

MADALENA BARON

**Isolamento e Caracterização de Alfa - D - Glucana,  
Laminarana, Umbilicina e Trealose do Líquen  
*STEREOCAULON RAMULOSUM***

Tese apresentada à Coordenação de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA  
1985

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcello Iacomini.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Philip Albert James Gorin.

*Para meu noivo  
Renato Rau,  
com todo carinho e amor  
sempre.*

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao professor Dr. Marcello Iacomini pela excelente orientação, estímulo, amizade e especialmente, pela dedicação constante e responsabilidade excepcional, que tornaram, sô assim, possível a realização desta tese.

Ao professor Dr. Philip Albert James Gorin pela valiosa co-orientação, assistência construtiva na revisão do manuscrito e essencial colaboração na obtenção dos espectros de massa e de ressonância nuclear magnética de carbono treze.

Ao professor Dr. José Hazencleve Duarte pelas produtivas sugestões oferecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. José Batista Chaves Corrêa pela inestimável colaboração nas análises de cromatografia líquida-gasosa.

À professora Mírian Blümel pela amizade sincera e incentivo incansável manifestados sempre.

À pós-graduanda Sandra Maria Warumby Zanin e ao amigo Paulo Odebrecht pela colaboração na realização desta tese.

Aos professores Dr. Marco Aurélio Lacombe Feijô, Dra. Fany Reicher, Maria Eugênia Rabello Duarte, Gissélia Rabello Duarte e colegas de pós-graduação Luiz Pereira Ramos, Roberto Pontarolo, Elisa Rabello Duarte e Maria de Lourdes Corradi C. da Silva pelo agradável convívio nos laboratórios do setor de química de carboidratos.

À professora Dra. D<sup>ea</sup>. Amaral Ferreira do Amaral pelo cordial apoio oferecido como coordenadora do Curso de P<sup>os</sup>-Graduação em Bioqu<sup>im</sup>ica da Universidade Federal do Paran<sup>a</sup>.

Ao Renato Luiz Novak pela intermin<sup>ave</sup>l paci<sup>en</sup>cia na excelente execu<sup>ç</sup>ão do trabalho datilogr<sup>af</sup>ico.

Ao Lauro Novak pela competente ajuda na confec<sup>ç</sup>ão dos gr<sup>af</sup>icos apresentados nesta tese.

Ao professor Dr. Hector S. Os<sup>o</sup>rio pela classifica<sup>ç</sup>ão sistem<sup>at</sup>ica do l<sup>iq</sup>uen estudado.

Aos professores e funcion<sup>ar</sup>ios do Departamento de Bioqu<sup>im</sup>ica da Universidade Federal do Paran<sup>a</sup> que direta e indiretamente colaboraram para a realiza<sup>ç</sup>ão deste trabalho.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ci<sup>en</sup>cias Biol<sup>og</sup>icas pela assist<sup>en</sup>cia.

À CAPES pelo suporte financeiro.

# SUMÁRIO

	PÁGINA
Lista de tabelas .....	viii
Lista de figuras .....	ix
Lista de siglas .....	xii
Resumo .....	xiv
Abstract .....	xvi
Introdução .....	1
Metodologia experimental .....	25
1. Métodos analíticos gerais .....	25
2. Local de coleta e características gerais do líquen <i>Stereocaulon ramulosum</i> (Sw.) Räsusch .....	29
3. Isolamento dos alditóis, oligossacarídeos e polis- sacarídeos do líquen <i>Stereocaulon ramulosum</i> (Sw.) Räsusch .....	29
3.1 Extração benzeno-etanol .....	30
3.2 Extração metanol-água .....	30
3.3 Extração aquosa .....	33
3.4 Extração alcalina .....	37
4. Testes de homogeneidade aplicados aos polissacarí- deos obtidos das extrações aquosa e alcalina ....	40
4.1 $\alpha$ -D-Glucopiranana .....	40
4.2 $\beta$ -D-Glucopiranana .....	40
5. Metilação dos polissacarídeos e oligossacarídeos obtidos do líquen <i>Stereocaulon ramulosum</i> (Sw.) Räsusch.	41
5.1 Metilação dos polissacarídeos $\alpha$ -D-glucana e $\beta$ -D- glucana .....	41

5.2	Metilação da umbilicina e dos produtos obtidos da degradação de Smith controlada da $\alpha$ -D-glucana ...	42
6.	Análise dos produtos de hidrólise ácida dos polis- sacarídeos metilados na forma de acetatos de aldi- tóis .....	42
7.	Determinações do consumo de meta-periodato de sódio e produção de ácido fórmico pelos polissacarídeos.	43
7.1	$\alpha$ -D-Glucopirana .....	43
7.2	$\beta$ -D-Glucopirana .....	45
8.	Degradação tipo Smith dos polissacarídeos .....	46
9.	Degradação de Smith controlada da $\alpha$ -D-glucana ....	47
10.	Fracionamento dos produtos de degradação de Smith controlada da $\alpha$ -D-glucana por cromatografia em co- luna de celulose .....	48
	Resultados e discussão .....	50
1.	Componentes solúveis no extrato metanol-aquoso ..	52
2.	Polissacarídeos da extração aquosa .....	65
2.1	Polissacarídeos do precipitado de Fehling .....	70
2.2	Polissacarídeo do sobrenadante de Fehling .....	70
3.	Polissacarídeo da extração alcalina .....	90
	Referências bibliográficas .....	103

## LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
I	Análise por g.l.c. da Fração-A obtida pela extração metanol-água 4:1 do líquen <i>Stereocaulon ramulosum</i> (Sw.) Räsusch .....	54
II	Propriedades características de alguns polissacarídeos obtidos por extração aquosa do líquen <i>Stereocaulon ramulosum</i> (Sw.) Räsusch .....	69
III	Sinais de $^{13}\text{C}$ -n.m.r. e suas atribuições para as $\beta$ - <u>D</u> -glucanas .....	97

## L I S T A   D E   F I G U R A S

FIGURA		PÁGINA
1	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de <u>ace</u> tulação do extrato metanol-aquoso (Fração-A) . . . . .	53
2	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de <u>re</u> dução seguida por acetilação do extrato metanol - aquoso (Fração-A) . . . . .	55
3	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de <u>hi</u> drólise ácida total, seguida por redução e acetila- ção do extrato metanol-aquoso (Fração-A) . . . . .	56
4	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de <u>hi</u> drólise ácida total do glicosídeo umbilicina . . . . .	58
5	Espectros de <sup>13</sup> C-n.m.r. dos glicosídeos umbilicina obtidos do <i>St. ramulosum</i> e da <i>A. muehlenbergii</i> ...	59
6	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de <u>hi</u> drólise ácida total do oligossacarídeo $\alpha$ - $\alpha$ -trealose. . . . .	62
7	Espectros de <sup>13</sup> C-n.m.r. dos oligossacarídeos $\alpha$ - $\alpha$ - trealose obtidos do <i>St. ramulosum</i> e da <i>Cora pavonia</i> . . . . .	63
8	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de <u>hi</u> drólise ácida total dos polissacarídeos do extrato aquoso (precipitado etanólico total) . . . . .	66
9	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de <u>hi</u> drólise ácida total dos polissacarídeos do resíduo aquoso, resultante do congelamento e degelo do ex - trato aquoso . . . . .	67

10	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do sobrenadante aquoso, resultante do congelamento e degelo do extrato aquoso .....	68
11	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do precipitado de Fehling (extração aquosa) .....	71
12	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do polissacarídeo do resíduo de pH 7 - Cetavlon (extração aquosa) .....	72
13	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do polissacarídeo do resíduo de pH 8,5 - Cetavlon (extração aquosa) .....	73
14	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do polissacarídeo do sobrenadante de Fehling (extração aquosa) .....	74
15	Cromatogramas da $\alpha$ -D-glucana em coluna de DEAE-celulose e Sepharose 6B .....	76
16	Espectros de $^{13}\text{C}$ -n.m.r. de $\alpha$ -D-glucanas obtidas do <i>St. ramulosum</i> e da <i>C. islandica</i> .....	77
17	Espectros de massa obtidos por g.l.c.-m.s. dos resultados de metilação da $\alpha$ -D-glucana .....	78
18	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de metilação da $\alpha$ -D-glucana .....	81
19	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de degradação tipo Smith da $\alpha$ -D-glucana .....	82
20	Cromatogramas obtidos por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos produtos de degradação de Smith controlada da $\alpha$ -D-glucana .....	84
21	Espectros de $^{13}\text{C}$ -n.m.r. dos produtos de degradação de Smith controlada das $\alpha$ -D-glucanas obtidas do <i>St. ramulosum</i> e da <i>R. usnea</i> .....	85

22	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do extrato alcalino (precipitado etanólico total) .....	91
23	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do sobrenadante aquoso, resultante do congelamento e degelo do extrato alcalino .....	92
24	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do resíduo aquoso, resultante do congelamento e degelo do extrato alcalino .....	93
25	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do polissacarídeo da fração solúvel em álcali, insolúvel em água (extrato alcalino)	95
26	Cromatogramas da $\beta$ -D-glucana em colunas de Sepharose 4B-200 e Sepharose 6B .....	96
27	Espectro de $^{13}\text{C}$ -n.m.r. da $\beta$ -D-glucana do <i>St. ramulosum</i> .....	97
28	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de metilação da $\beta$ -D-glucana .....	98
29	Espectro de massa obtido por g.l.c.-m.s. dos resultados de metilação da $\beta$ -D-glucana .....	99
30	Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de degradação tipo Smith da $\beta$ -D-glucana .....	101

## LISTA DE SIGLAS

AcOH	-	Ácido acético.
c.	-	Concentração.
Cetavlon	-	Brometo de hexadeciltrimetilamônio.
$^{13}\text{C}$ -n.m.r.	-	Ressonância nuclear magnética de carbono treze.
cm	-	Centímetro.
$\text{cm}^3$	-	Centímetro cúbico.
$\text{D}_2\text{O}$	-	Óxido de deutério.
d.i.	-	Diâmetro interno.
Fração-A	-	Extrato metanol-aquoso após deionização por resinas Dowex 50 W x 8 (forma $\text{H}^+$ ) e Dowex 2 x 8 (forma $\text{HCO}_3^-$ ).
Fração-B	-	Produto obtido após degradação de Smith controlada da $\alpha$ - <u>D</u> -glucana do <i>St. ramulosum</i> .
g	-	Grama
g.l.c.	-	Cromatografia líquida-gasosa.
g.l.c.-m.s.	-	Cromatografia líquida-gasosa e espectrometria de massa.
h	-	Hora.
Hz	-	Hertz.
Km	-	Kilômetro.
L	-	Litro.
M	-	Molaridade.
m	-	Metro.
m/e	-	Massa/carga.

mg	-	Miligrama.
min	-	Minuto.
mL	-	Mililitro.
mm	-	Milímetro.
N	-	Normalidade.
NaBH <sub>4</sub>	-	Boroidreto de sódio.
nm	-	Nanômetro.
NaOD	-	Hidrôxido de sódio deuterado.
p.c.	-	Cromatografia em papel.
p/p	-	Peso/peso.
p.p.m.	-	Parte por milhão.
r.p.m.	-	Rotação por minuto.
s	-	Segundo.
T	-	Tempo de retenção.
TFA	-	Ácido trifluoracético.
TMS	-	Tetrametilsilano.
ug	-	Micrograma.
us	-	Microsegundo.
v/v	-	Volume/volume.
δ	-	Delta.

## RESUMO

O líquen ascomiceto *Stereocaulon ramulosum*, previamente extraído com benzeno-etanol (9:1, v/v, a quente), um processo que removeu 2,28% de material não polar, foi tratado com metanol contendo 20% de água (v/v, a quente). O extrato resultante continha os alditóis manitol (0,34%), arabinitol (1,87%) e inositol (0,04%), de acordo com as análises de cromatografia em papel e g.l.c.. Neste extrato também foram identificados, o glicosídeo umbilicina (2-O- $\beta$ -D-galactofuranosil-D-arabinitol; 0,86%) e o dissacarídeo  $\alpha$ - $\alpha$ -D-trealose (1-( $\alpha$ -D-glucopiranosil)- $\alpha$ -D-glucopiranosose ; 0,08%), através da comparação de seus espectros de ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$  com aqueles de material autêntico isolado de outros líquens.

A extração do líquen residual com água quente mostrou uma glucana solúvel (4,48%), que apresentava uma rotação específica de  $+171^{\circ}$ , indicativa de uma configuração  $\alpha$ -D para os resíduos de glucose. O espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. continha sinais correspondentes aos átomos de carbono dos resíduos de glucopiranosose 3-O- e 4-O-substituídos numa relação de 1,6:1, que estava de acordo com os resultados de análise de metilação, oxidação pelo metaperiodato de sódio e dados de degradação tipo Smith. As ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) estavam distribuídas irregularmente ao longo da cadeia linear, já que o estudo dos produtos de degradação de Smith controlada, demonstrou uma sequência repetitiva preponderante com duas ligações (1  $\rightarrow$  3) consecutivas interceptadas por

uma ligação (1 → 4) isolada, na estrutura desta glucana. Entretanto, algumas unidades de glucopiranosose ligadas (1 → 3) e (1 → 4) alternadas e poucas ligações (1 → 4) adjacentes também estavam presentes.

Uma β-D-glucana (0,19%) insolúvel em água, com rotação específica de + 3°, foi obtida por extração alcalina (KOH 2% , 100°, 2 h ) do resíduo remanescente, após o tratamento aquoso . O espectro de <sup>13</sup>C-n.m.r. continha seis sinais com deslocamentos químicos típicos de laminarana e a análise de metilação mostrou somente um derivado metilado, representado pelo 2,4,6-tri-0-metil-D-glucopiranosose. Estas análises indicaram que a glucana era composta exclusivamente por ligações (1 → 3) em sua cadeia linear. Esta estrutura foi confirmada, pela presença de apenas glucitol nos produtos de degradação tipo Smith, consistente com os resíduos de glucopiranosose 3-mono-0-substituídos, que são resistentes à oxidação pelo periodato.

## ABSTRACT

The ascomycetous lichen *Stereocaulon ramulosum*, previously extracted with hot benzene-ethanol (9:1, v/v), a process which removed 2,28% of nonpolar material, was treated with refluxing methanol containing 20% of water. The resulting extract contained mannitol (0,34%), arabinitol (1,87%) and inositol (0,04%), according to paper and gas-liquid chromatography. Also were identified the glycoside umbilicin (2-O- $\beta$ -D-galactofuranosyl-D-arabinitol; 0,86%) and the disaccharide  $\alpha$ - $\alpha$ -trehalose (1-( $\alpha$ -D-glucopyranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranose; 0,08%), by means of comparison of their  $^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance spectra with those of authentic material isolated from other lichens.

Extraction with boiling water of the residual lichen gave rise to a soluble glucan (4,48%), that had a specific rotation of  $+171^{\circ}$ , which indicated an  $\alpha$ -D-configuration. The  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectrum contained signals corresponding to 3-O and 4-O-monosubstituted residues of glucopyranose in a 1,6:1 ratio, which agreed with results of methylation analysis, periodate oxidation, and Smith-degradation (using strong hydrolytic conditions) data. The (1  $\rightarrow$  3) and (1  $\rightarrow$  4)-linkages were distributed irregularly along the linear chain, since study of the Smith-degradation products, using mild hydrolytic conditions, demonstrated a preponderant repeating sequence with two consecutive (1  $\rightarrow$  3)-links interspersed with single (1  $\rightarrow$  4)-links in the structure of this glucan. However, some alternate (1  $\rightarrow$  3) and (1  $\rightarrow$  4)-linked glucopyranosyl units and few adjacent (1  $\rightarrow$  4)-linkages were also present.

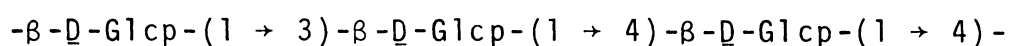
A water-insoluble  $\beta$ -D-glucan (0,19%), with a specific rotation of  $+ 3^{\circ}$ , was obtained by alkaline aqueous extraction (2% KOH,  $100^{\circ}$ , 2 h) of the residue remaining after aqueous treatment. The  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectrum contained six signals with chemical shifts typical of laminaran and methylation analysis gave rise to only one methylated monosaccharide component (2,4,6-tri-0-methyl-D-glucopyranose). This indicates that the glucan was composed exclusively of (1  $\rightarrow$  3)-links. This structure was confirmed by the formation of glucitol only after Smith-degradation, using strong hydrolytic conditions, consistent with 3-0-monosubstituted residues of glucopyranose, which are resistant to periodate attack.

## I N T R O D U Ç Ã O

O exame científico pioneiro em líquens, que são entidades resultantes da simbiose entre alga e fungo (13), foi registrado em 1815, quando Berzelius (7) trabalhando com o líquen *Cetraria islandica*, também conhecido por "Isländisch Moos", isolou um polissacarídeo através de sua precipitação por resfriamento de um extrato aquoso quente.

Em 1947, Meyer e Görtler (47), estudando o mesmo líquen e empregando o procedimento de isolamento como realizado por Berzelius, descreveram este polissacarídeo, originalmente denominado de liquenina e atualmente de liquenana, como sendo uma  $\beta$ -D-gluco-piranana ( $[\alpha]_D^{20} = +8^{\circ}$  a  $+10^{\circ}$  em NaOH 2N) linear, contendo ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) numa proporção molar de 3:7, de acordo com os resultados de oxidação com o ácido periódico. Esta estrutura foi confirmada em 1957, quando Chanda et alii (12) purificaram a liquenana por processos repetidos de solubilização em água quente seguida por sua precipitação pelo resfriamento, e via seu complexo cúprico insolúvel formado com solução de Fehling. No mesmo ano, Peat et alii (53), após efetuarem hidrólise ácida parcial do polissacarídeo, seguida pelo fracionamento e análise dos oligossacarídeos liberados, sugeriram que a cadeia da liquenana era formada por uma sequência repetitiva de unidades de  $\beta$ -celotriose unidas por ligações  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3). Em 1962, Perlin e Suzuki (55), realizando estudos de enzimólise seletiva com as enzimas celulase e laminarinase, concluíram que a constituição básica da liquenana era representada

por uma unidade tetramérica, em que duas ligações (1 → 4) adjacentes alternavam-se por uma ligação (1 → 3) isolada, embora, ocasionalmente, quatro monômeros consecutivos fossem unidos por ligações (1 → 4). Estudos posteriores de degradação de Smith controlada (19) e de espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. (4) mostraram que duas ligações (1 → 3) consecutivas não estavam presentes e que a estrutura repetitiva predominante na liquenana (Estrutura **I**) era idêntica à sugerida por Perlin e Suzuki (55).

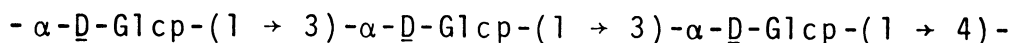


**I**

Além da presença da liquenana em *C. islandica*, Meyer e Görtler (48), em 1947, isolaram uma mistura de polissacarídeos na solução sobrenadante, obtida pelo resfriamento do extrato aquoso quente, como mencionado anteriormente. Esta mistura foi denominada originalmente de isoliquenina e pela hidrólise ácida, apresentou glucose, como também pequenas quantidades de galactose e manose. Entretanto, Chanda et alii (12) aplicaram o nome de isoliquenina, atualmente denominada de isoliquenana, a um polissacarídeo linear, contendo glucose como o único monômero e que foi obtido na solução sobrenadante, como descrito por Meyer e Görtler (48), porém com a remoção da liquenana residual por processos repetidos de congelamento e degelo desta solução. Outros polissacarídeos contaminantes foram removidos como complexos cúpricos insolúveis formados com solução de Fehling e uma purificação adicional da isoliquenana foi efetuada via precipitação fracional com acetona do seu complexo cúprico solúvel em água. Estes autores após realizarem as análises de polarimetria ( $[\alpha]_D^{15} = +255^0$ ; c. 1,0 em  $\text{H}_2\text{O}$ ) e metilação, demonstraram a presença de ligações  $\alpha$ -(1 → 3) e  $\alpha$ -(1 → 4), cuja relação molar de 60:40 foi determinada por oxidação com meta-periodato de sódio.

Contudo, em 1961, Peat et alii (54), estudando os produtos de hidrólise ácida parcial da isoliquenana, confirmaram a presença destas ligações, porém sugeriram uma relação molar de 55:45, ao realizarem também oxidação com periodato. Em 1966, Fleming e Manners (20) efetuaram a degradação de Smith controlada na isoliquenana e obtiveram como os principais produtos, nigerosil-eritritol (43%) e  $\alpha$ -glucosil-eritritol (38%) e em menores quantidades, aldeído glícólico (1%), glicerol (3%), eritritol (6%), nigerose (3%) e um oligossacarídeo superior (possivelmente nigerotriosil-eritritol) (5%). Com base nos resultados acima, foi calculada a proporção de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) igual a 56,5 e 43,5%, respectivamente, sendo esta proporção plenamente de acordo com os resultados da análise de oxidação pelo periodato realizada separadamente, em que foi obtida a relação molar de 57:43. Os autores ainda concluíram que a estrutura da isoliquenana apresentava sequências de um ou dois resíduos de glucose unidos por ligações  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3), os quais eram cercados em cada lado por resíduos de glucose unidos por ligações  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4). Entretanto, a relação molar de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) presente na isoliquenana permanecia duvidosa, de modo que posteriormente, com a espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., tentou-se obter resultados mais acurados para a determinação desta relação. O espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. (26) foi de grande interesse, já que a relação de sinais para C-3 ( $\delta$  82,1 e 81,9) e C-4 ( $\delta$  79,3) substituídos foi igual a 66:34, indicando que uma proporção superior de resíduos de glucose eram substituídos no C-3, ao contrário dos valores de 60(12), 55(54) e 57%(20), previamente registrados. Baseados nestes resultados de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., pode-se sugerir a estrutura repetitiva preponderante na isoliquenana, como representada na Estrutura 2, embora discordando até certo ponto, dos resultados obtidos por Fleming e Manners (20), pois além desta estrutura, demonstraram que a sequência de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) alternadas, também estava ampla-

mente distribuída ao longo da estrutura global do polímero.



## 2

Pelo prosseguimento com as investigações no líquen *C. islandica*, no sentido de obter outros polissacarídeos, além dos já isolados (liquenana e isoliquenana), foi deduzido que o processo de fracionamento descrito por Chanda et alii (12), presumivelmente separou a liquenana de um outro componente contendo D-manose e D-galactose, que já havia sido detectado em 1906, quando Ulander e Tollens (38) trabalharam com este líquen. Em 1924, Karrer e Joos (40) removeram a liquenana por resfriamento de um extrato aquoso quente obtido do mesmo líquen e trataram o sobrenadante com solução de Fehling, observando a formação de um complexo cúprico insolúvel, que após decomposição com ácido diluído, forneceu um polissacarídeo constituído por manose, galactose e glucose numa relação molar de 21:35:44. Tal observação sugeriu a co-precipitação, como complexos cúpricos, de um heteropolissacarídeo contendo manose e galactose com a liquenana residual. Mais tarde, Buston e Chambers (11), após remoção dos materiais solúveis em álcool (ácidos líquênicos) e em água quente (liquenana e principalmente isoliquenana) e posterior extração do resíduo líquênico com solução de hidróxido de sódio a 4%, a frio, sugeriram a presença "hemiceluloses", constituídas principalmente por manose e galactose, além de um ácido urônico, que foi identificado como sendo o galacturônico. Deve-se salientar que o termo "hemicelulose", foi empregado por Buston e Chambers para designar substâncias resistentes a extração com água, mas extraídas do tecido com álcali diluído, embora tal definição deveria ser considerada incorreta, pois as hemiceluloses não podem ser definidas simplesmente

por suas propriedades de solubilidade. Além disso, os resultados obtidos por estes autores, não foram confirmados em 1943, por Granischstädten e Percival (30), que após removerem os ácidos liquênicos e os polissacarídeos solúveis em água quente, submeteram o líquen à extração alcalina, em condições idênticas às descritas por Buston e Chambers (11). O extrato alcalino foi então, tratado com solução de Fehling, havendo a formação de um complexo cúprico insolúvel, que decomposto com ácido clorídrico diluído, forneceu uma mistura de polissacarídeos constituída por glucose (89%), galactose (8%), manose (3%) e um ácido urônico (5%). A presença da alta concentração de glucose no extrato alcalino, mostrou uma diferença surpreendente quando comparado com o extrato alcalino obtido por Buston e Chambers (11), o qual não apresentou glucose, estando este último também em discordância com os resultados obtidos por Ulander e Tollens (68), que desde 1906, já haviam registrado a presença de manose, galactose e principalmente glucose no resíduo liquênico, após a remoção de liquenana por extração aquosa quente. Também o ácido urônico encontrado por Granischstädten e Percival (30) não tratava-se do galacturônico, mas provavelmente do glucurônico, embora estes resultados da presença de ácidos urônicos registrados em ambos trabalhos, deveriam ser considerados duvidosos, uma vez que até aquele ano, métodos eficientes e tão simples como a cromatografia em papel, para a separação e identificação de misturas de açúcares, não haviam sido desenvolvidos. Apesar de um componente heteropolimérico de *C. islandica* não ter sido isolado em estado puro, visto que a glucose presente no extrato alcalino provavelmente era originária da liquenana residual não totalmente extraída por água quente, Granischstädten e Percival (30) foram os primeiros a encontrar uma possível estrutura deste composto, baseados nos resultados de metilação. Estes autores demonstraram a presença do derivado metilado 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose, indicando que

era um polissacarídeo ramificado, com unidades terminais não reductoras de D-galactopiranoose, ao contrário dos polissacarídeos até então isolados neste líquen, que eram lineares.

A investigação química dos polissacarídeos em líquens não foi restrita aos intensos estudos realizados com *C. islandica*, pois em 1955, Aspinall et alii (5) submetendo o líquen *Cladonia alpestris*, a um processo de extração alcalina (KOH aquoso, a frio) e posterior purificação com solução de Fehling, obtiveram uma mistura de polissacarídeos altamente ramificados, contendo resíduos de D-galactose, D-glucose e D-manose. Estudos de metilação deste material demonstraram que a maioria dos resíduos de D-galactose e pequena quantidade dos resíduos de D-glucose e D-manose ocupavam as posições terminais, enquanto que a maior parte dos resíduos de D-glucose e D-manose constituíam a cadeia principal da estrutura molecular. O interesse demonstrado pelo estudo deste líquen provavelmente surgiu, devido ao fato de conter mais de 90% de carboidratos, sugerindo que este líquen pudesse atuar como uma fonte alimentar de subsistência para as renas norueguesas e assim explicando o nome vulgar de "Reindeer Moos" (Musgo das Renas) (31).

Em 1969, Mičovič et alii (49) foram os primeiros a determinar a estrutura de um polissacarídeo ácido isolado do líquen *Evernia prunastri*. Este polímero obtido por extração com álcali (NaOH aquoso, a frio) e purificação por precipitação com hidróxido de bário, solução de Fehling e iodo, mostrou ser constituído por D-galactose (36%), D-manose (54%) e ácido D-galacturônico (10%). Com base nos resultados de metilação, a estrutura da galactomanana ácida era altamente ramificada com unidades terminais não reductoras de galactopiranosil, manopiranosil e ácido D-galactopiranosilurônico, além da presença de outras unidades de

manopiranosil 2-0-, 2,6-di-0-, 3,6-di-0- e 2,3,6-tri-0-substitu $\bar{i}$ das, sendo esta tri-0-substitui $\bar{c}$ o in $\bar{e}$ ditada, pois foi pela primeira vez observada em polissacar $\bar{i}$ deos liqu $\bar{e}$ nicos. E de acordo com os dados de espectroscopia de Infra-vermelho e hidr $\bar{o}$ lise enzim $\bar{a}$ tica, os res $\bar{i}$ duos galactosil apresentaram a configura $\bar{c}$ o  $\beta$ -D, enquanto que os res $\bar{i}$ duos manosil, mostraram ser predominantemente do tipo  $\alpha$ -D.

Mais tarde, o l $\bar{i}$ quen *E. prunastri* foi estudado por Takeda et alii (65), que demonstraram a presen $\bar{c}$ a de mais tr $\bar{e}$ s polissacar $\bar{i}$ deos estruturalmente diferentes, isolados por extra $\bar{c}$ o aquosa quente do l $\bar{i}$ quen. O extrato aquoso foi submetido a procedimentos repetidos de congelamento e degelo, obtendo-se uma fra $\bar{c}$ o polisacar $\bar{i}$ dica insol $\bar{u}$ vel em  $\bar{a}$ gua fria, que apresentava uma  $\alpha$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{17} = + 200^0$ ; c. 0,5 em  $H_2O$ ) com liga $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) numa rela $\bar{c}$ o molar de 4:1 e uma fra $\bar{c}$ o polisacar $\bar{i}$ dica sol $\bar{u}$ vel em  $\bar{a}$ gua fria. Esta  $\bar{u}$ ltima, foi ent $\bar{a}$ o, purificada por precipita $\bar{c}$ o com hidr $\bar{o}$ xido de cetiltrimetilam $\bar{o}$ nio, obtendo-se uma fra $\bar{c}$ o precipitada que revelou ser constitu $\bar{i}$ da por uma  $\beta$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{17} = + 12^0$ ; c. 0,5 em  $H_2O$ ) com liga $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) numa rela $\bar{c}$ o molar de 3:1 e uma fra $\bar{c}$ o sobrenadante que mostrou a presen $\bar{c}$ a de um polisacar $\bar{i}$ deo  $\alpha$ -D-glucos $\bar{i}$ dico ( $[\alpha]_D^{17} = + 164^0$ ; c. 0,5 em  $H_2O$ ), cujas liga $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) apresentavam-se numa rela $\bar{c}$ o aproximada de 3:2. Neste trabalho, os autores ainda investi $\bar{g}$ aram outros l $\bar{i}$ quens, demonstrando que um polisacar $\bar{i}$ deo de *Acrosyphus sphaerophoroides* consistia de um novo tipo de glucana linear, uma vez que al $\bar{e}$ m de liga $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3) e  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4), apresentava liga $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  6) na mol $\bar{e}$ cula, enquanto que os pol $\bar{i}$ meros de *Alectoria sulcata* e *A. sarmentosa* foram identificados com a isoliquenana e liquenana, em virtude de apresentarem rota $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s espec $\bar{i}$ ficas e espectros de Infra-vermelho id $\bar{e}$ nticos aos dos polisacar $\bar{i}$ deos de *C. islandica*.

Continuando com a pesquisa sobre polissacarídeos, para caracterização estrutural destes constituintes isolados de diferentes espécies de líquens, também mereceu especial atenção por parte dos pesquisadores, o estudo de um polissacarídeo vulgarmente conhecido com o nome de pustulana. Desde 1954, Lindberg e McPherson (43) acreditavam na presença de um polissacarídeo com unidades galactofuranosídicas no líquen *Umbilicaria pustulata*, em virtude de terem demonstrado a ocorrência da umbilicina, um glicosídeo galactofuranosídico, neste líquen. Entretanto estes autores não tiveram sucesso no isolamento de tal polímero, mas ao contrário encontraram em grande quantidade uma glucopirranana ( $[\alpha]_D = -46^{\circ}$ ; c. 0,5 em H<sub>2</sub>O) linear com ligações  $\beta$ -(1 → 6) entre as suas unidades, e que já havia sido isolada anteriormente por Drake, que a tinha originalmente chamada de pustulina. Em 1968, Shibata et alii (61) encontraram este polímero nos líquens *Gyrophora esculenta* e *Lasallia papulosa*, porém com uma diferença significativa revelada pelo espectro de Infra-vermelho, que mostrou bandas de absorção de éster em 1735 e 1250 cm<sup>-1</sup> para as glucanas destes líquens, enquanto que os espectros das pustulanas isoladas de *U. pustulata* e *U. hirsuta* não mostraram absorção nestas regiões. Mais tarde, estes autores (52) elucidaram a estrutura dos polissacarídeos isolados dos líquens *G. esculenta* e *L. papulosa*, mostrando que tratavam-se essencialmente de  $\beta$ -D-glucanas lineares unidas por ligações (1 → 6), em que aproximadamente 10% das unidades de glucose carregavam grupos O-acetil na posição 3. Em 1970, Nishikawa et alii (52), investigando três espécies do gênero *Umbilicaria*, *U. angulata*, *U. caroliniana* e *U. polyphylla*, observaram nos três líquens a presença de glucanas tipo-pustulana parcialmente O-acetiladas, semelhantes às isoladas em *G. esculenta* e *L. papulosa*. Esta observação sugeriu uma provável correlação entre a posição taxonômica destes líquens e seus constituintes polissacarídicos,

uma vez que pustulanas parcialmente aciladas ocorriam em três gêneros de líquens, *Gyrophora*, *Lasallia* e *Umbilicaria*, pertencentes à mesma família, Gyrophoraceae. Tal sugestão foi confirmada em 1974, quando os mesmos autores (51) isolaram este tipo de glucana em outra espécie do gênero *Lasallia*, *L. pensylvanica*, embora como toda regra, apresentando exceções, representadas pelas pustulanas isoladas dos líquens *U. pustulata* e *U. hirsuta*, que aparentemente não eram aciladas.

