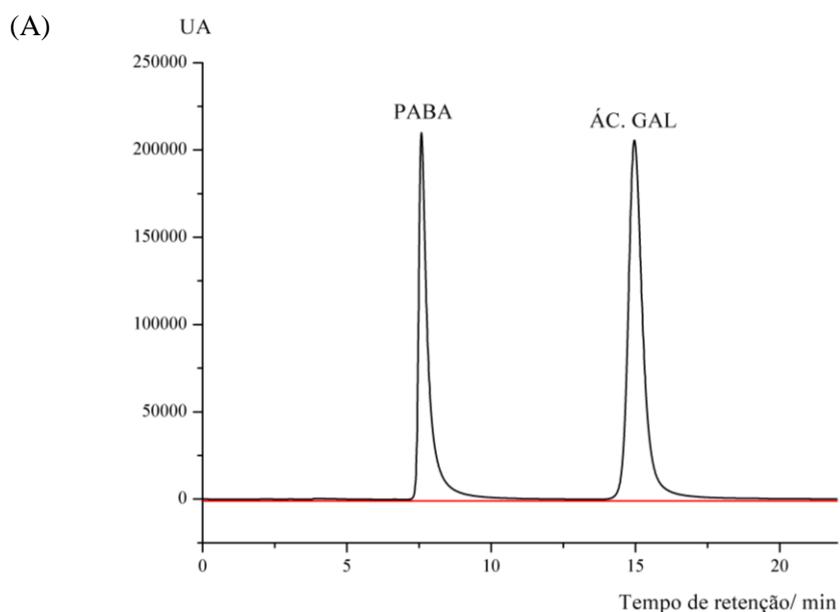


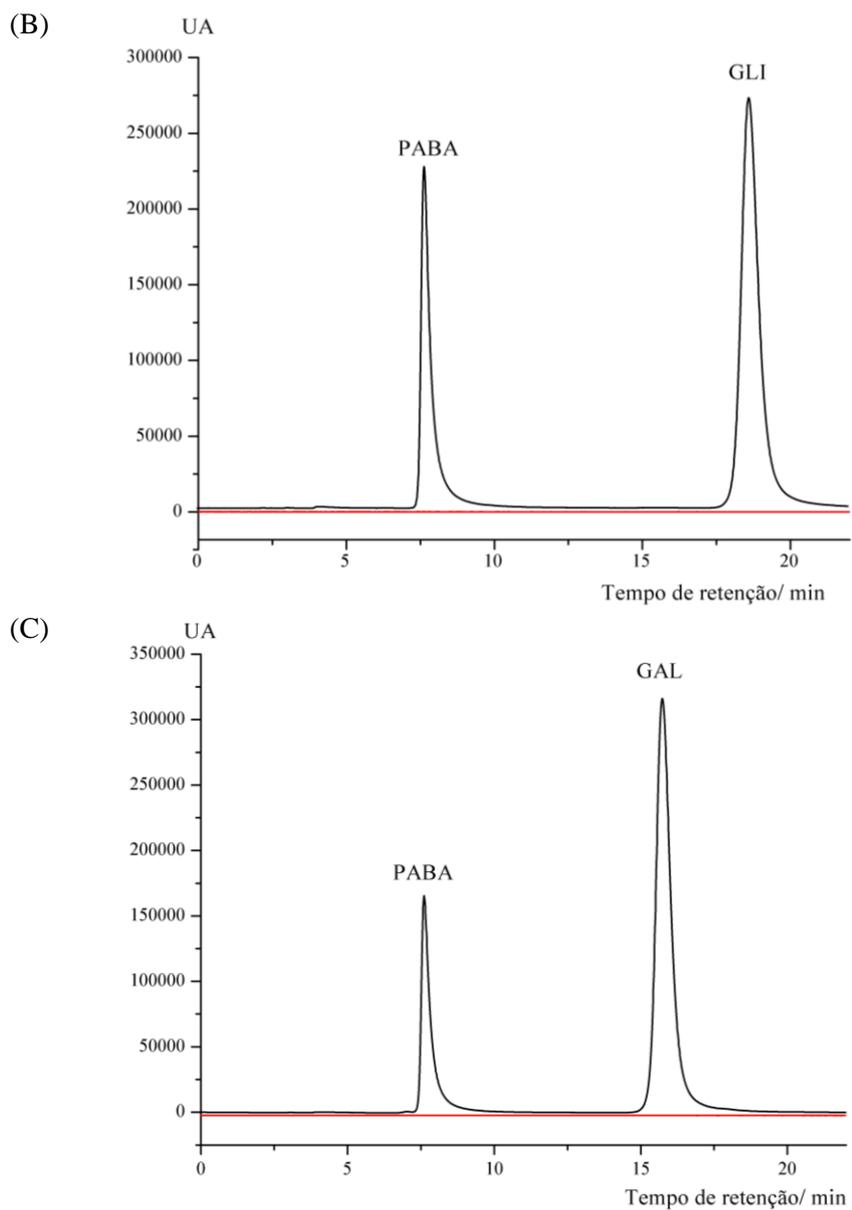
Esquema II: Derivatização dos padrões de monossacarídeos e das amostras



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Figura 5.7: Sobreposição dos cromatogramas dos padrões não derivatizados (vermelho) e derivatizados (preto) com o reagente PABA para cada analito. (A) Ácido galacturônico, (B) Glicose e (C) Galactose na concentração de 0,5 mg/ mL, com detecção em 305 nm.

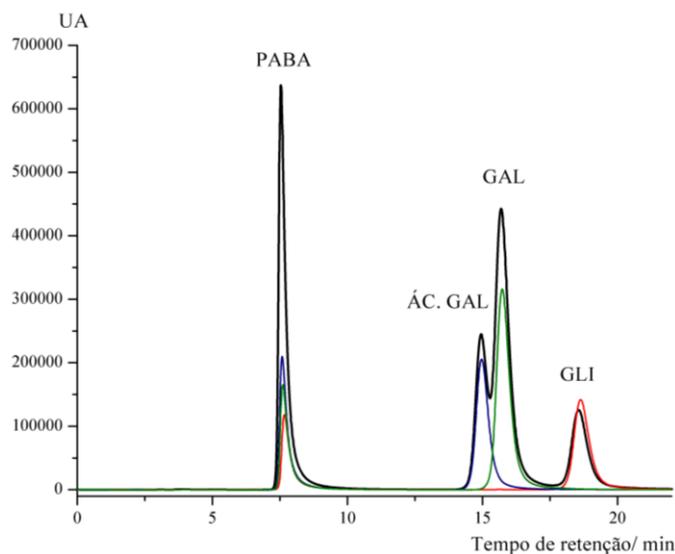




Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

A Figura 5.8 mostra um cromatograma de uma mistura dos padrões dos monossacarídeos – glicose, galactose e ácido galacturônico nas condições otimizadas de separação, e dos padrões injetados individualmente a fim de verificar se as condições adotadas para a análise é capaz de detectar todos os monossacarídeos foco deste estudo de forma simultânea.

Figura 5.8: Sobreposição dos cromatogramas de uma mistura dos padrões de monossacarídeos na concentração de 0,5 mg/ mL (preto) e dos padrões ácido galacturônico (azul), galactose (verde) e glicose (vermelho) injetados individualmente.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Os tempos de retenção obtidos nas condições otimizadas e a respectiva ordem de eluição obtida para análise em UFLC com detecção no UV dos três analitos, após derivatização com PABA, estão dispostos na Tabela 12.

Tabela 12: Ordem de eluição e tempos de retenção para separação por UFLC.

Analito	Tempo de retenção/ min
PABA	7,55
Ácido galacturônico	14,90
Galactose	15,63
Glicose	18,50

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

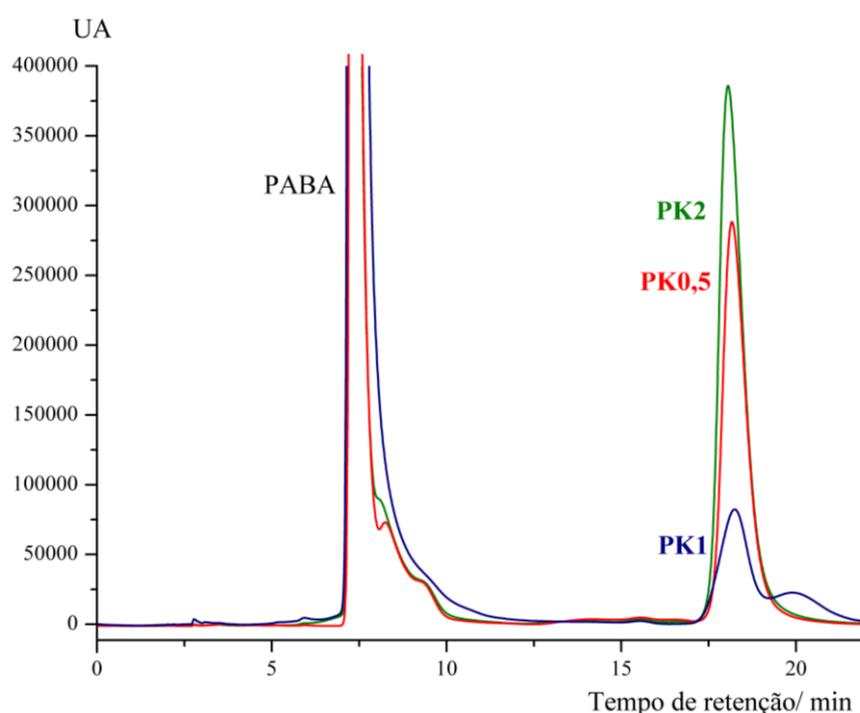
A condição otimizada para separação dos monossacarídeos, utilizando detecção na região do UV, apresentou resultados satisfatórios dos parâmetros cromatográficos (Tabela 12), com um tempo total de análise de 22 minutos.

A eficiência do método em separar e identificar os analitos de interesse permitiu que as amostras também fossem estudadas, no que diz respeito à composição monossacarídica, sob as mesmas condições de hidrólise, derivatização e análise por UFLC que os padrões.

Os cromatogramas da Figura 5.9 referem-se às amostras PK 0,5 (vermelho), PK 1 (azul) e PK 2 (verde). Exceto para a amostra PK 1, que apresentou um pico não identificado com tempo de retenção de 20 minutos, todas as amostras PK 0,5 e PK 2 contêm apenas o monossacarídeo glicose – tempo de retenção em torno de 18 minutos, evidenciando a eficácia da metodologia adotada para a purificação de glucanas, principal objeto deste estudo envolvendo os polissacarídeos liquênicos. Dessa forma, os monossacarídeos identificados na *FACE*, antes do processo de gelo/ degelo – galactose e ácido galacturônico foram separados da glicose com sucesso.

Como previsto, os polímeros de glicose tendem a permanecer no precipitado do processo de gelo/ degelo, evidenciando que estes, provavelmente, possuem poucas ramificações em sua estrutura. Ressalta-se que a amostra PK 1 também possui glicose em sua composição, mas não é majoritária como nas demais frações.

Figura 5.9: Sobreposição dos cromatogramas das frações polissacarídicas PK 0,5 (vermelho), PK 1 (azul) e PK 2 (verde) com a devida identificação do analito glicose (tempo de retenção ~ 18 minutos).



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

5.6.2 Caracterização estrutural das frações polissacarídicas por espectroscopia vibracional

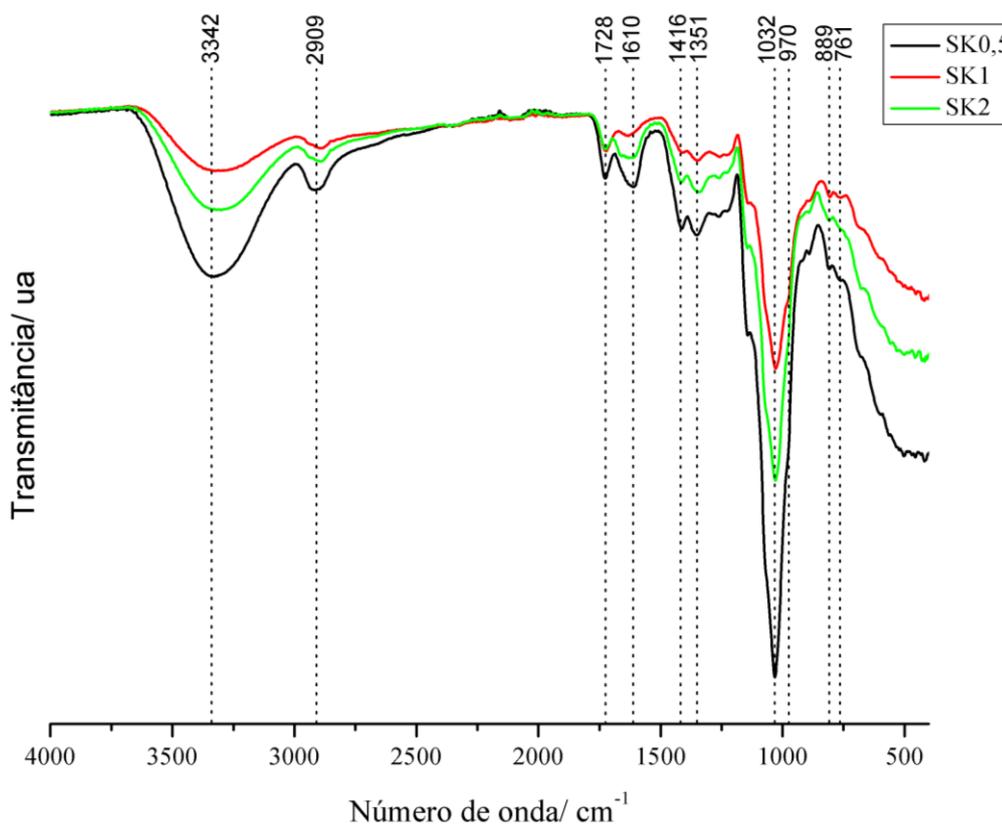
Ressalta-se que todas as caracterizações aqui descritas são feitas com as amostras devidamente liofilizadas.

5.6.2.1 Caracterização dos sobrenadantes SK 0,5; SK 1 e SK 2

Análise de composição monossacarídica das frações SK revelou a presença dos monossacarídeos glicose, galactose e algum derivado do ácido urônico (Figura 5.4). A identificação da glicose nestas frações sugere que nelas haja glucanas solúveis, provavelmente de cadeias ramificadas.

A Figura 5.10 mostra os espectros vibracionais na região do infravermelho destas frações solúveis em KOH, onde é possível identificarmos as principais bandas referentes aos monossacarídeos presentes nas amostras.

Figura 5.10: Espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras SK 0,5, SK 1 e SK 2.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Os espectros da Figura 5.10 são característicos para a presença de polissacarídeos. Destaca-se as bandas típicas para este tipo de material na região de 1430 a 1350 cm^{-1} referente aos movimentos de deformação angular dos grupos CH_2 e CH . De acordo com Wiercigroch (Wiercigroch *et al.*, 2017), a banda em 1221 cm^{-1} , atribuída ao modo τCH_2 , pode ser um importante marcador para a presença de glicose. A banda em 1030 cm^{-1} é associada à vibração da ligação C1-O-C5 do anel da molécula de glicose (Wu *et al.*, 2012), podendo evidenciar a presença de glucanas solúveis.

A galactose é um isômero da glicose com orientação diferente para o grupo OH do carbono C-4. Desta forma, a diferenciação entre ambas pelo espectro vibracional é dificultada, apesar de estudos relatarem que a banda 970 cm^{-1} é característica do modo $\delta(\text{CO})$ do C-4 da galactose, e em 761 cm^{-1} tem-se o modo $\delta(\text{CCC})_{\text{no plano}}$ do anel deste mesmo monossacarídeo (Wiercigroch *et al.*, 2017). Em contrapartida, as bandas do derivado do ácido urônico são facilmente observadas em 1728, 1610 e 1416 cm^{-1} , bandas estas características do grupamento COOH do anel urônico.

Tabela 13: Tentativa de atribuição vibracional para as frações SK 0,5, SK 1 e SK 2.

IV/ cm^{-1}	Modo vibracional
3342 m	$\nu(\text{OH})$
2909 w	$\nu(\text{CH}_2)$
1728 w	$\nu(\text{C}=\text{O})$ ácido urônico
1610 w	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ácido urônico
1416 m	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ácido urônico
1351 m	$\delta(\text{CH}_2)$
1221 w	$\tau(\text{CH}_2)$ glicose
1030 s	$\nu(\text{C1-O-C5})$ glicose
970 sh	$\delta(\text{CO})$ C4- galactose
889 w	Ligação β – glicosídica
761 w	$\delta(\text{CCC})_{\text{no plano}}$ galactose

Abreviações: s, *strong* (forte); m, *medium* (médio); w, *weak* (fraco).

