

MARIA DE LOURDES CORRADI CUSTÓDIO DA SILVA

Componentes Carboidratados do Líquen *Sticta damaecornis* (Sw.) Ach.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1986

ORIENTADOR: Prof. Dr. Philip Albert James Gorin.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcello Iacomini.

DEDICATÓRIA

Com carinho ao meu
marido João Fernando

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

Aos professores Dr. Philip Albert James Gorin-orientador e Dr. Marcello Iacomini-co-orientador, pelo incentivo e sempre dedicada atenção.

Aos professores doutores João Batista Chaves Corrêa, José Hazencleve Duarte, Fany Reicher e José Domingos Fontana pela co laboração nas análises de cromatografia líquida-gasosa.

Às amigas Mônica H. Cavichiolo Grochocki, Stela M. Romanowski e Miriam Blümel pelo espírito de coleguismo e grande ami zade.

A colega e amiga Madalena Baron pelas sugestões oferecidas durante este trabalho e as monitoras Tereza Cristina Leal Brandão e Eliane de Oliveira pela valiosa ajuda.

Aos professores Dr. Marco Aurélio Lacombe Feijó, Maria Eu genia Rabello Duarte, Gisselia Rabello Duarte e colegas de estu do Sandra Maria Warumby Zanin, Geny Aparecida Cantos, Luís Pe - reira Ramos, Roberto Pontarolo, Elisa Rabello Duarte e Maria Ri ta Sierakowski pelo agradável convívio no setor de química de carboidratos.

À Julieta Pie pela paciência e excelente serviço de dati lografia.

Ao Lauro Novak pela ajuda na confecção dos desenhos apre sentados neste trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao professor Estefano Francisco Jablonski, da PUC do Paraná, pela ajuda na coleta do líquen *Sticta damaecornis*.

Ao Dr. Bengt Lindberg, da Universidade de Estocolmo-Suécia, pela doação e rápido envio do padrão volemitol.

Aos Drs. M. Mazurek e L. Hogge, of Plant Biotechnology Institute, National Research Council, Saskatoon, Canadá, pelas análises de ^{13}C .n.m.r. e g.l.c.-m.s.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas.

À CAPES pelo suporte financeiro.

C O N T E Ú D O

	PÁGINA
Lista de tabelas	VIII
Lista de figuras	X
Lista de siglas	XI
Resumo	XIII
Summary	XV
Introdução	1
Materiais e métodos	19
1. Métodos gerais	19
2. Características gerais do líquen <i>Sticta damaecornis</i> (Sw.) Ach.	22
3. Isolamento dos alditóis, oligossacarídeos e polis- sacarídeos do líquen <i>Sticta damaecornis</i> (Sw.) Ach..	23
3.1 Extração benzeno-etanol	23
3.2 Extração metanol-água	23
3.3 Extração aquosa	25
3.4 Extração alcalina	28
4. Metilação dos oligossacarídeo e polissacarídeos obtidos do líquen <i>Sticta damaecornis</i> (Sw.) Ach.....	32
4.1 Metilação do oligossacarídeo obtido na extração me- tanol-água	32
4.2 Metilação dos polissacarídeos obtidos na extração aquosa e alcalina	33
5. Análise dos produtos de hidrólise ácida dos oligos- sacarídeos na forma de acetatos de alditóis	34

6.	Degradação tipo Smith do polissacarídeo	34
7.	Hidrólise parcial do polissacarídeo precipitado em pH 8,5 obtido do precipitado de Fehling da extração alcalina	35
	Resultados e Discussão	37
1.	Componentes solúveis no extrato metanol-água	39
1.1	Caracterização dos alditóis arabinitol e manitol ...	39
1.2	Caracterização do volemitol	41
1.3	Fracionamento dos componentes oligossacarídeos	44
1.4	Caracterização da lactose	45
1.5	Estudos preliminares das frações D ₂ e D ₃	50
2.	Polissacarídeos da extração aquosa	54
2.1	Polissacarídeos obtidos do precipitado de Fehling ..	56
2.2	Polissacarídeos obtidos do sobrenadante de Fehling..	56
2.2.1	Estudo da fração polissacarídica E	56
3.	Polissacarídeos da extração alcalina	60
3.1	Polissacarídeos obtidos do precipitado de Fehling ..	63
3.2	Polissacarídeos obtidos do sobrenadante de Fehling..	63
3.2.1	Estudo da fração polissacarídica G	64
3.2.2	Estudo da fração polissacarídica H	68
3.2.3	Estudo da fração polissacarídica F	72
	Conclusão	78
	Referências bibliográficas	79