Nishikawa et alii (51) também examinaram quatro espécies de líquens do gênero *Cladonia*, *C. crispata*, *C. mitis*, *C. rangiferina* e *C. squamosa*, revelando a presença de heteroglicanas complexas, solúveis em água fria, juntamente com pequenas quantidades de  $\alpha$ -D-glucanas ( $[\alpha]_D = + 215^0$  a  $+ 245^0$  em NaOH 1N), insolúveis em água fria, contendo ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) alternadas, como nas glucanas tipo-nigerana. Os heteropolímeros isolados dos quatro líquens eram constituídos predominantemente por glucose, galactose e manose, além de pequenas quantidades de arabinose, xilose e ramnose e mostraram espectros de Infra-vermelho e valores de rotação específica muito semelhantes, de modo que os autores sugeriram que tais polímeros, aparentemente relacionados, ocorriam comumente como os principais constituintes carboidratos nos líquens do gênero *Cladonia*. No mesmo trabalho, o líquen *Usnea rubescens* também foi investigado, sendo encontrado uma  $\beta$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{18} = + 21,3^0$ ; c. 0,61 em NaOH 1N), insolúvel em água, com ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) numa relação molar de 3:7, que foi identificada com a liquenana de *C. islandica*.

Outros polissacarídeos solúveis em água fria, isolados de várias espécies de líquens da família Stictaceae, também foram estudados quimicamente no ano de 1974, por Takahashi et alii (64), que comprovaram a presença de glicopeptídeos nestes simbiontes,

sugerindo a importância destes polímeros sob o ponto de vista quimiotaxonômico. Estes autores, estudando especialmente o líquen *Lobaria orientalis*, demonstraram a presença de no mínimo dois glicopeptídeos, e pelo estudo de um deles, verificaram que a porção carboidratada era constituída principalmente por glucose e galactose, com menores quantidades de manose, arabinose, xilose, ramnose e glucosamina. Embora poucas informações tenham sido fornecidas a cerca da estrutura deste último glicopeptídeo, foi revelado que de acordo com os resultados de metilação, os resíduos de glucose estavam unidos principalmente por ligações (1 → 6), enquanto que os resíduos de manose, por ligações (1 → 3), e além disso, a porção carboidratada estava unida aos aminoácidos serina e treonina da porção peptídica, através de ligações O-glicosil. Neste trabalho, os autores ainda mencionaram que glicopeptídeos eram encontrados em líquens da família Cladoniaceae, *C. bellidiflora* e *C. graciliformis*, como também no *A. sphaerophoroides*, e embora vários glicopeptídeos isolados de plantas já tivessem sido registrados em muitas literaturas, a ocorrência de tais polímeros em líquens nunca havia sido provada.

Com o advento da espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., informações valiosas e precisas sobre a estrutura de polissacarídeos e outros componentes químicos foram alcançadas, e em 1979, Yokota et alii (73), empregando este método de análise, determinaram as proporções relativas das ligações existentes em homo-D-glucanas isoladas de várias espécies de líquens. Esta análise demonstrou que o líquen *Parmelia caperata* continha uma  $\alpha$ -D-glucana com ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação molar de 1:1, enquanto que *Cetraria richardsonii* apresentava uma  $\beta$ -D-glucana e uma  $\alpha$ -D-glucana com ligações (1 → 3) e (1 → 4) em proporções relativas de 3:7 e 3:2, respectivamente. Os dados de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. ainda mostraram que a *acroscyphana* obtida de *A. sphaerophoroides* era uma  $\alpha$ -D-glucana com

ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação de 2:3 e que continha também 6% de ligações (1 → 6). Estes últimos resultados confirmaram os obtidos anteriormente por análise química (65), em que foi revelado a presença destas ligações, sem contudo serem fornecidas suas proporções. Polímero idêntico à *acroschyphana* foi encontrado no líquen *Sphaerophorus globosus*, sendo estes gêneros pertencentes à mesma família, Sphaerophoraceae. Além disso, o espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. do polissacarídeo isolado de *Pilophoron acicularis* foi idêntico ao do *Stereocaulon japonicum*, que mostrou ser uma  $\alpha$ -D-glucana com ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação de 2:1, sendo ambos os gêneros, membros da família Stereocaulaceae. Desse modo, os autores concluíram, que a taxonomia química de líquens, com base em seu conteúdo polissacarídico, era prontamente aceitável pelo exame dos espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. destes polímeros.

Outras espécies de líquens pesquisadas quanto ao seu conteúdo polissacarídico, foram as do gênero *Stereocaulon*, cujos estudos estruturais tiveram especial importância para uma possível análise comparativa, visto que o líquen investigado no presente trabalho foi da espécie *St. ramulosum*. Estes estudos foram iniciados, desde 1906, quando Ulander e Tollens (68) trabalharam com o líquen *St. paschale* e detectaram a presença de apenas manose e galactose, porém em 1951, foram encontrados, além destes dois monômeros, a ocorrência de grandes quantidades de glucose no mesmo líquen(31). Mais tarde, Hauan e Kjolberg (31), também estudando o *St. paschale*, obtiveram por extração aquosa quente e purificação por congelamento e degelo do extrato aquoso, com posterior passagem do sobrenadante por coluna de DEAE-celulose, uma fração principal, constituída essencialmente por uma  $\alpha$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{20} = +233^0$ ), levemente ramificada, contendo ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação molar de 1:2,5. Os autores verificaram que o polissacarídeo era constituído principalmente por ligações

(1 → 4), com ligações (1 → 3) nos pontos de ramificação, embora estas últimas ligações também ocorressem na cadeia linear, aproximadamente uma ligação (1 → 3) para cada quatro ligações (1 → 4) e em todas ou quase todas extremidades não redutoras. Em 1978, Yokota e Shibata (72), empregando a mesma metodologia de extração e purificação utilizada por Hauan e Kjolberg, isolaram do líquen *St. japonicum*, um polissacarídeo solúvel em água fria, que foi demonstrado tratar-se de uma α-D-homoglucana ( $[\alpha]_D^{20} = + 201^\circ$ ). Este polímero, quando submetido à metilação por uma combinação dos métodos de Hakamori e Kuhn e metanólise do material totalmente metilado para análise por g.l.c., mostrou que era uma glucana parcialmente ramificada, contendo ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação aproximada de 3:1. Contudo, a degradação de Smith controlada deste polissacarídeo, seguida por acetilação e posterior análise por espectrometria de massa dos produtos de degradação, evidenciaram a presença de um fragmento representado pelo nigerosil-eritritol peracetato, indicando que a glucana apresentava ligações (1 → 3) e (1 → 4), porém numa relação de 2:1. Estes resultados duvidosos foram então esclarecidos no ano seguinte, quando os mesmos autores mostraram a presença de uma α-D-glucana com ligações (1 → 3) e (1 → 4) na proporção de 2:1, de acordo com os resultados de espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. (73), já descritos anteriormente. Em 1981, Takahashi et alii (62), também investigando polissacarídeos de líquens "stereocaulaceous", obtidos por extração aquosa e purificação pelo método de congelamento e degelo, seguido pela cromatografia sobre uma coluna de DEAE-celulose, chegaram a conclusão, que os líquens da família Stereocaulaceae investigados até aquele ano, poderiam ser classificados em dois grupos, de acordo com os seus constituintes polissacarídicos solúveis em água fria. Um grupo compreendendo os líquens *St. vesuvianum*, *St. tomentosum* e *St. intermedium*, que era caracterizado pela presença de uma heteroglicana β-dominante contendo D-manose, D-

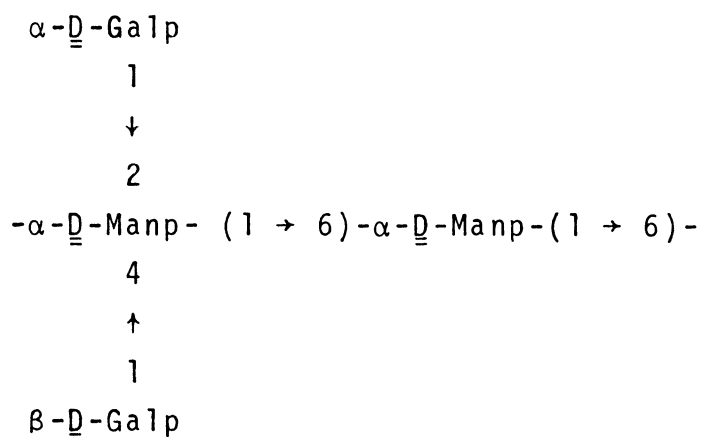
galactose e D-glucose e um grupo envolvendo o *St. japonicum*, *St. sorediiferum* e *St. exutum*, que continha uma  $\alpha$ -D-glucana com ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) numa relação molar de 3:1. Dessa classificação, deve-se apenas ressaltar, que a relação das ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1  $\rightarrow$  4) igual a 3:1 na  $\alpha$ -D-glucana do *St. japonicum* foi adotada de estudos realizados previamente com este líquen e deveria ter sido considerada como 2:1, já que esta última relação foi confirmada por dois métodos de análise plenamente confiáveis, a saber, degradação de Smith controlada (72) e espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. (73). Apesar disso, a finalidade principal deste trabalho foi perfeitamente válida, pois mostrou que estes resultados poderiam auxiliar numa futura investigação quimiotaxonômica dos líquens da família Stereocaulaceae.

Além de estudos quimiotaxonômicos sobre os polissacarídeos isolados de líquens, Takahashi et alii (63) também tiveram um grande interesse em saber qual a porção destas entidades simbióticas responsáveis pela produção dos componentes carboidratados. Estes autores, então realizaram um estudo muito importante, em que compararam os polissacarídeos de micobiontes e ficobiontes isolados separadamente de líquens dos gêneros *Cladonia*, *Parmelia* e *Ramalina*, com os polissacarídeos solúveis em água, característicos destes líquens intactos. Os micobiontes e ficobiontes dos líquens acima foram isolados e cultivados separadamente em meios de cultura específicos para os seus crescimentos. Em seguida, os micobiontes e ficobiontes coletados foram extraídos primeiramente com éter, seguido por etanol a 80%, para remoção dos compostos lipofílicos, e então tratados com água, para extração dos polissacarídeos. Estes últimos, foram precipitados a partir dos extratos aquosos pela adição de etanol, e separados por processos de congelamento e degelo, em duas frações, uma solúvel em água fria e a outra insolúvel. Estas frações foram então analisadas

segundo às suas composições monossacarídicas, seus espectros de Infra-vermelho e valores de rotação específica e de acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que os polissacarídeos de micobiontes eram muito similares ou idênticos com aqueles dos líquens intactos, enquanto que os dos ficobiontes apresentavam características diferentes. Desta forma, foi sugerido que os polissacarídeos solúveis em água isolados de líquens, eram principalmente produzidos por seus micobiontes, sendo esta sugestão plenamente de acordo com os resultados obtidos por Shibata e seus colaboradores, em inúmeros trabalhos realizados anteriormente, onde verificaram que vários metabólitos de tamanho molecular pequeno e médio eram produzidos pelos micobiontes, sem a participação dos ficobiontes.

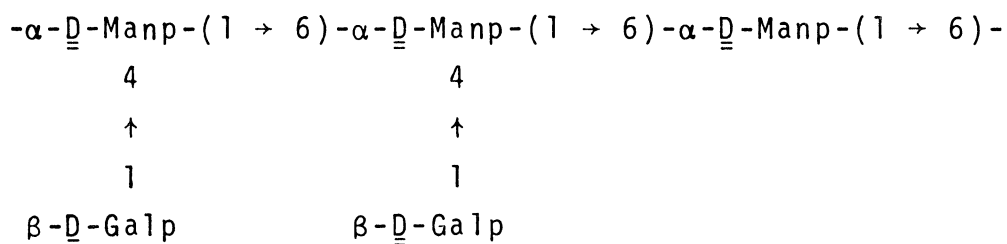
Como até o ano de 1982, pesquisas sobre polissacarídeos em líquens estavam sendo desenvolvidas quase que exclusivamente pelos pesquisadores japoneses e ofereciam ainda um vasto campo aberto para novas investigações químicas, Gorin e Iacomini (26) interessaram-se pelos estudos estruturais de polissacarídeos isolados dos líquens *C. islandica* e *Ramalina usnea*. O objetivo da escolha de *C. islandica* para purificação e caracterização estrutural de sua galactomanana, foi devido ao fato de que até aquele ano, a mesma não havia sido obtida em estado puro. Além disso, a estrutura da galactomanana de *R. usnea* também foi elucidada, com a finalidade de ser realizado um estudo comparativo entre estes dois heteropolissacarídeos. Pela extração aquosa quente de ambos os líquens, seguida por procedimentos repetidos de congelamento e degelo do extrato aquoso e posterior tratamento dos sobrenadantes resultantes com solução de Fehling, foram obtidas as galactomananas, precipitadas como complexos cúpricos. Estes polissacarídeos bastante relacionados estruturalmente, apresentaram cadeias principais compostas de unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosil unidas

por ligações (1 → 6). Entretanto, o polímero de *C. islandica* era mais ramificado, com cadeias laterais de α-D-Galp-(1 → 2) e β-D-Galp-(1 → 4) ligadas à mesma unidade α-D-manopiranosil, como mostra na Estrutura preponderante 3. Já a galactomanana de *R. usnea*



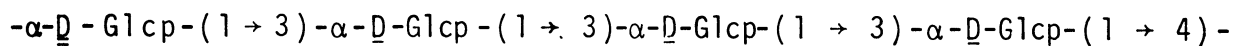
3

apresentava apenas grupos de β-D-Galp-(1 → 4) ligados à cadeia de manose, cuja disposição era aproximadamente dois substituintes a cada três resíduos de α-D-manopiranosil ligados (1 → 6) da cadeia principal, como representado na Estrutura preponderante 4.



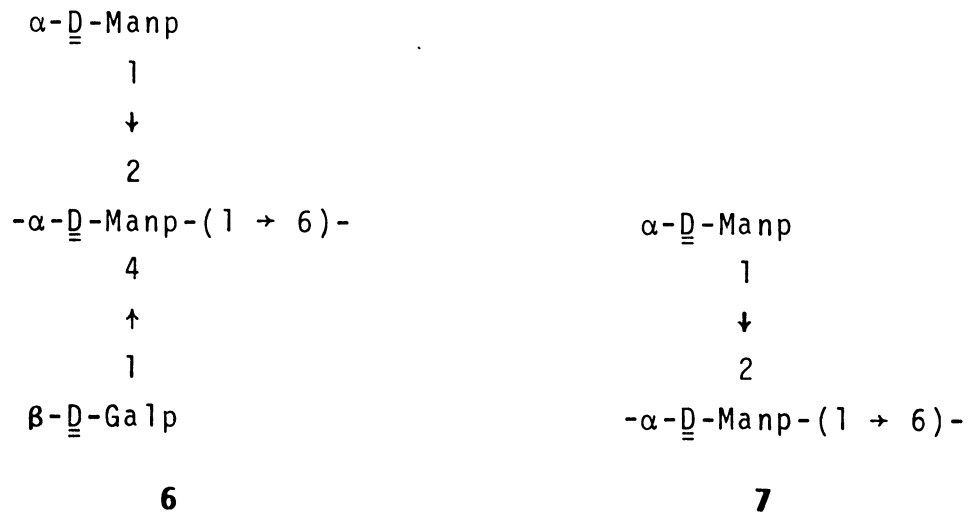
4

Também no líquen *R. usnea*, foi observado que não havia uma β-D-glu cana semelhante à liquenana de *C. islandica*, mas apresentava uma α-D-glu copiranana, com uma estrutura repetitiva preponderante (Estrutura 5), em que três ligações (1 → 3) consecutivas eram interceptadas por uma ligação (1 → 4) isolada.

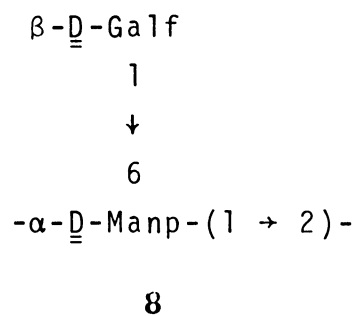


## 5

Para dar continuidade aos estudos com líquens, Gorin e Iacomini (36) reexaminaram os polissacarídeos de *C. alpestris*, desde que a investigação preliminar realizada neste líquen, por Aspinall et alii (5), foi no ano de 1955, e com os melhoramentos nas técnicas de análises de polissacarídeos, durante os últimos 30 anos, poderiam ser oferecidos maiores esclarecimentos da natureza estrutural destes polímeros. Além disso, as estruturas químicas dos polissacarídeos de *C. confusa* e *C. amaurocraea* também foram elucidadas com o propósito de ser realizado um estudo comparativo dentro do mesmo gênero. Os autores observaram que *C. alpestris* e *C. confusa* eram similares quanto à forma de crescimento, a despeito de seus habitats diferentes, em que as condições climáticas eram totalmente diversas. Estes dois líquens continham traços de nigerana insolúvel em água, isolada por precipitação subsequente à extração aquosa quente, sendo que este tipo de glucana também já havia sido isolado em outros líquens do gênero *Cladonia*, como mostrado no trabalho realizado por Nishikawa et alii (51), mencionado anteriormente. Os líquens residuais da extração aquosa de *C. confusa* e *C. alpestris* foram então tratados com solução de hidróxido de potássio, a quente, e aos extratos alcalinos resultantes foi adicionado solução de Fehling, observando-se a formação de complexos cúpricos insolúveis, que após a remoção do cobre, resultaram em galactomananas puras. Estes heteropolímeros não eram idênticos, mas estruturalmente relacionados, com cadeias principais de  $\alpha\text{-D}$ -manopiranosil ligadas (1  $\rightarrow$  6) e substituídas em diferentes posições por unidades de  $\beta\text{-D}$ -galacto e  $\alpha\text{-D}$ -manopiranosil, como representado nas Estruturas **6** e **7**. Já os sobrenadantes da etapa de Fehling apresentaram altas proporções de



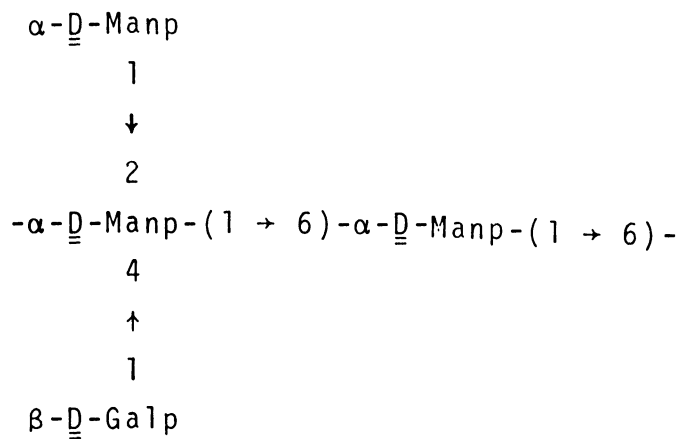
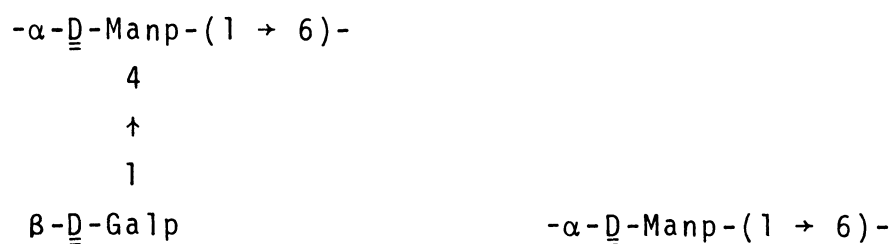
resíduos de  $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-galactofuranosil}$ , sendo que o polissacarídeo de *C. alpestris* continha unidades consecutivas de  $\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-manopiranosil}$  ligadas (1 → 2) e substituídas nas posições 6 por  $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-galactofuranose}$  (Estrutura 8), enquanto que o da *C. confusa* era uma galactana com ambas as formas furanosil e piranosil. O outro líquen



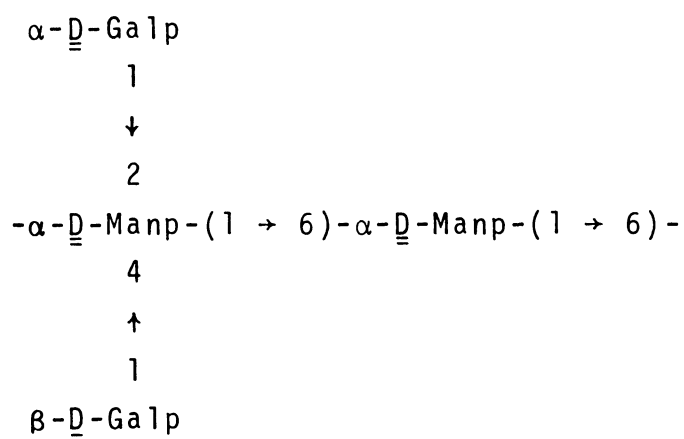
estudado do gênero *Cladonia*, *C. amaurocraea*, quando submetido à extração aquosa quente, não forneceu uma  $\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-glucana}$  insolúvel em água, porém, após extração alcalina, apresentou dois polissacarídeos, obtidos como complexos cúpricos insolúveis, sem a presença de quaisquer polissacarídeos no sobrenadante de Fehling. Após a regeneração desses complexos e congelamento seguido por degelo do material concentrado, foi encontrado uma glucana tipo-pustulana, insolúvel em água, e uma galactomanana, que pela análise de metilação, mostrou principalmente unidades terminais não redutoras de manopiranosose (17%) e galactopiranosose (19%) e resíduos 2-0-(17%),

4,6-di-O- (7%), 2,4,6-tri-O-substituídos (9%) de manopiranosose . Estes resultados demonstraram que o heteropolissacarídeo era ramificado, cuja cadeia principal era uma  $\alpha$ -D-manopiranosose ligada (1  $\rightarrow$  6), de acordo com o espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. do polissacarídeo residual, obtido após hidrólise ácida parcial do polímero original.

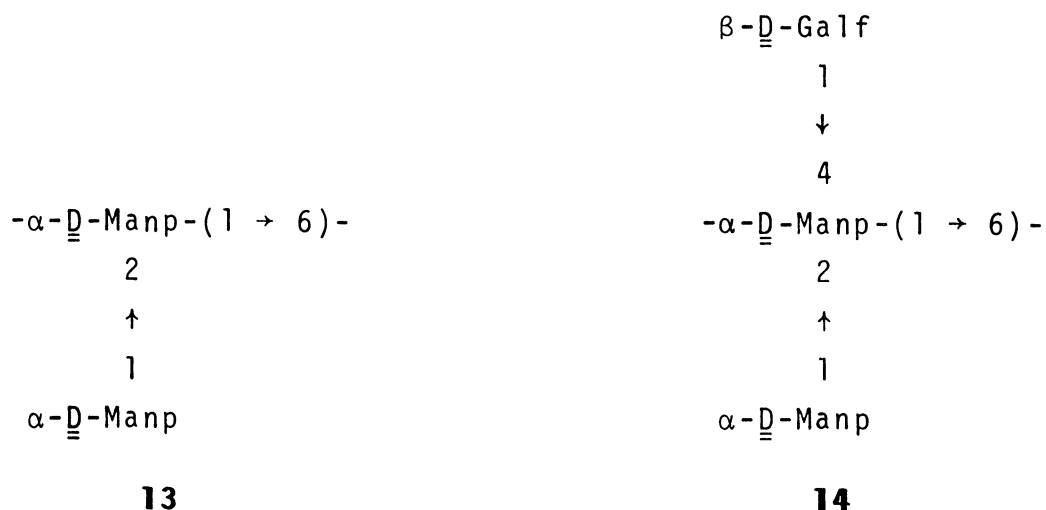
Neste último trabalho (36), bem como no anterior (26), Gorin e Iacomini verificaram que os componentes heteropoliméricos eram representados essencialmente por galactomananas estruturalmente relacionadas, devido a presença de cadeias principais com unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosil ligadas (1  $\rightarrow$  6), embora apresentando pequenas variações estruturais evidenciadas pelas diferentes cadeias laterais unidas às unidades de manose. Para determinar se esta diversidade estrutural das galactomananas era real ou aparente, mais seis espécies de líquens foram examinadas pelos mesmos autores (27). Os líquens em estudo foram coletados no Canadá e todos apresentavam micossimbiontes ascomicetos, sendo reconhecidos como *Parmelia sulcata*, *St. paschale*, *Peltigera aphthosa*, *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbergii* e uma *Usnea* sp. Após os estudos químicos comumente empregados para análise estrutural de polissacarídeos, e com o auxílio da espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., que mostrou ser uma importante técnica para a caracterização e elucidação estrutural destes açúcares, os autores concluíram, que a diversidade estrutural das galactomananas realmente dependia da maneira como as cadeias principais de  $\alpha$ -D-manopiranosil ligadas (1  $\rightarrow$  6), eram substituídas por determinadas cadeias laterais. Estas últimas, como pode ser visto nas Estruturas **9** a **11** presentes na galactomanana de *P. aphthosa*, podiam ocorrer como dissubstituintes sobre as posições 2 e 4, ou como monossubstituintes nas posições 4, embora frequentemente, as unidades da cadeia principal

**9****10****11**

fossem não substituídas. Já no heteropolímero de *P. sulcata*, os grupos constituintes das cadeias laterais eram representados por unidades de  $\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Galp-(1} \rightarrow 2)$  e  $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Galp-(1} \rightarrow 4)$  ligados à mesma unidade de  $\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-manopiranosil-(1} \rightarrow 6)$  da cadeia principal, como mostrado na Estrutura 12, enquanto que na galactomanana de *A. muehlenbergii*, foi observado que o grupo  $\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Manp-(1} \rightarrow 2)$  podia

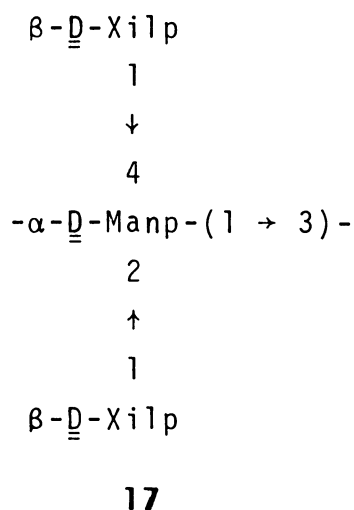
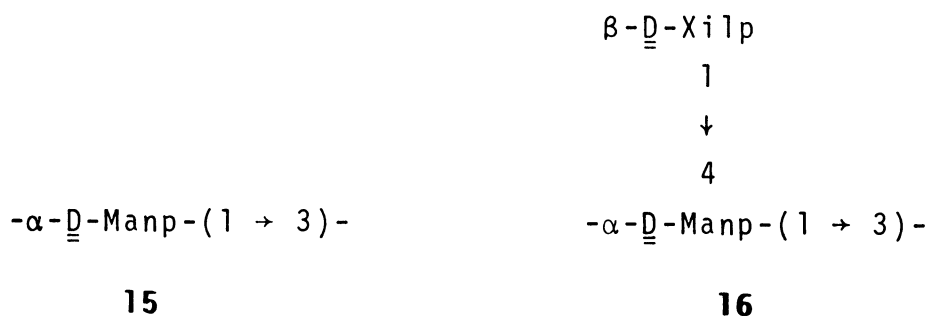
**12**

ser monossubstituinte ou constituir uma dissubstituição, juntamente com unidades de  $\beta$ -D-Galf-(1 → 4), sobre a cadeia de manose (Estruturas **13** e **14**).



Desde que até 1983, tinham sido estudados os polissacarídeos isolados de líquens que apresentavam essencialmente micossimbiontes ascomicetos, um trabalho pioneiro foi realizado por Gorin et alii (37) com o líquen *Cora pavonia*, uma vez que esta entidade simbiótica apresentava um micossimbionte basidiomiceto e até aquele ano, sua composição química não havia sido investigada. Os componentes carboidratados deste líquen foram isolados e caracterizados estruturalmente e os autores verificaram que estes constituintes eram típicos de basidiomicetos e diferentes de ascomicetos e ascolíquens (6). Dois polissacarídeos foram obtidos, sendo representados por uma  $\beta$ -D-glucana e um heteropolímero constituído por L-ramnose, L-fucose, D-xilose, D-manose, D-glucose e D-galactose. A  $\beta$ -D-glucana era altamente ramificada, com 21% de grupos terminais não redutores e continha unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosil 3-O-, 6-O- e 3,6-di-O-substituídas, sendo que a sua cadeia principal era composta por ligações (1 → 3) e (1 → 6). Já o heteropolímero apresentava principalmente manose e xilose, com um núcleo contendo manose e uma cadeia principal mostrando preponderância de resíduos de  $\alpha$ -D-manopiranosil ligados (1 → 3). Estes últimos, ou eram

não substituídos (10%) ou 4-O- (10%) e 2,4-di-O-substituídos (10%) por resíduos de  $\beta$ -D-xilopiranoose, como mostrado nas Estruturas **15** a **17**.



Além destes constituintes polissacarídicos, foi demonstrado que o líquen *C. pavonia* apresentava uma quantidade surpreendentemente alta de um dissacarídeo (4,4g %), que por hidrólise ácida mostrou apenas glucose e cujo espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. forneceu seis sinais com deslocamentos químicos típicos e correspondentes à estrutura da  $\alpha$ - $\alpha$ -trealose.

A principal finalidade da caracterização estrutural destes polissacarídeos, além do possível auxílio numa investigação quimiotaxonômica dos líquens, como já citado anteriormente, foi a evidenciação da atividade antineoplásica destes constituintes, demonstrada pela maior parte dos polissacarídeos até aqui mencionados. Em 1968, Fukuoka et alii (21) foram os primeiros a testar

preparações polissacarídicas isoladas de líquens, para verificar a efetividade destes componentes sobre tumores transplantados. Os autores observaram que até aquele ano, a atividade antineoplásica de polissacarídeos liquênicos nunca havia sido registrada, embora certos polissacarídeos derivados de outras fontes naturais, tais como de plantas superiores, de fungos, de leveduras, de bactérias e de algas, tivessem mostrado capacidade em inibir o crescimento de tais tumores. Neste trabalho, as frações polissacarídicas brutas foram preparadas pela adição de etanol aos extratos aquosos obtidos de líquens, e seus efeitos inibidores foram testados contra Sarcomas-180, implantados subcutaneamente em ratos. Todas as amostras testadas foram altamente efetivas, sendo que sete das dez amostras mostraram relações de inibição do crescimento do tumor superior a 90%, duas entre 80 e 90% e uma entre 70 e 80%. Em muitos casos, a regressão completa do tumor foi observada. Dentre os polissacarídeos testados, destacaram-se os efeitos antineoplásicos da  $\beta$ -D-glucana ligada (1  $\rightarrow$  6) parcialmente acetilada do líquen *G. esculenta* que mostrou uma relação de inibição igual a 99,1%, de um heteropolímero isolado de *C. mitis*, cuja relação de inibição foi de 99,4% e da isoliquenana e liquenana de *C. islandica*, que foram de 99,6 e 100%, respectivamente. Baseados nestes resultados, os autores sugeriram que os líquens poderiam ser uma nova fonte natural e promissora de polissacarídeos, com este tipo de atividade biológica.

A partir de 1968, muitos polissacarídeos isolados de líquens, especialmente as glucanas lineares, foram caracterizados estruturalmente e em seguida, testados contra Sarcomas-180 implantados em ratos, em virtude da crescente insatisfação com a quimioterapia comumente empregada contra o câncer, que objetivava a morte total das células cancerosas, podendo também incluir a morte do hospedeiro (70). Desse modo, pela busca de novas armas

contra o câncer, surgiu o interesse pelos polissacarídeos isolados de diversas fontes naturais, devido ao fato de não serem citotóxicos e exercerem uma ação antineoplásica dependente da reação do hospedeiro, isto é, apresentarem seus efeitos mediados pelo hospedeiro. Deve-se contudo, ressaltar, que a verdadeira natureza da ação antineoplásica de um polissacarídeo ainda não foi inteiramente esclarecida e está sendo especialmente estudada e debatida por inúmeros estudiosos.

Outro papel relevante dos polissacarídeos foi o encontrado em imunologia (3), pois desde 1917, resultados experimentais obtidos por vários pesquisadores, mostraram que polissacarídeos eram verdadeiros imunogênicos, induzindo a formação de uma resposta imune e a geração de anticorpos específicos. Baseados nestes resultados, pode-se ampliar a importância dos polissacarídeos, principalmente dos ramificados, visto que a diversidade estrutural de tais ramificações ou cadeias laterais, representativas dos determinantes antigênicos nestes polímeros, levariam a uma maior especificidade nas reações imunológicas entre antígenos e anticorpos, sem a ocorrência de reações cruzadas. Com isso, o uso de polissacarídeos como antígenos ou imunogênicos, contribuiu grandemente para a classificação e identificação de bactérias, para um melhor entendimento da resposta imune, para a definição do sítio ativo nas interações antígeno-anticorpo e para a prevenção de doenças humanas causadas por microrganismos invasores.

Em decorrência da grande importância biológica destes constituintes carboidratados e em especial, dos isolados de líquens, o presente trabalho teve por finalidade, o isolamento, a purificação e o estudo estrutural dos polissacarídeos do líquen *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Räscher. Este trabalho também visou dar continuidade à série de pesquisas desenvolvidas por Gorin e Iacomini,

na busca da elucidação estrutural dos componentes químicos existentes em líquens.