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

A Tabela 13 resume a atribuição vibracional das principais bandas dos monossacarídeos SK 0,5, SK 1 e SK 2 – glicose, galactose e ácido urônico. Como o enfoque deste estudo são os polímeros de glicose insolúveis em água, a purificação destas frações para a caracterização vibracional não é destacada neste trabalho. Mas, sugere-se que a composição monossacarídica destas frações é, basicamente, a mesma independente das concentrações de KOH usadas para as etapas de extração.

5.6.2.2 Caracterização dos precipitados PK 0,5, PK 1 e PK 2

Os espectros vibracionais no infravermelho, estão mostrados na Figura 5.11 para as frações polissacarídicas PK 0,5, PK 1 e PK 2.

As glucanas α ou β são polissacarídeos compostos por monômeros de glicose que diferem apenas na configuração da posição C1 anomérica, e, os espectros vibracionais, Raman e no infravermelho, na região de 900- 800 cm^{-1} , são sensíveis à ligações glicosídicas.

Estudos em uma série de monômeros mostraram que as vibrações de deformação angular do grupo C1-H são características na região 905-885 cm^{-1} para a conformação β , e para o tipo α , entre 865-835 cm^{-1} (Cael *et al.*, 1974; Corbett *et al.*, 1991).

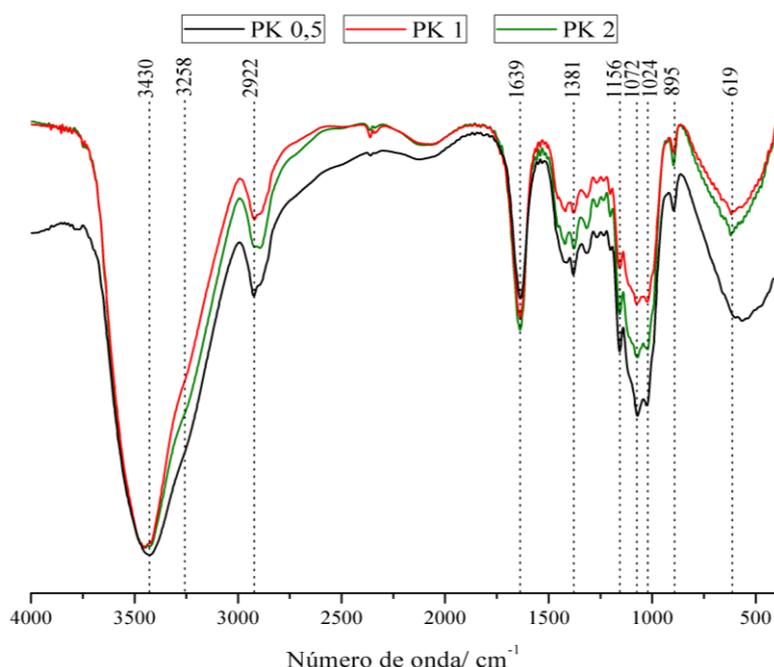
Os espectros no infravermelho (Figura 5.11) são bastante similares, e, indicativos da presença de β - glucanas nas frações polissacarídicas. A banda larga centrada em 3430 cm^{-1} é característica do modo $\nu(\text{OH})$, e o ombro deslocado para menor número de onda, 3258 cm^{-1} , pode ser uma evidência de interações de hidrogênio intra ou intermolecular. A banda em 2922 cm^{-1} pode ser atribuída à vibrações de estiramento do grupo CH_2 nos açúcares. A Figura 5.12, na faixa espectral de 1800-400 cm^{-1} , mostra com mais detalhes as bandas características da presença de β -glucanas.

A banda em 1639 cm^{-1} característica do modo $\delta(\text{H}_2\text{O})$ pode ser um forte indício, juntamente com as bandas já descritas em 3430 cm^{-1} , de que moléculas de água estejam presentes na rede polimérica mesmo após a liofilização dos materiais.

O ombro observado em 1459 cm^{-1} pode ser atribuído ao modo $\delta(\text{CH}_2)$ no plano do grupo CH_2OH de açúcares. Wetzel e colaboradores (Wetzel *et al.*, 2003) relataram que a banda em 1420 cm^{-1} é típica de β -glucanas apesar de estar presente também nos polímeros de celulose e hemicelulose.

As bandas na região de 1440-1200 cm^{-1} são atribuídas, principalmente, às deformações no plano do anel e dos grupos CH e OH (Novák *et al.*, 2012). A região de 1200-900 cm^{-1} (estiramento das ligações COC e CC) são características dos polissacarídeos e pode ser usado para sua identificação (Kačuráková *et al.*, 1998). As bandas em 1202 e 1156 cm^{-1} são únicas para β -glucanas, e assim, estas podem ser facilmente diferenciadas de outros biopolímeros. Em 896 cm^{-1} , observa-se uma banda característica da ligação β -glicosídica, e a ausência de banda na região de 840 cm^{-1} indica ausência de ligações do tipo α - as frações polissacarídicas em questão não possuem ligações do tipo mista (α e β).

Figura 5.11: Espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras PK 0,5, PK 1 e PK 2 na região de 4000-400 cm^{-1} .



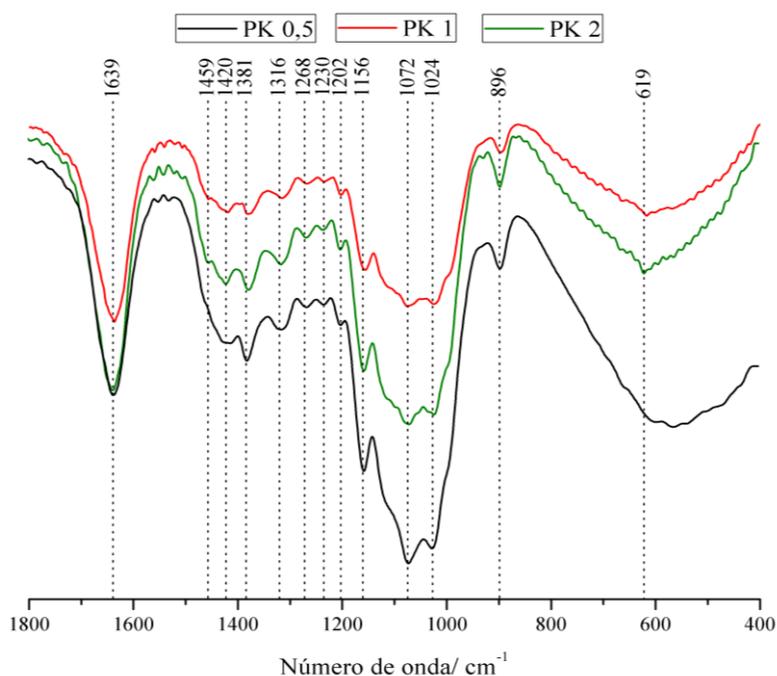
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

De acordo com Synytsya (Synytsya *et al.*, 2003), espectroscopia Raman tem sido amplamente utilizada nas investigações de polissacarídeos, principalmente por complementar a análise estruturais dos carboidratos. As atribuições vibracionais, Raman e no infravermelho, encontram-se resumidas na Tabela 14.

A Figura 5.13 exibe os espectros Raman das amostras PK 0,5, PK 1 e PK 2. As bandas mais importantes, 895 $\delta(\text{C1-H})$ e em 424 cm^{-1} – atribuído à deformação do

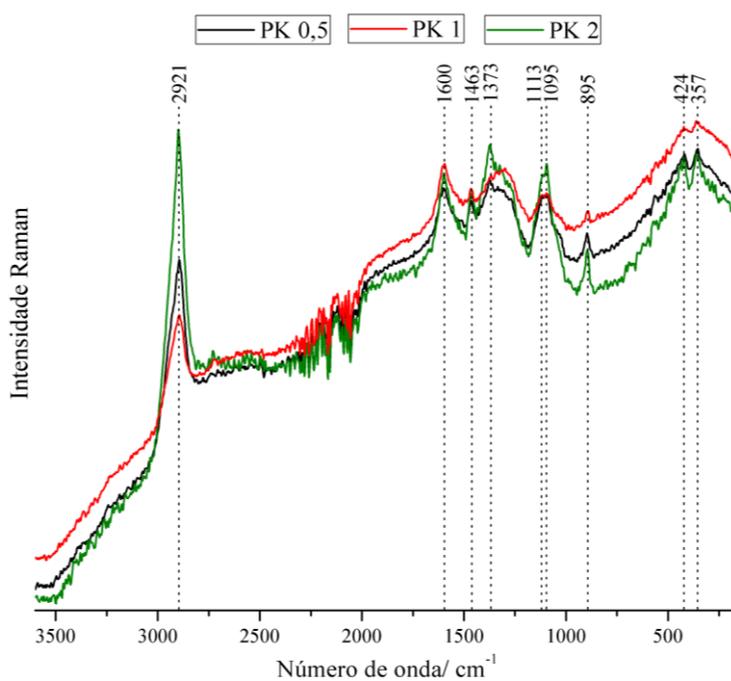
esqueleto dos anéis piranosídicos de glucanas (Noothalapati *et al.*, 2016) – concordam com a identificação deste tipo de polissacarídeo de glicose.

Figura 5.12: Espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras PK 0,5, PK 1 e PK 2 na região de 1800-400 cm^{-1} .



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Figura 5.13: Espectros Raman das amostras PK 0,5, PK 1 e PK 2.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Tabela 14: Tentativa de atribuição vibracional para as frações PK 0,5, PK 1 e PK 2.

Atribuições/ cm^{-1}		Modo vibracional
IV	Raman	
3430 s		$\nu(\text{OH})$
3258 sh		$\nu(\text{OH})$ – ligação de H
2922 m	2921 s	$\nu(\text{CH})$
1639 s		$\delta(\text{H}_2\text{O})$
	1600 m	
1459 sh	1463 m	$\delta(\text{CH}_2)$
	1373 m	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{OH})$
1202 w		$\delta(\text{CH})$
1156 m	1113 m	$\nu(\text{C-O-C})$
1072 s	1095 m	$\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$
1024 s		$\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$
896 m	895 m	$\delta(\text{C1-H})$ – ligação β glicosídica
	424 m	Deformação do esqueleto – marcado não específico de glucanas

Abreviações: s, *strong* (forte); m, *medium* (médio); w, *weak* (fraco).

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Enquanto as bandas em 1095 e 1113 cm^{-1} são relacionadas aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo C–O–C da ligação glicosídica, a banda em 1373 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação angular dos grupos CH e C3-OH (Mangolim *et al.*, 2017). Esta região espectral é claramente diferente para a fração PK 1, o que poderia justificar o aparecimento de outro analito no seu cromatograma (Figura 5.9). Por fim, a banda em 1463 cm^{-1} é resultado das vibrações do grupo $\text{CH}_2\text{-OH}$ dos monômeros de glicose (Ramazan e Joseph, 2007).

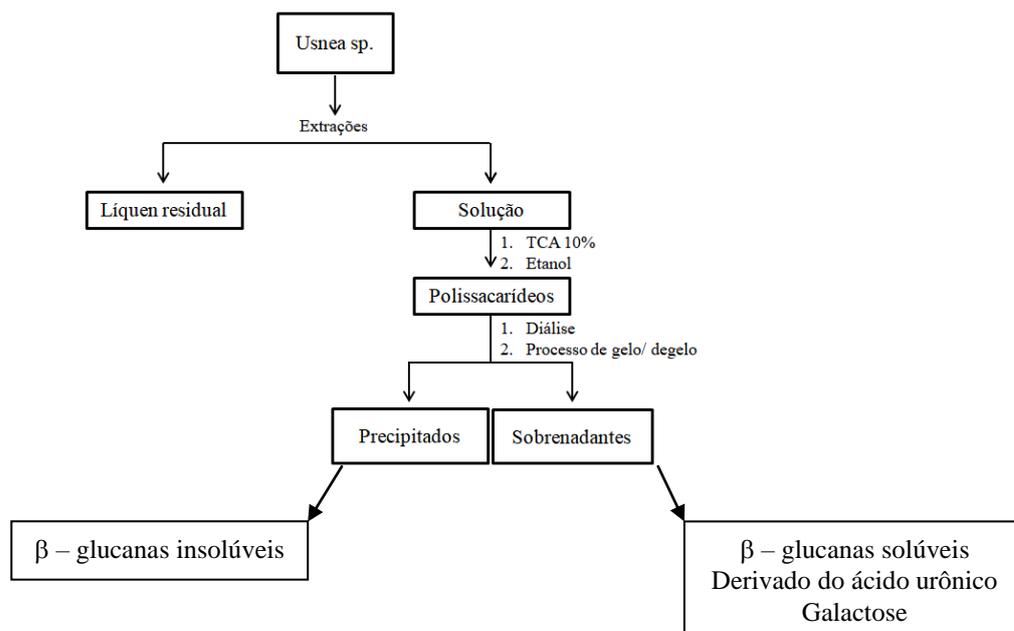
Analisando os espectros Raman das amostras PK 0,5, PK 1 e PK 2, a intensa banda em 1600 cm^{-1} – comum em todos os espectros – é no mínimo, intrigante para a análise dos polissacarídeos de glicose. De acordo com o conhecimento dos autores

deste trabalho, esta banda apenas havia sido relatada em polímeros de glicose em um único estudo, que envolve a influência do stress hidrodinâmico na composição polissacarídica da parede celular de algas. Em tal estudo, os autores atribuem uma banda larga centrada em 1600 cm^{-1} a vibrações de grupos carboxil, não usuais, no espectro Raman de celulose.

Não sendo comum para as glucanas em estudo, a presença desta banda Raman, passa a ser foco deste estudo, principalmente no que concerne à sua possível correlação com a organização estrutural do polímero. Outras técnicas de elucidação estrutural serão descritas para melhor compreensão do espectro Raman destas frações poliméricas.

A Figura 5.14 resume, após as extrações e purificações adotadas, as características dos polímeros obtidos de acordo com a espectroscopia vibracional.

Figura 5.14: Resumo dos polímeros caracterizados pela espectroscopia vibracional.



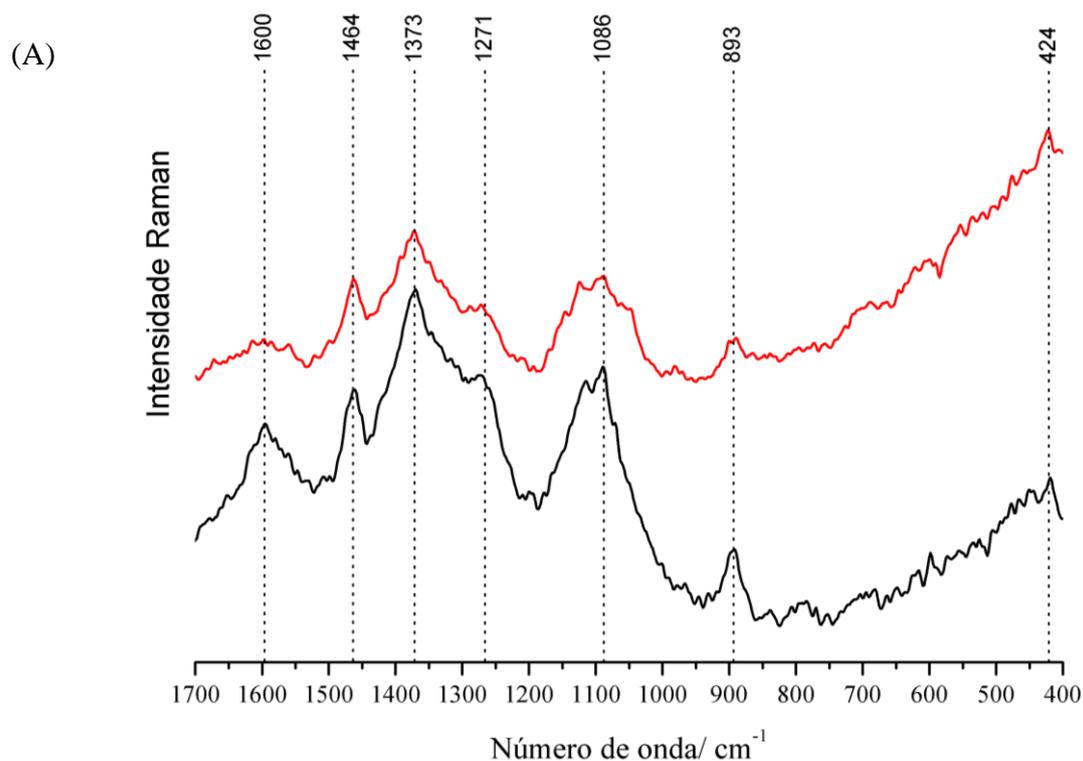
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

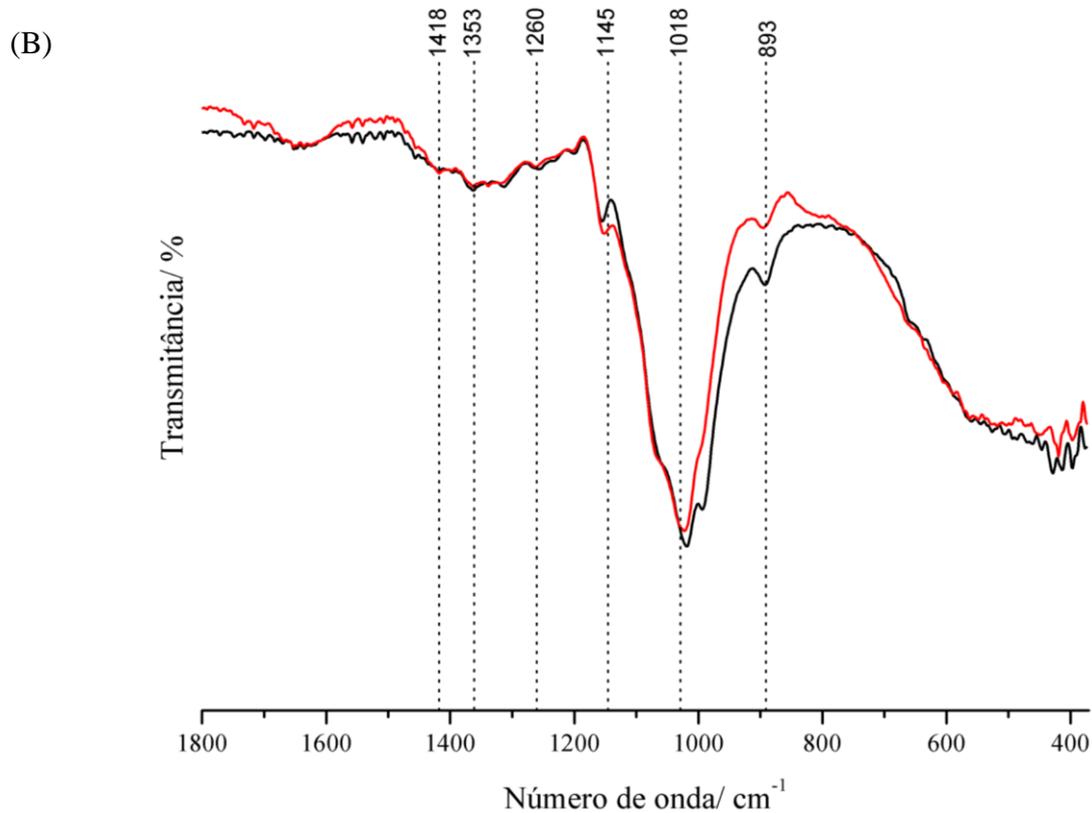
A primeira ideia relacionada à presença da banda, nos espectros Raman, em torno de 1600 cm^{-1} , é que ela esteja relacionada à solubilidade do material, e, portanto, intimamente correlacionada à estrutura organizacional destes polímeros de glicose. Comparando-se os espectros vibracionais (Figura 5.15), do precipitado PK 0,5 com o precipitado obtido após liofilização do sobrenadante, após o 2º ciclo de gelo/degelo de PK 0,5, observa-se que ambos correspondem a espectros de β- glucanas. Porém, PK

0,5 contém uma glucana insolúvel em água, e outra solúvel por ter sido encontrada no seu sobrenadante liofilizado.

Concentrando a análise no espectro Raman, observa-se que, a diferença mais evidente entre os espectros é justamente, a banda em 1600 cm^{-1} – presente para a glucana insolúvel e praticamente ausente para a solúvel. Dessa forma, entende-se que, apesar de neste momento ainda ser difícil uma tentativa de atribuição para a vibração correspondente a esta banda, a mesma está intimamente relacionada à sua solubilidade.

Figura 5.15: Espectros vibracionais (A) Raman e (B) na região do infravermelho do precipitado PK 0,5 (preto) e do seu sobrenadante liofilizado de segundo ciclo de gelo/degelo (vermelho).





Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

5.6.3 Análise elementar (%CHN)

A Tabela 15 apresenta as porcentagens observadas de carbono, hidrogênio e nitrogênio para as frações polissacarídicas PK 0,5, PK 1 e PK 2. Os valores estão dentro do esperado para o monômero de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), apesar da amostra PK 1 apresentar uma baixa porcentagem de nitrogênio em sua composição.

Tabela 15: Resultados de análise elementar para as frações PK 0,5, PK 1 e PK 2.

Teores observados de carbono, nitrogênio e hidrogênio			
	%C	%N	%H
PK 0,5	42,06	0	6,492
PK 1	41,22	0,02	6,421
PK 2	41,30	0	6,422
Monômero de glicose	40,00	-	6,710

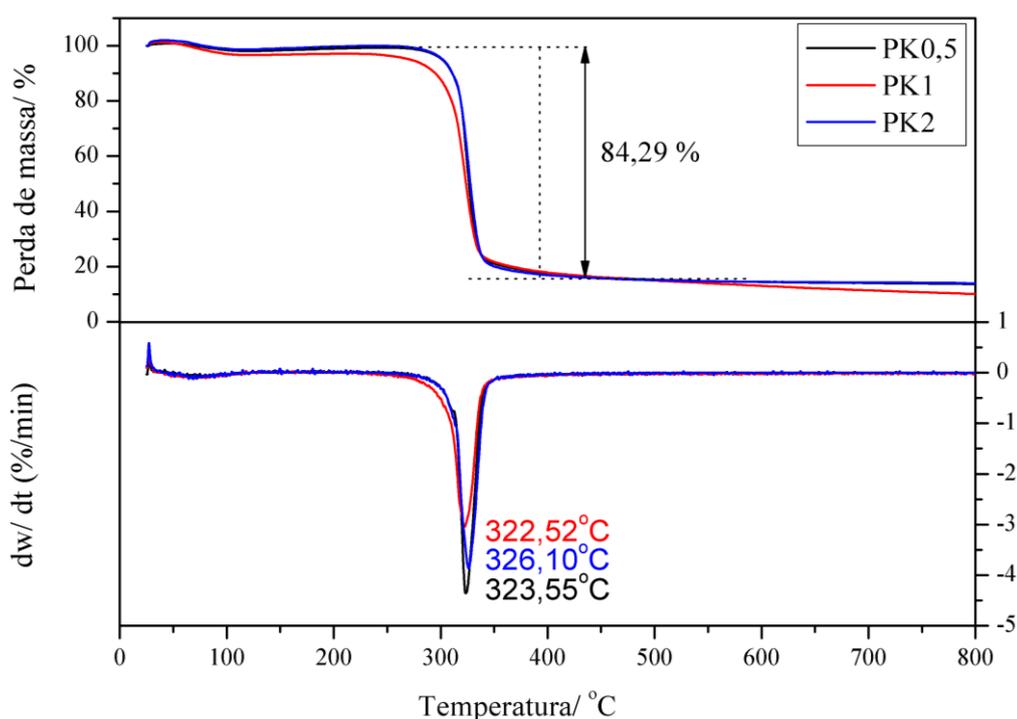
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Os dados de CHN corroboram para a presença de polímero de glicose, porém com a ressalva de que, possivelmente, moléculas de água façam parte da constituição do arranjo estrutural do polímero, desempenhando, provavelmente, um papel importante na estrutura da cadeia polimérica.

5.6.4 Análise termogravimétrica

As análises térmicas referentes às frações polissacarídicas PK 0,5, PK 1 e PK 2 são mostradas nas Figuras 5.16 e 5.17.

Figura 5.16: Análises térmicas TG e DTG referentes às amostras polissacarídicas.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

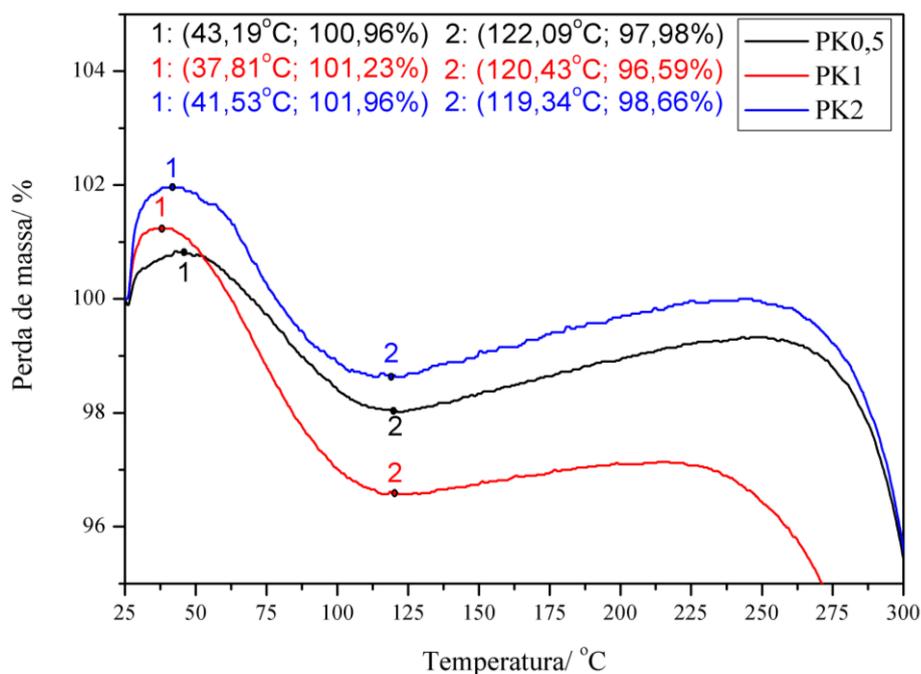
Podemos observar que todas as três curvas termogravimétricas apresentam perfis semelhantes no que se refere às perdas de massa. No geral, uma primeira perda de massa ocorre em, aproximadamente, 120 °C atribuída à saída de moléculas de água (Figura 5.17, ponto 2).

Em seguida, um único estágio de perda de massa é observado na curva TG entre 200 °C e 400 °C - perda de 84,29 % em massa, e confirmados na curva DTG por um pico em torno de 320 °C. Este último evento de perda de massa pode ser atribuído

à degradação térmica do polímero resultando na quebra das ligações C-C e glicosídica e consequente formação de uma variedade de hidrocarbonetos.

Uma avaliação da curva termogravimétrica no ponto 1 em destaque (Figura 5.17), pode inferir sobre uma importante propriedade deste polímero de glicose – a de adsorver gases em sua estrutura. Observa-se que todas as frações polissacarídicas em questão apresentaram um ganho de massa no início da curva termogravimétrica, indicando que, o gás N₂ inerte utilizado para as medidas, pode ter sido adsorvido e ocasionando o ganho de massa. Uma melhor avaliação da morfologia dos polímeros será feita pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), no próximo item descritivo de resultados.

Figura 5.17: Análises térmicas TG, região de 25 – 300 °C.



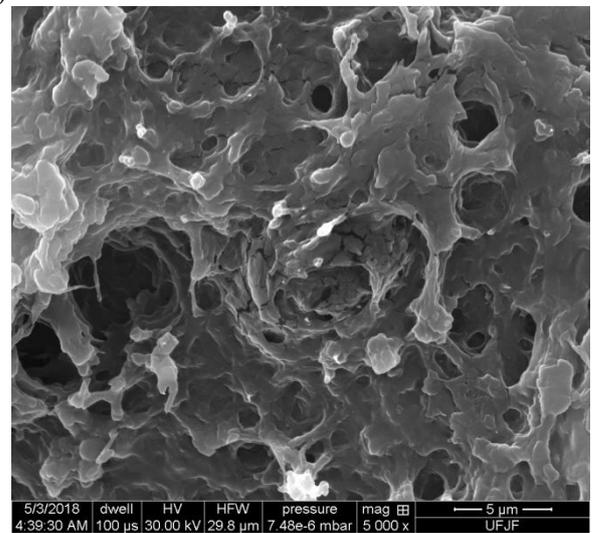
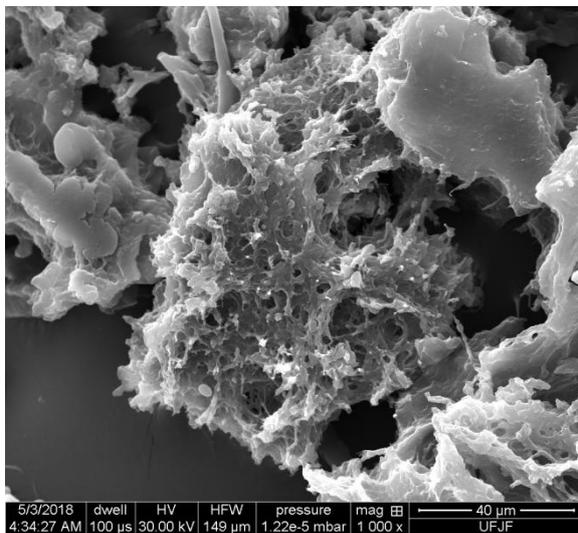
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

5.6.5 Microscopia eletrônica de varredura

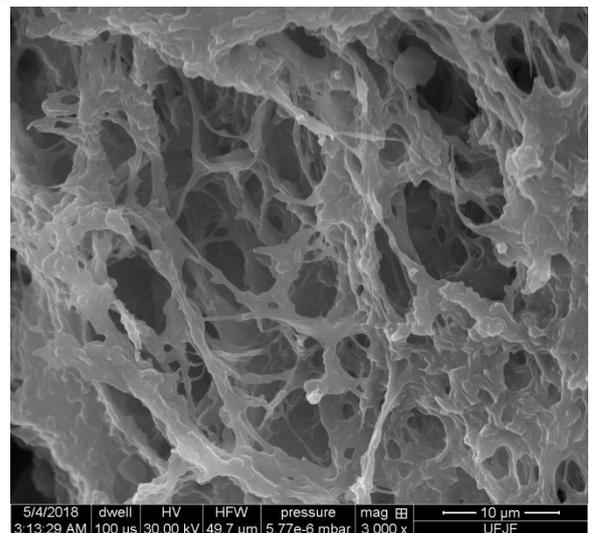
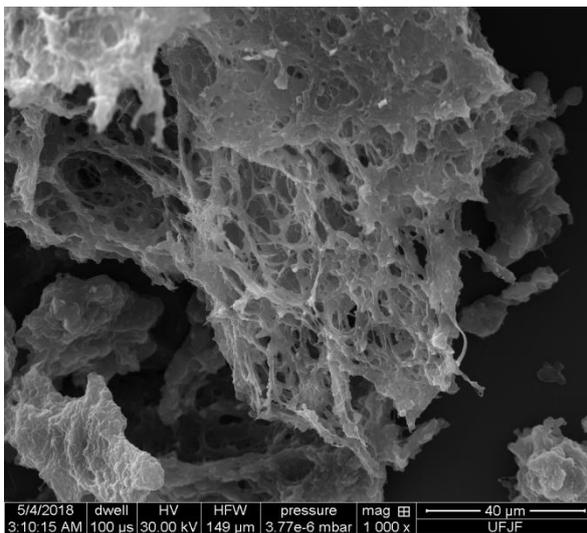
A Figura 5.18 mostra as imagens obtidas por microscópio eletrônico de varredura das amostras secas por liofilização e metalizadas com filme de ouro de 10 nm de espessura, examinadas com voltagem de aceleração de 30 kV e aumentos de 1000x, 3000x e 5000x.

Figura 5.18: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras de polissacarídeos.

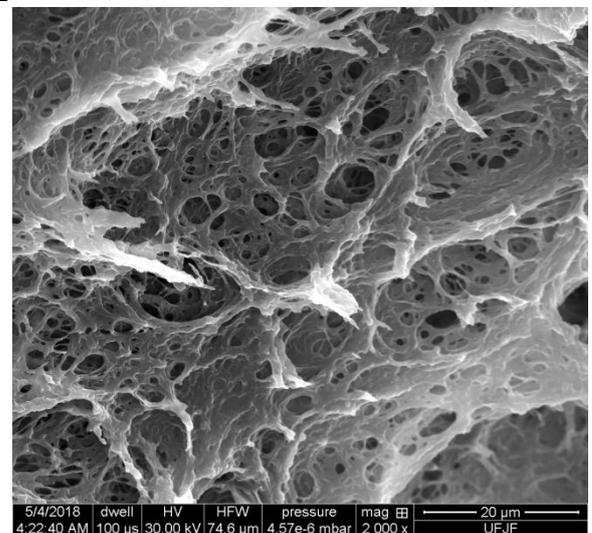
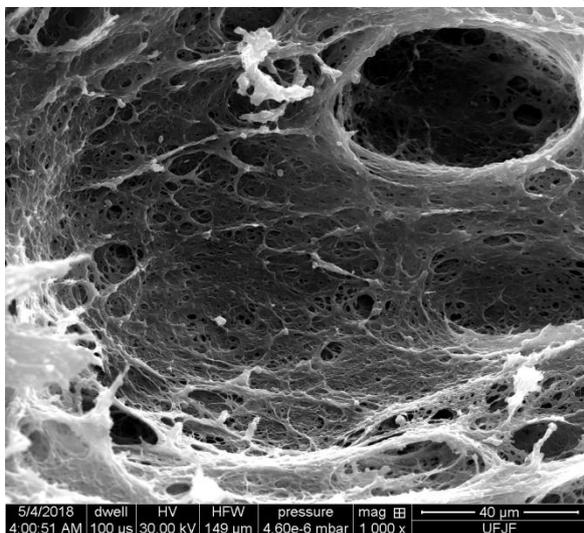
PK 0,5



PK 1



PK 2



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Em um estudo recente, micrografias de grânulos de β - glucanas obtidas de cogumelos revelaram a superfície rugosa com vincos e sulcos deste polímero (Ashraf Khan *et al.*, 2017). Byun et al. (Byun *et al.*, 2008) estudaram a presença de fissuras granulares na superfície de uma β -glucana de levedura contendo ligação glicosídica do tipo 1-3, 1-6.