As metodologias químicas experimentais foram as geralmente empregadas na análise estrutural de polissacarídeos, auxiliadas pelo uso da espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., que representou uma excelente ferramenta investigativa das estruturas de açúcares e seus derivados, acrescida do fato de ser uma técnica rápida e não destrutiva das amostras analisadas.

## METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 1. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

1.1- As evaporações foram realizadas em Evaporador Rotatório Büchi, sob pressão reduzida, e em temperaturas, geralmente, inferiores a 50°.

1.2- As rotações ópticas foram obtidas com polarímetro Perkin-Elmer, modelo 141, à temperatura de 25°. Os solventes usados nestas determinações foram água para polissacarídeos solúveis em água e solução de NaOH a 1% para aqueles insolúveis.

1.3- A cromatografia líquida-gasosa (g.l.c.) foi realizada em Cromatógrafo Varian, modelo 2440, com detector de ionização de chama e utilizando-se nitrogênio como gás de arraste (37,5 mL/min). As temperaturas da câmara de injeção e do detector foram de 200° e 250°, respectivamente. A coluna de aço inoxidável empregada (200 x 0,15 cm d.i.) foi empacotada com ECNSS-M a 3% (p/p) sobre Gas Chrom.Q de 100-120 mesh (58). Esta coluna foi utilizada para a determinação quantitativa dos acetatos de alditóis (à temperatura de 180° ou com programação de temperatura de 130 a 180°, pela variação de 4° por minuto) e dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (à temperatura de 160°), sendo seus tempos de retenção relativos ao do xilitol penta-0-acetato e do 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol, respectivamente. A composição molar foi calculada a partir da área registrada para cada componente, através do método de triangulação.

1.4- A cromatografia líquida-gasosa acoplada a espectrometria de massa (g.l.c.-m.s.) foi realizada com aparelho Finnigan, modelo 4000, dotado de um Sistema de Dados Incos 2300 e equipado com coluna capilar (30m x 0,25mm d.i.) preenchida com OV-225 e OV-17 na proporção de 3:1 (25). Os espectros foram obtidos por impacto de elétrons, repetitivamente a cada 2 segundos, desde massa 40 até massa 420. As injeções foram feitas diretamente na coluna a 50° e então, o aparelho foi rapidamente programado (40°/min) a 220° ("hold"). Utilizou-se hélio como gás de arraste, com uma velocidade linear de 22 cm/segundo. A identificação final dos acetatos de alditóis parcialmente metilados foi realizada pela co-injeção com padrões e as áreas dos picos foram obtidas por integração automática.

1.5- Os espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. foram obtidos pelo uso de um espectrômetro Bruker AM-360 WB incorporado ao transformador de Fourier. Polissacarídeos insolúveis em água foram examinados como soluções em  $\text{D}_2\text{O}$  contendo NaOD a 1%, enquanto que polissacarídeos solúveis em água foram examinados simplesmente como soluções em  $\text{D}_2\text{O}$ . Estas soluções (3 mL) foram colocadas em um tubo de 20 cm de comprimento e 10 mm de diâmetro e mantidas a 33°, para serem analisadas no espectrômetro \*. Os parâmetros espectrais empregados foram: "spectral width" de 18.519 Hz, "acquisition time" de 0,44s, "pulse width" de 21,0us e "number of transients" de 2.000 a 180.000, dependendo da quantidade de amostra utilizada. Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  (p.p.m.), relativos à ressonância do  $\text{Me}_4\text{Si}$  (TMS) determinada em experimento separado.

1.6- As determinações espectrofotométricas para a região do visível foram realizadas em aparelho Coleman Junior, modelo 6A.

\*Os deslocamentos químicos obtidos a 33° foram corrigidos para a temperatura de 70°.

1.7- As liofilizações das soluções contendo polissacarídeos ou oligossacarídeos foram feitas em aparelho Virtis, modelo 10-145 MR-BA.

1.8- As análises cromatográficas em papel (p.c.) foram realizadas em papel Whatman nº 1, com os seguintes sistemas de solventes: sistema-A = Benzeno-n-butanol-piridina-água (1:5:3:3, v/v, fase superior); e sistema-B=n-Butanol-etanol-água (2:1:1, v/v). A visualização dos açúcares foi efetuada com os reagentes de nitrato de prata alcalino (66) e cloridrato de para-anisidina (15) (para açúcares redutores). A migração dos oligossacarídeos da extração metanol-água 4:1 foi relacionada à da D-galactose ( $R_{GAL}$ ), enquanto que a migração dos produtos de degradação de Smith controlada da  $\alpha$ -D-glucana foi relacionada à do 2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-eritritol ( $R_{GE}$ ).

1.9- A determinação quantitativa de carboidratos totais foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (17). O complexo colorido, resultante da conjugação do hidroximetilfurfural com fenol, foi lido a 490nm, usando-se como padrão a D-galactose na faixa de 10 a 100ug/ensaio.

1.10- A determinação quantitativa de proteínas foi feita com o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo processo descrito por Lowry et alii. (23,46). A absorbância foi lida a 660nm, comparativamente ao padrão de soro-albumina cristalina na faixa de 10 a 100ug/ensaio.

1.11- A composição em açúcares dos polissacarídeos foi determinada da seguinte maneira:

### Hidrólise ácida total dos polissacarídeos

Amostras dos polímeros (cerca de 5 mg) foram tratadas com ácido trifluoracético (TFA) (2) 2M (2 mL) e aquecidas a 100<sup>0</sup> durante, em média, 15 horas. Após hidrólise, o excesso de TFA foi removido por evaporação à secura das soluções hidrolisadas. Os resíduos foram dissolvidos em água e as soluções dos polissacarídeos hidrolisados foram cromatografadas em papel.

### Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida total

As misturas de açúcares obtidas dos polissacarídeos hidrolisados foram reduzidas com boroidreto de sódio (60) (NaBH<sub>4</sub>) à temperatura ambiente durante, em média, 15 horas. Decorrido este período, as soluções reduzidas foram tratadas com resina Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>), para remoção dos íons sódio. Após filtração por papel, as soluções foram evaporadas à secura e o ácido bórico resultante deste tratamento foi eliminado, na forma do éster volátil borato de metila, por co-destilação com metanol.

Os alditóis obtidos foram, então, submetidos a acetilação (71) com uma mistura de anidrido acético-piridina na proporção de 1:1 (v/v, 2 mL), à temperatura ambiente, durante, 15 horas. Após este intervalo de tempo, o processo de acetilação foi interrompido pela adição de água gelada e os açúcares acetilados foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual foi eliminada da preparação por tratamentos sucessivos com ácido sulfúrico 0,5M. Em seguida, a fração clorofórmica foi lavada várias vezes com água destilada, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão. Após evaporação do solvente, os acetatos de alditóis foram analisados por g.l.c., nas condições descritas anteriormente.

## 2. LOCAL DE COLETA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DO LÍQUEN *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) RÄUSCH.

Este líquen foi obtido na Serra do Mar - Estrada da Graçiosa - Estado do Paraná, encontrando-se o mesmo em desenvolvimento sobre rochas situadas à margem da estrada. O local exato foi a 1 Km do Posto de Polícia Florestal, na direção de Morretes, numa altitude de 900 metros.

Sua classificação sistemática foi esclarecida como sendo *Stereocaulon ramulosum*, pertencente à ordem Gymnocarpeae e família Stereocaulaceae.

O líquen em estudo caracteriza-se pelo seu talo arbustivo denominado de pseudopodécio, e sobre o qual observa-se o desenvolvimento dos apotécios. Verifica-se também ao longo do talo, formações cilíndricas denominadas de ramificações ou râmulos filocladióides que conferem um aspecto coralóide ao líquen. Além disso, excrescências muito comuns, de coloração diversa da do talo e de conformação geralmente arredondada, são observadas, sendo denominadas de cefalódios (18).

## 3. ISOLAMENTO DOS ALDITÓIS, OLIGOSSACARÍDEOS E POLISSACARÍDEOS DO LÍQUEN *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) RÄUSCH.

O líquen seco à temperatura ambiente, foi submetido à uma limpeza manual, para separação de outros vegetais contaminantes do material em estudo. Em seguida foi tratado por quatro processos sucessivos de extração (36), para obtenção dos constituintes químicos existentes neste líquen.

### 3.1- EXTRAÇÃO BENZENO-ETANOL

O líquen devidamente seco e limpo (214,9 g) foi delipidificado com uma mistura de benzeno-etanol (9:1, v/v, 1750 mL) , sob refluxo, durante 4 horas. Após filtração a quente, o extrato benzeno-etanólico foi descartado, enquanto que o líquen residual foi seco à temperatura ambiente, durante a noite, para ser submetido ao próximo processo extrativo.

### 3.2- EXTRAÇÃO METANOL-ÁGUA

O material remanescente da extração benzeno-etanol (210,0g) foi tratado com metanol-água (4:1, v/v, 1750 mL), sob refluxo , por um período de 6 horas, com posterior filtração a quente. O extrato metanol-aquoso resultante foi evaporado à secura e o resíduo no balão de evaporação foi solubilizado em água e deionizado pelas resinas Dowex 50W x 8 (forma  $H^+$ ) e Dowex 2 x 8 (forma  $HCO_3^-$ ). O eluente obtido após dessalificação foi evaporado à secura fornecendo um resíduo de 7,10 g, que correspondeu a 3,30 % do peso de líquen original. Pela cromatografia em papel (sistema-B) deste resíduo solubilizado em água (FRAÇÃO-A), observou-se principalmente arabinitol, manitol e um componente com mobilidade menor que a do manitol. A visualização pelo cloridrato de para-anisidina da Fração-A não indicou a presença de açúcares redutores neste extrato. Os componentes desta fração foram em-tão, convertidos em acetatos de polióis, pelo tratamento com anidrido acético e piridina na proporção de 1:1. Os produtos foram analisados por g.l.c., confirmando a presença de arabinitol (93,22%, T 0,84) e manitol (6,78%, T 1,49), além de um componente não identificado, cujo tempo de retenção em relação ao do xilitol penta-0-acetato foi igual a 1,58. A redução com boroidreto de sódio, seguida pela acetilação da Fração-A, forneceu, após análise por g.l.c., concentrações de arabinitol (93,88%, T 0,84)

e manitol (6,12%, T 1,49) similares às da Fração-A simplesmente acetilada, além da presença do componente não identificado, demonstrando que esta fração não apresentava monossacarídeos livres. Entretanto, resultados diferentes foram obtidos, quando submeteu-se a mesma fração à hidrólise pelo ácido trifluoracético, com posterior exame do material hidrolisado por cromatografia em papel (sistema-B), onde observou-se principalmente arabinitol, manitol e galactose, sendo esta última identificada pela visualização através do cloridrato de para-anisidina. Após tratamento dos produtos de hidrólise da Fração-A com boroidreto de sódio e anidrido acético-piridina 1:1, obteve-se por g.l.c., arabinitol (65,70%, T 0,84), manitol (8,06%, T 1,49), galactose (20,72%, T 1,66), como também glucose (5,53%, T 1,83) e o componente não identificado (T 1,58), indicando a presença de oligossacarídeos não redutores neste extrato. Em decorrência disto, a próxima etapa foi o fracionamento, com conseqüente purificação, dos componentes existentes na Fração-A, pela cromatografia de partição em coluna de celulose.

#### Fracionamento dos Alditóis e Oligossacarídeos da Fração-A pela Cromatografia em Coluna de Celulose

A montagem da coluna de celulose, bem como a preparação e aplicação da amostra, foram feitas como descrito por Whistler e BeMiller (69) e Gardell (22). O pó de celulose (Grau Padrão Whatman), após ter sido lavado com água e seco em estufa a 50<sup>o</sup>, foi suspenso em acetona e compactado na coluna cromatográfica (45 x 3,8 cm d.i.). Após o empacotamento, lavou-se o leito de celulose (altura do leito 33 cm, volume de leito 374,26 cm<sup>3</sup>) com três vezes o seu volume total de acetona (1.200 mL) e a seguir, uma amostra da Fração-A (0,70 g) foi aplicada, de forma que a altura de celulose alcançou 37 cm, correspondendo a um volume

de leite igual a 419,62 cm<sup>3</sup>. A eluição foi realizada, inicialmente, com acetona (500 mL), seguida por soluções de acetona - água (v/v) nas proporções 7:1 (3.000 mL), 4:1 (1.000 mL), 3:1 (1.000 mL) e finalmente, com água (1.000 mL), sendo o volume das frações coletadas igual a 200 mL. Com o decorrer das eluições, as frações foram concentradas a um pequeno volume, para serem cromatografadas em papel, utilizando-se o sistema de solvente-B e o visualizador AgNO<sub>3</sub> alcalino.

A cromatografia em papel das frações obtidas mostrou arabinitol (0,397 g, R<sub>GAL</sub> 1,18), manitol (0,071 g, R<sub>GAL</sub> 1,04), ambos eluídos por acetona-água 7:1, e inositol (0,008 g, R<sub>GAL</sub> 0,62), que foi arrastado por acetona-água 3:1, além de um glicosídeo e um oligossacarídeo com mobilidades inferiores a do manitol. O glicosídeo encontrado foi o 2-O-β-D-galactofuranosil-D-arabinitol (0,183 g, R<sub>GAL</sub> 0,94), vulgarmente conhecido por umbilicina, eluído por acetona-água 7:1, e que por hidrólise ácida seguida por redução e acetilação, forneceu arabinitol e galactose na proporção de 1:1. A estrutura deste glicosídeo foi esclarecida pela identificação do 1,4-di-O-acetil-2,3,5,6-tetra-O-metil-D-galactitol, nos produtos de hidrólise do material totalmente metilado e analisado por g.l.c., na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados, e também por comparação de seu espectro de <sup>13</sup>C-n.m.r. com o da umbilicina isolada do líquen *Actinogyra muhlenbergii*.

O oligossacarídeo foi reconhecido como sendo a α-α-D-trealose (0,016 g, R<sub>GAL</sub> 0,73), eluída por acetona-água 4:1, que por hidrólise ácida mostrou glucose, e cujo espectro de <sup>13</sup>C-n.m.r. apresentava seis sinais com deslocamentos químicos típicos desta substância.

### 3.3- EXTRAÇÃO AQUOSA

O líquen residual da extração benzeno-etanol e metanol - aquoso (189,4 g) foi tratado com água, a 100<sup>0</sup>, durante 4 horas. Após este período de extração, filtrou-se enquanto quente, e o processo extrativo foi repetido mais duas vezes. Os filtrados foram combinados e concentrados a um pequeno volume, para precipitação dos polissacarídeos com excesso de etanol. Após centrifugação (2.500 rpm, 20 minutos, 10<sup>0</sup>), o sobrenadante etanólico foi desprezado, enquanto que o precipitado etanólico (44,49 g) forneceu um rendimento de 20,70 g % em relação ao peso de líquen original.

A cromatografia em papel (sistema-A) do precipitado etanólico hidrolisado por ácido trifluoracético, bem como a análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos por redução e acetilação dos produtos de hidrólise, mostraram principalmente glucose e traços de manose e galactose, em concentrações molares de 90,14%, 4,50% e 5,36%, respectivamente.

#### Separação dos Polissacarídeos do Precipitado Etanólico por Congelamento e Degelo

O precipitado etanólico foi então, solubilizado em água com auxílio de aquecimento, e submetido ao congelamento, seguido por degelo à temperatura ambiente e posterior centrifugação (10.000 rpm, 20 minutos, 6<sup>0</sup>). Este processo de purificação (26) foi repetido diversas vezes, até que o sobrenadante aquoso não formasse mais resíduo por congelamento e degelo, e o resíduo aquoso, após tentativa de solubilização em água usando aquecimento, não apresentasse mais polissacarídeos solúveis em água fria, detectados pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (17), que estivessem contaminando este material.

O resíduo aquoso resultante da purificação por congelamento e degelo do extrato aquoso, que mostrou uma composição monossacarídica de ramnose (4,75%), fucose (4,81%), xilose (4,12%), manose (12,29%), galactose (48,30%) e glucose (25,73%), não foi investigado no presente trabalho.

O sobrenadante aquoso, após análises de cromatografia em papel (sistema-A) do material hidrolisado e g.l.c. dos respectivos acetatos de alditóis, mostrou ser constituído principalmente por glucose (85,07%), embora traços de manose (4,29%) e galactose (10,64%) também estivessem presentes, de forma que foi submetido a outro processo de purificação pelo emprego de solução de Fehling (26,39).

#### Fracionamento dos Polissacarídeos do Sobrenadante Aquoso por Precipitação com Solução de Fehling

Ao sobrenadante, que foi concentrado a pequeno volume (150 mL), adicionou-se igual quantidade de solução de Fehling, havendo a formação de um precipitado. Após centrifugação (8.000 rpm, 10 minutos, 6<sup>o</sup>), o sobrenadante de Fehling foi neutralizado com ácido acético concentrado à temperatura de 0-2<sup>o</sup>, dialisado e então, deionizado pelas resinas Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>) e Dowex 2 x 8 (forma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Já o precipitado de Fehling foi lavado sucessivamente com solução de hidróxido de potássio a 2%, e metanol, e em seguida o complexo cúprico insolúvel foi decomposto por agitação numa suspensão aquosa de Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>), durante, no mínimo 20 minutos, para então ser filtrado. Esta purificação, pela solução de Fehling, foi repetida diversas vezes, até que o sobrenadante não mostrasse mais precipitação pela adição de solução de Fehling e o precipitado não revelasse mais a presença de polissacarídeos solúveis na solução de Fehling, que

fossem evidenciados por cromatografia em papel do material hidrolisado por TFA e detectados pelo teste do fenol-  $H_2SO_4$  (17).

Uma vez obtidos o sobrenadante e o precipitado de Fehling puros, ambos foram liofilizados, fornecendo produtos de 9,64 g (4,48 g% do peso de líquen original) e 0,90 g (0,42 g%), respectivamente. A cromatografia em papel (sistema-A) dos materiais de Fehling hidrolisados, juntamente com a análise por g.l.c. dos respectivos acetatos de alditóis, mostraram que o precipitado de Fehling era constituído principalmente por galactose (68,60%) e manose (21,62%), embora traços de ramnose (2,67%), fucose (3,12%), xilose (3,99%) e glucose também estivessem presentes, enquanto que o sobrenadante de Fehling era constituído exclusivamente por glucose.

Desde que no sobrenadante de Fehling, evidenciou-se a presença de uma glucana, aparentemente pura, este polímero foi submetido a testes de homogeneidade química, que incluíram cromatografias em colunas de DEAE-celulose e Sepharose 6B, como será descrito mais adiante. Por estes testes, a  $\alpha$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{25} = +171^0$ ; c. 0,6 em  $H_2O$ ) apresentou-se homogênea ou constituída de uma mistura inseparável nas condições empregadas, sendo portanto, considerada adequada para estudos estruturais. Já o precipitado de Fehling apresentou uma galactomanana contaminada por diversos açúcares, inclusive glucose, de modo que empregou-se outro procedimento de purificação pelo uso de um sal de amônio quaternário (Cetavlon).

Fracionamento dos Polissacarídeos do Precipitado de Fehling por Precipitação com Cetavlon (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio)

O material liofilizado (0,90g) foi dissolvido em água e submetido a um processo de fracionamento, usando-se sal de amônio quaternário, em diferentes pH, como descrito por Scott (59) e Duarte e Jones (16).

Em pH 7, houve a formação de um precipitado que foi decomposto por solução de cloreto de sódio 4 M e o polissacarídeo da solução obtida, foi precipitado com excesso de etanol. Este processo de dissolução na solução do eletrólito e precipitação com etanol foi repetido mais duas vezes e o resíduo (0,119 g) resultante forneceu um rendimento de 0,055 g% em relação ao peso de líquen original.

O sobrenadante de pH 7 foi tratado com tampão borato a 3%, pH 8,5 e o precipitado obtido na forma de complexo polissacarídico boratado com base quaternária foi descomplexado com solução de ácido acético 2 M. A solução obtida, foi adicionado excesso de etanol, e o precipitado, após mais dois procedimentos de dissolução em ácido acético e precipitação com etanol, forneceu um produto de 0,510g (0,237g %).

O sobrenadante de pH 8,5 foi tratado com solução de NaOH a 40%, para ajustar o pH até 12, e como não houve formação de precipitado, neutralizou-se a solução com ácido acético concentrado, à temperatura de 0 - 2<sup>o</sup>. Após concentração a um pequeno volume, precipitou-se o polissacarídeo com excesso de etanol e o precipitado obtido após centrifugação, foi submetido a dois tratamentos de dissolução em ácido acético 2 M e precipitação

com etanol, como realizado para o polissacarídeo de pH 8,5. O precipitado resultante (0,015 g) apresentou um rendimento de 0,007 g % em relação ao peso de líquen original.

Os polissacarídeos de pH 7, pH 8,5 e pH 12 foram então hidrolisados por TFA e os produtos de hidrólise reduzidos por boroidreto de sódio e acetilados com anidrido acético - piridina 1:1, como descrito em métodos analíticos gerais. Os acetatos de alditóis resultantes, quando analisados por g.l.c., mostraram ramnose (4,08%), fucose (10,61%), xilose (22,67%), manose (14,50%), galactose (44,64%) e glucose (3,50%) para o polímero de pH 7. A maior parte destes componentes já tinha sido identificada pela cromatografia em papel (sistema-A) do material de pH 7 hidrolisado por TFA, que mostrou também um componente não identificado, cujo  $R_{GAL}$  foi igual a 0,13.

Visto que o polissacarídeo de pH 7 apresentou um rendimento relativamente baixo, além de exigir uma metodologia experimental mais complexa devido a provável presença de resíduos de ácido urônico, a estrutura deste heteropolímero não foi investigada no presente trabalho, bem como a da galactomanana neutra isolada em pH 8,5, que apresentou uma composição monossacarídica bem definida com manose e galactose numa concentração molar de 60,33% e 39,67% respectivamente. O polímero de pH 12 apresentou glucose como único componente, que pela rotação específica mostrou ser a  $\alpha$ -D-glucana presente no sobrenadante de Fehling.

### 3.4- EXTRAÇÃO ALCALINA

O líquen residual (137,0 g), após extração aquosa, foi tratado com solução de hidróxido de potássio a 2%, a 100°, durante 2 horas. Em seguida, filtrou-se a quente, e o resíduo

liquênico foi seco em estufa a  $50^{\circ}$ , durante a noite, resultando um peso de líquen, após extração alcalina, igual a 83,60 g. O extrato alcalino resultante foi neutralizado com ácido acético concentrado, à temperatura de  $0 - 2^{\circ}$ , concentrado a um pequeno volume e os polissacarídeos foram precipitados com excesso de etanol. O precipitado etanólico obtido após centrifugação (2500 rpm, 20 minutos,  $10^{\circ}$ ), forneceu um produto de 26,23 g, o qual correspondeu a 12,21 g% do peso de líquen original.

A análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos pela redução e acetilação dos produtos de hidrólise do precipitado etanólico, mostrou que este material era constituído principalmente por glucose (47,23%), galactose (27,53%) e manose (23,88%), embora traços de xilose (0,34%) e ramnose (1,02%) também estivessem presentes.

#### Separação dos Polissacarídeos do Precipitado Etanólico por Congelamento e Degelo

O precipitado etanólico foi então, solubilizado em água pelo uso de aquecimento e dialisado contra água corrente, durante 48 horas. Após diálise, o material foi concentrado a pequeno volume e submetido a processos de purificação por congelamento, seguido por degelo à temperatura ambiente, com posterior centrifugação (11000 rpm, 20 minutos,  $6^{\circ}$ ), de maneira idêntica à purificação realizada para o precipitado etanólico da extração aquosa. O sobrenadante aquoso resultante desta purificação, que apresentou uma composição monossacarídica de ramnose (0,97%), xilose (0,67%), manose (36,94%), galactose (36,57%) e glucose (24,85%), não foi investigado no presente trabalho, enquanto que o resíduo aquoso, após análises de cromatografia em papel (sistema-A) do material hidrolisado e g.l.c. dos respectivos acetatos de alditóis,

mostrou ser constituído principalmente por glucose (65,31%), porém contaminado por galactose (21,41%) e manose (13,28%). Em decorrência da contaminação, este material foi submetido a outro procedimento de purificação por tratamentos com álcali, devido à sua insolubilidade em água (67).

#### Purificação do Polissacarídeo do Resíduo Aquoso por Tratamentos com Álcali (KOH 2%)

Este resíduo foi solubilizado em solução de hidróxido de potássio a 2%, contendo  $\text{NaBH}_4$ , e levado à fervura, durante 20 minutos. Após resfriamento ( $0 - 2^\circ$ ), o material foi neutralizado com ácido acético 2 M e dialisado contra água corrente, durante 72 horas. A fração não dialisável foi concentrada até pequeno volume e em seguida, centrifugada (3.000 rpm, 15 minutos, temperatura ambiente).

Vários tratamentos do resíduo aquoso, insolúvel em água mas solúvel em álcali, foram realizados com solução de KOH 2% e acompanhados por cromatografias em papel (sistema-A) do material hidrolisado, obtendo-se no final, um resíduo (0,41 g) constituído apenas por glucose, que forneceu um rendimento de 0,19g% em relação ao peso de líquen original. O polissacarídeo foi então, submetido a testes de homogeneidade química, pela passagem em colunas cromatográficas de Sepharose 4B-200 e Sepharose 6B, como será descrito a seguir. Uma vez que foi demonstrada homogenea nas condições empregadas, a  $\beta$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{25} = + 3^\circ$ ; c. 0,4 em NaOH 1%) foi considerada adequada para ser investigada estruturalmente.

#### 4. TESTES DE HOMOGENEIDADE APLICADOS AOS POLISSACA RÍDEOS OBTIDOS DAS EXTRAÇÕES AQUOSA E ALCALINA

##### 4.1- $\alpha$ -D-GLUCOPIRANANA

Amostras da  $\alpha$ -D-glucana, obtida pela extração aquosa do líquen, foram solubilizadas em água e cromatografadas nas seguintes condições:

(a) 100 mg da amostra foram aplicadas em coluna de DEAE-celulose forma fosfato (24,5 x 3,8 cm), usando eluição etapa por etapa com soluções de tampão fosfato pH 6,8 (0,01 M, 0,05 M, 0,10 M e 0,20 M) ( $\sim$  90 mL/h). O volume das frações coletadas foi igual a 5 mL (31,62, 72).

(b) 5 mg da amostra foram aplicadas em coluna de Sepharose 6B (33,5 x 1,7 cm), usando-se como eluente água destilada ( $\sim$  40,8 mL/h) e o volume das frações igual a 1 mL.

Todas as frações coletadas foram analisadas para carboidratos totais (17).

##### 4.2- $\beta$ -D-GLUCOPIRANANA

Amostras da  $\beta$ -D-glucana, obtida pela extração alcalina do líquen, foram solubilizadas em álcali e cromatografadas nas seguintes condições:

(a) 100 mg da amostra foram dissolvidas em NaOH 0,1M e aplicadas em coluna de Sepharose 4B-200 (27,0 x 1,7 cm). O eluente empregado foi NaOH 0,1M ( $\sim$  56,6 mL/h) e o volume das frações coletadas foi de 3 mL.

(b) 3 mg da amostra foram dissolvidas em NaOH a 1% e aplicadas em coluna de Sepharose 6B (33,5 x 1,7 cm). O eluente foi NaOH a 1% ( $\sim$  24 mL/h) e o volume das frações igual a 1 mL.

Todas as frações coletadas foram analisadas para carboidratos totais (17).

## 5. METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS DO LÍQUEN *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) RÄUSCH

### 5.1- METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS $\alpha$ -D-GLUCANA E $\beta$ -D- GLUCANA

Uma amostra de cada polímero (30 mg) foi tratada com boroidreto de sódio, à temperatura ambiente, durante 15 horas. Ap<sup>o</sup>s redução neutralizou-se o meio alcalino com ácido acético 2M, à temperatura de 0 - 2<sup>o</sup>, e dialisou-se contra água corrente, durante uma noite. A fração não dialisável foi evaporada à secura e submetida à metilação com sulfato de dimetila em solução alcalina, segundo processo descrito por Haworth (32,34).

Primeiramente, o resíduo no balão de metilação foi dissolvido em 15 mL de solução de hidróxido de sódio a 33%. Em seguida, fez-se 10 adições de 0,5 mL de sulfato de dimetila, em intervalos de 20 minutos, sob agitação constante e à temperatura ambiente. Novas adições de solução de NaOH a 33% (15 mL) e sulfato de dimetila (10 vezes 0,5 mL) foram feitas em mais dois dias consecutivos, sendo que no 4<sup>o</sup> dia, o processo de metilação, foi interrompido pelo aquecimento do balão de metilação a 100<sup>o</sup>, durante 30 minutos, para decomposição do excesso de sulfato de dimetila. Ap<sup>o</sup>s resfriamento a 0 - 2<sup>o</sup>, neutralizou-se o meio com ácido acético concentrado e dialisou-se contra água corrente durante 72 horas e com água destilada durante 24 horas. Decorrido este período de diálise, os polissacarídeos parcialmente metilados foram liofilizados e submetidos ao tratamento com óxido de prata e iodeto de metila, de acordo com o método descrito por Purdie e modificado por Kuhn et alli (34, 41).

O material liofilizado foi dissolvido em 2 mL de dimetil

formamida. No 1º dia de metilação, adicionou-se 2 mL de iodeto de metila e 1 g de óxido de prata, porém nos dois dias seguintes, fez-se apenas adição de 1 g de  $Ag_2O$ . Durante estes três dias, o sistema de reação foi mantido sob agitação constante, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Depois de 72 horas o processo foi interrompido pela extração exaustiva do material metilado com clorofórmio e após filtração por papel, o filtrado clorofórmico foi evaporado à secura e os polissacarídeos permetilados foram convertidos em acetatos de alditóis parcialmente metilados, como será descrito no próximo tópico.

#### 5.2- METILAÇÃO DA UMBILICINA E DOS PRODUTOS OBTIDOS DA DEGRADAÇÃO DE SMITH CONTROLADA DA $\alpha$ -D-GLUCANA

Estes materiais (10 mg) foram metilados somente pelo processo de Kuhn, como descrito anteriormente. Os produtos metilados foram então, extraídos com clorofórmio e derivatizados para seus respectivos acetatos de alditóis.

### 6. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DOS POLISSACARÍDEOS METILADOS NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS

Uma amostra de cada polissacarídeo metilado (2 a 5 mg) foi submetida à hidrólise com solução aquosa de ácido fórmico a 90% (v/v), durante 1 hora, à temperatura de  $100^{\circ}$  (10, 42). O excesso de ácido fórmico foi removido por evaporação, sob pressão reduzida, a  $50^{\circ}$ , e o resíduo foi lavado duas vezes com água destilada, e submetido ao tratamento com ácido sulfúrico 0,25M, durante 16 horas, à temperatura de  $100^{\circ}$ . O excesso de ácido sulfúrico foi eliminado com carbonato de bário, e o filtrado límpido foi deionizado por meio de resina Dowex 50W x 8 (forma  $H^+$ ). Após filtração, a solução resultante foi evaporada a um pequeno volume

e tratada com boroidreto de sódio, durante 15 horas, à temperatura ambiente. Decorrido o período de redução, os íons sódio foram eliminados da preparação pelo tratamento com resina Dowex 50W x 8 (forma  $H^+$ ) e o ácido bórico formado foi removido, na forma de borato de metila, por co-destilação com metanol.

A acetilação dos alditóis parcialmente metilados foi realizada por método convencional, com anidrido acético e piridina numa relação de 1:1.

Os produtos metilados na forma de acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio e analisados por g.l.c. na coluna convencional de ECNSS-M a 3% em Gas Chrom. Q e por g.l.c.-m.s. na coluna capilar preenchida por OV-225 e OV-17, na proporção de 3:1, como descrito em métodos analíticos gerais.

## 7. DETERMINAÇÕES DO CONSUMO DE META-PERIODATO DE SÓDIO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO PELOS POLISSACARÍDEOS

### 7.1- $\alpha$ -D-GLUCOPIRANANA

A  $\alpha$ -D-glucana (30 mg) isolada por extração aquosa do líquen *Stereocaulon ramulosum* e o metil- $\alpha$ -D-galactosídeo (30 mg), usado como um controle, foram oxidados com solução de meta-periodato de sódio 0,05 M (50 mL), durante, em média 96 horas, à temperatura de 0 - 2<sup>o</sup> e na ausência de luz (33, 50).

#### (a) Consumo de Meta-periodato de Sódio.

Em diferentes intervalos de tempo, foram retiradas alíquotas de 1 mL da solução oxidante, para determinação do consumo de periodato, por titulação com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,01N, usando solução de amido 1 g %, como indicador.

Para o cálculo do número de moles de periodato reduzido por mol de hexose anidra, empregou-se a seguinte fórmula:

$$x = \frac{(B - A) \times \text{Volume total da solução oxidante} \times N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times 162}{2 \times \text{mL de alíquota titulada} \times \text{g de amostra oxidada} \times 1.000}$$

onde,

x = Número de moles de periodato consumido por mol de hexose anidra.

B = Volume da solução de tiossulfato encontrado para a titulação do branco.

A = Volume da solução de tiossulfato encontrado para a titulação das alíquotas colhidas em diferentes intervalos de tempo.

$N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  = Normalidade da solução de tiossulfato de sódio, multiplicada pelo seu fator de correção.

Usando-se o consumo de periodato, expresso em moles de meta-periodato de sódio consumido por mol de hexose anidra, em diferentes intervalos de tempo, obteve-se um gráfico, em que o valor real da quantidade de periodato requerida para a oxidação completa do polissacarídeo, foi obtida pela extrapolação da curva para o tempo zero.