A análise microscópica das glucanas (Figura 5.18) presente nas frações PK 0.5, PK 1 e PK 2 mostrou uma morfologia bastante similar entre as amostras, evidenciando, principalmente, que a estrutura polimérica é altamente porosa – apesar de observada a diferença na distribuição de tamanho dos poros. A estrutura morfológica reflete a complexidade das interações intra e intermoleculares na estrutura polimérica, e, resultados de vários estudos sugerem que temperatura e pH das extrações tem um efeito significativo sobre as propriedades, químicas e funcionais das β - glucanas (Ahmad *et al.*, 2010).

Outra evidência de que as metodologias de extração adotadas podem alterar a morfologia destes polímeros de glicose é relatada no estudo de Limberger- Bayer e colaboradores (Limberger-Bayer *et al.*, 2014). Constatou-se que, a morfologia das amostras analisadas, β - glucanas extraídas e comerciais é semelhante com uma aparência porosa e esponjosa, sem vestígios visíveis da estrutura da parede celular, apesar das diferenças na distribuição de tamanho e forma das partículas - β -glucanas extraídas tem uma distribuição de tamanho de partícula irregular e menor formando clusters, enquanto as β -glucanas comerciais apresentaram aglomerados mais redondos e homogêneos.

Dessa forma, entende-se que, os métodos de extração empregados neste trabalho, principalmente, concentração das extrações alcalinas e também, a metodologia de gelo/ degelo adotada para a purificação das glucanas, podem ter alterado a estrutura morfológica destes polímeros, e, provavelmente, intensificado algumas propriedades físico- químicas deste material.

5.6.6 Determinação da massa molecular - *DLS*

A distribuição da massa molecular é uma das características mais importantes para as β - glucanas, apesar dos valores relatados serem bastantes variáveis. Valores de massa molecular reportados na literatura estão entre $2,68 \cdot 10^4$ e $3 \cdot 10^6$ kDa para β -glucanas de cevada e aveia, mas essas diferenças podem ser ainda mais acentuadas de

acordo com a matéria prima, procedimentos de extração e métodos adotados para a determinação (Roubroeks *et al.*, 2000). Em contrapartida, as principais β - glucanas liquênicas, como as liquenanas, pustulanas e laminaranas, são reportadas com massa molecular entre 20-62 kDa (Olafsdottir e Ingolfsson, 2001).

As análises para determinação da massa molecular foram feitas através da construção de uma curva analítica de concentrações 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg/ mL. As amostras foram dissolvidas em DMSO (índice de refração 1,479) e o tolueno (índice de refração 1,496) foi usado como padrão de calibração do equipamento. As massas moleculares obtidas estão discriminadas na Tabela 16.

Tabela 16: Massas moleculares dos polímeros.

	Massa molecular/ kDa
PK 0,5	443 \pm 32,9
PK 1	318 \pm 18
PK 2	371 \pm 29,4

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Os resultados mostram que os polímeros são, razoavelmente, homogêneos no que diz respeito às suas massas moleculares – apesar da fração PK 0,5 ser da ordem de 400 kDa. Estes valores, quando comparados às massas moleculares de polímeros liquênicos já descritos na literatura, são indubitavelmente maiores (Olafsdottir e Ingolfsson, 2001). Com esta análise, entende-se que ou a metodologia adotada para a determinação da massa molecular não foi a mais adequada para a investigação das mesmas, ou estes polímeros possuem propriedades físico- químicas ainda não antes descritas.

5.6.7 Ressonância magnética nuclear

Espectros de ^1H de RMN foram obtidos como tentativa de elucidação da estrutura polimérica da β - glucana isolada. Aproximadamente 10 mg da amostra PK 0,5 liofilizada foi solubilizada em DMSO- d_6 para cada experimento. No intuito de entender o comportamento da amostra na presença de água, em alguns experimentos

foram adicionadas quantidades diferenciadas de D₂O, como descrito na Tabela 17. Todos os espectros foram calibrados em relação ao sinal do DMSO-*d*₆.

Tabela 17: Experimentos realizados para a obtenção de espectros de ¹H de RMN.

Experimento	Descrição
EXP- 1	10 mg de amostra em 400 µL de DMSO- <i>d</i> ₆
EXP- 2	10 mg de amostra em 400 µL de DMSO- <i>d</i> ₆ + 20 µL de D ₂ O
EXP- 3	10 mg de amostra em 400 µL de DMSO- <i>d</i> ₆ + 40 µL de D ₂ O
EXP- 4	10 mg de amostra em 400 µL de DMSO- <i>d</i> ₆ + 70 µL de D ₂ O
EXP- 5	10 mg de amostra aquecida à 120°C/ 2 dias e dissolvida em 400 µL de DMSO- <i>d</i> ₆
EXP- 6	EXP- 5 + 70 µL de D ₂ O
EXP- 7	10 mg de amostra aquecida à 200°C/ 2 dias e dissolvida em 400 µL de DMSO- <i>d</i> ₆
EXP- 8	EXP- 7 + 70 µL de D ₂ O
EXP- 9	400 µL de DMSO- <i>d</i> ₆ + 70 µL D ₂ O

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

A baixa solubilidade do material limitou o uso dos solventes deuterados ao DMSO-*d*₆, e, assim, para uma melhor compreensão dos prótons da estrutura polimérica, principalmente que no concerne à identificação do grupo OH e do próton anomérico, fez-se um estudo relacionado à adição de D₂O - experimentos 1, 2, 3 e 4 (Tabela 17).

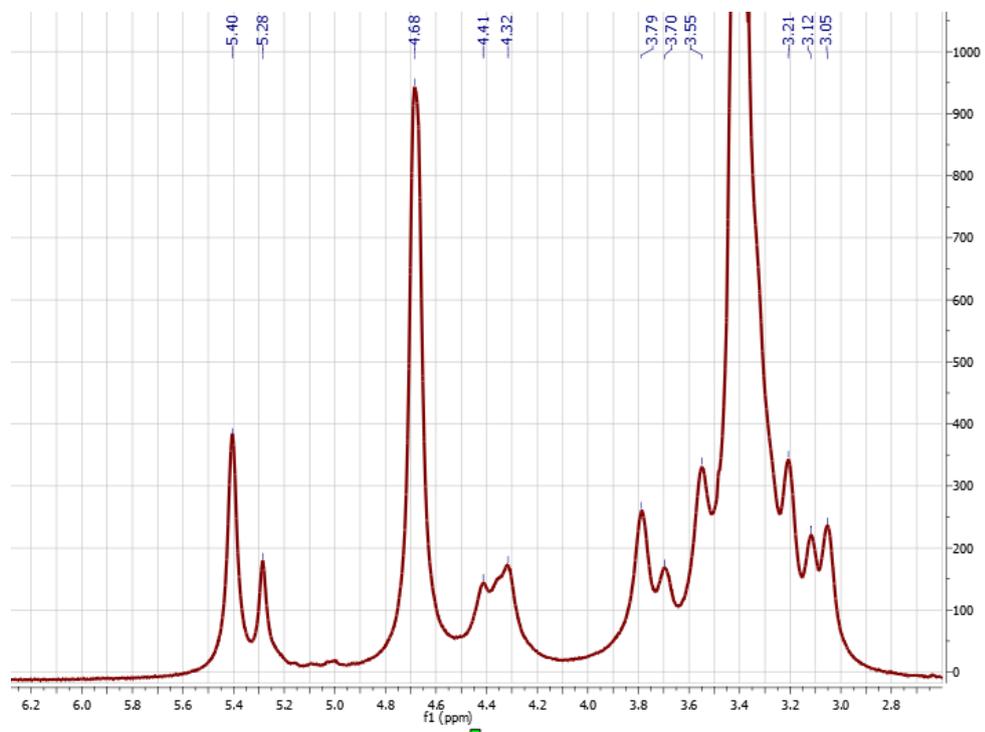
Os espectros de ¹H de RMN destes experimentos são exibidos na Figura 5.19, bem como os principais deslocamentos químicos (ppm) na Tabela 18.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é reconhecida como uma ferramenta poderosa na análise de polissacarídeos, apesar dos sinais dos prótons dos polissacarídeos se sobreporem na faixa de e 3,0 a 4,0 ppm, fator que dificulta as suas atribuições (Weller, 2017). Principalmente devido ao efeito de retirada de elétrons do oxigênio do anel piranosídico, os prótons anoméricos (H-1) dão origem a sinais fora desta região dos prótons de anel, entre δ 4.25 e 5.5 ppm. Como os prótons equatoriais experimentam uma mudança de aproximadamente δ -0,5 ppm em relação aos sinais de

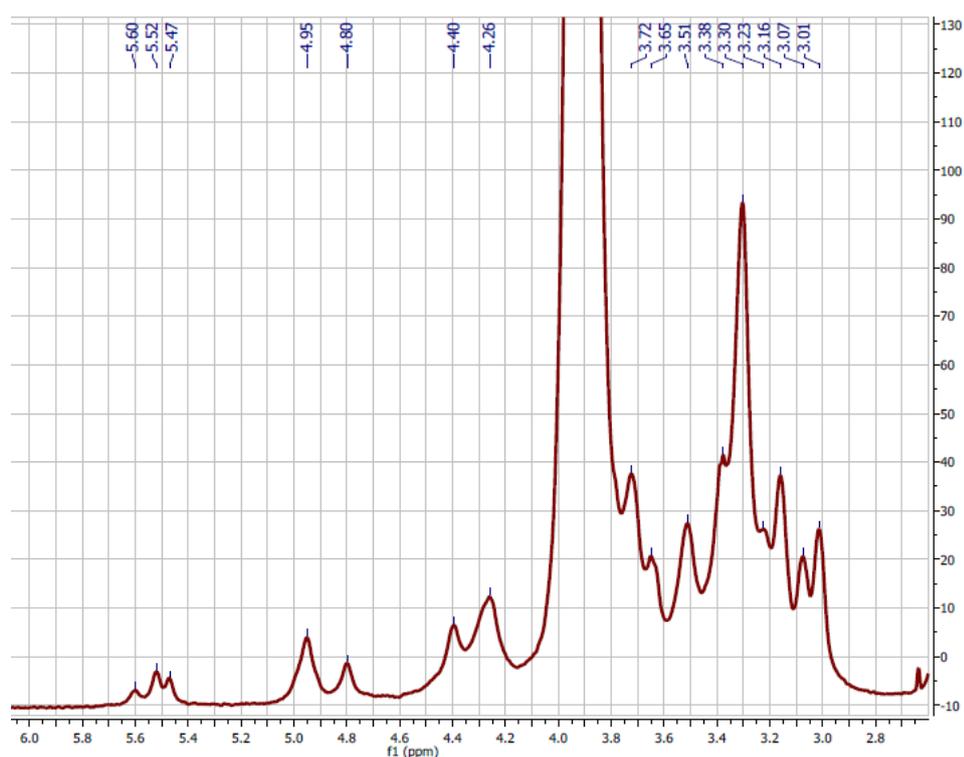
próton axiais, prótons α anoméricos de D- açúcares tendem a ser encontrados entre δ 4.9 e 5.5 ppm, e β prótons entre δ 4.3 e 4.7 ppm (Weller, 2017).

Figura 5.19: Espectros de RMN de ^1H dos experimentos 1, 2, 3 e 4, (500 MHz, DMSO-*d*6 ou DMSO-*d*6/D₂O).

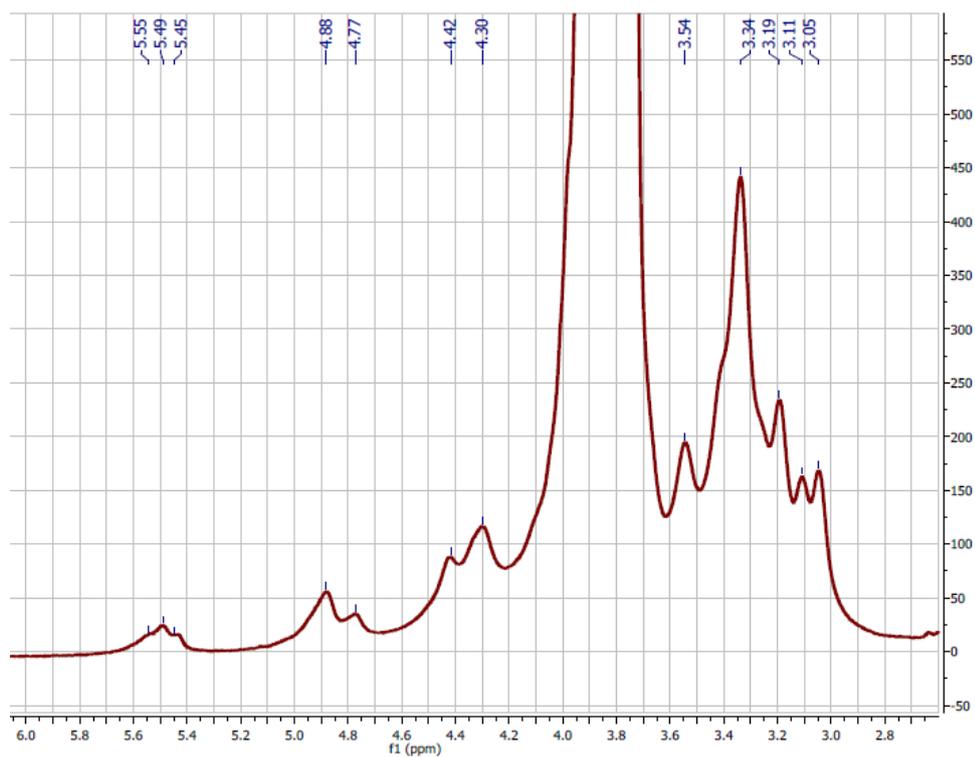
EXP- 1



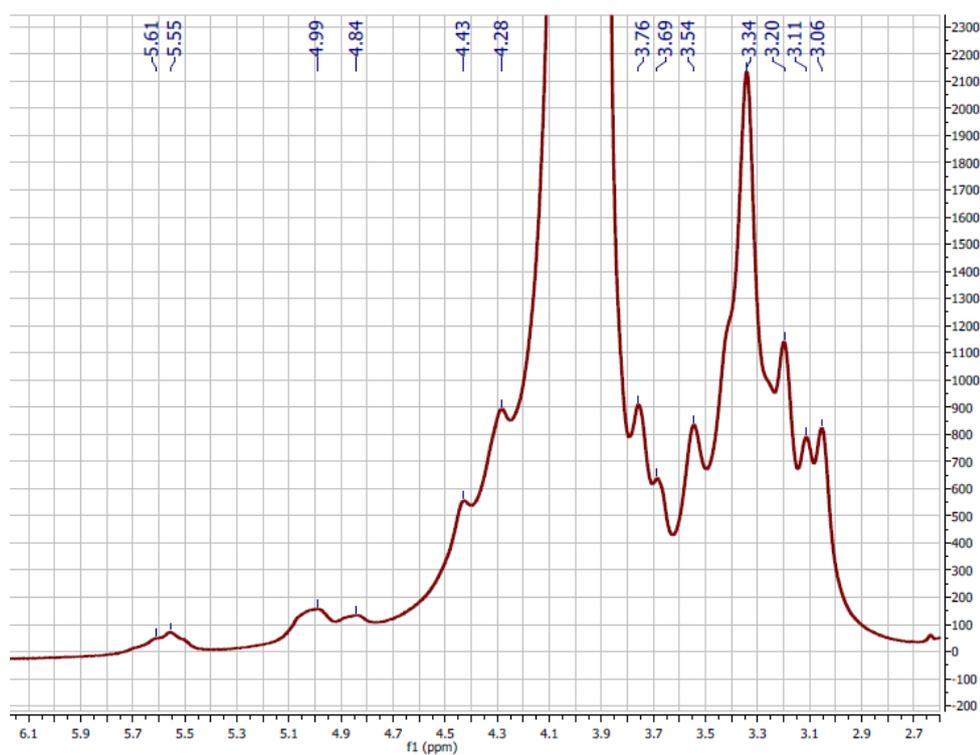
EXP- 2



EXP- 3



EXP- 4



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Baseado no espectro do EXP-1 (Figura 5.19) entende-se que os prótons anoméricos estão na faixa de δ 4.2 a 5.6 ppm, e para a sua correta identificação fez-se o estudo da mudança isotópica pela adição de D₂O. Comparando, nesta faixa espectral,

os experimentos 1, 2, 3 e 4, observa-se que os únicos sinais que não sofreram alterações consideráveis, em termos de intensidade e deslocamento químico, são os prótons em, aproximadamente, δ 4.3 e 4.4 ppm. Dessa forma, sugere-se que os prótons desta região sejam os anoméricos, na posição β – como previsto pela espectroscopia vibracional. A presença de, no mínimo, dois sinais aparentes nesta região indica a presença de ligações β - glicosídicas envolvendo 2 ou mais carbonos anoméricos distintos na amostra.

A Tabela 18 resume os principais sinais dos prótons da β -glucana isolada para uma melhor compreensão das mudanças observadas com o estudo do efeito isotópico, e, os sinais de uma mistura 400 μ L de DMSO- d_6 e 70 μ L D_2O também são mostrados.

A adição de D_2O desdobra o sinal em δ 4,68 ppm do espectro do EXP- 1 (sem adição de D_2O) para δ 4,80 e 4,95 ppm, sinais estes com deslocamentos químicos quase constantes para os espectros dos EXP- 2, EXP-3 e EXP- 4 (com adição de D_2O), com alterações apenas na intensidade. Outra mudança pode ser observada nos sinais em δ 5,28 e 5,40 ppm – um alargamento do sinal e distinção deste em três sinais, em aproximadamente, δ 5,47, 5,52 e 5,60 ppm.

Dessa forma, as alterações em deslocamento químico e intensidade, com a adição de D_2O , nos sinais da região de δ 4.2 a 5,6 ppm, sugere-se que os sinais dessa região sejam atribuídos às hidroxilas da cadeia polimérica.

A região característica dos prótons dos anéis, entre δ 3,0 e 4,0 ppm, não sofreram alterações com adição de D_2O , exceto o intenso sinal em δ 3,4 ppm. Nos experimentos 2, 3 e 4, observa-se um deslocamento para a região de δ 3,9 ppm deste sinal, provavelmente atribuído à presença de moléculas de H_2O na estrutura polimérica. Esse deslocamento evidencia o aparecimento de outros sinais de prótons antes não visualizados.

Tabela 18: Principais sinais de ^1H dos espectros de RMN dos experimentos 1, 2, 3 e 4. Prótons anoméricos em vermelho e em azul, prótons de H_2O .

Principais sinais de RMN de ^1H (em ppm)				
EXP- 1	EXP- 2	EXP- 3	EXP- 4	
Sem adição de D_2O	20 μL de D_2O	40 μL de D_2O	70 μL de D_2O	400 μL de DMSO- d_6 + 70 μL D_2O
3,05	3,01; 3,07	3,05	3,06	
3,12	3,16	3,11	3,11	
3,21	3,23	3,19	3,20	
	3,30	3,34	3,34	
	3,38	3,42 (ombro)	3,42 (ombro)	
3,40				
3,55	3,51	3,54	3,54	
3,70	3,65		3,69	
3,79	3,72		3,76	
	3,88; 3,90	3,77; 3,87	3,92; 4,04	3,82; 8,83; 3,84
4,32; 4,41	4,26; 4,40	4,30; 4,42	4,28; 4,43	
4,68	4,80; 4,95	4,77; 4,88	4,84, 4,99	
5,29; 5,40	5,47; 5,52; 5,60	5,45; 5,49; 5,55	5,55; 5,61	

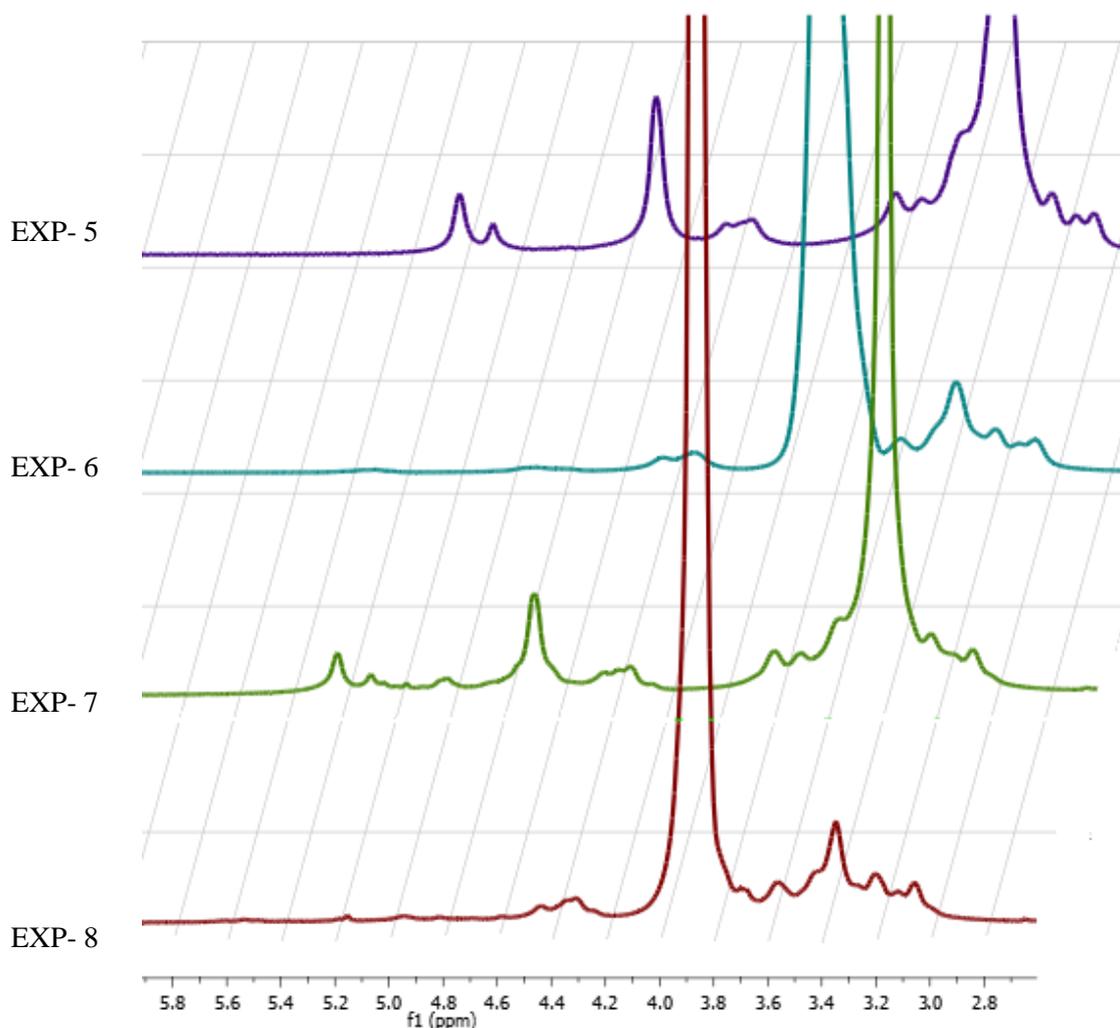
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

A constatação da presença de moléculas de água na estrutura polimérica propiciou outros experimentos envolvendo o aquecimento da amostra como tentativa de retirada da água – EXP- 5; EXP- 6, EXP- 7 e EXP- 8. Os espectros referentes aos experimentos citados encontram-se na Figura 5.20.

A análise dos espectros (Figura 5.20) indica que mesmo com as tentativas de remoção da água por aquecimento, os sinais referentes aos prótons da água não se alteram quando comparados com os experimentos anteriores. Os experimentos 5 e 7 mostraram o mesmo sinal em δ 3,39 ppm como no EXP- 1 e, os experimentos com aquecimento e adição de D_2O (EXP- 6 e EXP- 8) apresentam deslocamento químico de, aproximadamente, δ 3,90 ppm, próximos da mistura de DMSO- d_6 e D_2O (400 μL

de DMSO- d_6 + 70 μ L D_2O). Dessa forma, as tentativas ineficientes para retirada da água, para consequente obtenção de melhores espectros de RMN, indicam que tais moléculas estejam fortemente envolvidas na estrutura polimérica.

Figura 5.20: Espectros de RMN de 1H dos experimentos 5, 6, 7 e 8, (500 MHz, DMSO- d_6 ou DMSO- d_6/D_2O).



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

A morfologia extremamente porosa da β - glucana isolada, evidenciada pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura, podem ser um indicativo de que a estrutura esponjosa seja capaz de aprisionar certa quantidade de água que os métodos adotados neste trabalho, liofilização e aquecimento, não foram adequados para a sua remoção.

5.7 Conclusões

Neste trabalho, foram aplicadas metodologias para extração e purificação de polissacarídeos liquênicos, onde uma β - glucana insolúvel em água foi isolada e purificada. A presença de outros monossacarídeos, além da glicose, foi confirmada pela eletroforese em gel e o sucesso do processo de purificação adotado, confirmado por análises de cromatografia líquida.

A caracterização vibracional indica a presença de β -glucanas nas frações insolúveis das extrações alcalinas, principalmente pela atribuição da banda em torno de 896 cm^{-1} referente ao modo $\delta(\text{C1-H})$ da ligação β -glicosídica nos espectros Raman e de absorção na região do infravermelho; e a banda em 424 cm^{-1} atribuída à deformação do esqueleto, um marcador não específico de glucanas, no espectro Raman.

Uma análise mais aprofundada com relação à banda Raman em 1600 cm^{-1} deve ser feita, mas entende-se que haja correlação entre a presença da mesma com a baixa solubilidade do material em estudo, bem como à existência de moléculas de H_2O de caráter especial envolvidas na estrutura polimérica. Dessa forma, a saída de moléculas de água, observada na análise termogravimétrica, pode ser atribuída apenas às moléculas de hidratação – possivelmente, outras moléculas de H_2O estão aprisionadas nos poros da estrutura da β - glucana identificados nas imagens de microscopia eletrônica.

Experimentos usando a espectroscopia de ressonância magnética com aquecimento da amostra e adição de D_2O confirmam a presença de β -glucanas, possivelmente, com dois ou mais carbonos anoméricos, além da afirmação de que moléculas de água estão presentes na estrutura do polímero de glicose.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram a análise dos principais quimiomarcadores das espécies liquênicas *Gondwania regalis*, *Teloschistes exilis* e *Xanthoria candelaria*. Nesta investigação, a análise não destrutiva por espectroscopia Raman proporcionou a identificação da parietina e carotenoides, para os líquens *X. candelaria* e *T. exilis* e parietina para *G. regalis*. Assim, este é o primeiro relato, por espectroscopia Raman, da ocorrência de parietina e carotenoide nos tecidos de *T. exilis* e *X. candelaria*, bem como da parietina em *G. regalis* - pigmentos estes altamente eficazes contra a radiação UV. A partir da identificação dos constituintes químicos nos líquens *T. exilis* e *X. candelaria* verificou-se também que a parietina apresenta atividade geradora de oxigênio singlete a qual co-ocorre com carotenoides amplamente descrito como supressor do mesmo. Esses resultados são bastante intrigantes do ponto de vista biológico, já que cada parceiro do sistema simbiótico parece contribuir diferentemente para o equilíbrio e manutenção do holobionte.

A excelente capacidade da parietina em formar oxigênio singlete também pode estar relacionada a um mecanismo de defesa contra invasores e/ou hospedeiros indesejáveis, e, desta forma, a presença do carotenoide poderia ser compreendida como um controle natural para a não formação de espécies reativas em quantidade inadequada, já que este tipo de pigmento vem sendo amplamente descrito com forte absorvedor de radicais livres e oxigênio singlete.

A análise Raman *in situ* tem se mostrado muito útil para caracterizar estes tipos de pigmentos e, assim, pode-se propor que a esta técnica seja utilizada como uma ferramenta auxiliar na identificação taxonômica desses organismos. Como os pigmentos parietina e β -caroteno são compostos eficazes contra os radicais livres gerados pela radiação UV, a identificação desses pigmentos por espectroscopia Raman em espécies que são drasticamente expostas a diferentes níveis de isolamento (Brasil e Antártida) pode fornecer informações que auxiliem estudos de monitoramento ambiental.

A química dos líquens *Candelaria fibrosa* e *Pyxine coccifera* foi investigada pela primeira vez através da espectroscopia FT-Raman, e, com o auxílio de cálculos de DFT de mecânica quântica para confirmar atribuições das bandas espectrais. A análise vibracional não destrutiva forneceu evidências para a presença de derivados de ácido pulvínico e carotenoides. A identificação de bandas marcadoras características do ácido quiodectônico nas espécies de *Pyxine* e dos pigmentos de calicina e dilactona pulvínica em *C. fibrosa* foi auxiliada pelos cálculos de DFT, mas a identificação das

assinaturas espectrais de biomarcadores para estes líquens sem a necessidade de processos de extração química reforça o potencial da espectroscopia Raman como ferramenta auxiliar para o estudo taxonômico de espécies de líquens.

Pigmentos absorvedores de luz de diferentes classes químicas foram identificados nos líquens *Usnea* sp. e *Crocodia aurata* por meio da espectroscopia Raman também suportada por cálculos de DFT de mecânica quântica. Espectros Raman foram obtidos diretamente dos tecidos liquênicos e de substâncias isoladas, e, para o líquen *Usnea* sp, o ácido úsnico, foi relatado juntamente com um constituinte minoritário, o ácido estítico - inequivocamente identificado por análises espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C . As estruturas da calicina e dilactona pulvínica isoladas de *Crocodia aurata* foram confirmadas por difração de raios X de monocristal. Os carotenoides presentes nos líquens *Usnea* sp. e *C. aurata* foram caracterizados por FT-Raman e imagem Raman. O mapeamento Raman revelou a presença de uma mistura de carotenoides distribuídos heterogeneamente na camada superior de *C. aurata*, demonstrando que a espectroscopia Raman pode ser usada para monitorar pigmentos poliênicos aromáticos e conjugados em diferentes camadas de tecidos de líquen.

Em uma matriz biológica complexa como a dos líquens, metabólitos primários tais como os polissacarídeos também parecem exercer papel de destaque como ferramenta auxiliar no estudo taxonômico de fungos liquenizados. Dentro desse contexto, investigamos a composição polissacarídica da espécie *Usnea* sp. através de várias técnicas, principalmente pela espectroscopia vibracional. Metodologias de extração por solventes orgânicos e extrações aquosas e alcalinas foram aplicadas para obtenção de uma β -glucana insolúvel em água. Após os processos de extração e purificação adotados, análises por UFLC indicam que apenas o monômero de glicose é o componente do polissacarídeo estudado, confirmando o que a espectroscopia vibracional já havia sugerido. Outros estudos devem ser realizados para o completo entendimento da estrutura polimérica em questão, principalmente, envolvendo a espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

A compilação destes resultados tem como objetivo principal ampliar e divulgar o estudo dos principais compostos químicos de líquens através da espectroscopia Raman, propondo a técnica como uma importante ferramenta para auxiliar o estudo e identificação de líquens a partir das bandas quimiomarcadoras de seus principais componentes. Os manuscritos gerados neste trabalho expõem uma abordagem ampla acerca do uso da técnica para a compreensão da natureza destes organismos.

PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho envolvem, além da elucidação estrutural da β -glucana insolúvel em água isolada da espécie de *Usnea*, o estudo de suas propriedades biotecnológicas. Entende-se que, através dos resultados obtidos nesta tese, tal material polimérico possui características físicas e químicas ainda não esclarecidas pela literatura atual, e com possíveis usos práticos na área de novos materiais.

Trabalhos futuros possuirão, como motivação central, o desenvolvimento de novos filmes poliméricos à base de polissacarídeos extraídos quimicamente desta espécie de *Usnea*, bem como a avaliação, por espectroscopia Raman, da compatibilidade da formação de géis de íons polissacarídeos produzidos a partir de suas soluções com líquidos iônicos. Além disso, os géis de íons serão convertidos em materiais sustentáveis de valor agregado, como filmes e hidrogéis, por meio de procedimentos adequados.

Em termos de líquens, acreditamos que esta tese tenha sido uma boa base para o avanço do conhecimento espectroscópico sobre tais sistemas; espera-se que este assunto continue sendo abordado, tanto em termos do uso de espectroscopia vibracional para conhecimento de componentes químicos e suas funções biológicas, quanto ao uso das técnicas como ferramenta auxiliar na taxonomia de espécies conhecidas.

Por fim a aplicação de imagem, tanto em Raman como em infravermelho, deve ser um dos focos futuros na área de aplicações em líquens, pois imagens permitem visualizar muito facilmente o que dados espectroscópicos muitas vezes não permitem com tanta nitidez.