#### (b) Produção de Ácido Fórmico.

Já a produção de ácido fórmico foi determinada por titulação de alíquotas de 5 mL., retiradas no final da oxidação, com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,01N, usando solução de fenolftaleína a 1g%, como indicador.

O número de moles de ácido fórmico liberado por mol de hexose anidra, foi calculado por intermédio da fórmula a seguir:

$$y = \frac{(A-B) \times \text{Volume total da solução oxidante} \times N_{\text{NaOH}} \times 162}{\text{mL de alíquota titulada} \times \text{g de amostra oxidada} \times 1.000}$$

onde,

y = Número de moles de ácido fórmico liberado por mol de hexose anidra.

B = Volume da solução de NaOH encontrado para a titulação do branco.

A = Volume da solução de NaOH encontrado para a titulação das alíquotas coletadas no final da oxidação.

$N_{\text{NaOH}}$  = Normalidade da solução de NaOH, multiplicada pelo seu fator de correção.

Para a  $\alpha$ -D-glucana, as quantidades de periodato consumido e de ácido fórmico liberado por unidade de hexose anidra foram de 0,39 e 0,005, respectivamente.

## 7.2- $\beta$ -D-GLUCOPIRANANA

Em decorrência da insolubilidade da  $\beta$ -D-glucana em água, foi necessário preparar a solução para ser oxidada pelo periodato, de uma maneira diferente daquela empregada para o polissacarídeo solúvel em água (67). Primeiramente, dissolveu-se uma amostra do polímero (30 mg) em solução de NaOH 1M (5,4 mL) e em seguida, ajustou-se o pH para 4,85 com solução de HCl 0,5M (10,2 mL). A solução resultante foi então, tratada com solução de meta-periodato de sódio 0,05M (34,4 mL), durante 96 horas, à temperatura ambiente, sob agitação constante e na ausência de luz. As determinações do consumo de periodato, bem como a produção de ácido fórmico foram feitas de modo idêntico ao empregado para o polissacarídeo solúvel em água, como descrito anteriormente.

Após 96 horas, verificou-se que a  $\beta$ -D-glucana não "consumiu periodato" e conseqüentemente, não houve a "produção de ácido fórmico", indicando tratar-se de um polímero resistente à oxidação pelo meta-periodato de sódio.

## 8. DEGRADAÇÃO TIPO SMITH DOS POLISSACARÍDEOS

Uma amostra de cada polissacarídeo (30 mg) foi oxidada com meta-periodato de sódio, exatamente como descrito no tópico anterior. O excesso do agente oxidante foi destruído pela adição de etileno-glicol (3 mL) e a solução oxidada foi dialisada contra água corrente, por 15 horas. Após diálise, a solução contendo o polialdeído foi tratada com boroidreto de sódio (1,35), durante 15 horas, à temperatura ambiente. O excesso do agente redutor foi destruído pela adição cuidadosa de ácido acético 2M até pH 5-6, à temperatura de 0 - 2<sup>o</sup>, e a solução reduzida foi novamente dialisada contra água corrente, durante uma noite.

A fração não dialisável foi evaporada à secura e submetida à hidrólise com ácido sulfúrico 0,5M (2 mL), durante 7 horas, à temperatura de 100<sup>o</sup>. Decorrido este período de hidrólise, neutralizou-se o meio ácido com carbonato de bário e filtrou-se por papel. O filtrado límpido foi deionizado com as resinas Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>) e Dowex 2 x 8 (forma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e após filtração, foi evaporado a um pequeno volume.

Uma parte do material hidrolisado foi analisada por cromatografia em papel (sistema-A), enquanto que a outra parte foi reduzida com boroidreto de sódio, à temperatura ambiente, durante 15 horas. O excesso do agente redutor foi destruído pelo tratamento da solução reduzida com resina Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>), e o ácido bórico resultante foi removido por co-destilação com

metanol, na forma do éster volátil borato de metila.

Os alditóis obtidos foram acetilados com anidrido acético-piridina (1:1) e os acetatos de alditóis resultantes foram extraídos com clorofórmio e analisados por g.l.c. em coluna convencional de ECNSS-M a 3% em Gas Chrom.Q, com programação de temperatura de 130 a 180<sup>o</sup>, pela variação de 4<sup>o</sup> por minuto.

## 9. DEGRADAÇÃO DE SMITH CONTROLADA DA $\alpha$ -D-GLUCANA

O polissacarídeo (1 g) foi oxidado com meta-periodato de sódio 0,05M (1.000 mL), durante 96 horas, à temperatura de 0 - 2<sup>o</sup> e na ausência de luz. O excesso do agente oxidante foi destruído pela adição de etileno-glicol (10 mL) e a solução oxidada foi reduzida e dialisada, como descrito no tópico anterior.

A fração não dialisável foi evaporada a um pequeno volume e o poliol foi parcialmente hidrolisado em pH 2 (pH ajustado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M), à temperatura de 100<sup>o</sup>, durante 40 minutos (26). Após hidrólise ácida parcial, neutralizou-se o meio ácido com carbonato de bário e filtrou-se por papel. O filtrado límpido foi tratado com as resinas Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>) e Dowex 2x8 (forma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e após filtração, foi evaporado a um pequeno volume (FRAÇÃO-B), para ser cromatografado em papel usando o sistema de solvente-A.

Pela análise da cromatografia em papel desta fração, observou-se três manchas com R<sub>GE</sub> de 1,60, 1,05 e 0,66, que não foram visualizadas pelo cloridrato de para-anisidina, de modo que a próxima etapa foi o fracionamento e purificação dos componentes contidos na Fração-B, por cromatografia em coluna de celulose, como descrito a seguir.

## 10. FRACIONAMENTO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE SMITH CONTROLADA DA $\alpha$ -D-GLUCANA POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE CELULOSE

A montagem da coluna de celulose, bem como a preparação e aplicação da amostra, foram feitas de modo idêntico ao empregado para o fracionamento dos alditóis e oligossacarídeos da fração-A, obtida pela extração metanol-água 4:1 do líquen.

Após o empacotamento da coluna e lavagem do leito de celulose (altura do leito 32,5 cm, volume de leito 368,59 cm<sup>3</sup>) com três vezes o seu volume total de acetona, verificou-se pela aplicação de uma amostra da Fração-B (171,9 mg), que a altura de celulose alcançou 39,5 cm, correspondendo a um volume de leito igual a 447,96 cm<sup>3</sup>.

A eluição foi realizada inicialmente com acetona (500 mL), seguida por soluções de acetona-água (v/v) nas proporções de 9:1 (1.000 mL), 4:1 (1.000 mL), 3:1 (1.000 mL) e 2:1 (1.000 mL), para finalmente ser utilizada água (1.000 mL), como eluente. O volume das frações coletadas foi igual a 200 mL, e com o decorrer das eluições, estas frações foram evaporadas a um pequeno volume, para serem cromatografadas em papel, utilizando-se o sistema de solvente-A e o visualizador AgNO<sub>3</sub> alcalino.

O fracionamento da Fração-B pela cromatografia em coluna de celulose forneceu apenas três compostos que foram eluídos por acetona-água 9:1 com  $R_{GE}$  de 1,60 (7,7 mg), por acetona-água 7:1 com  $R_{GE}$  de 1,05 (38,5 mg) e por acetona-água 4:1 com  $R_{GE}$  de 0,66 (98,5 mg).

O componente com  $R_{GE}$  de 1,06 foi identificado pela própria cromatografia em papel e também por g.l.c., como sendo

eritritol, enquanto que os outros dois componentes foram reconhecidos pelas análises de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. e metilação, como sendo o glicosídeo  $\underline{0}$ - $\alpha$ - $\underline{\underline{D}}$ -glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)- $\underline{\underline{D}}$ -eritritol ( $R_{GE}$  1,05 ) e o oligossacarídeo  $\underline{0}$ - $\alpha$ - $\underline{\underline{D}}$ -glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  3)- $\underline{0}$ - $\alpha$ - $\underline{\underline{D}}$ -glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)- $\underline{\underline{D}}$ -eritritol ( $R_{GE}$  0,66).

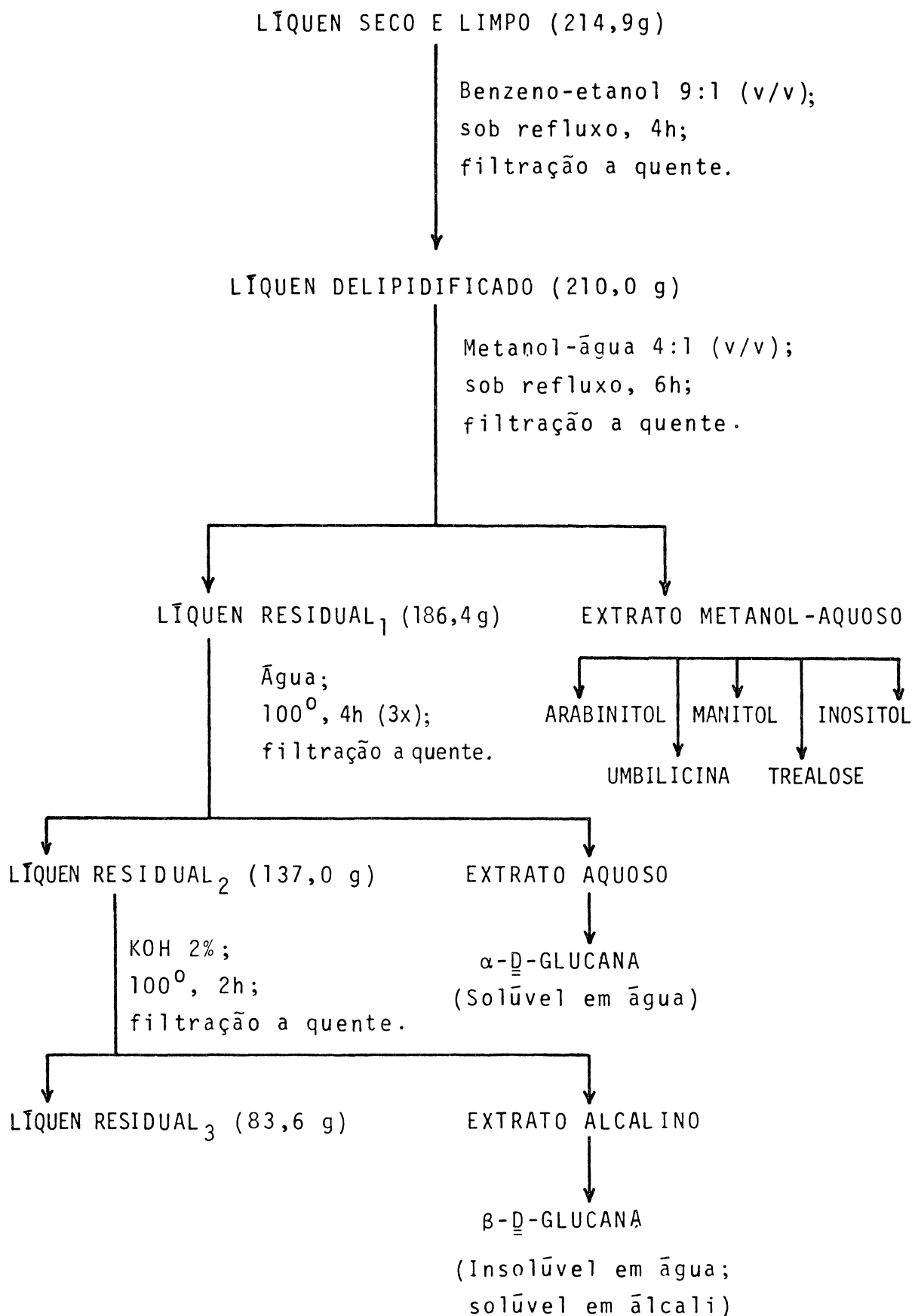
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Stereocaulon ramulosum*, um líquen com micossimbionte ascomiceto, não foi investigado até a presente data quanto aos seus componentes carboidratados, embora Ramaut et alii (56), em 1978, pesquisaram outros constituintes químicos neste líquen. Estes autores, após estudos de cromatografia em camada delgada e espectroscopia de Ultra-violeta, mostraram a existência de ácidos liquênicos (atranorina e ácido perlatólico) no líquen *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Räs<sup>u</sup>sch, coletado nas montanhas da África Oriental (Zaire/Kivu, Rwanda e Burundi).

Este mesmo líquen, também bastante comum no Brasil, foi coletado na Serra do Mar-Estrada da Graciosa-Estado do Paraná, e, após ser devidamente seco e limpo, foi submetido a quatro processos de extração, como mostrado no Esquema-I.

## E S Q U E M A - I

PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS EXISTENTES NO LÍQUEN *Stereocaulon Ramulosum* (Sw.) RÄUSCH.



## 1. COMPONENTES SOLÚVEIS NO EXTRATO METANOL-AQUOSO

O líquen previamente extraído com benzeno-etanol, um processo que removeu 2,28 g % de materiais solúveis, foi tratado com metanol contendo 20% de água (v/v), para extração de constituintes carboidratados de baixo molecular.

O extrato metanol-aquoso resultante, após deionização, forneceu um resíduo de 7,10 g, que correspondeu a 3,30 g % do peso de líquen original. Este resíduo solubilizado em água (FRAÇÃO-A), quando cromatografado em papel (sistema-B), mostrou principalmente arabinitol ( $R_{GAL} 1,18$ ), manitol ( $R_{GAL} 1,04$ ) e um componente ( $R_{GAL} 0,94$ ), que pela visualização com cloridrato de paranisidina apresentou teste negativo para açúcar redutor. A análise por g.l.c. (Figura 1) dos acetatos de polióis obtidos simplesmente por acetilação da Fração-A confirmou a presença de arabinitol (93,22%) e manitol (6,78%), apresentando ainda um componente não identificado, cujos tempos de retenção estão relacionados na Tabela-I. Esta tabela também mostra que os acetatos de polióis obtidos após redução e acetilação desta fração (Figura 2), foram representados por arabinitol e manitol em proporções similares às da Fração-A somente acetilada. Desse modo, demonstrou-se que esta fração não era constituída de monossacarídeos livres, no entanto, estes foram evidenciados, após hidrólise ácida e posterior análise dos acetatos de alditóis por g.l.c. (Figura 3). Esta análise mostrou que além dos alditóis acima mencionados, também foram encontrados galactose e glucose (Tabela-I), os quais comprovaram a presença de oligossacarídeos na Fração-A.

Com a finalidade de realizar o fracionamento dos componentes existentes na Fração-A, empregou-se uma coluna cromatogrã-

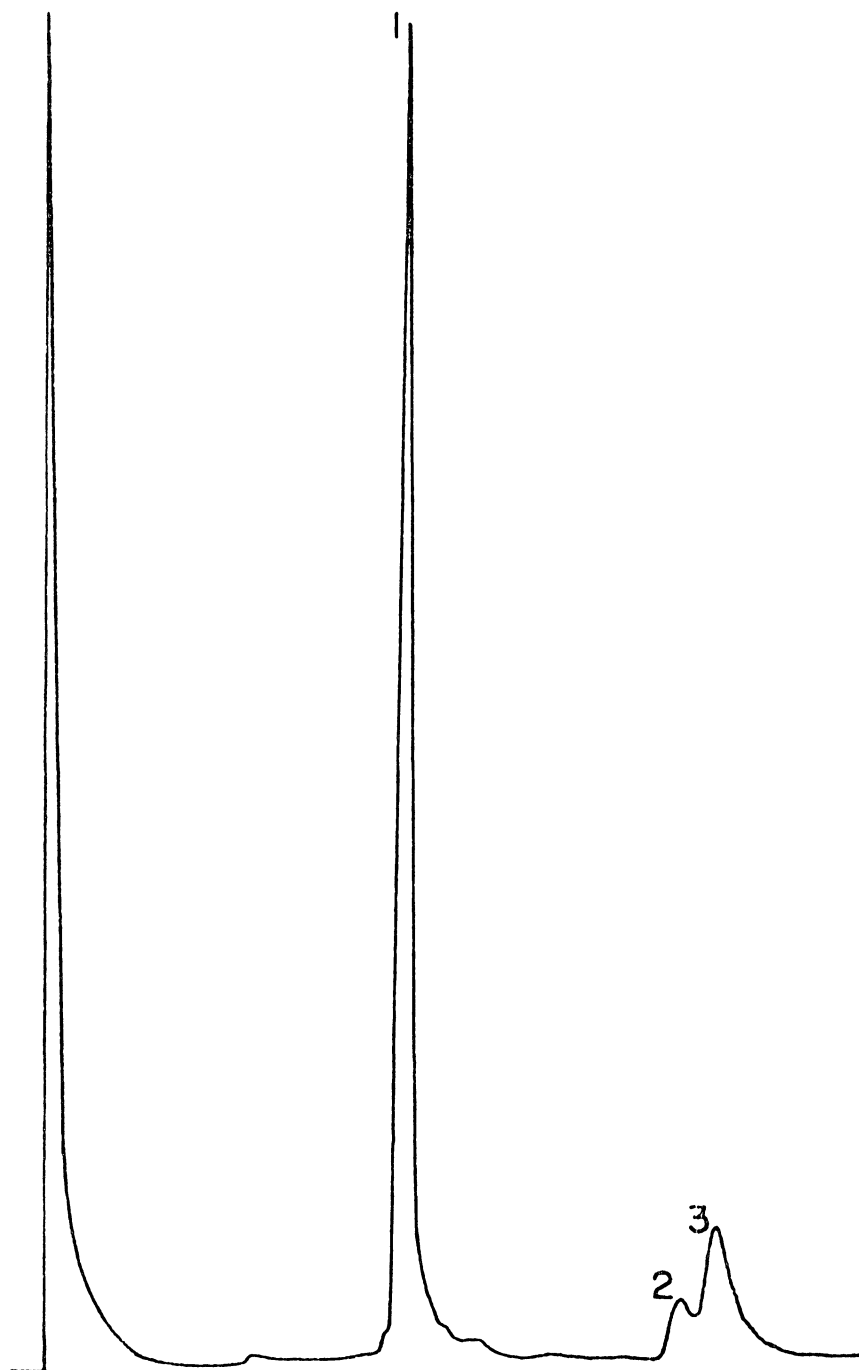


Figura 1- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de acetilação do extrato metanol-aquoso (Fração-A), na forma de acetatos de polióis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 130-180<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> por minuto).

1. Arabinitol penta-o-acetato (93,22%).
2. Manitol hexa-o-acetato (6,78%).
3. Desconhecido.

## T A B E L A - I

ANÁLISE POR g.l.c. (a) DA FRAÇÃO-A OBTIDA PELA EXTRAÇÃO METANOL-ÁGUA 4:1 DO LÍQUEN *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) RÄUSCH.

Componentes	T (b)	FRAÇÃO - A Composição relativa %		
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
Arabinitol	0,84	93,22	93,88	65,70
Manitol	1,49	6,78	6,12	8,06 *
Desconhecido	1,58	-	-	-
Galactose	1,66	-	-	20,72
Glucose	1,83	-	-	5,53

(a) Coluna convencional de ECNSS-M a 3% (p/p) em Gas Chrom. Q, com programação de temperatura de 130 a 180<sup>o</sup>, pela variação de 4<sup>o</sup> por minuto.

(b) Tempos de retenção em relação ao do xilitol penta-o-acetato.

A<sub>1</sub> = Fração-A simplesmente acetilada.

A<sub>2</sub> = Fração-A reduzida e acetilada.

A<sub>3</sub> = Fração-A hidrolisada, reduzida e acetilada.

\* O aumento da % relativa de manitol em relação a % de arabinitol, deve-se, presumivelmente, a ocorrência de algum glicosídeo, que por hidrólise ácida forneceu manitol e que não foi estudado no presente trabalho. No líquen *Peltigera aphthosa* foi encontrado o 3-o- $\beta$ -o-glucopiranosil-o-manitol, sugerindo que tal glicosídeo também ocorra no *Stereocaulon ramulosum* (27).

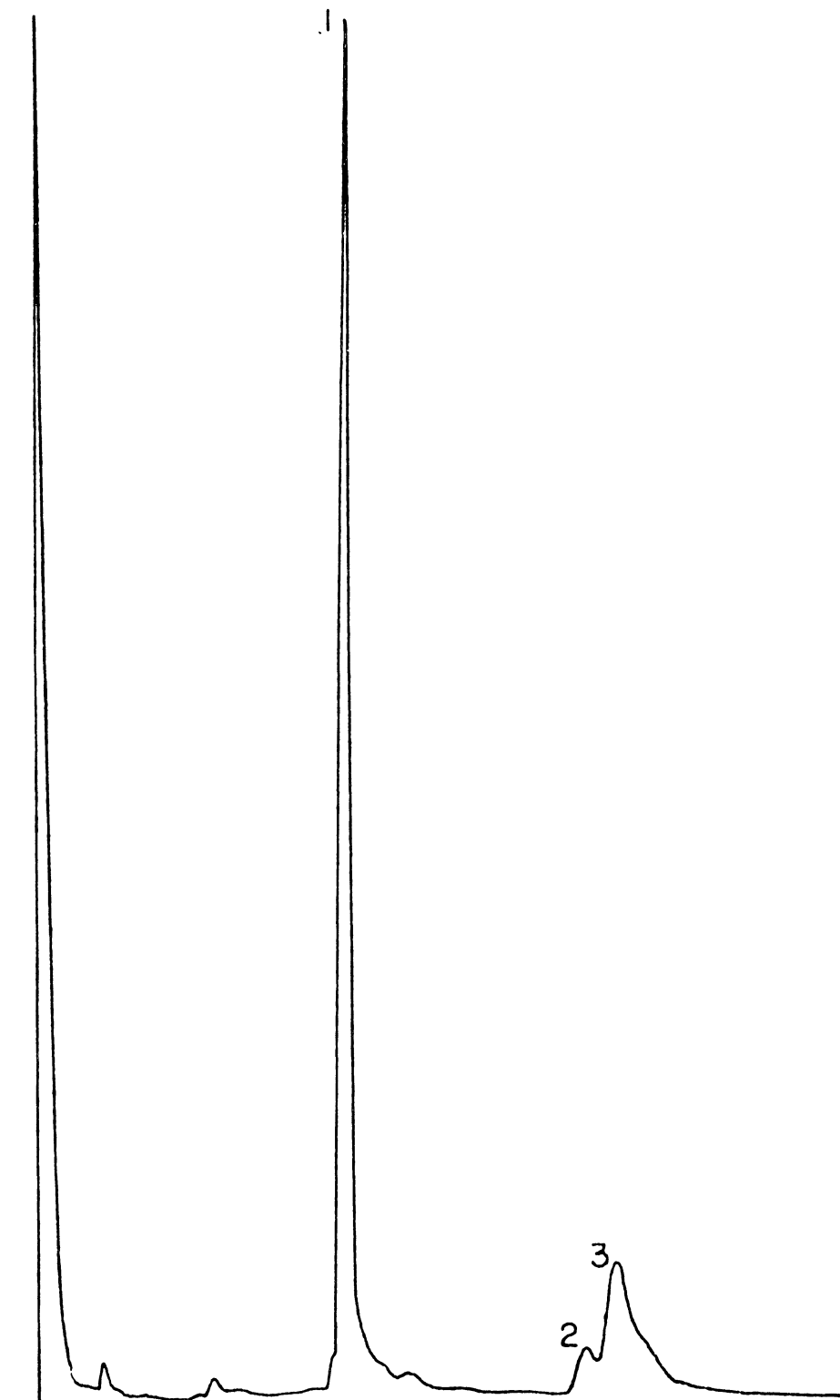


Figura 2- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de redução seguida por acetilação do extrato metanol-aquoso (Fração-A), na forma de acetatos de polióis.(ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 130-180<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> por minuto).

1. Arabinitol penta-o-acetato (93,88%).
2. Manitol hexa-o-acetato (6,12%).
3. Desconhecido.

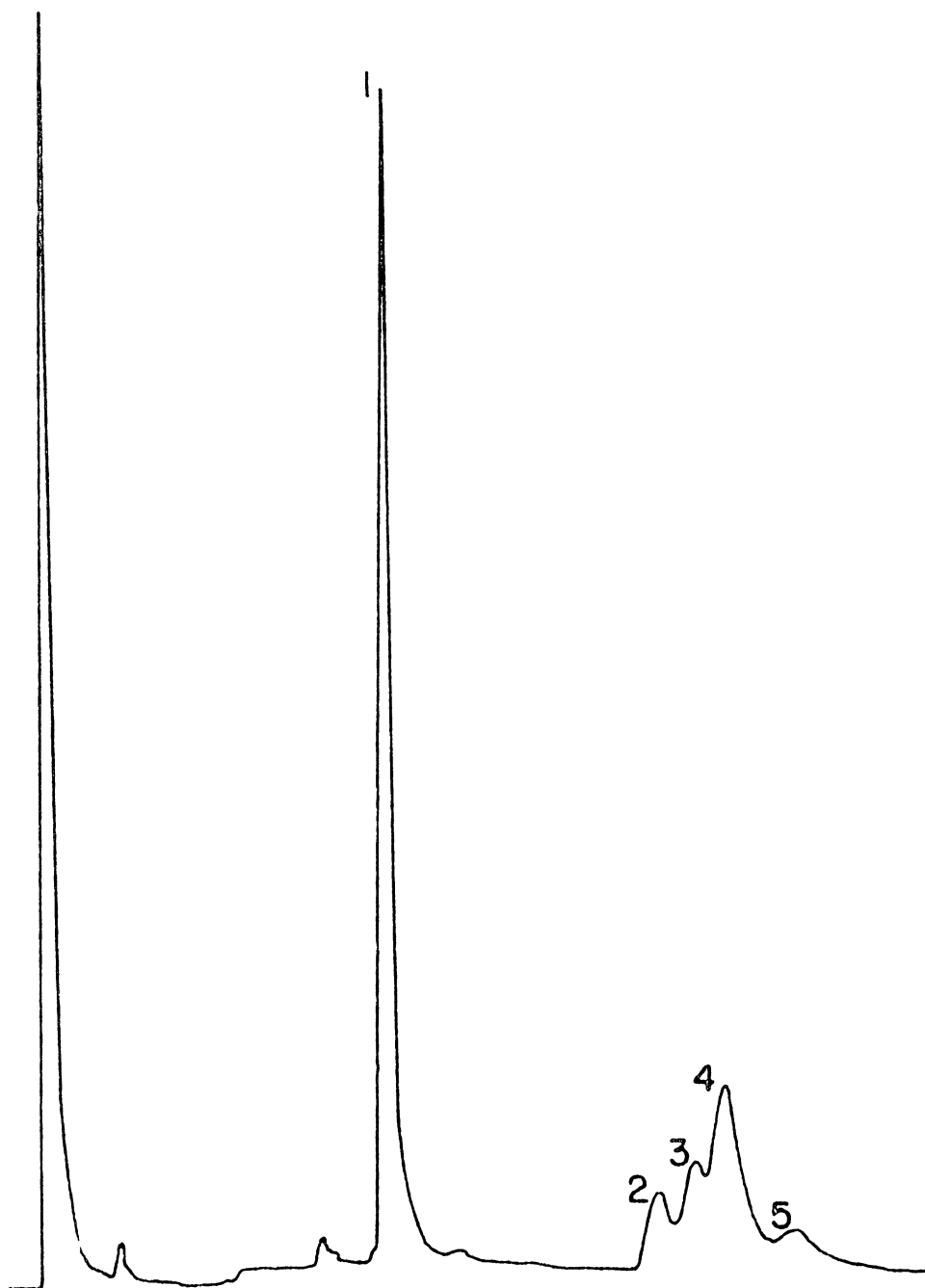


Figura 3- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total, seguida por redução e acetilação do extrato metanol-aquoso (Fração-A), na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/ Gas Chrom. Q, 130-180<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> por minuto).

1. Arabinitol penta-0-acetato. (65,70%).
2. Manitol hexa-0-acetato (8,06%).
3. Desconhecido.
4. Galactitol hexa-0-acetato (20,72%).
5. Glucitol hexa-0-acetato (5,53%).

fica empacotada com pó de celulose. À esta coluna, foi aplicada uma amostra de 0,70 g e a eluição foi feita com acetona e várias soluções de acetona-água (v/v) com proporções crescentes em água.

Pela cromatografia de partição da Fração-A em coluna de celulose, obteve-se arabinitol (0,397 g,  $R_{GAL}$  1,18) e manitol (0,071 g,  $R_{GAL}$  1,04) que foram eluídos por acetona-água na proporção de 7:1 e cujos rendimentos em relação ao peso de líquen original foram de 1,87 g% e 0,34 g%, respectivamente. Além destes componentes, obteve-se inositol (0,008 g,  $R_{GAL}$  0,62), que foi eluído por acetona-água 3:1 e identificado por análises de cromatografia em papel e g.l.c., apresentando um rendimento de 0,04 g% do peso de líquen original, como também obteve-se um glicosídeo e um oligossacarídeo com mobilidades inferiores ao manitol.

O glicosídeo encontrado nesta fração foi o 2-O- $\beta$ -D-galactofuranosil-D-arabinitol (0,183 g,  $R_{GAL}$  0,94), comumente conhecido por umbilicina, eluído por acetona-água 7:1 e que forneceu um rendimento de 0,86 g%, do peso de líquen original. Este glicosídeo, após hidrólise ácida e análise dos respectivos acetatos de alditóis por g.l.c. (Figura 4), mostrou ser constituído por arabinitol e galactose numa proporção de 1:1. O baixo valor da rotação específica ( $[\alpha]_D^{25} \sim -60^\circ$ ; c. 0,5 em  $H_2O$ ) indicou uma configuração  $\beta$ -D para o resíduo de galactose. Pela análise de metilação da umbilicina, e posterior derivatização na forma de seus acetatos de alditóis, pode-se identificar o componente 1,4-di-O-acetil-2,3,5,6-tetra-O-metil-D-galactitol, indicando que o resíduo de galactose encontrava-se na forma furanosídica. Esta forma também foi confirmada pela análise do seu espectro de  $^{13}C$ -n.m.r. (Figura 5-A), que mostrou sinais com deslocamentos químicos idênticos aos do espectro de  $^{13}C$ -n.m.r. da umbilicina isolada do

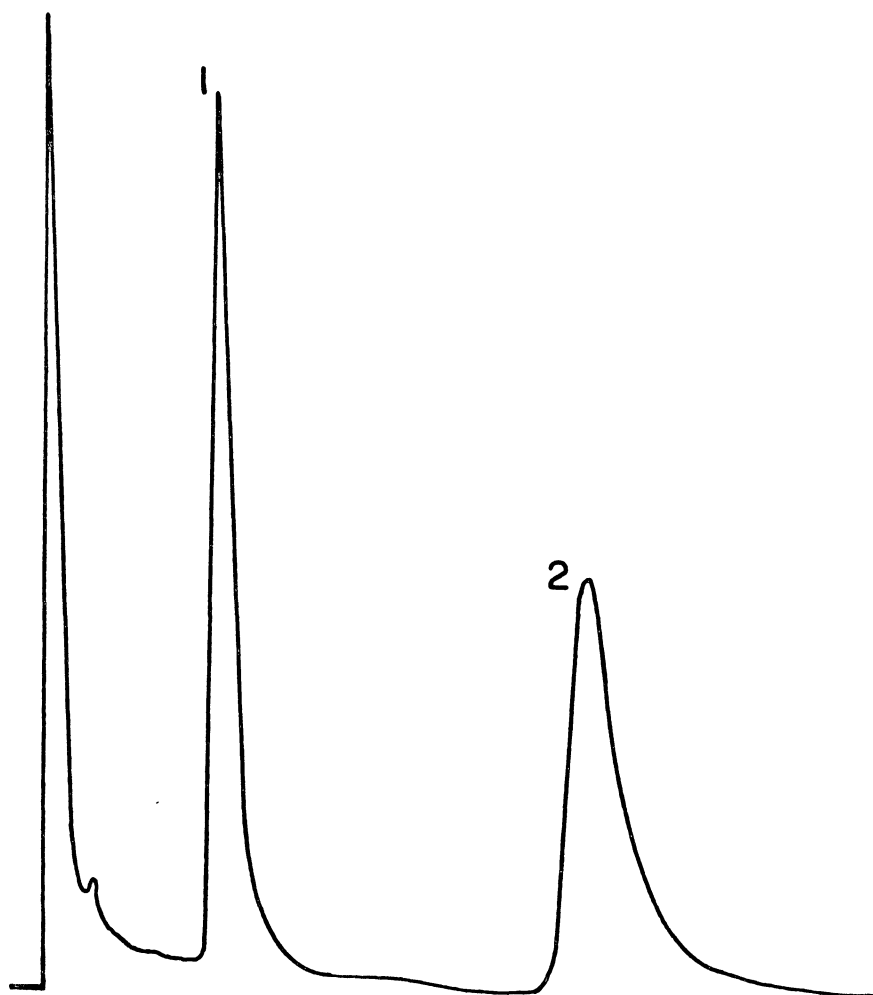


Figura 4- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do glicosídeo umbilicina, na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 180°).