REFERÊNCIAS

ADAMS, W. W.; DEMMIG-ADAMS, B.; LANGE, O. L. Carotenoid composition and metabolism in green and blue-green algal lichens in the field. **Oecologia**, v. 94, n. 4, p. 576-584, July 01 1993. ISSN 1432-1939.

AGARWAL, S. K. et al. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 43-46, 2000. ISSN 0378-8741.

AGARWAL, U. Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (*Picea mariana*). **Planta**, v. 224, p. 1141 - 1153, 2006.

AGNEZ-LIMA, L. F. et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 751, n. 1, p. 15-28, 2012. ISSN 1383-5742.

AHMAD, A. et al. Extraction and characterization of β -d-glucan from oat for industrial utilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 304-309, 2010/04/01/ 2010. ISSN 0141-8130.

AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. Wiley, 1993a. ISBN 9780471578857. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=at7uXMn-8iMC> >.

AMARAL, A. E. et al. An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 3, p. 473-478, 2008/05/16/ 2008. ISSN 0144-8617.

APTROOT, A. Pyxinaceae (Lichens). **Fl. Guianas**, v. 1, p. 1-59, 1987.

APTROOT, A.; VAN HERK, C. M. Further evidence of the effects of global warming on lichens, particularly those with Trentepohlia phycobionts. **Environmental Pollution**, v. 146, n. 2, p. 293-298, 2007. ISSN 0269-7491.

ARMSTRONG, K. et al. Screening Mammography in Women 40 to 49 Years of Age: A Systematic Review for the American College of Physicians. **Annals of Internal Medicine**, v. 146, n. 7, p. 516-526, 2007. ISSN 0003-4819.

ARUP, U.; SØCHTING, U.; FRÖDÉN, P. A new taxonomy of the family Teloschistaceae. **Nordic Journal of Botany**, v. 31, n. 1, p. 16-83, 2013.

ASHRAF KHAN, A. et al. Structural, rheological, antioxidant, and functional properties of β -glucan extracted from edible mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Coprinus atramentarius*. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 11, p. 67-74, 2017/07/01/ 2017. ISSN 2212-6198.

BAČKOROVÁ, M. et al. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 37-44, 2011. ISSN 0887-2333.

BAČKOROVÁ, M. et al. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 3, p. 462-468, 2012. ISSN 0887-2333.

BARANSKI, R.; BARANSKA, M.; SCHULZ, H. Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy. **Planta**, v. 222, n. 3, p. 448-457, October 01 2005. ISSN 1432-2048.

BERNEBURG, M. et al. Singlet Oxygen Mediates the UVA-induced Generation of the Photoaging-associated Mitochondrial Common Deletion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 22, p. 15345-15349, May 28, 1999 1999.

BRANDT, A. et al. Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS. **International Journal of Astrobiology**, v. FirstView, p. 1-15, 2014. ISSN 1475-3006.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1551-1558, 1995.

BYUN, E.-H. et al. Effects of gamma irradiation on the physical and structural properties of β -glucan. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 77, n. 6, p. 781-786, 2008/06/01/ 2008. ISSN 0969-806X.

CAEL, J. J.; KOENIG, J. L.; BLACKWELL, J. Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates: Part IV. Identification of configuration- and conformation-sensitive modes for D-glucose by normal coordinate analysis. **Carbohydrate Research**, v. 32, n. 1, p. 79-91, 1974/01/01/ 1974. ISSN 0008-6215.

CARBONERO, E. R. et al. Galactomannans with novel structures from the lichen *Rocella decipiens* Darb. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 10, p. 1699-1705, 2005/07/25/ 2005. ISSN 0008-6215.

CARBONERO, E. R. et al. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 252-257, 2006/10/27/ 2006. ISSN 0144-8617.

CARBONERO, E. R. et al. Glucans of lichenized fungi: significance for taxonomy of the genera *Parmotrema* and *Rimelia*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 8, p. 929-934, 2005/04/01/ 2005. ISSN 0031-9422.

CARBONERO, E. R. et al. Structure of two glucans and a galactofuranomannan from the lichen *Umbilicaria mammulata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 1, p. 13-18, 2006/01/18/ 2006. ISSN 0144-8617.

CARDOSO, S. L. Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante de b-caroteno. **Química Nova**, v. 20, p. 535-540, 1997. ISSN 0100-4042.

CAZZONELLI, C. I. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. **Functional Plant Biology**, v. 38, n. 11, p. 833-847, 2011.

CHOI, S.-M. et al. Applications of Vibrational Spectroscopy to the Analysis of Polysaccharide and Hydrocolloid Ingredients. In: (Ed.). **Handbook of Vibrational Spectroscopy**: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. ISBN 9780470027325.

CHYLINSKA, M.; SZYMANSKA-CHARGOT, M.; ZDUNEK, A. Imaging of polysaccharides in the tomato cell wall with Raman microspectroscopy. **Plant Methods**, v. 10, n. 1, p. 14, 2014. ISSN 1746-4811.

COCCHIETTO, M. et al. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 4, p. 137-146, 2002/04/01 2002. ISSN 0028-1042.

COCKELL, C.; HORNECK, G. **ROME: Response of Organisms to the Martian Environment**. ESA Communications, European Space Agency, 2007. ISBN 92-9092-393-8.

COCKELL, C. S. et al. The Ultraviolet Environment of Mars: Biological Implications Past, Present, and Future. **Icarus**, v. 146, n. 2, p. 343-359, 2000. ISSN 0019-1035.

COCKELL, C. S.; KNOWLAND, J. Ultraviolet radiation screening compounds. **Biological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 311-345, 1999. ISSN 1469-185X.

CORBETT, E. C. et al. Fourier transform Raman studies of materials and compounds of biological importance—II. The effect of moisture on the molecular structure of the alpha and beta anomers of d-glucose. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 47, n. 9, p. 1399-1411, 1991/01/01/ 1991. ISSN 0584-8539.

CORDEIRO, L. M. C. et al. Comparative studies of the polysaccharides from species of the genus *Ramalina*—lichenized fungi—of three distinct habitats. **Phytochemistry**, v. 63, n. 8, p. 967-975, 2003/08/01/ 2003. ISSN 0031-9422.

CZECZUGA, B.; BECKETT, R. P.; PIENAAR, R. N. Investigations on carotenoids in lichens. XVIII. Carotenoid content in certain lichens from southern Africa. **South African Journal of Botany**, v. 54, n. 6, p. 571-574, 1988/12/01/ 1988. ISSN 0254-6299.

CZECZUGA, B.; LALLEMANT, R. Investigations on Carotenoids in Lichens, 44: carotenoids of some lichens from France. **Acta Botanica Gallica**, v. 140, n. 1, p. 35-40, 1993/01/01 1993. ISSN 1253-8078.

DA CUNHA, A. L. et al. Pharmaceutical grade chondroitin sulfate: Structural analysis and identification of contaminants in different commercial preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 300-308, 2015/12/10/ 2015. ISSN 0144-8617.

DANIEL, J.; RAPHAËL, T. Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, n. 2, p. 49-61, 2009.

DAVIS, W. L.; MCKAY, C. P. Origins of life: A comparison of theories and application to mars. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 26, n. 1, p. 61-73, 1996.

DE LA TORRE, R. BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission: Pre-flight verification tests of the Rhizocarpon geographicum-granite ecosystem. **Advances in Space Research**, v. 40, n. 11, p. 1665-1671, 2007. ISSN 0273-1177.

DE LOURDES, M. et al. Chemical characterization and biotechnology applications of fungal glucans. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

DE LUCAS, N. C.; FERREIRA, A. B. B.; NETTO-FERREIRA, J. C. Fotoquímica de Naftoquinonas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 403-463, 2015.

DE OLIVEIRA, L. F. C. et al. The analytical characterization of a depside in a living species: Spectroscopic and theoretical analysis of lecanoric acid extracted from Parmotrema tinctorum Del. Ex Nyl. lichen. **Journal of Molecular Structure**, v. 920, n. 1-3, p. 128-133, 2009. ISSN 0022-2860.

DE OLIVEIRA, V. E. et al. Carotenoids and β -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 30, p. 8511-8519, 2011/08/04 2011. ISSN 1089-5639.

DE OLIVEIRA, V. E. et al. Carotenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, n. 6, p. 642-650, 2010. ISSN 1097-4555.

DE VERA, J. P. et al. The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space – I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. **International Journal of Astrobiology**, v. 1, n. 04, p. 285-293, 2002. ISSN 1475-3006.

DE VERA, J. P. et al. The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. **Advances in Space Research**, v. 33, n. 8, p. 1236-1243, 2004. ISSN 0273-1177.

DESIRAJU, G. R. The C-H...O hydrogen bond in crystals: what is it? **Accounts of Chemical Research**, v. 24, n. 10, p. 290-296, 1991/10/01 1991. ISSN 0001-4842.

DIAS, D. A.; URBAN, S. Chemical constituents of the lichen, Candelaria concolor: A complete NMR and chemical degradative investigation. **Natural Product Research**, v. 23, n. 10, p. 925-939, 2009/07/10 2009. ISSN 1478-6419.

DORNELLAS, R. M. **Determinação de carboidratos estruturais em forrageiras tropicais por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV)**. 2009. (mestre). Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

ECHAVARRI-ERASUN, C.; JOHNSON, E. A. Fungal carotenoids. In: KHACHATOURIANS, G. G. e ARORA, D. K. (Ed.). **Applied Mycology and Biotechnology**: Elsevier, v.2, 2002. p.45-85. ISBN 1874-5334.

EDWARDS, H. G. M. et al. Protective pigmentation in UVB-screened Antarctic lichens studied by Fourier transform Raman spectroscopy: an extremophile bioresponse to radiation stress. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 35, n. 6, p. 463-469, 2004. ISSN 1097-4555.

EDWARDS, H. G. M.; DE OLIVEIRA, L. F. C.; SEAWARD, M. R. D. FT-Raman spectroscopy of the Christmas wreath lichen, *Cryptothecia rubrocincta* (Ehrenb.:Fr.) Thor. **The Lichenologist**, v. 37, n. 02, p. 181-189, 2005.

EDWARDS, H. G. M. et al. Vibrational Raman spectroscopic study of scytonemin, the UV-protective cyanobacterial pigment. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 56, n. 1, p. 193-200, 2000. ISSN 1386-1425.

EDWARDS, H. G. M.; HOLDER, J. M.; WYNN-WILLIAMS, D. D. Comparative FT-Raman spectroscopy of *Xanthoria* lichen-substratum systems from temperate and antarctic habitats. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 14, p. 1947-1953, 1998.

EDWARDS, H. G. M. et al. Raman spectroscopic detection of key biomarkers of cyanobacteria and lichen symbiosis in extreme Antarctic habitats: Evaluation for Mars Lander missions. **Icarus**, v. 174, n. 2, p. 560-571, 2005. ISSN 0019-1035.

EDWARDS, H. G. M.; NEWTON, E. M. **Application of Raman Spectroscopy to Exobiological Prospecting**. Life on Mars; The search for life on Mars Symposium; 1st, Life on Mars; The search for life on Mars. British Interplanetary Society 1999.

EDWARDS, H. G. M.; NEWTON, E. M.; WYNN-WILLIAMS, D. D. Molecular structural studies of lichen substances II: Atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 651-653, p. 27-37, 2003.

EDWARDS, H. G. M. et al. Molecular spectroscopic studies of lichen substances 1: parietin and emodin. **Journal of Molecular Structure**, v. 648, n. 1-2, p. 49-59, 2003. ISSN 0022-2860.

EDWARDS, H. G. M. et al. Non-destructive analysis of pigments and other organic compounds in lichens using Fourier-transform Raman spectroscopy: a study of Antarctic epilithic lichens. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n. 10, p. 2301-2309, 2003. ISSN 1386-1425.

EDWARDS, H. G. M.; RUSSELL, N. C.; WYNN-WILLIAMS, D. D. Fourier Transform Raman spectroscopic and scanning electron microscopic study of cryptoendolithic lichens from Antarctica. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 28, n. 9, p. 685-690, 1997. ISSN 1097-4555.

EDWARDS, H. G. M. et al. FT-Raman spectroscopy of lichens on dolomitic rocks: an assessment of metal oxalate formation. **Analyst**, v. 128, n. 10, p. 1218-1221, 2003. ISSN 0003-2654.

EHRHARDT, M.; PETRICK, G. The sensitized photo-oxidation of n-pentadecane as a model for abiotic decomposition of aliphatic hydrocarbons in seawater. **Marine Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 227-238, 1985. ISSN 0304-4203.

EINARSDÓTTIR, E. et al. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. **Planta Medica**, v. 76, n. 10, p. 969-974, 2010.

FASS, L. Imaging and cancer: A review. **Molecular Oncology**, v. 2, n. 2, p. 115-152, 2008.

FERNANDES, R. F. et al. FT-Raman spectroscopy of the Candelaria and Pyxine lichen species: A new molecular structural study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1102, p. 57-62, 2015.

FERNANDES, R. F. et al. Raman spectroscopy as a tool in differentiating conjugated polyenes from synthetic and natural sources. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 134, 434-441, 2015.

FERNANDES, R. F.; SPIELMANN, A. A.; DE OLIVEIRA, L. F. C. Raman spectroscopy as a tool to the in situ study of three lichens species from Antarctica and Brazil. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 1, p. 70-75, 2015. ISSN 1097-4555.

FERNÁNDEZ-FRIERA, L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, A.; IBÁÑEZ, B. Imagining the Future of Diagnostic Imaging. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 66, n. 2, p. 134-143, 2013/02/01/ 2013. ISSN 1885-5857.

FOOTE, C. S. DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTSENSITIZED OXIDATION. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659-659, 1991. ISSN 1751-1097.

FOURNET, A. et al. Activity of Compounds Isolated From Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 51-54, 1997. ISSN 0742-8413.

FRIEDMANN, E. I. Endolithic Microorganisms in the Antarctic Cold Desert. **Science**, v. 215, n. 4536, p. 1045-1053, February 26, 1982 1982.

FU, D. et al. Imaging the intracellular distribution of tyrosine kinase inhibitors in living cells with quantitative hyperspectral stimulated Raman scattering. **Nat Chem**, v. 6, n. 7, p. 614-622, 2014. ISSN 1755-4330.

GALANTY, A. et al. Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and melanoma cancer cells. **Toxicology in Vitro**, v. 40, p. 161-169, 2017/04/01/ 2017. ISSN 0887-2333.

GARGAS, A. et al. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. **Science**, v. 268, n. 5216, p. 1492-1495, 1995.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology : fundamentals of applied microbiology**. New York (N.Y.) : Freeman, 1995. ISBN 0716726084.

GOLLNICK, K.; HELD, S. Hydroxyanthraquinones as sensitizers of electron-transfer-induced photo-oxygenation reactions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 135-145, 1993. ISSN 1010-6030.

GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. et al. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. **RSC Advances**, v. 4, n. 103, p. 59017-59047, 2014.

GONZAGA, M. L. C. et al. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, n. 2, p. 152-156, 2013/10/01/ 2013. ISSN 2212-6198.

GORIN, P. et al. Lichen carbohydrates. **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 27-27, 1993. ISSN 0009-6725.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, n. 1, p. 119-132, 1984/05/15/ 1984. ISSN 0008-6215.

GRIFFITHS, P. R. Infrared and Raman Instrumentation for Mapping and Imaging. In: (Ed.). **Infrared and Raman Spectroscopic Imaging**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. p.1-64. ISBN 9783527628230.

GUERRA DORE, C. M. P. et al. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 9, p. 1160-1169, 2007/09/01/ 2007. ISSN 1567-5769.

GUTIÉRREZ, I. et al. Quinones and hydroxyquinones as generators and quenchers of singlet molecular oxygen. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 423-428, 1997/04/01 1997. ISSN 0008-4042.

HAKULINEN, R. Die Flechtengattung *Candelariella* Mu" ll. Arg., mit besonderer Beru" cksichtigung ihres Auftretens und ihrer Verbreitung in Fennoskandien. **Annales Botanici Societatis Zoologicae Botanicae Fennicae 'Vanamo'**, v. 27, n. 3, p. 1-127, 1954.

HALE, M. The Biology of Lichens. **Edward Arnold, London**, 1983.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Clarendon Press, 1989. ISBN 9780198552949.

HARRIS, D. C.; BERTOLUCCI, M. D. **Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy**. Dover Publications, 1989. ISBN 9780486661445.

HARTSUIKER, L. et al. A comparison of breast cancer tumor cells with varying expression of the Her2/neu receptor by Raman microspectroscopic imaging. **Analyst**, v. 135, n. 12, p. 3220-3226, 2010.

HAWKSWORTH, D. L.; DIVISION, N. A. T. O. S. A. **Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties**. Springer, 1994. ISBN 9780306448829.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSE, F. Qualitative Scale for estimating Sulphur Dioxide Air Pollution in England and Wales using Epiphytic Lichens. **Nature**, v. 227, n. 5254, p. 145-148, 1970.