1. Arabinitol penta-0-acetato (50,49%).
2. Galactitol hexa-0-acetato (49,51%).

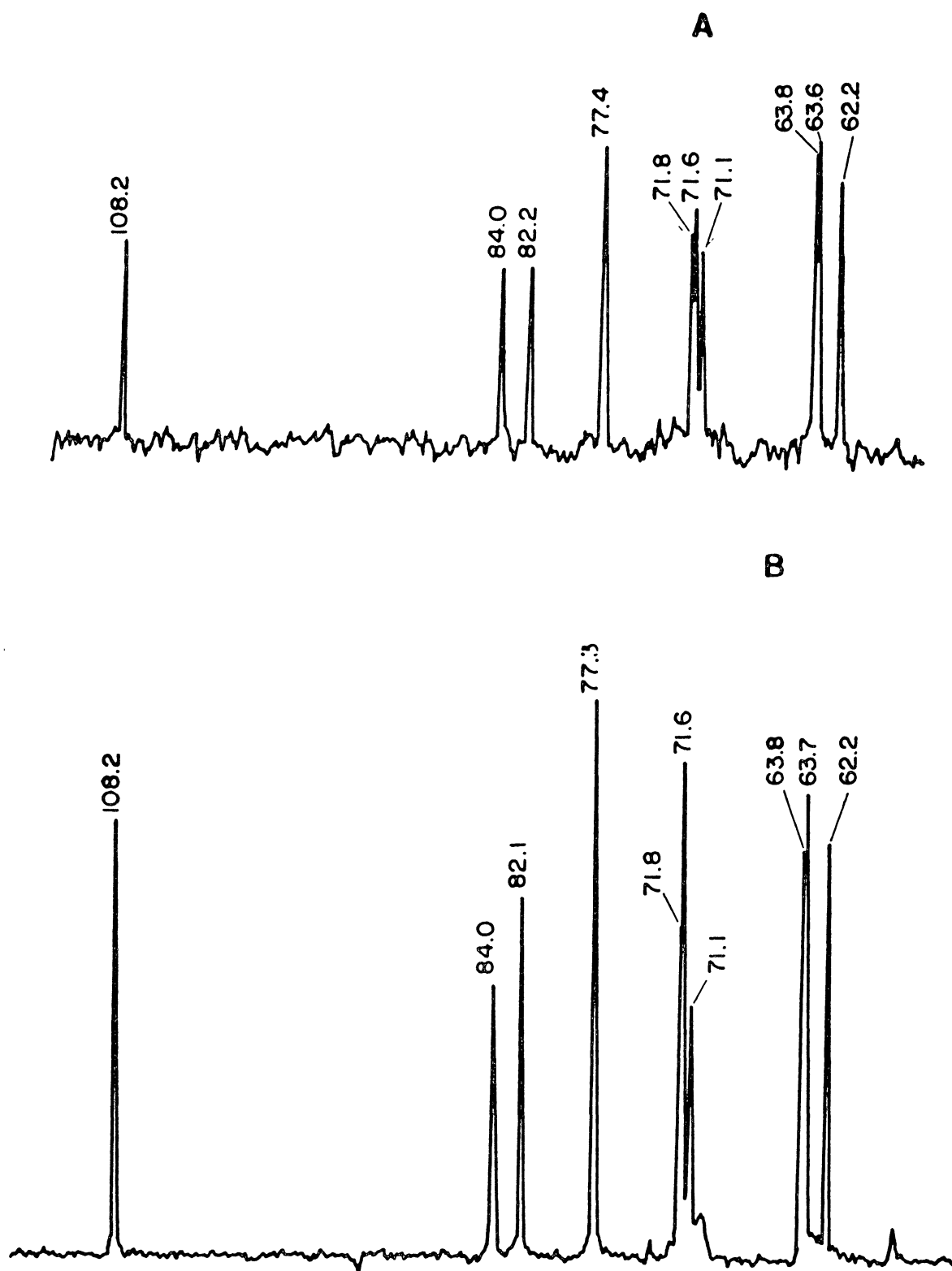
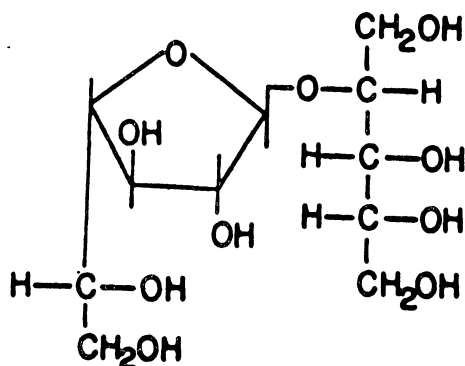


Figura 5- Espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. dos glicosídeos umbilicina, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$ p.p.m.

A) Isolado de *Stereocaulon ramulosum*.

B) Isolado de *Actinogyra muelenbergii*.

líquen *Actinogyra muehlenbergii* (Figura 5-B) (27). A atribuição de sinais aos átomos de carbono específicos foi feita em comparação com os dados de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. encontrados para o arabinitol (9) e para o resíduo de  $\beta$ -D-galactofuranosil (24, 28). Correspondendo com a estrutura do glicosídeo umbilicina (Estrutura 18),

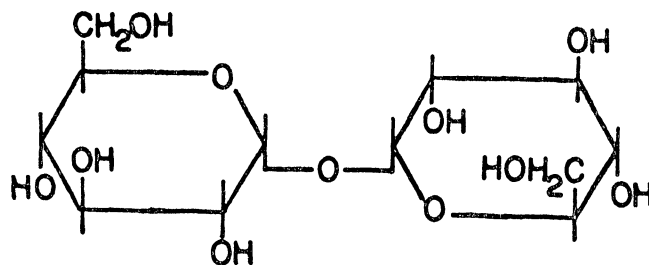


18

o espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. mostrou um sinal em  $\delta$  108,2 para C-1 $^\ominus$  do resíduo de  $\beta$ -D-galactofuranosil; dois sinais em  $\delta$  84,0 e 82,2 para C-4 $^\ominus$  e C-2 $^\ominus$ , respectivamente, não substituídos do resíduo de  $\beta$ -D-galactofuranosil; e dois sinais sobrepostos em  $\delta$  77,4 correspondentes ao C-3 $^\ominus$  não substituído do resíduo de galactofuranose e ao C-2 substituído do resíduo de arabinitol. Este espectro ainda mostrou três sinais em  $\delta$  71,8, 71,6 e 71,1 correspondentes aos átomos de carbono ligados a grupos hidroxil secundários não substituídos, ou seja, para C-5 $^\ominus$  do resíduo de  $\beta$ -D-galactofuranosil e/ou C-4 do resíduo de arabinitol e C-3 do resíduo de arabinitol, respectivamente; e três outros sinais em  $\delta$  63,8, 63,6 e 62,2 que corresponderam aos átomos de carbono ligados a grupos hidroxil primários não substituídos, isto é, para C-6 $^\ominus$  do resíduo de  $\beta$ -D-galactofuranosil e/ou C-5 do resíduo de arabinitol e C-1 do resíduo de arabinitol, respectivamente.

O oligossacarídeo isolado da Fração-A, foi reconhecido como sendo a  $\alpha$ -D-trealose (0,016 g,  $R_{\text{GAL}}$  0,73), que foi eluída por

acetona-água 4:1 e forneceu um rendimento de 0,08 g% do peso de líquen original. Pela hidrólise ácida mostrou apenas glucose (Figura 6) e o alto valor de sua rotação específica ( $[\alpha]_D^{25} \sim +171^{\circ}$  c. 0,5 em  $H_2O$ ) indicou uma configuração  $\alpha$ -D para o resíduo de glucose. O esclarecimento da estrutura do oligossacarídeo  $\alpha$ - $\alpha$ -D-trealose (Estrutura 19) foi obtido por comparação de seu espectro



19

de  $^{13}C$ -n.m.r. (Figura 7-A) com o da  $\alpha$ - $\alpha$ -trealose isolada do líquen *Cora pavonia* (Figura 7-B) (37), e a correlação de cada sinal a um determinado átomo de carbono foi obtida com o auxílio dos dados de  $^{13}C$ -n.m.r. do monossacarídeo  $\alpha$ -D-glucose (29). O espectro de  $^{13}C$ -n.m.r. deste oligossacarídeo apresentou seis sinais com deslocamentos químicos típicos, representados por um sinal em  $\delta$  95,0 para C-1 dos resíduos de  $\alpha$ -D-glucopiranosil; quatro sinais em  $\delta$  74,3, 73,9, 72,8 e 71,5 correspondentes aos átomos de carbono 3,5,2 e 4, respectivamente, não substituídos dos resíduos de  $\alpha$ -D-glucopiranosil; e um sinal em  $\delta$  62,4 que correspondeu aos átomos de carbono ligados a grupos hidroxil primários não substituídos (C-6).

Estes compostos carboidratados de baixo peso molecular, isolados do líquen *Stereocaulon ramulosum*, com exceção do inositol, também foram intensamente investigados em outras espécies de líquens, por Lindberg et alli (44), que obtiveram os mesmos

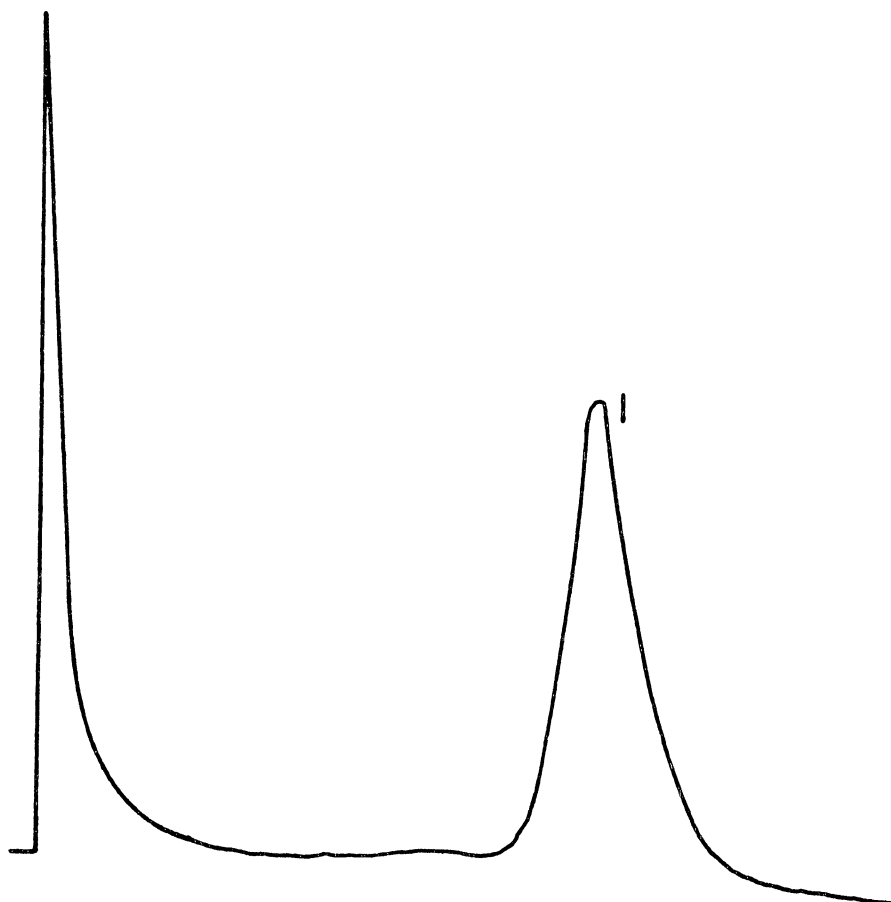


Figura 6- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do oligossacarídeo  $\alpha$ - $\alpha$ -D-trealose, na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS a 3%/Gas Chrom. Q, 180<sup>0</sup>).

1. Glucitol hexa-0-acetato.

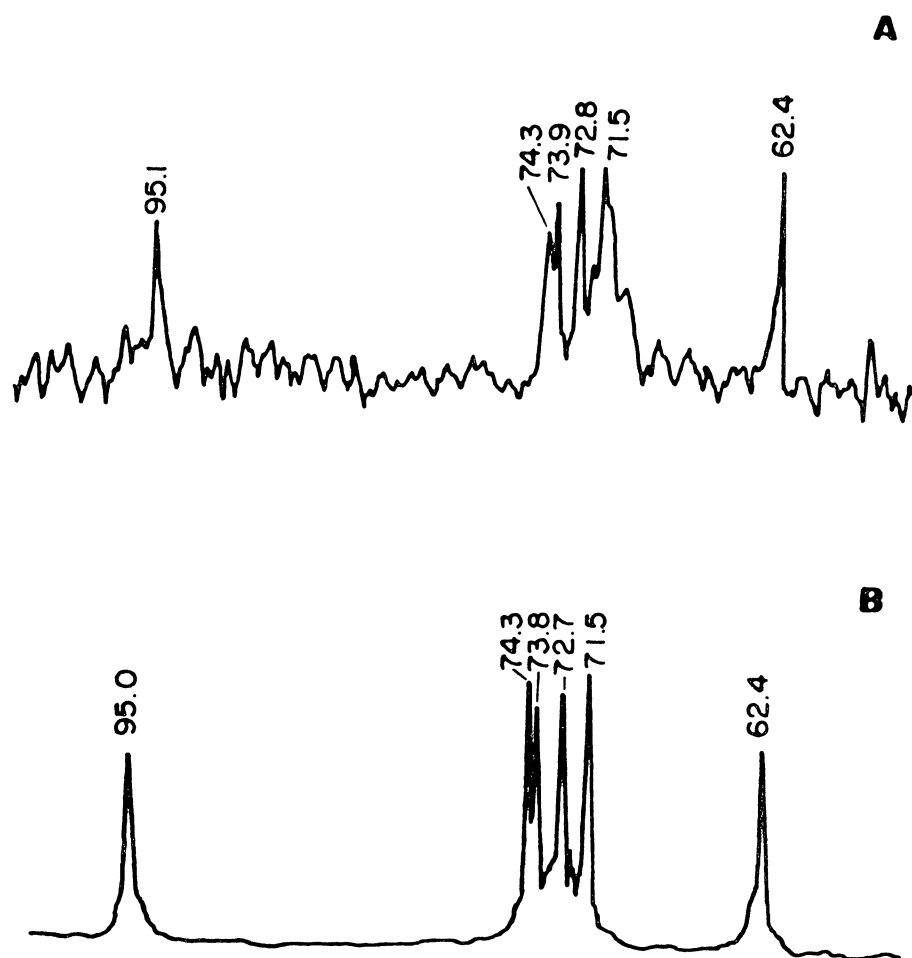


Figura 7- Espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. dos oligossacarídeos  $\alpha$ - $\alpha$ -D-tre<sub>alose</sub>, em  $\bar{\text{o}}\text{xido}$  de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ$ . Os deslocamentos quí $\text{m}$ icos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

- A) Isolado de *Stereocaulon ramulosum*.  
 B) Isolado de *Cora pavonia*.

por extrações destas espécies com éter (3 dias), seguida por acetona (3 dias) e usaram a cromatografia em papel (Whatman nº 1, sistema de solvente butanol-etanol-água 4:1:5, visualizadores nitrato de prata-etóxido de sódio e ftalato ácido de anilina ou fosfato de para-anisidina) para a identificação destes compostos. Os autores estudando sessenta líquens diferentes encontraram o manitol em todas as espécies investigadas, parecendo ser um constituinte de ocorrência geral em líquens.

O arabinitol mostrou-se como um constituinte comum dos líquens da ordem Gymnocarpeae, que apresenta, entre outros, os gêneros *Stereocaulon*, *Cladonia*, *Umbilicaria*, *Parmelia*, *Cetraria*, *Ramalina*, etc., porém não ocorrendo nos gêneros *Dermatocarpon* e *Endocarpon* pertencentes à ordem Pyrenocarpeae, que por sua vez, contém volemitol (D-glicero-D-talo-heptitol).

A trealose foi encontrada em vários líquens, tais como, *Haematomma ventosum*, *Cetraria islandica*, *Cladonia rangiferina*, *Lecanora atra*, *Umbilicaria rigida*, *U. pustulata*, que apresentaram concentrações baixas variando de 0,025 a 0,2 % de líquen seco, embora Gorin et alii (37), mais tarde, evidenciaram a presença de uma quantidade surpreendentemente alta desta substância (4,4%) no líquen *Cora pavonia*.

A umbilicina mostrou ser um constituinte de vários líquens da ordem Gymnocarpeae, com concentrações variando de 0,05 a 0,2% de líquen seco, com exceção no líquen *U. pustulata* que apresentou este componente em concentrações elevadas (2,5%).

De acordo com os resultados obtidos por Lindberg et alii (44), pode-se observar que estes constituintes são comumente isolados de líquens, sendo esta observação plenamente favorável

vel com os resultados revelados para o líquen *St. ramulosum*, que mostrou principalmente arabinitol e umbilicina, com traços de manitol e trealose. Deve-se contudo, ressaltar, que os componentes arabinitol, manitol e trealose também podem ser encontrados em outras fontes naturais (14), como em fungos, algas, bactérias, plantas superiores, etc., enquanto que, a umbilicina, foi o primeiro glicosídeo isolado de líquens (45), além de apresentar um tipo de estrutura não frequentemente encontrado na natureza, parecendo, portanto, ser um componente característico destas entidades simbióticas.

## 2. POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA

O líquen residual, após extração com benzeno-etanol e metanol-aquoso, foi tratado com água quente e o extrato aquoso resultante, foi adicionado em excesso de etanol para precipitação dos polissacarídeos. O precipitado etanólico forneceu um produto de 44,49 g, que correspondeu a 20,70 g% do peso de líquen original e pela análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos do material hidrolisado (Figura 8), foi evidenciada a presença de glucose (90,14%), manose (4,50%) e galactose (5,36%). Este material, quando submetido a processos de congelamento e degelo sucessivos para separação dos polissacarídeos solúveis em água fria daqueles insolúveis, forneceu um resíduo aquoso (Figura 9), que não foi investigado no presente trabalho. Já o sobrenadante aquoso, que mostrou ser constituído por glucose (85,07%), manose (4,29%) e galactose (10,64%) (Figura 10), foi adicionado igual quantidade de solução de Fehling, resultando na formação de um complexo cúprico insolúvel (precipitado de Fehling; 0,90 g), que forneceu um rendimento de 0,42 g% do peso de líquen original. O sobrenadante de Fehling, por sua vez, mostrou um polissacarídeo solúvel (9,64g), cujo rendimento está indicado na Tabela-II.

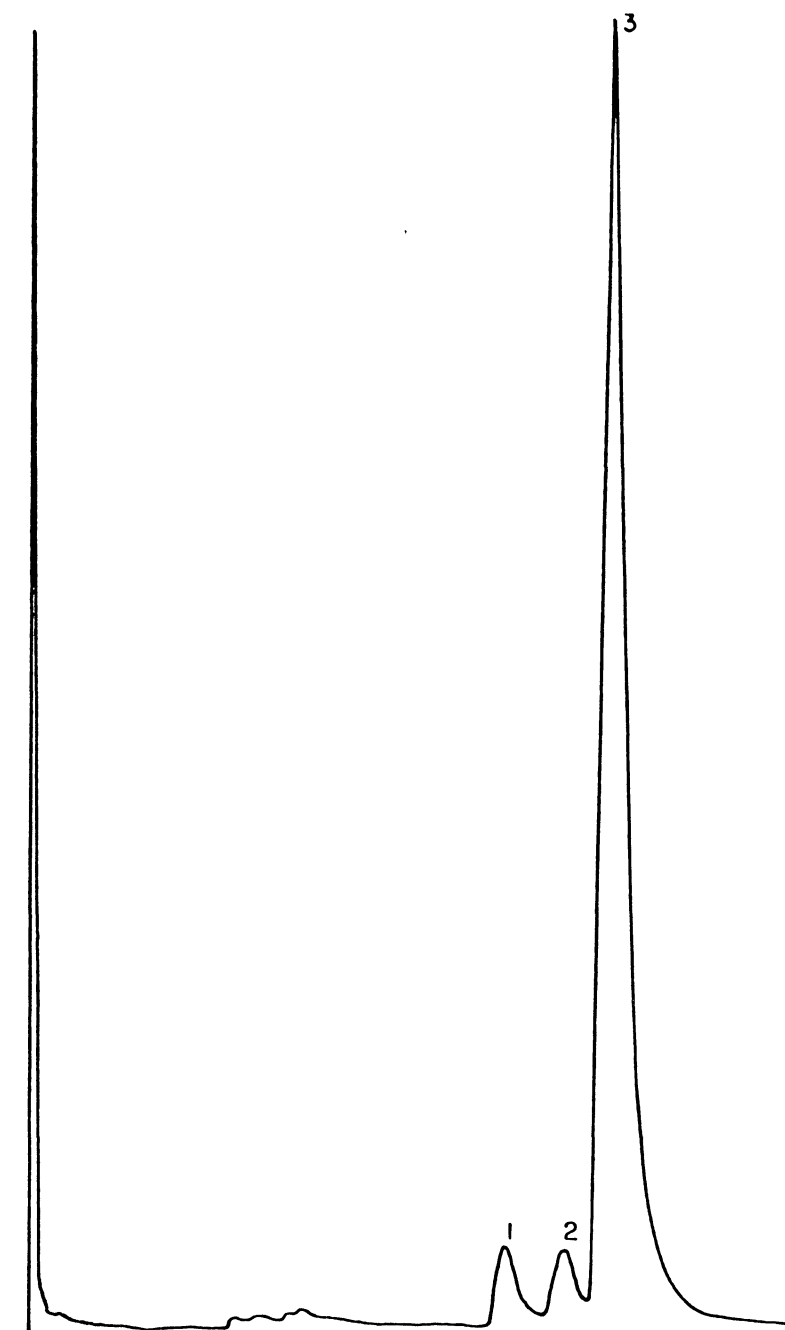


Figura 8- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do extrato aquoso (precipitado etanólico total), na forma de acetatos de alditóis (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 130-180<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> por minuto).

1. Manitol hexa-0-acetato (4,50%).
2. Galactitol hexa-0-acetato (5,36%).
3. Glucitol hexa-0-acetato (90,14%).

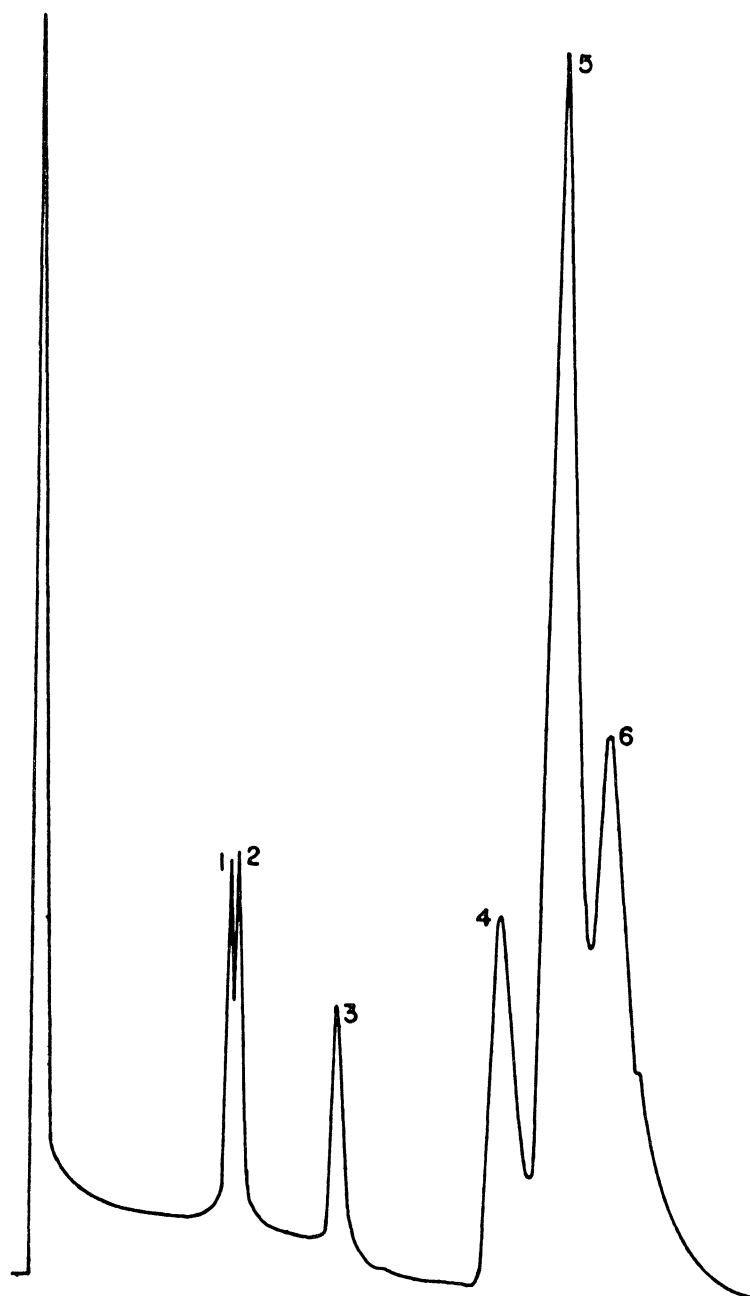


Figura 9- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do resíduo aquoso, resultante do congelamento e degelo do extrato aquoso, na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 130-180<sup>0</sup>).

1. Ramnitol penta-0-acetato (4,75%).
2. Fucitol penta-0-acetato (4,81%).
3. Xilitol penta-0-acetato (4,12%).
4. Manitol hexa-0-acetato (12,29%).
5. Galactitol hexa-0-acetato (48,30%).
6. Glucitol hexa-0-acetato (25,73%).

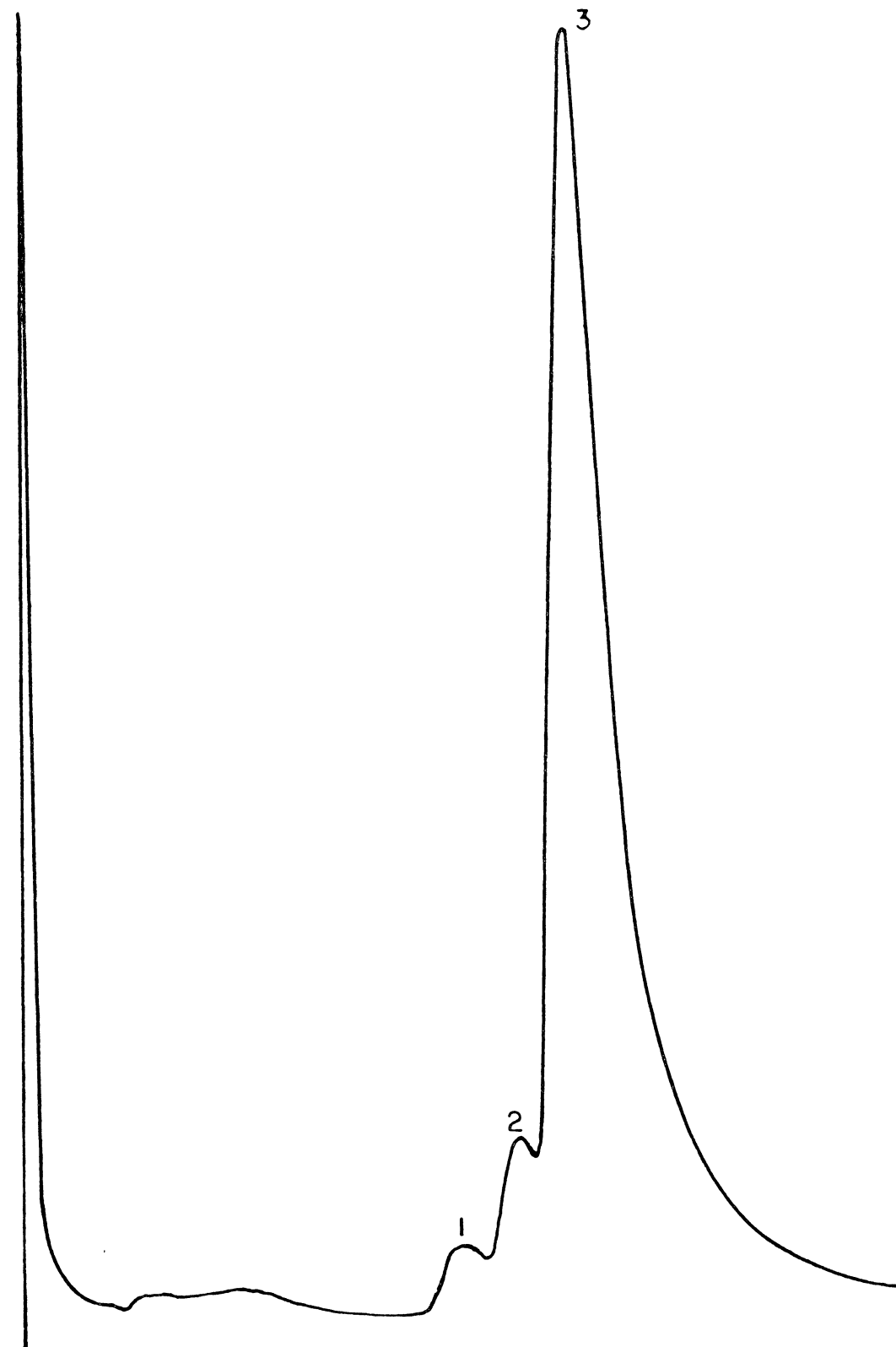


Figura 10- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do sobrenadante aquoso, resultante do congelamento e degelo do extrato aquoso, na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/ Gas Chrom. Q, 180<sup>0</sup>).

1. Manitol hexa-0-acetato (4,29%).
2. Galactitol hexa-0-acetato (10,64%).
3. Glucitol hexa-0-acetato (85,07%).

TABELA - I I

PROPRIEDADES CARACTERÍSTICAS DE ALGUNS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA DO LÍQUEN *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) RÄUSCH.

Fração Polissacarídica	Nitrogênio (a)	$[\alpha]_D^{25}$	Componentes (%) monossacarídicos						Rendimento em relação ao peso de líquen original (%).
			Glc	Man	Gal	Fuc	Xil	Rha	
$\alpha$ -D-Glucana (Sobrenadante de Fehling)	Traços	+ 171 <sup>0</sup>	100	-	-	-	-	-	4,48
Heteropolímero ácido (Resíduo de pH 7 do Cetavlon)	Traços	- 76 <sup>0</sup>	3,50	14,50	44,64	10,61	22,67	4,08	0,06
Galactomanana neutra (Resíduo de pH 8,5 do Cetavlon)	Traços	+ 52 <sup>0</sup>	-	60,33	39,67	-	-	-	0,24

(a) Traços= Valores menores que 0,01% de nitrogênio.

## 2.1- POLISSACARÍDEOS DO PRECIPITADO DE FEHLING

O material insolúvel da precipitação por solução de Fehling, após remoção do cobre, apresentou como produtos de hidrólise ácida, galactose (68,60 %), manose (21,62%), xilose (3,99%), fucose (3,12%) e ramnose (2,67%) (Figura 11). Além destes produtos, observou-se pela análise de cromatografia em papel (sistema-A) do material hidrolisado, a presença de um componente com características de ácido urônico, sendo que por este motivo, realizou-se um novo processo de purificação, por intermédio do sal de amônio quaternário-Cetavlon. No precipitado de pH 7,0 do Cetavlon, obteve-se um polissacarídeo, com rotação específica de valor negativo (Tabela-II), cujos componentes monossacarídicos podem ser observados na Figura 12. O exame da cromatografia em papel (sistema-A) dos seus produtos de hidrólise, mostrou além destes componentes, a presença de um provável ácido urônico, cujo  $R_{GAL}$  foi igual a 0,13. Já o precipitado de pH 8,5 do Cetavlon caracterizou a presença de um polissacarídeo constituído apenas por manose e galactose (Figura 13), cujo rendimento e rotação específica também estão apresentados na Tabela-II.

Estes heteropolissacarídeos de pH 7,0 e pH 8,5 isolados no precipitado de Fehling não foram estudados, estruturalmente, no presente trabalho.

## 2.2- POLISSACARÍDEO DO SOBRENADANTE DE FEHLING

Este polissacarídeo, quando hidrolisado pelo ácido trifluoracético, forneceu apenas glucose (Figura 14), indicando tratar-se de uma glucana. Embora, através da análise por g.l.c., evidenciou-se um polímero aparentemente puro, este grau de pureza foi confirmado pela sua passagem em colunas de DEAE-celulose

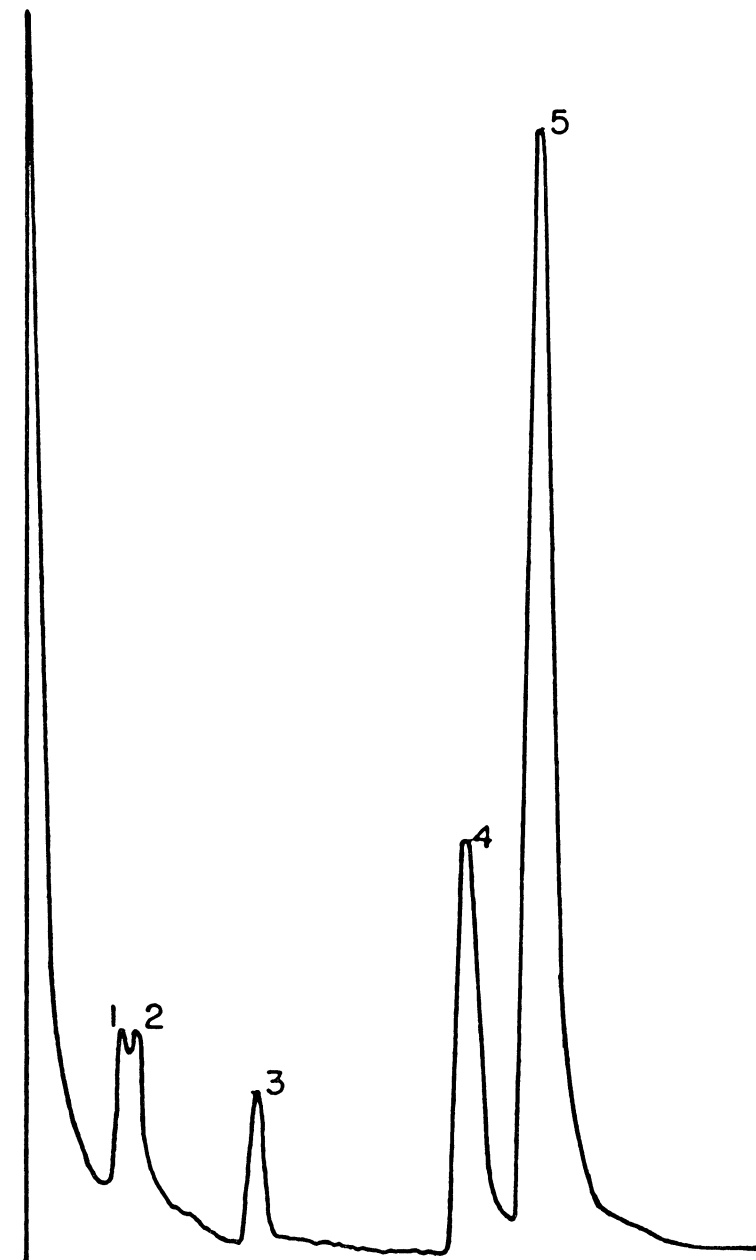


Figura 11- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do precipitado de Fehling (extração aquosa), na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 180<sup>o</sup>).

1. Ramnitol penta-0-acetato. (2,67%).
2. Fucitol penta-0-acetato (3,12%).
3. Xilitol penta-0-acetato (3,99%).
4. Manitol hexa-0-acetato (21,62%).
5. Galactitol hexa-0-acetato. (68,60%).

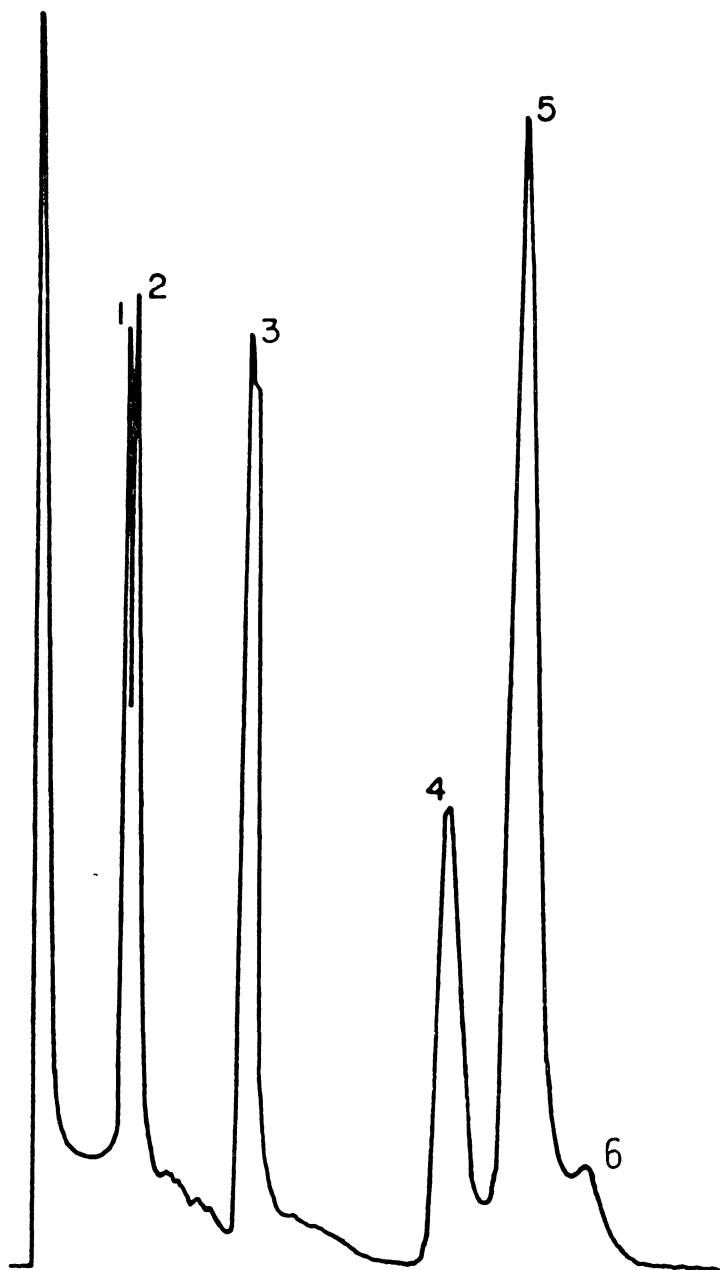


Figura 12- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do polissacarídeo do resíduo de pH 7-Cetavlon(extração aquosa), na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M.a 3%/Gas Chrom. Q, 180°).

1. Ramnitol penta-0-acetato (4,08%).
2. Fucitol penta-0-acetato (10,61%).
3. Xilitol penta-0-acetato (22,67%).
4. Manitol hexa-0-acetato (14,50%).
5. Galactitol hexa-0-acetato (44,64%).
6. Glucitol hexa-0-acetato (3,50%).

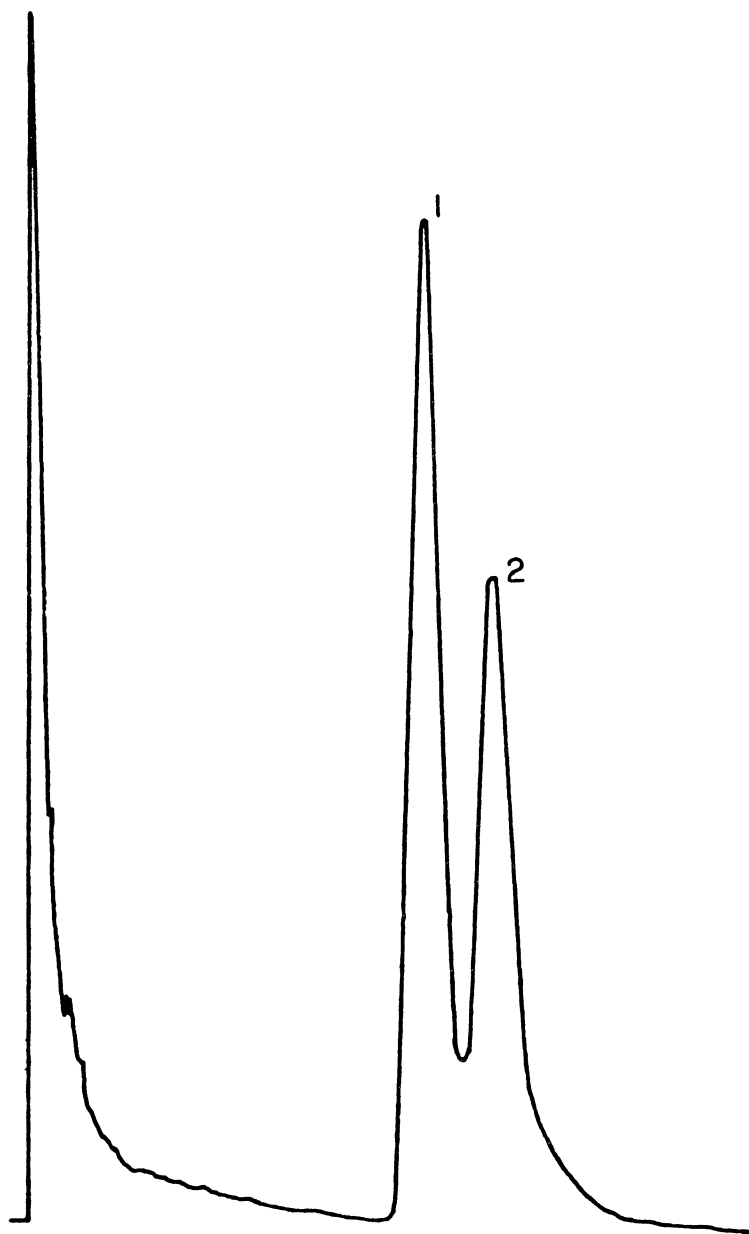


Figura 13- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do polissacarídeo do resíduo de pH 8,5-Cetavlon (extração aquosa), na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 180<sup>0</sup>).

1. Manitol hexa-0-acetato (60,33%).

2. Galactitol hexa-0-acetato (39,67%).

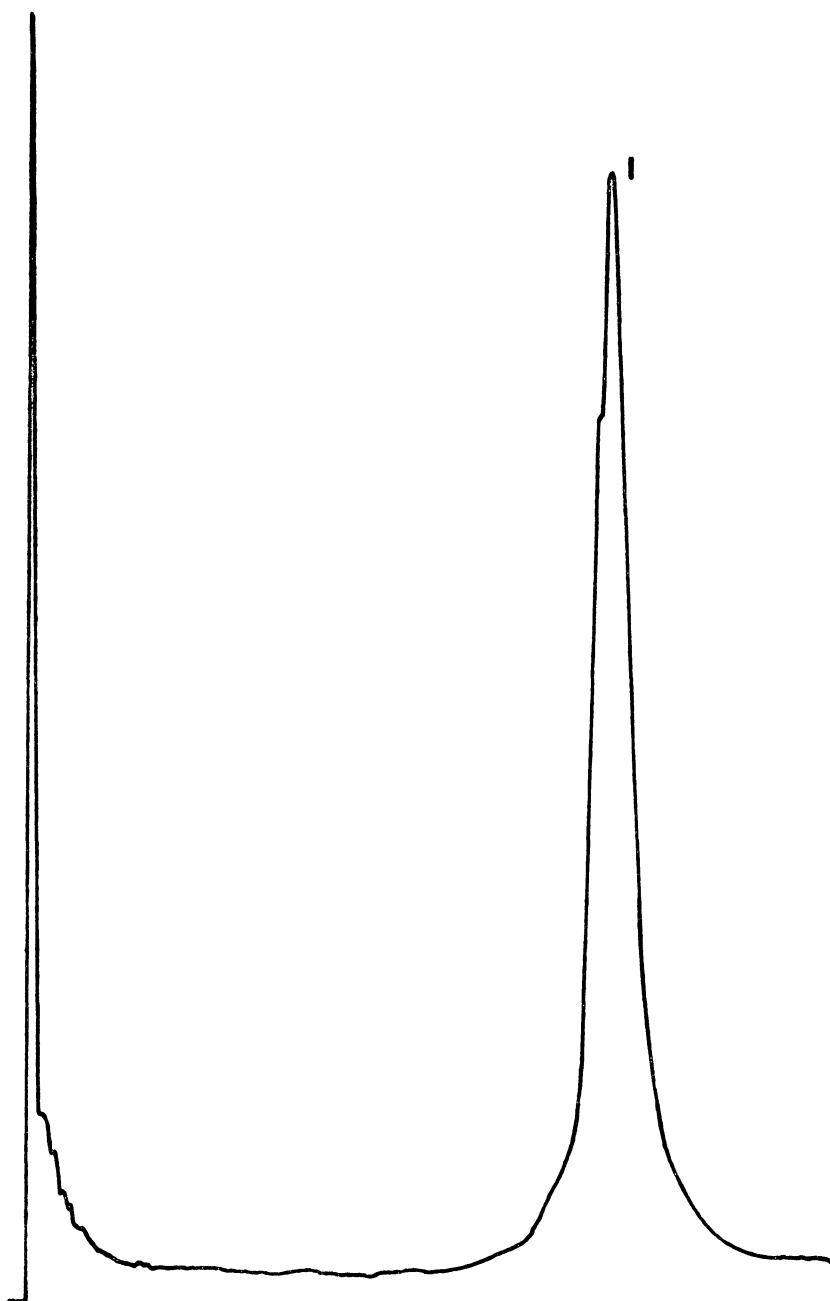


Figura 14- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do polissacarídeo do sobrenadante de Fehling (extração aquosa), na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 180<sup>o</sup>).

1. Glucitol hexa-0-acetato.

e Sepharose 6B. Após determinações de açúcares totais nas frações eluídas, obteve-se apenas um pico em ambos cromatogramas, como mostrado nas Figuras 15-A e 15-B, demonstrando a homogeneidade desta glucana, que foi então, considerada adequada para estudos estruturais.

O alto valor da rotação específica, mostrado na Tabela-II, indicou uma configuração  $\alpha$ -D para os resíduos de glucose. Esta configuração também foi comprovada pela análise do espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. deste polissacarídeo (Figura 16-A), que apresentou similaridades ao da isoliquenana obtida do líquen *C. islandica* (Figura 16-B) (26). A atribuição de sinais a determinados átomos de carbono foi facilitada pela comparação dos dados de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. mostrados nestes espectros, com os fornecidos para polissacarídeos de glucose, lineares, constituídos por ligações  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3) e/ou  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4) (13,73). O espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. da glucana de *St. ramulosum* mostrou principalmente três sinais em  $\delta$  101,8, 101,1 e 100,8 para C-1 dos resíduos de  $\alpha$ -D-glucopiranosil; dois sinais em  $\delta$  81,9 e 81,6 para C-3 substituído e um sinal em  $\delta$  79,1 para C-4 substituído dos resíduos de glucopiranosil; e um sinal em  $\delta$  62,2 correspondente aos átomos de carbono ligados a grupos hidroxil primários não substituídos (C-6).

A análise por g.l.c.-m.s. (OV-225 e OV-17 3:1, 50-220<sup>o</sup>/40<sup>o</sup> por minuto), dos produtos de hidrólise da glucana metilada, na forma de acetatos de alditóis, mostrou apenas dois componentes (I e II), cujas fragmentações pela espectrometria de massa podem ser observadas nas Figuras 17-A e 17-B. O componente I (Figura 17-A), após análise dos principais fragmentos primários ( $m/e$  45-117-161) e secundários ( $m/e$  101-129), foi identificado como sendo o 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol,

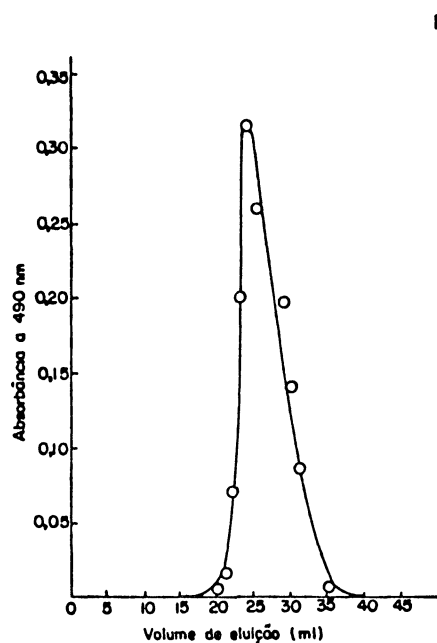
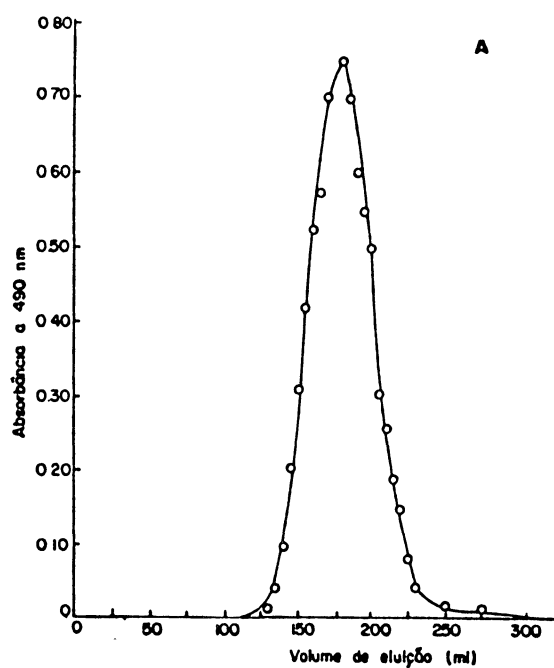


Figura 15- Cromatogramas da  $\alpha$ -D-glucana em colunas de:

- A) DEAE-celulose forma fosfato (24,5 x 3,8 cm). Eluição com soluções de tampão fosfato pH 6,8 (0,01M, 0,05 M, 0,10 M, 0,20 M). Frações de 5 mL.
- B) Sepharose 6B (33,5 x 1,7 cm). Eluição com água. Frações de 1 mL.

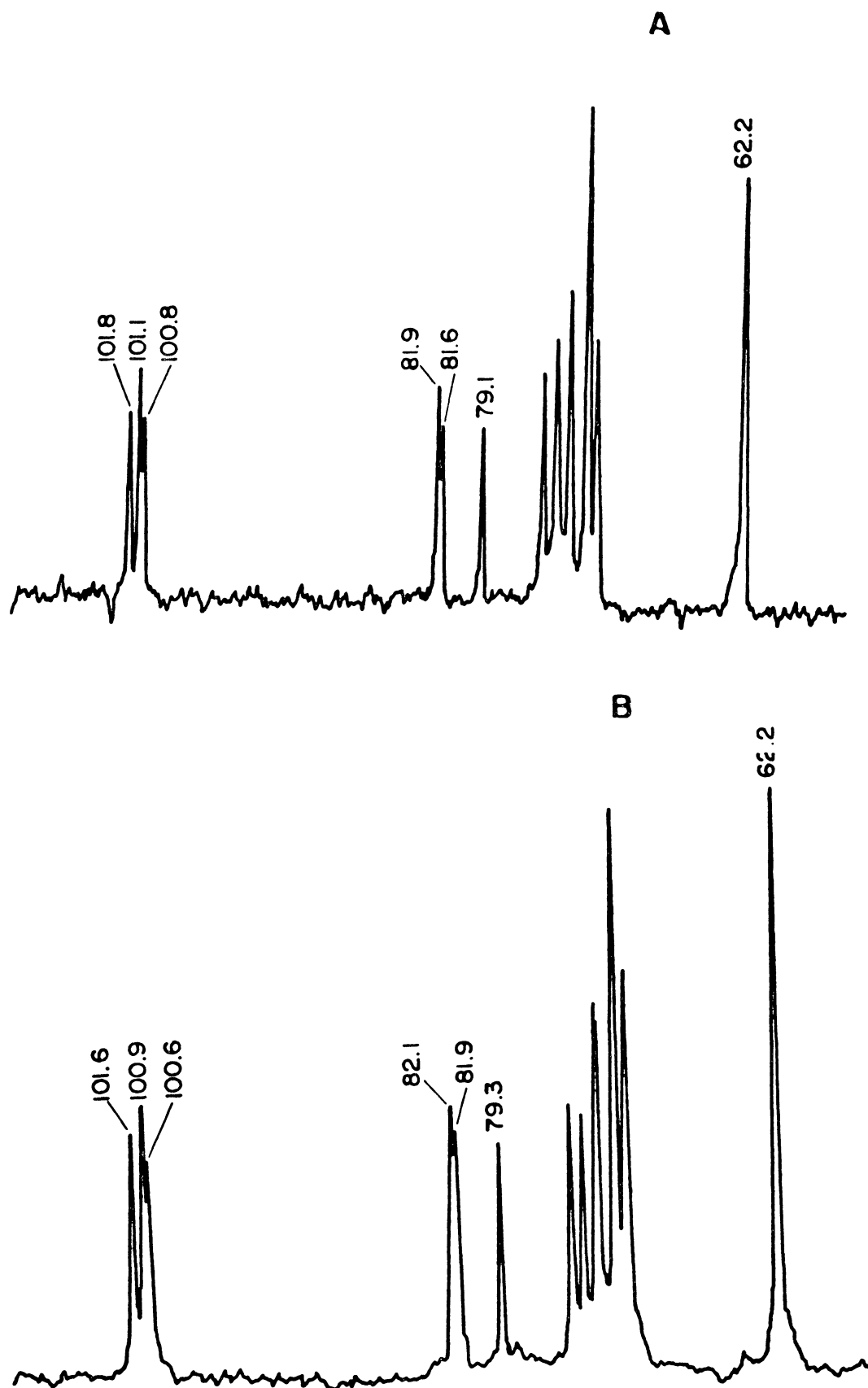


Figura 16- Espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. de polissacarídeos, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

A)  $\alpha$ -D-Glucana isolada de *Stereocaulon ramulosum*.

B) Isoliquenana isolada de *Cetraria islandica*.

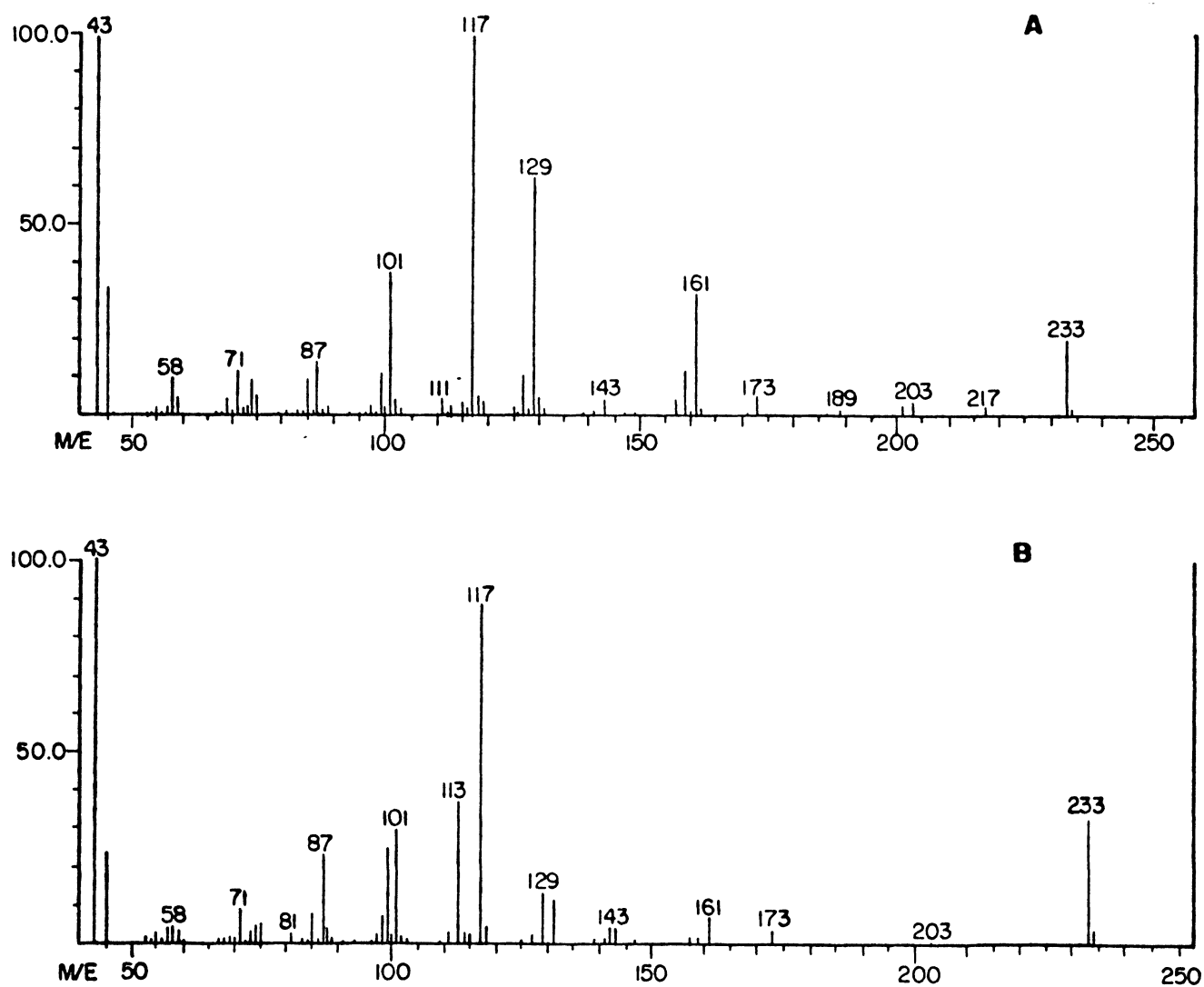
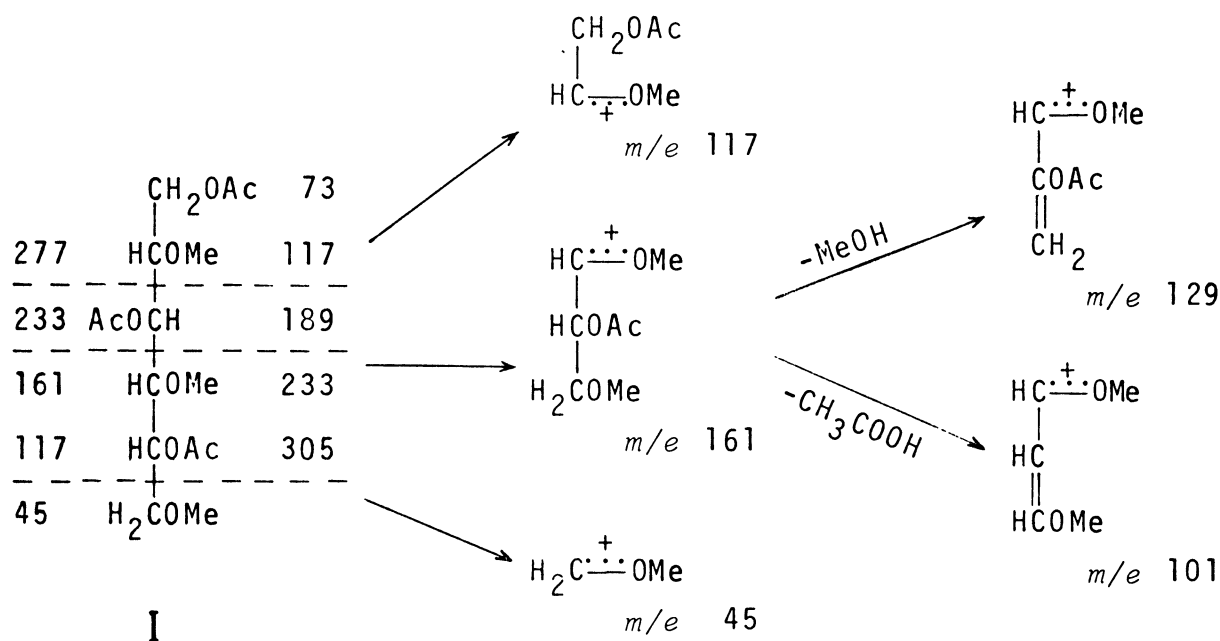
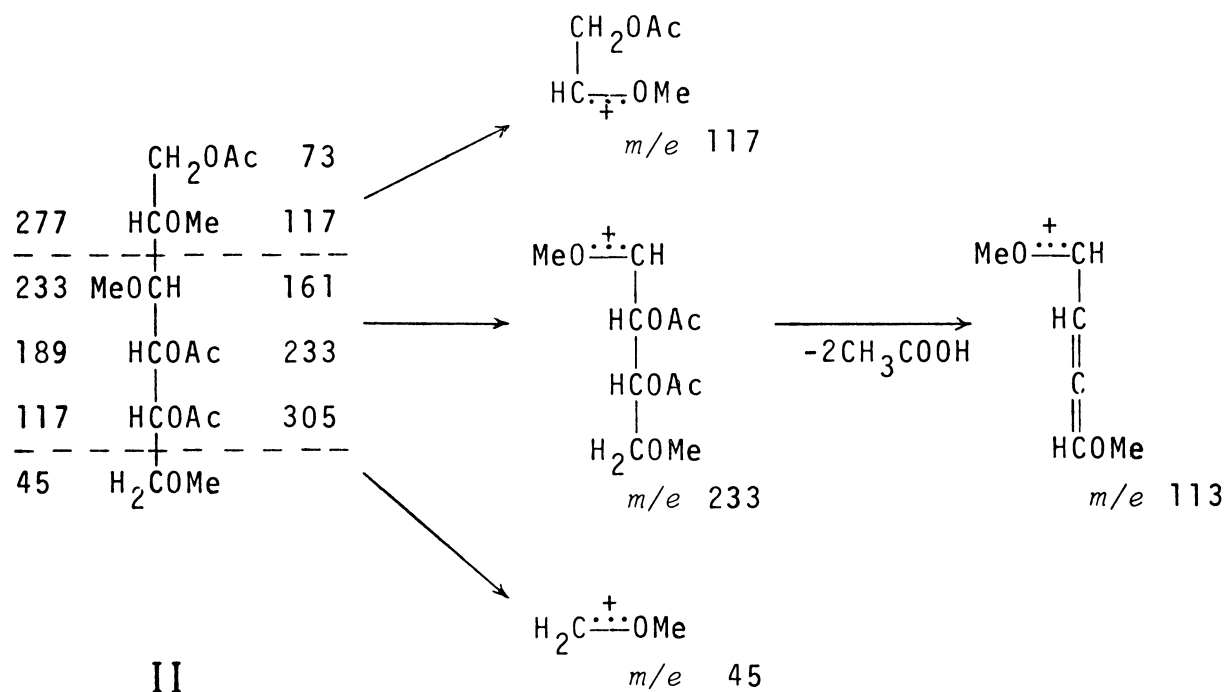


Figura 17- Espectros de massa obtidos por g.l.c.-m.s. dos resultados de metilação da  $\alpha$ -D-glucana, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados (0V-225 e 0V-17 3:1, 50-220<sup>o</sup>/40<sup>o</sup> por minuto).

- A) Componente I: 1,3,5-tri O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-hexitol.
- B) Componente II: 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-hexitol.



enquanto que os principais fragmentos primários ( $m/e$  45 - 117 - 233) e secundários ( $m/e$  113) do componente II (Figura 17 - B)



foram compatíveis com o 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-D-glucitol (8,38,42). Estes componentes, portanto, indicaram a presença de ligações (1 → 3) e (1 → 4) ao longo da estrutura da glucana, em concordância com os dados de <sup>13</sup>C-n.m.r., mostrados anteriormente. Além disso, quando estes derivados metilados I e II

foram analisados por g.l.c. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 160<sup>o</sup>) (Figura 18), apresentaram concentrações molares de 62 e 38%, respectivamente, mostrando que um número maior de resíduos de glucose era resistente à oxidação pelo periodato de sódio, como pode ser observado pelos resultados de consumo de periodato e degradação tipo Smith deste polissacarídeo.

A  $\alpha$ -D-glucana, quando oxidada, mostrou um consumo de 0,39 moles de periodato de sódio por mol de hexose anidra, enquanto que a quantidade de ácido fórmico produzida foi igual a 0,005 moles por hexose anidra. Este consumo ocorreu pelo resíduo de glucose 4-mono-O-substituído, representado pelo derivado metilado 2,3,6-tri-O-metil-D-glucopiranosose. Já os produtos de degradação tipo Smith, quando analisados por g.l.c., na forma de acetatos de alditóis (Figura 19), mostraram a presença de glucose e eritritol numa relação molar de 62:38. A glucose remanescente foi proveniente do resíduo 3-mono-O-substituído, o qual é resistente à oxidação pelo periodato, enquanto que o eritritol foi produzido pelo resíduo 4-mono-O-substituído, justamente pela oxidação entre as hidroxilas de C-2 e C-3 das unidades de glucose. Dessa forma, confirmou-se que os resultados de oxidação pelo periodato e degradação tipo Smith estão de pleno acordo com os dados de metilação, os quais comprovaram a predominância de ligações (1 → 3) no polímero.