HIDALGO, M. E. et al. Photophysical, photochemical, and thermodynamic properties of shikimic acid derivatives: calycin and rhizocarpic acid (lichens). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, n. 3, p. 213-217, 2002. ISSN 1011-1344.

HIRAKAWA, K. et al. Guanine-specific DNA oxidation photosensitized by the tetraphenylporphyrin phosphorus(V) complex via singlet oxygen generation and electron transfer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 87, n. 3, p. 209-217, 2007. ISSN 1011-1344.

HOLM, N. G.; ANDERSSON, E. Hydrothermal simulation experiments as a tool for studies of the origin of life on earth and other terrestrial planets: A review. **Astrobiology**, v. 5, n. 4, p. 444-460, 2005.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, v. 22, p. 110-125, 1999. ISSN 0100-4042.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. **Identification of lichen substances**. Springer, 1996. ISBN 9783540608110.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, n. 7, p. 729-736, 2002. ISSN 0031-9422.

ISMED, F. et al. NMR reassignment of stictic acid isolated from a Sumatran lichen *Stereocaulon montagneanum* (Stereocaulaceae) with superoxide anion scavenging activities. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 72: 55 p. 2017.

JIANG, G.; VASANTHAN, T. MALDI-MS and HPLC Quantification of Oligosaccharides of Lichenase-Hydrolyzed Water-Soluble β -Glucan from Ten Barley Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3305-3310, 2000/08/01 2000. ISSN 0021-8561.

JIANG, W. et al. Novel gadopentetic acid-doped silica nanoparticles conjugated with YPSMA-1 targeting prostate cancer for MR imaging: an in vitro study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 499, n. 2, p. 202-208, 2018/05/05/2018. ISSN 0006-291X.

JOHANSSON, S. et al. Chemical variation in the lichen genus *Letrovitia* (Ascomycota, Letrouitiaceae). **Mycological Progress**, v. 4, n. 2, p. 139-148, 2005/05/01 2005. ISSN 1617-416X.

JORGE-VILLAR, S. E.; EDWARDS, H. G. M. Lichen colonization of an active volcanic environment: A Raman spectroscopic study of extremophile biomolecular protective strategies. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, n. 1, p. 63-67, 2010.

JORGE-VILLAR, S. E. et al. Raman spectroscopy study of lichens using three spectrometers under different experimental conditions: analyses of the results with relevance for extraplanetary exploration. **Analytical Methods**, v. 3, n. 12, p. 2783-2791, 2011. ISSN 1759-9660.

JORGE VILLAR, S. E.; EDWARDS, H. G. M.; BENNING, L. G. Raman spectroscopic and scanning electron microscopic analysis of a novel biological colonisation of volcanic rocks. **Icarus**, v. 184, n. 1, p. 158-169, 2006.

JORGE VILLAR, S. E.; EDWARDS, H. G. M.; COCKELL, C. S. Raman spectroscopy of endoliths from Antarctic cold desert environments. **Analyst**, v. 130, n. 2, p. 156-162, 2005.

JORGE VILLAR, S. E. et al. FT-Raman spectroscopic analysis of an Antarctic endolith. **International Journal of Astrobiology**, v. 1, n. 04, p. 349-355, 2002. ISSN 1475-3006.

JULIANI, R.; GRAZIANO, M. N.; COUSSIO, J. D. Chemical investigation of Argentine lichens-I. *Teloschistes exilis* (Michaux) Wainio. **Phytochemistry**, v. 7, n. 3, p. 507, 1968.

JUNGBLUTH, P.; MARCELLI, M. P. The *Pyxine pungens* complex in São Paulo State, Brazil. **The Bryologist**, v. 114, n. 1, p. 166-177, 2011/03/01 2011. ISSN 0007-2745.

JUNGBLUTH, P.; MARCELLI, M. P.; KALB, K. A new species and a new record of *Pyxine* (Physciaceae) with norstictic acid from São Paulo State, Brazil. **Mycotaxon**, v. 115, p. 435-442, 2011.

KAČURÁKOVÁ, M. et al. Hydration properties of xylan-type structures: an FTIR study of xylooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, n. 1, p. 38-44, 1998.

KALB, K. Brasilianische Flechten. 1. Die Gattung *Pyxine*. **Biblioth. Lichenol.**, v. 24, p. 1-89, 1987.

KAPPEN, L. **Response to extreme environments**. New York: 1973.

KAPPEN, L. Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. **Antarctic Science**, v. 12, n. 3, p. 314-324, 2000.

KAPPEN, L.; SCHROETER, B. ACTIVITY OF LICHENS UNDER THE INFLUENCE OF SNOW AND ICE (18th Symposium on Polar Biology). **Proceedings of the NIPR Symposium on Polar Biology**, v. 10, p. 163-168, 1997/02 1997. ISSN 0914563X.

KAPPEN, L. et al. Cold resistance and metabolic activity of lichens below 0°C. **Advances in Space Research**, v. 18, n. 12, p. 119-128, 1996.

KÄRNEFELT, I. Morphology and phylogeny in the Teloschistales. **Cryptogamic Botany**, v. 1, p. 147-203, 1989.

KEARNS, D. R. Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. **Chemical Reviews**, v. 71, n. 4, p. 395-427, 1971/08/01 1971. ISSN 0009-2665.

KLAUS, A. et al. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2005-2011, 2011/12/01/ 2011. ISSN 0023-6438.

KNOP, W.; SCHNEDERMANN, G. Ueber die Flechten. **Journal für Praktische Chemie**, v. 39, n. 1, p. 363-367, 1846.

KONO, H. et al. Two-dimensional NMR data of a water-soluble β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* and schizophyllan from *Schizophyllum commune*. **Data in Brief**, v. 15, p. 382-388, 2017/12/01/ 2017. ISSN 2352-3409.

KRAFFT, C. et al. Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 16, p. 4392-4430, 2017.

KRANNER, I. et al. Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 8, p. 3141-3146, 2005.

LI, D. et al. Characterization of Reactive Intermediates by Multinuclear Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY). **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 2, p. 270-280, 2009/02/17 2008. ISSN 0001-4842.

LIAO, C. et al. In situ imaging of usnic acid in selected *Cladonia* spp. by vibrational spectroscopy. **Analyst**, v. 135, n. 12, p. 3242-3248, 2010.

LIMBERGER-BAYER, V. M. et al. Barley β -glucans extraction and partial characterization. **Food Chemistry**, v. 154, p. 84-89, 2014/07/01/ 2014. ISSN 0308-8146.

LINDSAY, D. C. The Role of Lichens in Antarctic Ecosystems. **The Bryologist**, v. 81, n. 2, p. 268-276, 1978. ISSN 00072745.

LLANSOLA-PORTOLES, M. J. et al. Twisting a β -Carotene, an Adaptive Trick from Nature for Dissipating Energy during Photoprotection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 4, p. 1396-1403, January 27, 2017 2017.

LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F. et al. Lichenic extracts and metabolites as UV filters. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, n. 0, p. 17-28, 2013. ISSN 1011-1344.

LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F. et al. Stictic Acid Derivatives from the Lichen *Usnea articulata* and Their Antioxidant Activities. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 7, p. 1218-1220, 2007/07/01 2007. ISSN 0163-3864.

LUTZONI, F.; PAGEL, M.; REEB, V. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 937-940, 2001.

MA, X. et al. Physcion, a natural anthraquinone derivative, enhances the gene expression of leaf-specific thionin of barley against *Blumeria graminis*. **Pest Management Science**, v. 66, n. 7, p. 718-724, 2010. ISSN 1526-4998.

MAIA, L. F. et al. Conjugated polyenes as chemical probes of life signature: Use of Raman spectroscopy to differentiate polyenic pigments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 372, n. 2030, 2014.

MAIA, L. F. et al. Raman Spectroscopic Study of Antioxidant Pigments from Cup Corals *Tubastraea* spp. **The Journal of Physical Chemistry A**, 118 (19):3429-37, 2014. ISSN 1089-5639

MAIA, L. F. et al. Monitoring of sulfated polysaccharide content in marine sponges by Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 87, p. 149-156, 2016. ISSN 0924-2031.

MAITY, P. et al. Structure elucidation and antioxidant properties of a soluble β -D-glucan from mushroom *Entoloma lividoalbum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 140-149, 2014/02/01/ 2014. ISSN 0141-8130.

MALME, G. O. A. Die Flechten der ersten Regnellschen Expedition. I. Die Gattung *Pyxine* (Fr.) Nyl. **Bih. K. svenska VetenskAkad. Handl.**, v. 23, n. 13, p. 1-52, 1897.

MANGOLIM, C. S. et al. Use of FT-IR, FT-Raman and thermal analysis to evaluate the gel formation of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 and determination of its rheological properties with food applicability. **Food Chemistry**, v. 232, p. 369-378, 2017/10/01/ 2017. ISSN 0308-8146.

MATTHÄUS, C. et al. Raman and infrared microspectral imaging of mitotic cells. **Applied Spectroscopy**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 2006.

MAYER, M. et al. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. **Anti-Cancer Drugs**, v. 16, n. 8, p. 805-809, 2005. ISSN 0959-4973.

MCCREERY, R. L. **Raman Spectroscopy for Chemical Analysis**. Wiley, 2005. ISBN 9780471231875.

MCKAY, C. P. The search for life on Mars. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 27, n. 1-3, p. 263-289, 1997.

MEYER, A.; RABA, C.; FISCHER, K. Ion-Pair RP-HPLC Determination of Sugars, Amino Sugars, and Uronic Acids after Derivatization with p-Aminobenzoic Acid. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 11, p. 2377-2382, ISSN 0003-2700.

MONCADA, B.; REIDY, B.; LÜCKING, R. A phylogenetic revision of Hawaiian Pseudocyphellaria sensu lato (lichenized Ascomycota: Lobariaceae) reveals eight new species and a high degree of inferred endemism. **The Bryologist**, v. 117, n. 2, p. 119-160, 2014/05/01 2014. ISSN 0007-2745.

MOREIRA, A. S. N. et al. Larvicidal activity of Ramalina usnea lichen against Aedes aegypti. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 4, p. 530-532, 2016/07/01/ 2016. ISSN 0102-695X.

MUELLER, D. R. et al. Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, n. 1, p. 73-87, 2005.

MULLOY, B. High-Field NMR as a Technique for the Determination of Polysaccharide Structures. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 241-265, 1996.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1150-1154, 2000/04/01 2000. ISSN 0021-8561.

NASH, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge University Press, 1996. ISBN 9780521459747.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 2008.

NGUYEN, K. H. et al. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 12, p. 1490-1508, 2013.

NIE, C. et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce. **Carbohydrate Polymers**, v. 188, p. 236-242, 2018/05/15/ 2018. ISSN 0144-8617.

NONELL, S.; GONZALEZ, M.; TRULL, F. R. 1h-Phenalen-1-One-2-Sulfonic Acid - an Extremely Efficient Singlet Molecular-Oxygen Sensitizer for Aqueous-Media. **Afinidad**, v. 50, n. 448, p. 445-450, Nov-Dec 1993. ISSN 0001-9704.

- NOOTHALAPATI, H. et al. Label-free Chemical Imaging of Fungal Spore Walls by Raman Microscopy and Multivariate Curve Resolution Analysis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27789, 2016.
- NOVÁK, M. et al. Yeast $\beta(1-3),(1-6)$ -d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2496-2504, 2012/03/01/ 2012. ISSN 0144-8617.
- NYBAKKEN, L. et al. The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. **Oecologia**, v. 140, n. 2, p. 211-216, 2004.
- OKSANEN, I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 4, p. 723-734, 2006/12/01 2006. ISSN 0175-7598.
- OLAFSDOTTIR, E. S.; INGOLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. **Planta Med**, v. 67, n. 3, p. 199-208, 2001. ISSN 0032-0943.
- OLIVEIRA, L. F. C. D. et al. FT-Raman Spectroscopy of three Follicolous Lichens from Costa Rican Rainforests. **The Lichenologist**, v. 34, n. 03, p. 259-266, 2002. ISSN 1096-1135.
- OLSEN, O.; GØTZSCHE, P. C. Cochrane review on screening for breast cancer with mammography. **The Lancet**, v. 358, n. 9290, p. 1340-1342, 2001. ISSN 0140-6736.
- OMARSDOTTIR, S. et al. Structural characterisation of a highly branched galactomannan from the lichen *Peltigera canina* by methylation analysis and NMR-spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 1, p. 54-60, 2006/01/18/ 2006. ISSN 0144-8617.
- PALONPON, A. F. et al. Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells. **Nat. Protocols**, v. 8, n. 4, p. 677-692, 2013. ISSN 1754-2189.
- PAPAIOANNOU, E. H. et al. Raman Spectroscopy for Intracellular Monitoring of Carotenoid in *Blakeslea trispora*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 2, p. 478-487, November 01 2009. ISSN 1559-0291.
- PAZUR, J. H. Neutral polysaccharides. **Carbohydrate Analysis: A Practical Approach**, p. 73-124, 1986.
- PEREIRA, L. Chapter 6 - Vibrational Spectroscopy of Seaweed Polysaccharides. In: VENKATESAN, J.; ANIL, S., et al (Ed.). **Seaweed Polysaccharides**: Elsevier, 2017. p.83-100. ISBN 978-0-12-809816-5.
- PHILIPPE, C. Systematics of the *Usnea fragile* aggregate and its distribution in Scandinavia. **Nordic Journal of Botany**, v. 7, n. 4, p. 479-495, 1987.

POELT, J. Zur Kenntnis der Flechtenfamilie Candelariaceae. Ein Beitrag mit besonderer Berücksichtigung einiger südamerikanischer Arten. **Phyton - Austria**, p. 189-210, 1974.

POELT J.; REDDI, B.V., Candelaria und Candelariella. Flechten des Himalaya **Khumbu Himal**, v. 6, n. 1-16, 1969.

QI, J.; SHIH, W. C. Performance of line-scan Raman microscopy for high-throughput chemical imaging of cell population. **Applied Optics**, n. 13, p. 2881-2885, 2014.

RAGGIO, J. et al. Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: Results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. **Astrobiology**, v. 11, n. 4, p. 281-292, 2011.

RAMAZAN, K.; JOSEPH, I. Rapid evaluation and discrimination of γ -irradiated carbohydrates using FT-Raman spectroscopy and canonical discriminant analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 7, p. 1244-1251, 2007.

RAND, A. A.; BARCLAY, L. R. C. Photo-oxidations initiated by UV radiation of urocanic acid and its methyl ester in solution, micelles, and lipid bilayers: TYPE I (free radical) or TYPE II (singlet oxygen) mechanisms depend on the medium. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 208, n. 2-3, p. 79-90, 2009. ISSN 1010-6030.

RAO, D. N.; LEBLANC, F. A Possible Role of Atranorin in the Lichen Thallus. **The Bryologist**, v. 68, n. 3, p. 284-289, 1965. ISSN 00072745.

RAYMOND, H.; CHRISTOPHER S, F.; HELEN, C. Chemistry of Singlet Oxygen. In: (Ed.). **Oxidation of Organic Compounds**: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, v.77, 1968. cap. 68, p.102-117. (Advances in Chemistry). ISBN 0-8412-0078-5.

RICHARD, A. LICHENOMETRIC DATING (LICHENOMETRY) AND THE BIOLOGY OF THE LICHEN GENUS RHIZOCARPON: CHALLENGES AND FUTURE DIRECTIONS. **Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography**, v. 98, n. 3, p. 183-206, 2016.

RIEDER, A. et al. Quantification of 1,3- β -D-glucan from yeast added as a functional ingredient to bread. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 34-42, 2018/02/01/ 2018. ISSN 0144-8617.

RONG, Y. et al. Sequencing analysis of β -glucan from highland barley with high performance anion exchange chromatography coupled to quadrupole time – Of – Flight mass spectrometry. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 235-242, 2017/12/01/ 2017. ISSN 0268-005X.

ROPRET, P. et al. **Assessment of Lichens' Metabolic and Degradation Products at Dornava Manor**. 2012. 325-330.

ROSSO, M. L. et al. Anthraquinones from the cultured lichen mycobionts of *Teloschistes exilis* and *Caloplaca erythrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 10, p. 1197-1200, 2003.

ROUBROEKS, J. P. et al. Molecular Weight, Structure, and Shape of Oat (1→3),(1→4)-β-d-Glucan Fractions Obtained by Enzymatic Degradation with Lichenase. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 584-591, 2000.

RUTHES, A. C. et al. *Lactarius rufus* (1→3),(1→6)-β-d-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 129-136, 2013/04/15/ 2013. ISSN 0144-8617.

RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. d-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 753-761, 2015/03/06/ 2015. ISSN 0144-8617.

SADOWSKY, A.; OTT, S. Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: The physiological response of lichen photobionts to drought and cold. **Symbiosis**, v. 58, n. 1-3, p. 81-90, 2012.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. Unesp, 2008. ISBN 9788571398689.