Com a finalidade de determinar como as ligações  $\alpha$ -(1 → 3) e  $\alpha$ -(1 → 4) estavam sequencialmente arranjadas na estrutura da glucana, foi realizada a degradação de Smith controlada. Após hidrólise ácida branda (pH 2, 40 minutos, 100<sup>o</sup>) do polioliol resultante da oxidação seguida por redução do polissacarídeo, obteve-se um produto (FRAÇÃO-B), que pela visualização com cloridrato de para-anisidina, não apresentou glucose livre e nem oligossa-

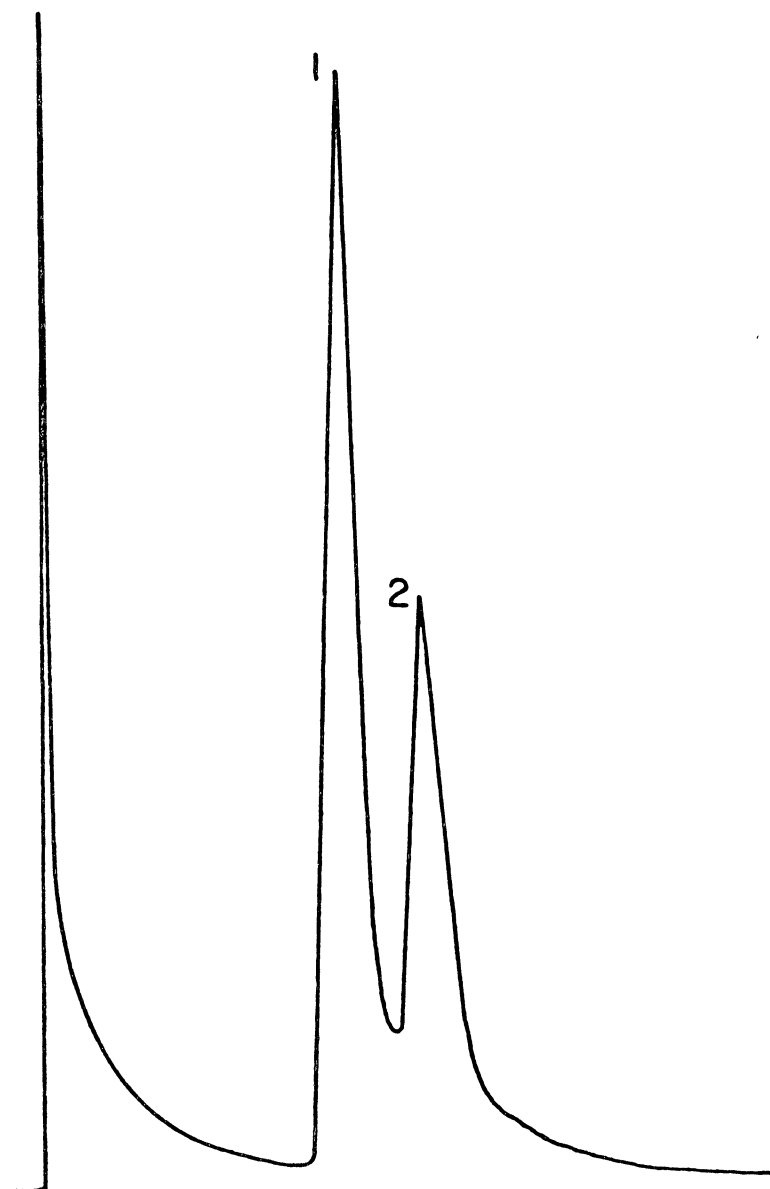


Figura 18- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de metilação da  $\alpha$ -D-glucana, na forma de acetatos de aldios parcialmente metilados. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 160<sup>o</sup>).

1. 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol (62,22%).
2. 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol (37,78%).

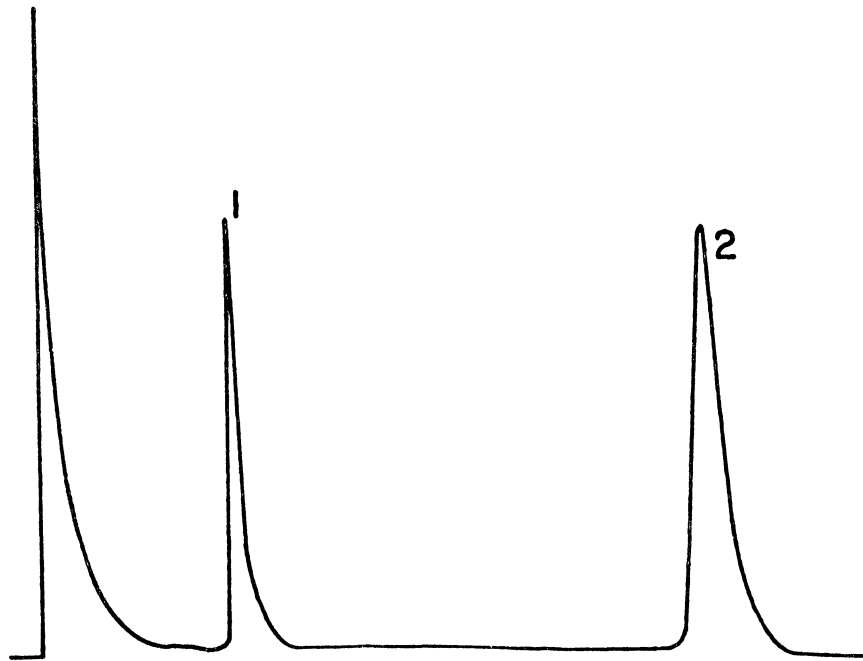


Figura 19- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de de-  
gradação tipo Smith da  $\alpha$ -D-glucana, na forma de aceta-  
tos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 130-180<sup>o</sup>/  
4<sup>o</sup> por minuto).

1. Eritritol tetra-O-acetato (38,23%).
2. Glucitol hexa-O-acetato (61,77%).

carídeos redutores, demonstrando que o polímero foi degradado, nas condições experimentais, apenas nos resíduos susceptíveis à oxidação. Esta Fração-B (171,9 mg) foi então fracionada em coluna de celulose, fornecendo três componentes com  $R_{GE}$  de 1,60, 1,05 e 0,66, que foram eluídos por soluções de acetona-água(v/v) nas proporções de 9:1, 7:1 e 4:1, respectivamente. O primeiro componente, com  $R_{GE}$  de 1,60 (7,7 mg), foi identificado pelas análises de cromatografia em papel (sistema-A) e g.l.c., como sendo eritritol, enquanto que o componente com  $R_{GE}$  de 1,05 (38,5 mg), quando analisado por g.l.c., na forma dos seus respectivos acetatos de alditóis (Figura 20-A), apresentou glucose e eritritol numa relação molar de 1:1. Já o componente com  $R_{GE}$  de 0,66 (98,5 mg), mostrou ser constituído por glucose e eritritol numa relação de 2:1 (Figura 20-B).

A determinação das estruturas dos componentes com  $R_{GE}$  de 1,05 e 0,66 foi alcançada pelas análises de metilação e espectroscopia de  $^{13}C$ -n.m.r.. Os espectros destes componentes estão representados na Figura 21, que apresenta também o espectro de  $^{13}C$ -n.m.r. do oligossacarídeo obtido após degradação de Smith controlada da  $\alpha$ -D-glucana de *Ramalina usnea*. Sabendo-se que o oligossacarídeo de *R. usnea* trata-se do  $\alpha$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  3)- $\alpha$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  3)- $\alpha$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  2)-D-eritritol, a identificação dos componentes obtidos pela degradação da  $\alpha$ -D-glucana de *St. ramulosum* foi facilitada, pela comparação dos dados de  $^{13}C$ -n.m.r. existentes nos três espectros. Além disso, a atribuição de sinais a cada átomo de carbono específico foi auxiliada, pelos deslocamentos químicos característicos dos sinais de  $^{13}C$ -n.m.r. do eritritol (9) e de oligossacarídeos unidos por ligações  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3) (13).

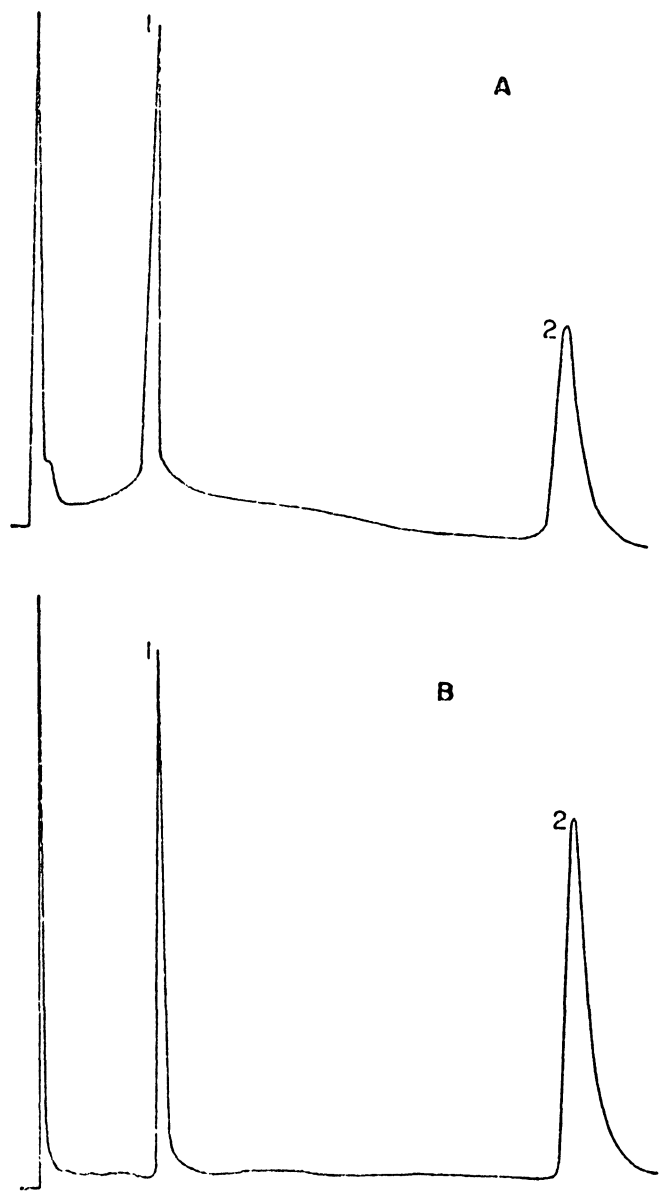


Figura 20- Cromatogramas obtidos por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos produtos de degradação de Smith controlada da  $\alpha$ -D-glucana, na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 130 - 180<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> por minuto).

- A) Componente com  $R_{GE}$  de 1,05, eluído por acetona 7:1.
  - B) Componente com  $R_{GE}$  de 0,66, eluído por acetona 4:1.
- A e B) 1. Eritritol tetra-O-acetato.  
2. Glucitol hexa-O-acetato.

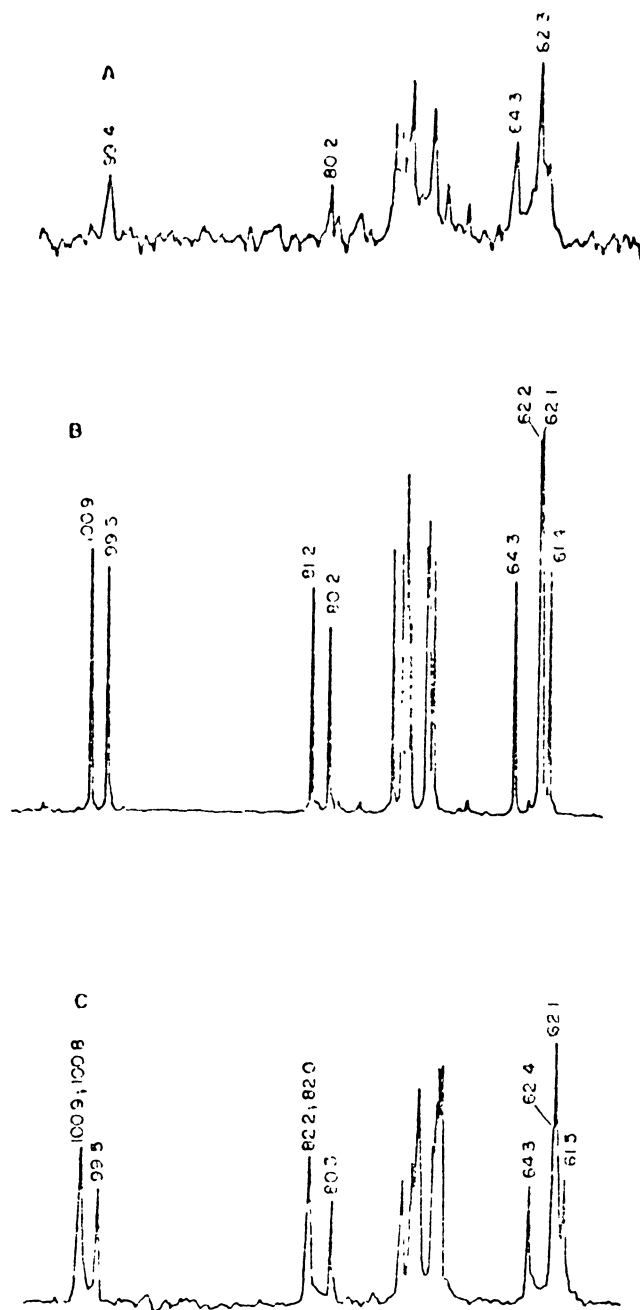
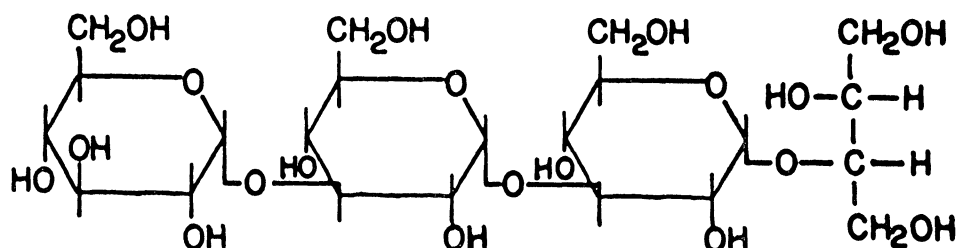


Figura 21- Espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. de glicosídeo e oligossacáridos, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$ p.p.m.

- A) Componente com  $R_{GE}$  de 1,05 obtido após degradação de Smith controlada da  $\alpha$ -D-glucana de *Stereocaulon ramulosum*.
- B) Componente com  $R_{GE}$  de 0,66 obtido após degradação de Smith controlada da  $\alpha$ -D-glucana de *Stereocaulon ramulosum*.
- C) Oligossacárido obtido após degradação de Smith controlada da  $\alpha$ -D-glucana de *Ramalina usnea*.

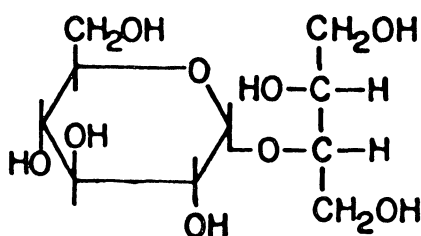
O espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. (Figura 21-C) correspondente com a estrutura do oligossacarídeo de *R. usnea* (Estrutura 20) apresentou principalmente três sinais em  $\delta$  100,9, 100,8 e 99,5 para



20

C-1 dos resíduos de  $\alpha$ -D-glucopiranosil, sendo os dois primeiros para C-1 unido glicosidicamente ao C-3 do outro resíduo de glucose e o sinal em  $\delta$  99,5 para C-1 unido ao C-2 do resíduo de eritritol; dois sinais em  $\delta$  82,2 e 82,0 para C-3 substituído dos resíduos de  $\alpha$ -D-glucopiranosil; um sinal em  $\delta$  80,3 para C-2 substituído do eritritol; e cinco sinais em  $\delta$  64,3, 62,4, 62,1 (dois sinais) e 61,5 para átomos de carbono unidos a grupos hidroxil primários não substituídos, ou seja, para C-4 e C-1 do eritritol e os três C-6 dos resíduos de  $\alpha$ -D-glucopiranosil.

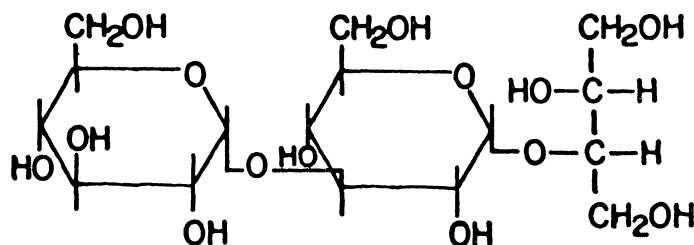
Por analogia com os dados de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. apresentados para o oligossacarídeo de *R. usnea*, pode-se facilmente atribuir os sinais para os átomos de carbono do componente com  $R_{GE}$  de 1,05 (Estrutura 21), cujo espectro (Figura 21-A) mostrou principalmente



21

um sinal em  $\delta$  99,4 para C-1 do resíduo de  $\alpha$ -D-glucopiranosil; um sinal em  $\delta$  80,2 para C-2 substituído do eritritol; e três sinais em  $\delta$  64,3 e 62,3 (dois sinais) para átomos de carbono unidos a grupos hidroxil primários não substituídos, ou seja, para C-4 e C-1 do eritritol e o C-6 do resíduo de  $\alpha$ -D-glucopiranosil. A par destes dados, juntamente com os resultados de metilação que mostraram apenas grupos terminais não redutores, representados pelo derivado metilado 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, o componente com  $R_{GE}$  de 1,05 foi identificado como sendo o glicosídeo O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)-D-eritritol.

Jã o exame do espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. (Figura 21-B) do componente com  $R_{GE}$  de 0,66 (Estrutura 22) revelou principalmente



22

dois sinais em  $\delta$  100,9 e 99,5 para C-1 dos resíduos de  $\alpha$ -D-glucopiranosil, sendo que o primeiro para C-1 unido glicosidicamente ao C-3 do outro resíduo de glucose e o segundo sinal para C-1 unido ao C-2 do resíduo de eritritol; um sinal em  $\delta$  81,2 para C-3 substituído do resíduo de  $\alpha$ -D-glucopiranosil; um sinal em  $\delta$  80,2 para C-2 substituído do eritritol; e quatro sinais em  $\delta$  64,3, 62,2, 62,1 e 61,4 para átomos de carbono unidos a grupos hidroxil primários não substituídos, isto é, para C-4 e C-1 do eritritol e os dois C-6 das unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosil. A análise de metilação mostrou que os resíduos de glucose estavam

presentes como grupos terminais não redutores e 3-mono-0-substituídos numa relação molar de 1:1 sendo representados pelos derivados metilados 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol e 2,4,6-tri-0-metil-D-glucitol, respectivamente. Estes resultados, juntamente com os dados de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., demonstraram que o componente com  $R_{GE}$  de 0,66 é o oligossacarídeo 0- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  3)-0- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)-D-eritritol.

Portanto, pela degradação de Smith controlada, obtêve-se três compostos diferentes, representados pelo D-eritritol, 0- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)-D-eritritol e 0- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  3)-0- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)-D-eritritol, indicando que a  $\alpha$ -D-glucana isolada do líquen *St. ramulosum* contém as ligações glicosídicas (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) distribuídas de maneira irregular ao longo da cadeia linear. Estas ligações apresentam-se numa relação molar da ordem de 1,6:1, que difere das proporções de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) encontradas para as diferentes  $\alpha$ -D-glucanas isoladas de líquens, até o momento investigadas. Fazendo-se uma comparação entre estas glucanas, observa-se que na isoliquenana de *C. islandica*, que é um polissacarídeo solúvel em água fria, foi inicialmente encontradas ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) numa relação de 1,5 : 1 (12), embora posteriormente foi sugerida as relações de 1,2:1 (54), 1,3:1 (20) e 1,9:1 (26). Glucanas similares foram reconhecidas em *A. sulcata* e *A. sarmentosa* (65), enquanto que na glucana de *C. richardsonii* a relação de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) foi igual a 1,5:1 (73). O líquen *Farmelia caperata* também produz uma  $\alpha$ -D-glucana, que é estruturalmente semelhante à nigerana, tendo uma estrutura predominante com ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) alternadas (4). Já o líquen *E. prunastri* produz duas  $\alpha$ -D-glucanas, uma solúvel em água, com proporção de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) igual a 1,5:1, e a outra, insolúvel em água, com ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) numa relação de 4:1 (65).

A glucana isolada do *St. japonicum* contém uma relação destas ligações estimada em 2:1, que foi determinada por estudos de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. (73) e degradação de Smith controlada (72). Contudo, uma  $\alpha$ -D-glucana diferente foi isolada do líquen *St. paschale*, cujos dados de metilação indicaram uma proporção molar de ligações (1  $\rightarrow$  3) para (1  $\rightarrow$  4) da ordem de 1:2,5, mostrando que um número maior de ligações (1  $\rightarrow$  4) estavam presentes na estrutura do polímero (31).

Além da presença destas ligações glicosídicas, foi encontrado outro tipo de ligação como na *acroscyphana*, um polissacarídeo isolado do líquen *A. sphaerophoroides*, que apresenta ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) entre os resíduos de glucose, numa relação de 2:3 e a análise de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. ainda indicou 6% de ligações (1  $\rightarrow$  6) (73). Um polímero semelhante foi obtido do *S. globosus*, cujo estudo de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. e análise química evidenciaram uma proporção de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) igual a da *acroscyphana*, e não mais que 6% de ligações (1  $\rightarrow$  6). (73).

Pesquisas recentes realizadas por Gorin e Iacomini (36) mostraram a presença de  $\alpha$ -D-glucanas nos líquens *C. alpestris* e *C. confusa*, que consistiam de polímeros insolúveis em água, estruturalmente similares à *nigerana*. Estes autores (26) também isolaram uma  $\alpha$ -D-glucana em *R. usnea*, solúvel em água fria, cuja proporção de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) foi estimada em 3:1.

Como pode-se observar,  $\alpha$ -D-glucanas estruturalmente semelhantes à isolada do *St. ramulosum*, não foram encontradas nas diversas espécies de líquens investigadas, já que a glucana em estudo, apresenta uma relação de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) diferente das citadas acima, e a distribuição destas ligações é de pouca regularidade sequencial na estrutura do polímero.

Pelos dados da degradação de Smith controlada, pode ser sugerida que a estrutura repetitiva preponderante na  $\alpha$ -D-glucana, apresenta duas ligações (1 → 3) consecutivas, interceptadas por uma ligação (1 → 4) isolada, como mostrado na Estrutura 23, embora uma menor proporção de ligações (1 → 3) e (1 → 4)



### 23

alternadas e poucas ligações (1 → 4) adjacentes também estejam presentes.

### 3. POLISSACARÍDEO DA EXTRAÇÃO ALCALINA

O líquen residual da extração aquosa, foi tratado com hidróxido de potássio aquoso, quente, e o extrato alcalino, após neutralização (AcOH), foi adicionado em excesso de etanol, fornecendo um precipitado etanólico de 26,23 g, que correspondeu a 12,21 g% do peso de líquen original. Este precipitado, quando hidrolisado e analisado por g.l.c., na forma dos seus respectivos acetatos de alditóis (Figura 22), mostrou ser constituído por glucose (47,23%), manose (23,88%), galactose (27,53%), xilose (0,34%) e ramnose (1,02%). O material foi então, submetido a processos de congelamento e degelo sucessivos, de maneira idêntica à purificação realizada para o precipitado etanólico da extração aquosa. O sobrenadante aquoso (Figura 23) resultante desta purificação, não foi estudado neste trabalho, enquanto que o resíduo aquoso (Figura 24), constituído principalmente por glucose contaminada por galactose e manose, foi submetido à purificação com álcali, devido ser insolúvel em água, mas facilmente solúvel em meio alcalino.

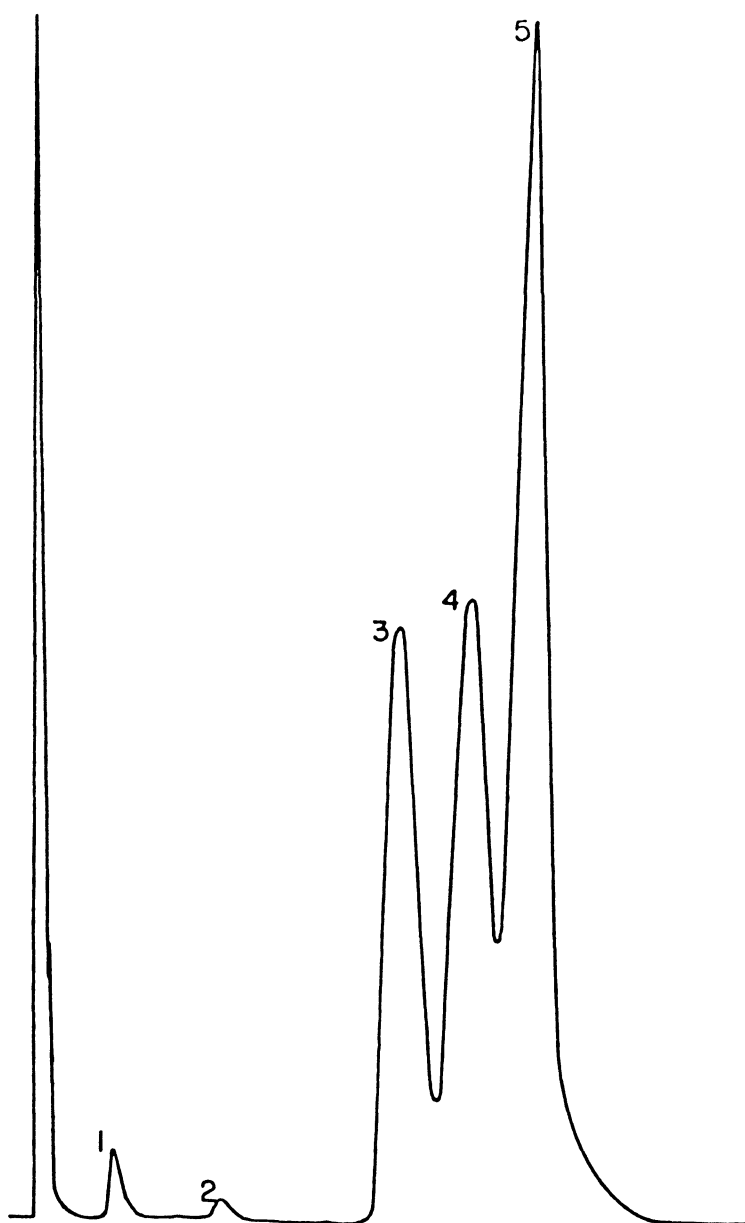


Figura 22-. Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do extrato alcalino (precipitado etanólico total), na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 180<sup>0</sup>).

1. Ramnitol penta-0-acetato (1,02%).
2. Xilitol penta-0-acetato. (0,34%).
3. Manitol hexa-0-acetato (23,88%).
4. Galactitol hexa-0-acetato (27,53%).
5. Glucitol hexa-0-acetato (47,23%).

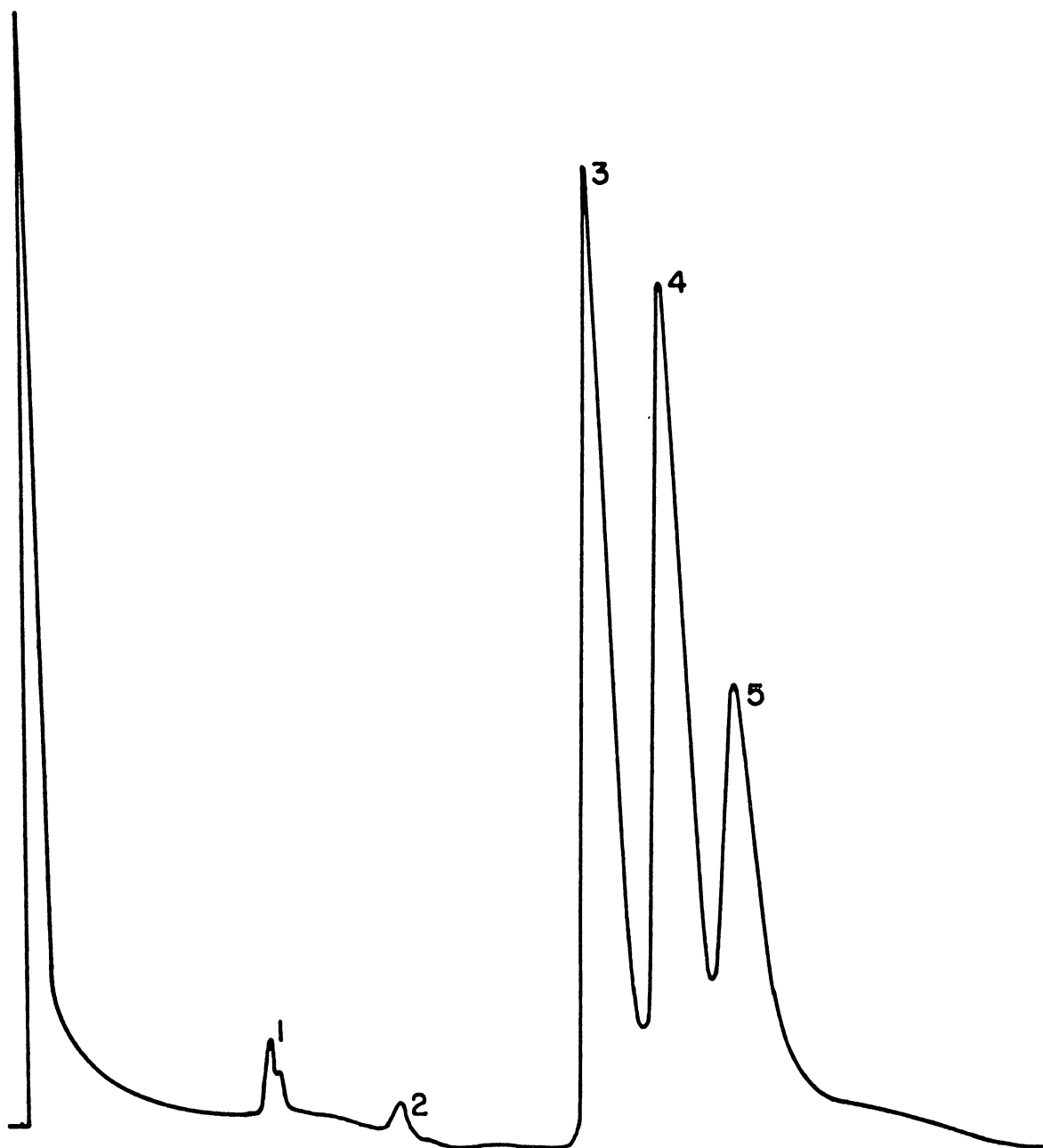


Figura 23- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do sobrenadante aquoso, resultante do congelamento e degelo do extrato alcalino, na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 130-180<sup>o</sup>C).

1. Ramnitol penta-0-acetato (0,97%).
2. Xilitol penta-0-acetato (0,67%).
3. Manitol hexa-0-acetato (36,94%).
4. Galactitol hexa-0-acetato (36,57%).
5. Glucitol hexa-0-acetato (24,85%).

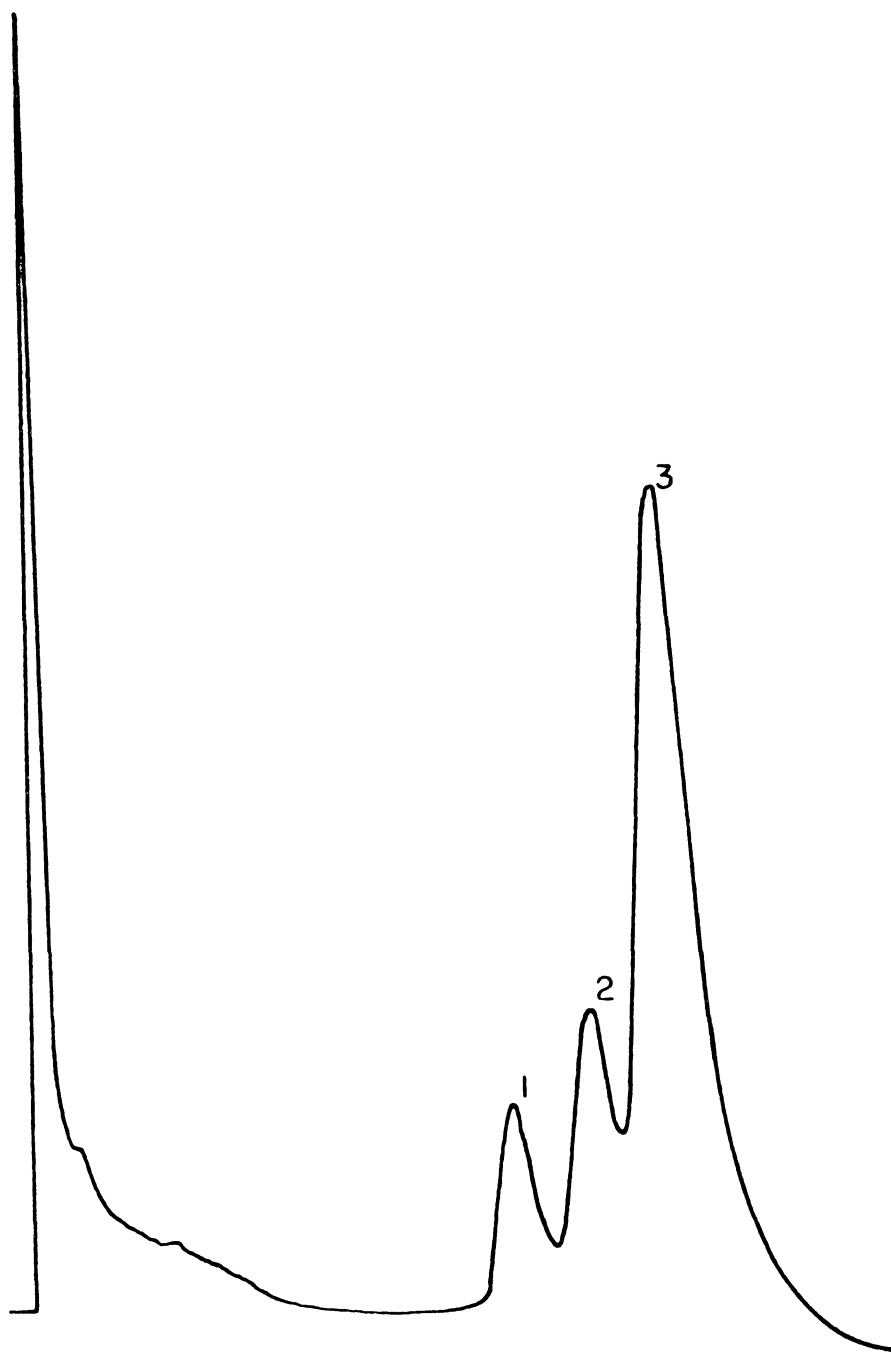


Figura 24- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do resíduo aquoso, resultante do congelamento e degelo do extrato alcalino, na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 180<sup>0</sup>).