SÁNCHEZ, F. J. et al. UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: Role of the hydration state and cortex/screening substances. **International Journal of Astrobiology**, v. 13, n. 1, p. 1-18, 2014.

SANCHO, L. G.; DE LA TORRE, R.; PINTADO, A. Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 3-4, p. 103-109, 2008. ISSN 1749-4613.

SANZ, M. L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1, p. 74-89, 2007/06/15/ 2007. ISSN 0021-9673.

SAVITSKY, A.; MÖBIUS, K. High-field EPR. **Photosynthesis Research**, v. 102, n. 2-3, p. 311-333, 2009/12/01 2009. ISSN 0166-8595.

SCHMITT, M.; POPP, J. Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 37, n. 1-3, p. 20-28, 2006.

SEAWARD, M. R. D. Lichens and sulphur dioxide air pollution: field studies. **Environmental Reviews**, v. 1, n. 2, p. 73-91, 1993/07/01 1993. ISSN 1181-8700.

SHRESTHA, G.; ST. CLAIR, L. L. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 1, p. 229-244, March 01 2013. ISSN 1572-980X.

SIES, H.; MENCK, C. F. M. Singlet oxygen induced DNA damage. **Mutation Research/DNAging**, v. 275, n. 3–6, p. 367-375, 1992. ISSN 0921-8734.

SILVA, A. S. et al. Determination of Aldoses, Deoxy-aldoses and Uronic Acids Content in a Pectin-Rich Extract by RP-HPLC-FLD after p-AMBA Derivatization. **Chromatographia**, v. 76, n. 17, p. 1117-1124, September 01 2013. ISSN 1612-1112.

SMIDERLE, F. R. et al. Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 19, p. 2189-2196, 2006/10/01/ 2006. ISSN 0031-9422.

SOLHAUG, K.; GAUSLAA, Y. Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. **Oecologia**, v. 108, n. 3, p. 412-418, 1996/11/01 1996. ISSN 0029-8549.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, p. 1755-1774, 2008. ISSN 0100-4042.

STENNER, R. S. Structure and dynamics of biomolecules probed by Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 4, p. 276-278, 2005. ISSN 1097-4555.

STÉPHANE, M. et al. High-Throughput Evaluation of Antioxidant and Pro-oxidant Activities of Polyphenols with Thymidine Protection Assays. **ChemBioChem**, v. 6, n. 7, p. 1234-1241, 2005.

STEVENSON, C. S. et al. The identification and characterization of the marine natural product scytonemin as a novel antiproliferative pharmacophore. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 858-866, 2002.

STEWART, S. et al. Raman Imaging. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 337-360, 2012.

STIEF, T. W. Singlet oxygen (1O_2)-oxidizable lipids in the HIV membrane, new targets for AIDS therapy? **Medical Hypotheses**, v. 60, n. 4, p. 575-577, 2003. ISSN 0306-9877.

STOCKER-WORGOTTER, E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 1, p. 188-200, 2008. ISSN 0265-0568.

STÖFFLER, D. et al. Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like planets. **Icarus**, v. 186, n. 2, p. 585-588, 2007.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

- SYNYTSYA, A. et al. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. **Carbohydr Pol**, v. 54, p. 97 - 106, 2003.
- SYNYTSYA, A. et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 548-556, 2009/05/16/ 2009. ISSN 0144-8617.
- SZYMANSKA-CHARGOT, M.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A. Sensing the Structural Differences in Cellulose from Apple and Bacterial Cell Wall Materials by Raman and FT-IR Spectroscopy. **Sensors**, v. 11, p. 5543 - 5560, 2011.
- TOMCZYK, M. et al. The potential mechanism of tiliroside-dependent inhibition of t-butylhydroperoxide-induced oxidative stress in endometrial carcinoma cells. **Planta Medica**, v. 76, n. 10, p. 963-968, 2010.
- TOURNAIRE, C. et al. Antioxidant activity of flavonoids: Efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 19, n. 3, p. 205-215, 1993/08/01/ 1993. ISSN 1011-1344.
- TRIGUI, I. et al. Physicochemical properties of water-soluble polysaccharides from black cumin seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018/06/01/ 2018. ISSN 0141-8130.
- TURRO, N. J. **Modern Molecular Photochemistry**. University Science Books, 1991. ISBN 9780935702712.
- ULF, A.; ULRIK, S.; PATRIK, F. Addendum to 'A new taxonomy of the family Teloschistaceae'. **Nordic Journal of Botany**, v. 31, n. 2, p. 256-256, 2013.
- VAN HERK, C. M.; APTROOT, A.; VAN DOBBEN, H. F. Long-term monitoring in the Netherlands suggests that lichens respond to global warming. **The Lichenologist**, v. 34, n. 2, p. 141-154, 2002. ISSN 0024-2829.
- VERONELLI, M.; ZERBI, G.; STRADI, R. In situ resonance Raman spectra of carotenoids in bird's feathers. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 26, n. 8-9, p. 683-692, 1995. ISSN 1097-4555.
- VILLAR, S. E. J.; EDWARDS, H. G. M.; SEAWARD, M. R. D. Raman spectroscopy of hot desert, high altitude epilithic lichens. **Analyst**, v. 130, n. 5, p. 730-737, 2005.
- WECKESSER, S. et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, v. 14, n. 7, p. 508-516, 2007/08/06/ 2007. ISSN 0944-7113.
- WELLER, C. T. Carbohydrates Studied by NMR. In: LINDON, J. C.; TRANTER, G. E., et al (Ed.). **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2017. p.158-164. ISBN 978-0-12-803224-4.

WETZEL, D. L.; SRIVARIN, P.; FINNEY, J. R. Revealing protein infrared spectral detail in a heterogeneous matrix dominated by starch. **Vibrational Spectroscopy**, v. 31, n. 1, p. 109-114, 2003/01/15/ 2003. ISSN 0924-2031.

WIERCIGROCH, E. et al. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 317-335, 2017/10/05/ 2017. ISSN 1386-1425.

WILHELMSSEN, J. M. Chlorophylls in the lichens *Peltigera*, *Parmelia* and *Xanthoria*. **Bot. Tidsskr**, v. 55, p. 30-39, 1959.

WILKINSON, F.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 24, n. 2, p. 663-677, 1995.

WORANOVICZ, S. M. et al. STRUCTURAL STUDIES ON THE GALACTOMANNANS OF LICHENS OF THE GENUS *CLADONIA*. **The Lichenologist**, v. 29, n. 5, p. 471-481, 1997/09/01/ 1997. ISSN 0024-2829.

WU, S.; CAI, R.; SUN, Y. Degradation of curdlan using hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2436-2438, 2012/12/15/ 2012. ISSN 0308-8146.

WYNN-WILLIAMS, D. D. Antarctica as a model for ancient Mars. In: HISCOX, J. A. (Ed.). **The search for life on Mars**. London, 1999. p.49-57.

WYNN-WILLIAMS, D. D. et al. Pigmentation as a survival strategy for ancient and modern photosynthetic microbes under high ultraviolet stress on planetary surfaces. **International Journal of Astrobiology**, v. 1, n. 01, p. 39-49, 2002. ISSN 1475-3006.

Y. ASAHINA; SHIBATA, S. **Chemistry of Lichen Substances**. ASHER. Vaals-Amsterdam 1971.

YUAN, X.; XIAO, S.; TAYLOR, T. N. Lichen-Like Symbiosis 600 Million Years Ago. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1017-1020, May 13, 2005 2005.

ZHANG, L. et al. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from thirteen boletus mushrooms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1-7, 2018/07/01/ 2018. ISSN 0141-8130.

ZUO, S.-T. et al. Usnic acid induces apoptosis via an ROS-dependent mitochondrial pathway in human breast cancer cells in vitro and in vivo. **RSC Advances**, v. 5, n. 1, p. 153-162, 2015.

ANEXOS

Trabalhos provenientes da tese

1. Eventos

“5th French Brazilian Meeting on Polymers” – Estudo de novas matérias poliméricas – Florianópolis – 2018.

V Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman. Uso do Mapeamento e Imagem Raman para caracterização de carotenoides liquênicos – 2017.

XXIV International Conference on Raman Spectroscopy. Raman spectroscopy of lichens from Brazil and Antarctica. Jena, Alemanha. 2014.

2. Artigos completos publicados em periódicos

FERNANDES, RAFAELLA F.; SPIELMANN, ADRIANO A.; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C. Raman spectroscopy as a tool to the *in situ* study of three lichens species from Antarctica and Brazil. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 46, p. 70-75, 2015.

FERNANDES, RAFAELLA F.; FERREIRA, GILSON R.; SPIELMANN, ADRIANO A.; EDWARDS, HOWELL G.M.; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C. FT-Raman spectroscopy of the Candelaria and Pyxine lichen species: A new molecular structural study. *Journal of Molecular Structure*, v. 1102, p. 57-62, 2015.

FERNANDES, RAFAELLA F.; PORTO, ARTHUR B.; FLORES, LEONÃ S.; MAIA, LENIZE F.; CORRÊA, CHARLANE C.; SPIELMANN, ADRIANO A.; EDWARDS, HOWELL G.M.; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C. Nature of light-absorbing pigments from Brazilian lichens identified by Raman spectroscopy. *Vibrational spectroscopy*, 99 (2018) 59–66.

Trabalhos paralelos

1. Eventos

IV Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman. Estudo Vibracional e Estrutura Molecular de alguns derivados quinolínicos. Juiz de Fora - 2015.

III Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman. Síntese e Caracterização Espectroscópica de Polienais Conjugados. Fortaleza, 2013.

2. Artigos completos publicados em periódicos

STEPHANI, R.; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C.; PAULA, I. L.; FERNANDES, R. F.; CARVALHO, ANTÔNIO F. DE; PERRONE, ÍTALO; TORRES, J. K. F.; MARTINS, E. ; TAVARES, G. M.. Solucionando defeitos e problemas em derivados do leite utilizando espectroscopia e análises de microestrutura. Indústria de Laticínios, v. Maio/Junho, p. 78-81, 2017.

FERNANDES, RAFAELLA F.; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C.; EDWARDS, H. G. M.; BROOKE, C. J. ; PEPPER, M. Raman spectroscopic analysis of a belltower commemorative wall decoration. Applied Physics. A, Materials Science & Processing, v. 123, p. 123-147, 2017.

FERNANDES, RAFAELLA F.; STROPPA, PEDRO HENRIQUE F. ; FERREIRA, GILSON R. ; DA SILVA, ADILSON D. ; EDWARDS, HOWELL G.M. ; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C. Vibrational spectroscopic study of some quinoline derivatives. Vibrational Spectroscopy, v. 86, p. 128-133, 2016.

FERNANDES, RAFAELLA F.; JÚNIOR, ANDERSON A.B. CANTARUTI; PORTO, ARTHUR B.; FERREIRA, GILSON R.; FLORES, LEONÃ S.; CORRÊA, CHARLANE C.; DOS SANTOS, HÉLIO F.; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C. ; MACHADO, FLÁVIA C. Vibrational spectroscopic and supramolecular studies applied to a chloramphenicol derivative. Vibrational Spectroscopy, v. 88, p. 63-70, 2016.

MAIA, LENIZE F.; FERNANDES, RAFAELLA F.; ALMEIDA, MARIANA R.; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C. Rapid assessment of chemical compounds from *Phyllogorgia dilatata* using Raman spectroscopy. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 619-626, 2015.

FERNANDES, R. F. et al. Raman spectroscopy as a tool in differentiating conjugated polyenes from synthetic and natural sources. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 434-441, 2015.

MAIA, L. F.; FERNANDES, R. F.; LOBO-HAJDU, G.; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C. Conjugated polyenes as chemical probes of life signature: use of Raman spectroscopy to differentiate polyenic pigments. *Philosophical Transactions - Royal Society. Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 372, p. 20140200-20140200, 2014.

Trabalho desenvolvido no exterior – Doutorado sanduíche

Jagiellonian University, Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET)

Supervisora: Prof. Malgorzata Baranska

Período: Abril/2017 – Fevereiro/ 2018.

O propósito do estágio no exterior envolveu o uso da microscopia Raman como ferramenta de investigação de sistemas celulares, mais precisamente células do sistema imune, eosinófilos (EOS) e o estudo da influência de corpos lipídicos na produção da peroxidase eosinofílica.

Eosinófilos compõem um dos três tipos de granulócitos correspondentes a 2-6 % das células brancas do sangue, e que possuem função na regulação dos processos de inflamação e no combate de parasitas. Por outro lado, os corpos lipídicos são inclusões citoplasmáticas ricas em lipídios com papel fundamental na formação de mediadores eicosanóides durante a inflamação e, capazes de se desenvolver nas células associadas aos processos de inflamação.

A enzima peroxidase eosinofílica (EPO) está envolvida no processo de morte de eosinófilos por parasitas, e, em média, presente na quantidade de 15 pg por célula; possui como cromóforo a protoporfirina IX.

Neste trabalho, comparou-se, através da espectroscopia Raman, modelos de culturas de células como a EOL-1, uma linha celular eosinofílica humana, e os eosinófilos isolados de doadores humanos.

Mapeamentos Raman foram obtidos através de um equipamento Raman WITec alpha 300 com linha de excitação em 532 nm, objetiva aumento em 60x de imersão em água, resolução de 3 pontos/ 1 μm e 0,5s de tempo de integração para um único espectro. O processamento de dados envolve a remoção de raios cósmicos, subtração do *background* (ordem 3) e análise da distribuição dos componentes selecionados, baseados na integração das bandas marcadoras, por *K-means cluster* (KMC).

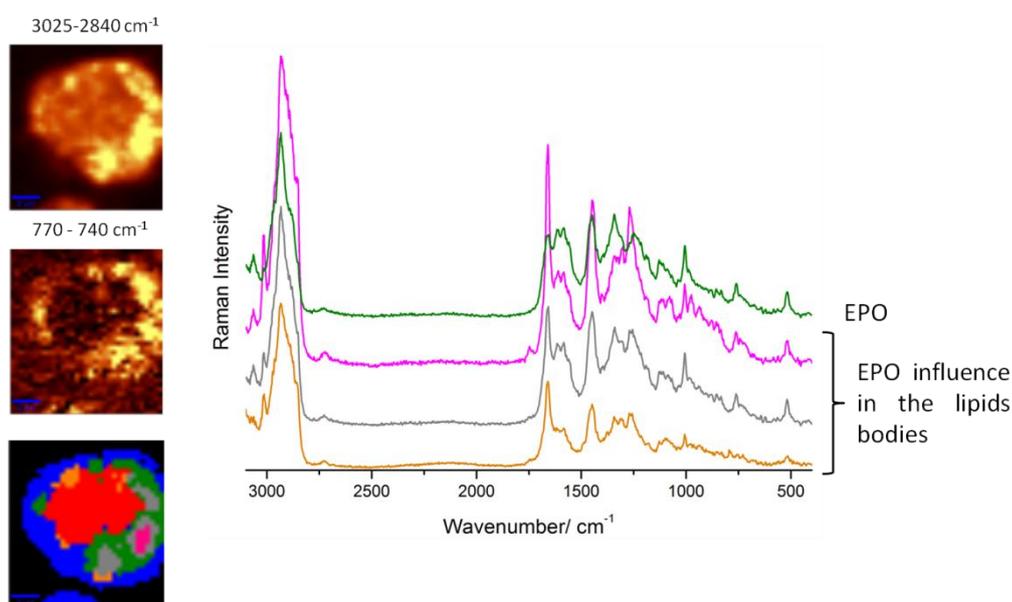
Eosinófilos foram isolados do sangue periférico de três doadores, e, como resultado do isolamento, 670.000 células foram obtidas. As células foram fixadas com glutaraldeído 0,5% durante 10 minutos e armazenadas em solução de PBS.

A principal diferença entre EOS e EOL-1 é na presença de EPO, que é observada em todas células analisadas. A composição química do citoplasma para o EOL-1 ainda é discutida. Após a ativação com PMA, tanto EOS e EOL- 1 produzem

corpos lipídicos homogêneos em quantidade comparável, e, de acordo com os espectros Raman obtidos, a composição química dos corpos lipídicos não depende do grupo de células (EOL ou EOS) e da ativação com PMA.

A Figura S1 exemplifica o tipo de resultado obtido no mapeamento Raman. O espectro em verde exibe, tipicamente, a presença de EPO devido à banda em 757 cm^{-1} relacionada ao grupo heme, e, nos demais espectros, a influência desta enzima no espectro do corpo lipídico, e, estas alterações exige uma análise mais aprofundada à respeito da bioquímica deste tipo de célula.

Figura S1: Análise Raman de célula EOS.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Trabalho submetido em 08 de Novembro de 2018 para a revista “British Journal of Haematology” com o título “Raman imaging highlights biochemical heterogeneity of human eosinophils versus human eosinophilic leukemia cell line”.