1. Manitol hexa-0-acetato (13,28%).
2. Galactitol hexa-0-acetato (21,41%).
3. Glucitol hexa-0-acetato (65,31%).

Após vários tratamentos deste resíduo com álcali, obteve-se um polissacarídeo constituído apenas por unidades de glucose (Figura 25), cujo rendimento em relação ao peso de líquen original foi igual a 0,19 g %. Esta glucana, quando eluída em colunas cromatográficas de géis Sepharose 4B-200 e Sepharose 6B, mostrou apenas um pico em ambos processos cromatográficos (Figura 26 - A e 26-B), de modo que o polímero foi considerado homogêneo e submetido a estudos químicos e físicos para caracterização estrutural.

Este polímero apresentou uma rotação específica relativamente baixa ( $[\alpha]_D^{25} = + 3^{\circ}$ ; c. 0,4 em NaOH 1%), indicando uma configuração  $\beta$ -D para as unidades de glucose. Tal configuração foi confirmada pela análise do espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. (Figura 27), que mostrou seis sinais com deslocamentos químicos característicos e semelhantes aos da laminarana de algas (Tabela-III) (13, 24), embora deva-se ressaltar, que estes sinais são extremamente sensíveis às mudanças de pD, ou seja, às diferentes concentrações de álcali, principalmente a ressonância do C-3. Nesta análise, pode-se observar um sinal em  $\delta 104,8$  para C-1 dos resíduos de  $\beta$ -D-glucopiranosil; um sinal em  $\delta 87,6$  para C-3 substituído e três sinais em  $\delta 77,5$ ,  $75,0$  e  $69,9$  correspondentes aos átomos de carbono 5,2 e 4, respectivamente, não substituídos dos resíduos de  $\beta$ -D-glucopiranosil; e um sinal em  $\delta 62,5$  que correspondeu aos átomos de carbono ligados a grupos hidroxil primários não substituídos (C-6).

As análises por g.l.c. (Figura 28) e espectrometria de massa (Figura 29) dos acetatos de alditóis obtidos após hidrólise ácida da glucana metilada, mostraram apenas um componente, que foi identificado como sendo o 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-

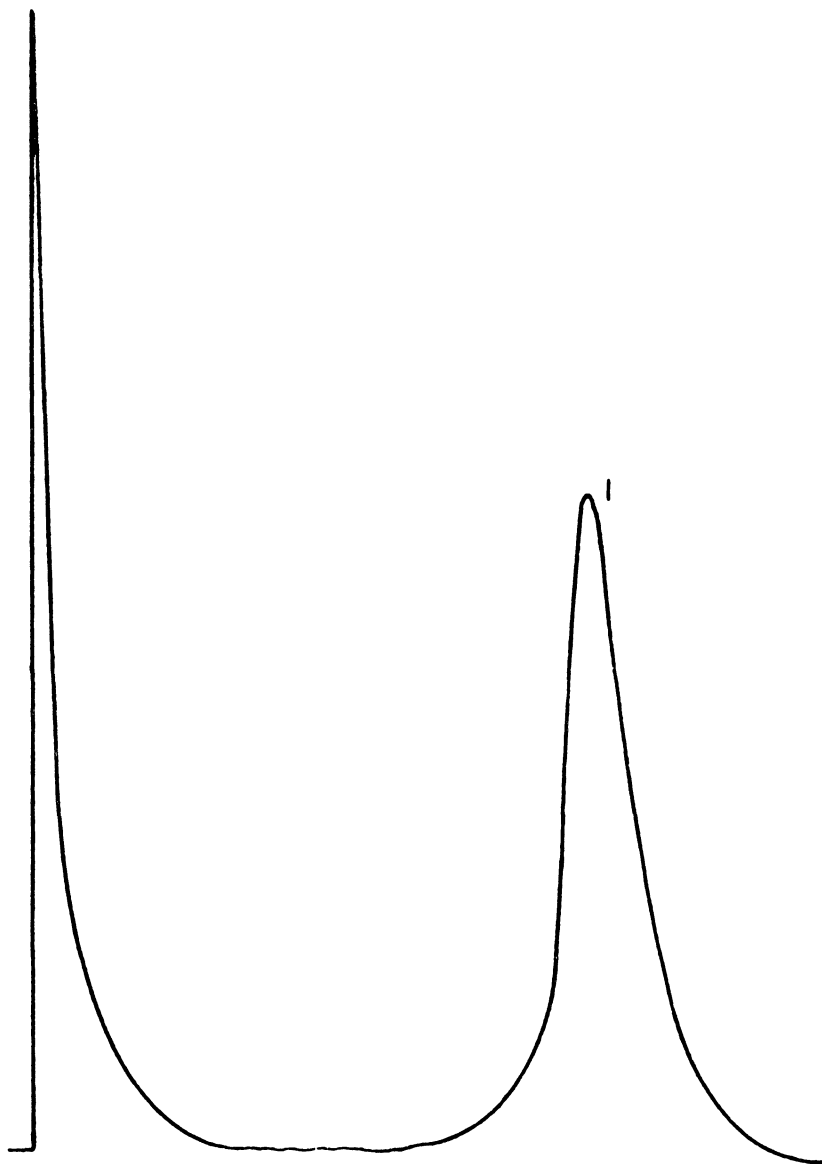


Figura 25- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do polissacarídeo da fração solúvel em álcali, insolúvel em água (extrato alcalino), na forma de acetatos de alditóis. (ECNSS-M a 3% / Gas Chrom. Q, 180<sup>0</sup>).

1. Glucitol hexa-0-acetato.

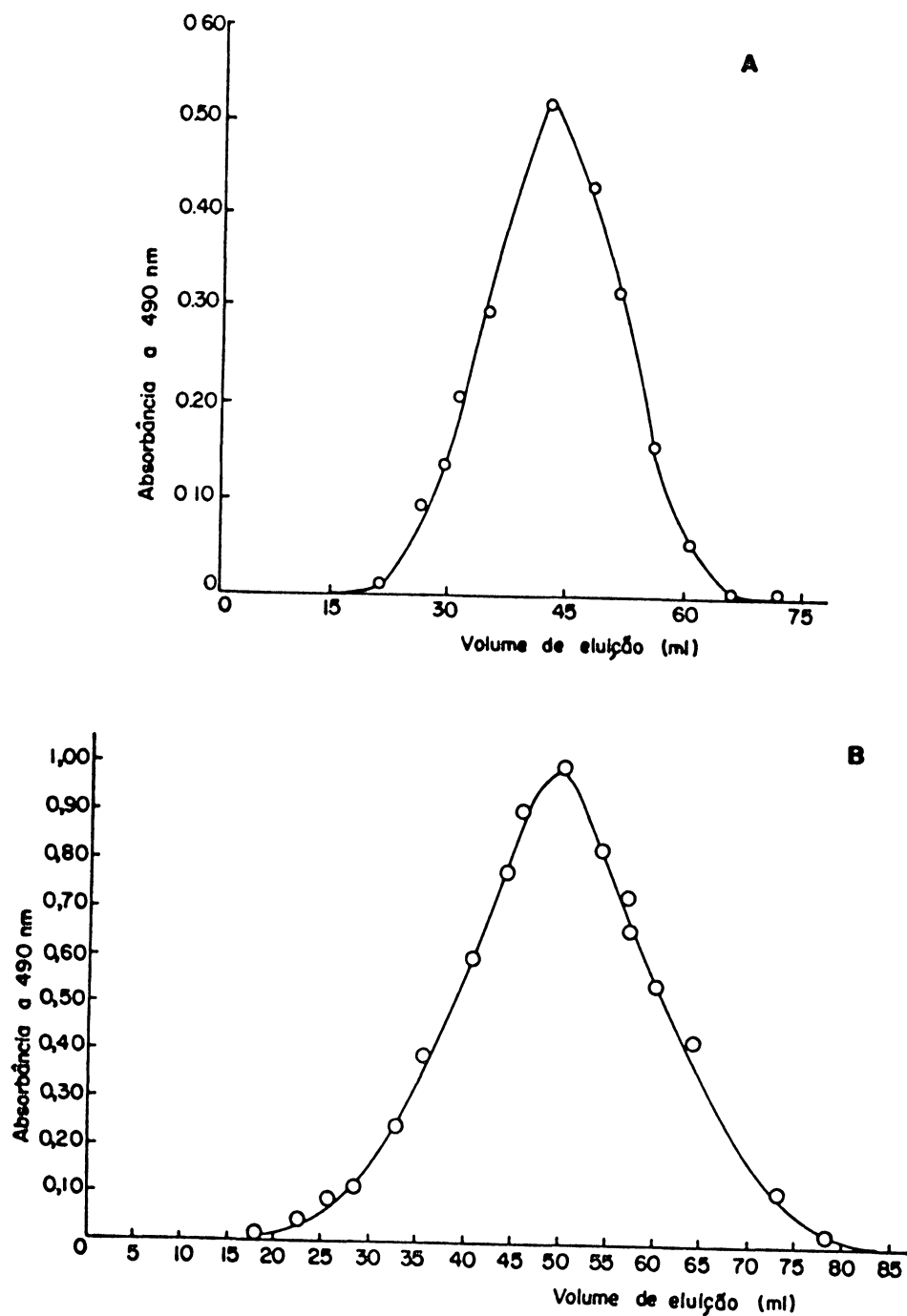


Figura 26- Cromatogramas da  $\beta$ -D-glucana em colunas de:

A) Sepharose 4B-200 (27,0 x 1,7 cm).

Eluição com NaOH 0,1M. Frações de 3mL.

B) Sepharose 6B (33,5 x 1,7 cm).

Eluição com NaOH a 1%. Frações de 1mL.

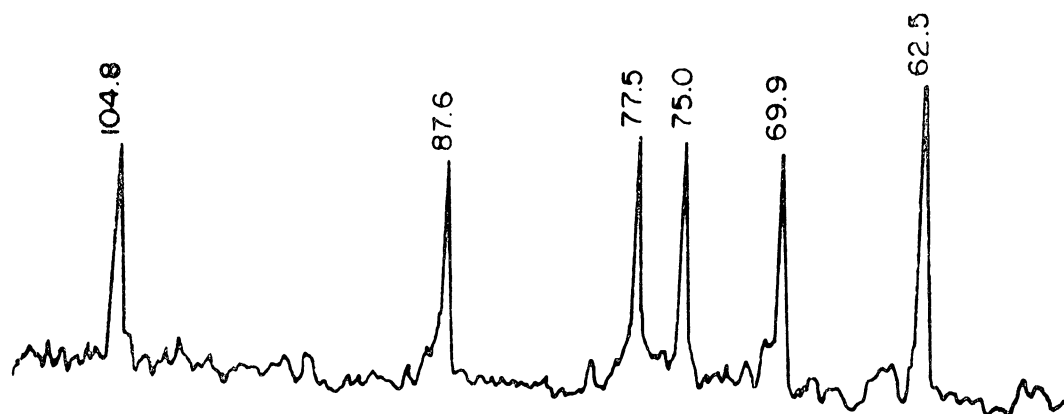


Figura 27- Espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. da  $\beta$ -D-glucana do *Stereocaulon ramulosum*, em  $\bar{\text{o}}\text{xido}$  de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo 1% de NaOD a  $70^\circ$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

### TABELA - III

SINAIS DE  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. E SUAS ATRIBUIÇÕES PARA AS  $\beta$ -D-GLUCANAS

Atribuição de Sinal	Laminarana de alga <sup>(a)</sup>		$\beta$ -D-Glucana de <i>Stereocaulon ramulosum</i>
	pD 7	pD 14	
C-1	103,8	104,7	104,8
C-2	74,4	74,9	75,0
C-3	85,5	88,0	87,6
C-4	69,3	69,9	69,9
C-5	76,8	77,8	77,5
C-6	61,9	62,5	62,5

(a) Dados obtidos das referências 13 e 24.



Figura 28- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de metilação da  $\beta$ -D-glucana, na forma de acetatos de aldítóis parcialmente metilados. (ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 160°).

1. 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol.

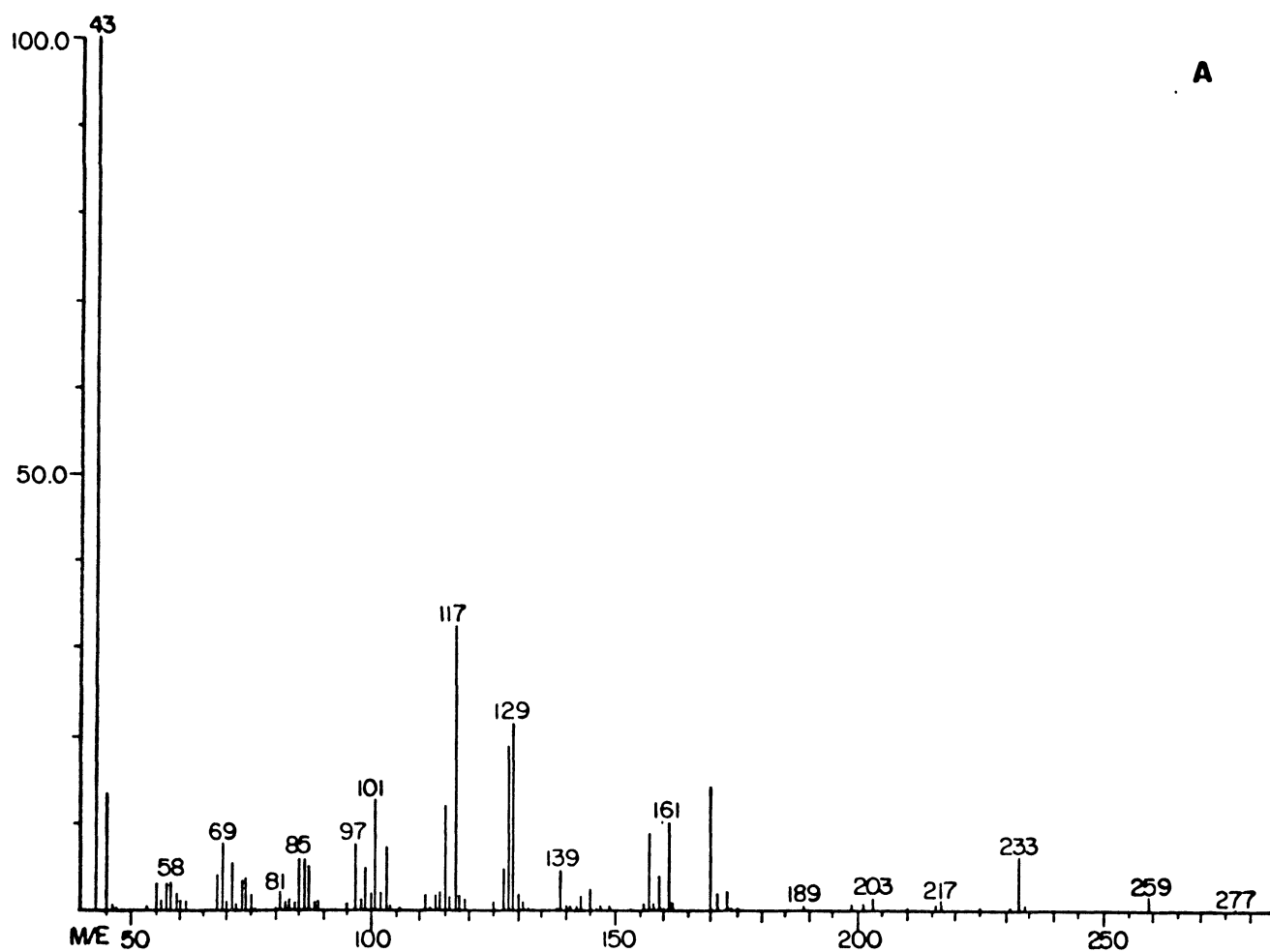


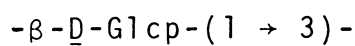
Figura 29- Espectro de massa obtido por g.l.c.-m.s. dos resultados de metilação da  $\beta$ -D-glucana, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados. (OV-225 e OV-17 3:1, 50-220<sup>o</sup>/40<sup>o</sup> por minuto).

A) Componente 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-hexitol.

metil-D-glucitol. Este resultado está de pleno acordo com os dados de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., indicando que a  $\beta$ -D-glucana apresenta somente ligações (1 → 3) em sua estrutura.

A confirmação da estrutura desta glucana foi obtida pelo tratamento de uma solução do polímero com meta-periodato de sódio, não verificando-se consumo de periodato e conseqüentemente, não havendo produção de ácido fórmico. Além disso, quando fez-se degradação tipo Smith, da  $\beta$ -D-glucana e análise dos produtos degradados por g.l.c., na forma de acetatos de alditóis (Figura 30), observou-se apenas glucose, proveniente do resíduo 3-mono-O-substituído, o qual é resistente à oxidação pelo periodato.

Em vista dos resultados apresentados, verificou-se que o líquen *St. ramulosum*, além da  $\alpha$ -D-glucana citada anteriormente, contém uma  $\beta$ -D-glucana linear, cuja estrutura repetitiva é bastante simples (Estrutura 24), uma vez que foi evidenciada somente a presença de ligações (1 → 3) entre as unidades de glucose.



## 24

Algumas  $\beta$ -D-glucanas tem sido isoladas de líquens, apresentando características estruturais diversas, que muitas vezes podem auxiliar numa possível investigação taxonômica destas entidades simbióticas. Um exemplo bastante conhecido, refere-se à pustulana, um polissacarídeo linear com ligações  $\beta$ -(1 → 6), que pode carregar grupos O-acetil na posição 3, sendo encontrada nos gêneros *Gyrophora*, *Lasallia* e *Umbilicaria*, pertencentes à mesma família, Gyrophoraceae (52). Outra  $\beta$ -D-glucana encontrada em líquens, trata-se da liquenana, que foi pela primeira vez

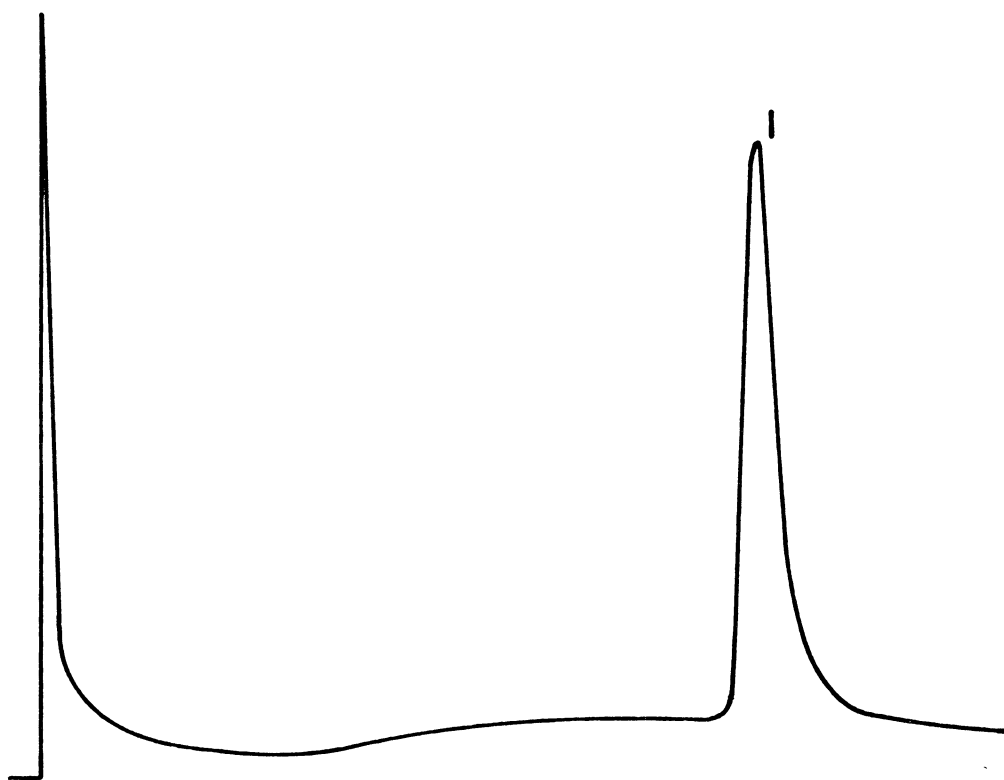


Figura 30- Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de de-  
gradação tipo Smith da  $\beta$ -D-glucana, na forma de ace-  
tatos de alditóis. ECNSS-M a 3%/Gas Chrom. Q, 130 -  
180<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> por minuto).

1. Glucitol hexa-O-acetato.

isolada de *C. islandica*, em 1815, por Berzelius (7), e quando estudada por vários pesquisadores (4, 19, 47, 53, 55), mostrou ser constituída por ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação de 3:7. Glucanas semelhantes foram encontradas em *C. richardsonii* (73), *A. sulcata*, *A. sarmentosa* (65) e *U. rubescens* (51), enquanto que no líquen *Evernia prunastri*, foi encontrada uma variação estrutural, já que a β-D-glucana isolada, apresentou ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação de 3:1 (65).

Recentemente, Gorin et alii(37) investigando o líquen *Corra pavonia*, isolaram uma β-D-glucana altamente ramificada, que apresentou a cadeia principal com ligações (1 → 3) e (1 → 6). Polímeros desta natureza, apresentando cadeias principais com ligações (1 → 3) e (1 → 6) ou apenas (1 → 3), são frequentemente encontrados em fungos, tais como, *Piricularia oryzae*, *Lentinus edodes*, *Aureobasidium pullulans*, *Sclerotium glucanicum*, *Claviceps fusiformis* e outros (4). Contudo, glucanas lineares, com apenas ligações β-(1 → 3) em suas estruturas, até a presente data, não foram isoladas de líquens, e nem de fungos, a não ser certos polissacarídeos de fungos, que apresentam estruturas predominantemente lineares formadas principalmente por ligações β-(1 → 3) entre as unidades de glucose, embora contenham outros tipos de ligações em menores proporções, como ocorrem nas paredes celulares de *Neurospora crassa*, *Coprinus macrorhizus* var. *microsporus* e *Paracoccidioides brasiliensis* e nos corpos de frutificação de *Pleurotus ostreatus* (4).

Desse modo, a β-D-glucana do *St. ramulosum* representa uma nova caracterização estrutural de polissacarídeos, pois pela primeira vez foi isolada em líquens, além de não ter sido encontrada em fungos, embora possa ser produzida por outras fontes naturais, como por algas (13, 24) e bactérias (57).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J.K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. J.Am.Chem.Soc., 74: 4970-1, 1952.
2. ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res., 5: 340-5, 1967.
3. ASPINALL, G.O. The Polysaccharides. New York, Academic Press, 1982. v. 1, p. 291-325.
4. \_\_\_\_\_. The Polysaccharides. New York, Academic Press, 1983. v. 2, p. 365-409.
5. ASPINALL, G.O.; HIRST, E.L.; WARBURTON, M. The alkali-soluble polysaccharides of the lichen *Cladonia alpestris* (Reindeer Moss). J. Chem. Soc., 651-5, 1955.
6. BARRETO-BERGTER, E. & GORIN, P.A.J. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 41: 67-103, 1983.
7. BERZELIUS, J.J. Versuche über die Mischung des Isländischen Moores und seine Anwendung als Nahrungsmittel. J.Chem. Phys., 7: 317 - 52, 1815.
8. BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B.; SVENSSON, S. Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. Carbohydr.Res.,

5(4): 433- 40, 1967.

9. BOCK, K. & PEDERSEN, C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 41: 27-65, 1983.
10. BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. Hydrolysis of methylated polysaccharides. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 296-8, 1965.
11. BUSTON, H.W. & CHAMBERS, V.H. Some cell-wall constituents of *Cetraria islandica* ("Iceland Moss"). Biochem. J., 27: 1691- 702, 1933.
12. CHANDA, N.B.; HIRST., E.L.; MANNERS, D.J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland Moss (*Cetraria islandica*). J. Chem. Soc., 1951-8, 1957.
13. COLSON, P.; JENNINGS, H.J.; SMITH, I.C.P. Composition, sequence, and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by carbon 13 nuclear magnetic resonance. J. Am. Chem. Soc., 96(26): 8081-7, 1974.
14. CULBERSON, C.F. Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. North Carolina, University of North Carolina Press, 1970. p. 73-89.
15. DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K.M. Data for biochemical research. 29 ed. Oxford, Clarendon Press, 1969. p.541 - 2.
16. DUARTE, J. H. & JONES, J.K.N. Some structural studies on the galactan from the albumen glands of the snail, *Strophocheilus oblongus*. Carbohydr. Res., 16: 327 - 35, 1971.
17. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350 - 6, 1956.

18. FILHO, L. & RIZZINI, C.T. Manual de Liquenologia Brasileiro. 1ª ed. Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, 1976. p. 1-205.
19. FLEMING, M. & MANNERS, D.J. A comparison of the fine-structure of lichenin and barley glucan. Biochem.J., 100: 4p, 1966.
20. \_\_\_\_\_. The fine structure of isolichenin. Biochem. J., 100: 24 p, 1966.
21. FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M.; SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M. Polysaccharides in lichens and fungi. II. Antitumor activities on sarcoma-180 of the polysaccharide preparations from *Gyrophora esculenta* Miyoshi, *Cetraria islandica* (L.) Ach. var. *orientalis* Asahina, and some other lichens. Gann, 59: 421-32, 1968.
22. GARDELL, S. Fractionation on cellulose columns. Meth. Carbohydr.Chem., 5: 9-14, 1965.
23. GOMES, V.M.V. Bioquímica Clínica; manual de práticas. Curitiba, UFPR., 1975. p. 148-9.
24. GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. Adv. Carbohydr.Chem.Biochem., 38: 13-104, 1981.
25. GORIN, P.A.J.; GIBLIN, E.M.; SLATER, G.P.; HOGGE, L. Improved resolution of O-methylalditol acetates by gas-liquid chromatography on capillary columns with blended coatings of OV-17 and OV-225. Carbohydr. Res., 106: 235-8, 1982.
26. GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens, *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. Carbohydr. Res., 128: 119-32, 1984.

27. GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Structural diversity of galactomannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. No prelo.
28. GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance studies on methyl aldofuranosides and their O-alkyl derivatives. Carbohydr.Res., 48:171- 86, 1976.
29. \_\_\_\_\_. Further studies on the assignment of signals in <sup>13</sup>C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. Can. J. Chem., 53: 1212-23, 1975.
30. GRANICHSTÄDTEN, H. & PERCIVAL, E.G.V. The polysaccharides of Iceland Moss (*Cetraria islandica*). Part I. Preliminary study of the hemicelluloses. J. Chem. Soc., 54-8, 1943.
31. HAVAN, E. & KJOLBERG, O. Studies on the polysaccharides of lichens. 1. The structure of a water-soluble polysaccharide in *Stereocaulon paschale* (L.) Fr. Acta.Chem. Scand., 25: 2622-8, 1971.
32. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J. Chem. Soc., 107: 8-16, 1915.
33. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides general procedures. Meth. Carbohydr.Chem., 5: 357-60, 1965.
34. HIRST., E.L. & PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. Meth. Carbohydr.Chem., 5: 287-96, 1965.
35. IACOMINI, M.; DUARTE, G.R.; DUARTE, E.R.; DUARTE, H.S.; FONTANA, J.D.; DUARTE, J.H. Structural study on snail galactans from genus *Biomphalaria*. Agric. Biol. Chem., 45 (6): 1373-80, 1981.

36. IACOMINI, M.; SHNEIDER, C.L.; GORIN, P.A.J. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer Moss), *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocraea*. No prelo.
37. IACOMINI, M.; ZANIN, S.M.W.; FONTANA, J.D.; GORIN, P.A.J. Isolation and characterization of  $\beta$ -D-glucan, heteropolysaccharide and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. No prelo.
38. JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. Chem. Commun., (8): 1 - 70, 1976.
39. JONES, J.K.N. & STOODLEY, R.J. Fractionation using copper complexes. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 36-8, 1965.
40. KARRER, P. & JOOS, B. Polysaccharide. XXX. Zur Kenntnis des Isolichenins. Z. Physiol. Chim., 141: 311-5, 1924.
41. KUHN, R.; TRISCHMANN, H.; LÖW, I. Zur Permethylierung von Zuckern und Glikosiden. Angew. Chem., 67(1): 32, 1955.
42. LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. Meth. Enzymol., 28: 178-95, 1972.
43. LINDBERG, B. & McPHERSON, J. Studies on the chemistry of lichens. VI. The structure of pustulan. Acta Chem. Scand., 8: 985-8, 1954.
44. LINDBERG, B.; MISIORNY, A.; WACHTMEISTER, C.A. Studies on the chemistry lichens. IV. Investigation of the low-molecular carbohydrate constituents of different lichens. Acta Chem. Scand., 7 (4): 591-5, 1953.
45. LINDBERG, L.; WACHTMEISTER, C.A.; WICKBERG, B. Studies on the chemistry of lichens. II. Umbilicin, an arabitol galactoside from *Umbilicaria pustulata* (L.) Hoffm. Acta Chem. Scand., 6: 1052-5, 1952.

46. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.  
Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol. Chem., 193: 265-75, 1951.
47. MEYER, K.H. & GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXI.  
La constitution de la lichénine. Helv.Chim.Acta, 30: 751-61, 1947.
48. \_\_\_\_\_. Recherches sur l'amidon. XXXII. L'isolichénine. Helv. Chim. Acta, 30: 761-5, 1947.
49. MIČOVIČ, V.M.; HRANISAVLJEVIČ-JAKOVLJEVIČ, M.; MILJKOVIČ-STOJANOVIČ, J. Structural study of polysaccharides from the oak lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. Carbohydr. Res., 10: 525-33, 1969.
50. NEUMÜLLER, G. & VASSEUR, E. The influence of pH on the periodate oxidation of carbohydrates. Arkiv för Kemi, 5 (21): 235-45, 1953.
51. NISHIKAWA, Y.; OHKI, K.; TAKAHASHI, K.; KURONO, G.; FUKUOKA, F.; EMORI, M. Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Antitumour polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea*, and *Cladonia* species. Chem. Pharm. Bull., 22: 2692-702, 1974.
52. NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. IV. Antitumour active O-acetylated pustulan - type glucans from the lichens of *Umbilicaria* species. Chem. Pharm. Bull., 18: 1431-4, 1970.
53. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; ROBERTS, J.G. The structure of lichenin. J. Chem. Soc., 3916-24, 1957.
54. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; TURVEY, J.R.; MORGAN, K. The structure of isolichenin. J. Chem. Soc., 623-9, 1961.

55. PERLIN, A.S. & SUZUKI, S. The structure of lichenin: selective enzymolysis studies. Can. J. Chem., 40: 50-6, 1962.
56. RAMAUT, J.L. Lichen acids of the *Stereocaulon ramulosum* group in Central East Africa. Bryol., 81(3):415-21, 1978.
57. SAITŌ, H.; OHKI, T.; SASAKI, T. A  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance study of gel-forming (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-glucans. Evidence of the presence of single-helical conformation in a resilient gel of a curdlan-type polysaccharide 13140 from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* IFO 13140. Biochem., 16(5): 908-13, 1977.
58. SAWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal. Chem., 37: 1602-4, 1965.
59. SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 38-44, 1965.
60. SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. Anal. Biochem., 96: 282-92, 1979.
61. SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M.; FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M. Studies on the chemical structures of the new glucans isolated from *Gyrophora esculenta* Miyoshi and *Lasallia papulosa* (Ach.) Llano and their inhibiting effect on implanted sarcoma - 180 in mice. Chem. Pharm. Bull., 16: 1639-41, 1968.
62. TAKAHASHI, K.; KON, T.; YOKOTA, I.; SHIBATA, S. Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of stereocaulaceous lichens. Carbohydr. Res., 89: 166-73, 1981.

63. TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S. Polysaccharides of lichen symbionts. Chem. Pharm. Bull., 27: 238-41, 1979.
64. TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S.; INOMATA, M.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. VI. Antitumour active polysaccharides of lichens of Stictaceae. Chem. Pharm. Bull., 22: 404-8, 1974.
65. TAKEDA, T.; FUNATSU, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. V. Antitumour active polysaccharides of lichens of *Evernia*, *Acroscyphus*, and *Alectoria* spp. Chem. Pharm. Bull., 20: 2445-9, 1972.
66. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444, 1950.
67. UKAI, S.; YOKOYAMA, S.; HARA, C.; KIH0, T. Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the fruit body of *Ganoderma japonicum* Lloyd. Carbohydr. Res., 105: 237-45, 1982.
68. ULANDER, A. & TOLLENS, B. Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten. Chem. Ber., 39: 401-9, 1906.
69. WHISTLER, R.L. & MILLER, J.N. Cellulose column chromatography. Meth. Carbohydr. Chem., 1: 47-50, 1962.
70. WHISTLER, R.L.; BUSHWAY, A.A.; SINGH, P.P.; NAKAHARA, W.; TOKUZEN, R. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32: 235-75, 1976.
71. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. Meth. Carbohydr. Chem., 2: 211-15, 1963.
72. YOKOTA, I. & SHIBATA, S. A polysaccharide of the lichen, *Stereocaulon japonicum*. Chem. Pharm. Bull., 26: 2668-70, 1978.
73. YOKOTA, I.; SHIBATA, S.; SAITŌ, H. A  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. Carbohydr. Res., 69: 252-8, 1979.