L I S T A D E T A B E L A S

TABELA		PÁGINA
1	Análise por g.l.c. do extrato metanol-água 4:1 do líquen <i>S. damaecornis</i>	40
2	Análise por g.l.c. dos hidrolisados provenientes dos oligossacarídeos obtidos do líquen <i>S. damaecornis</i>	46
3	Análise por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente <u>O</u> -metilados obtidos do oligossacarídeos D ₁	47
4	Sinais de ¹³ C-n.m.r. e suas atribuições para o dissacarídeo lactose	48
5	Análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos dos polissacarídeos isolados do complexo cúprico insolúvel e do sobrenadante de Fehling ..	55
6	Análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos da fração polissacarídica E, encontrada no sobrenadante de Fehling da extração aquosa	57
7	Análise por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente <u>O</u> -metilados obtidos da fração polissacarídica E, totalmente metilada	59
8	Análise por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis obtidos dos polissacarídeos isolados do complexo cúprico insolúvel e do sobrenadante de Fehling ..	62
9	Análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos das frações polissacarídicas G e H do sobrenadante de Fehling da extração alcalina	65

10	Análise por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente <u>O</u> -metilados obtidos da fração G, totalmente metilada	66
11	Análise por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente <u>O</u> -metilados obtidos da fração polisacarídica H, totalmente metilada	70
12	Análise por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente <u>O</u> -metilados obtidos da fração polisacarídica F, totalmente metilada	73

L I S T A D E F I G U R A S

FIGURA		PÁGINA
1	Espectros de ^{13}C -n.m.r. dos alditóis volemitol obtidos dos líquens <i>S. damaecornis</i> e <i>Dermatocarpon miniatum</i>	42
2	Cromatogramas obtidos por g.l.c. dos produtos de acetilação do volemitol obtido da <i>S. damaecornis</i> e <i>D. miniatum</i>	43
3	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do oligossacarídeo lactose do líquen <i>S. damaecornis</i>	49
4	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do componente D_2 obtido da <i>S. damaecornis</i>	52
5	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do componente D_3 obtido da <i>S. damaecornis</i>	53
6	Espectro de ^{13}C -n.m.r. da fração polissacarídica E do líquen <i>S. damaecornis</i>	61
7	Espectro de ^{13}C -n.m.r. da fração polissacarídica G obtida do líquen <i>S. damaecornis</i>	67
8	Espectro de ^{13}C -n.m.r. da fração polissacarídica H do líquen <i>S. damaecornis</i>	71
9	Espectro de ^{13}C -n.m.r. da fração polissacarídica F do líquen <i>S. damaecornis</i>	74

L I S T A D E S I G L A S

alc.	- Alcalino.
c.	- Concentração.
Cetavlon	- Brometo de hexadeciltrimetilamônio.
cm	- Centímetro.
cm ³	- Centímetro cúbico
¹³ C-n.m.r.	- Ressonância nuclear magnética de carbono treze.
c.p.	- Cromatografia em papel.
d.i.	- Diâmetro interno.
D ₂ O	- Óxido de deutério.
g	- Grama.
g.l.c.	- Cromatografia líquida-gasosa.
g.l.c.-m.s.	- Cromatografia líquida-gasosa e espectrometria de massa.
h	- Hora
H _z	- Hertz
L	- Litro
M	- Molaridade
m	- Metro
m/e	- Massa/carga.
mg	- Miligrama
min	- Minuto
mL	- Mililitro
mm	- Milímetro
nm	- Nanômetro
p/p	- Peso/peso
p.p.m.	- Parte por milhão

p.f.	- Ponto de fusão.
r.p.m.	- Rotação por minuto.
R_I	- Mobilidade relativa ao inositol.
s.	- Segundo.
sobren.	- Sobrenadante.
T	- Tempo de retenção.
TMS	- Tetrametilsilano
v/v	- Volume/volume
α	- Alfa.
β	- Beta
δ	- Delta

R E S U M O

O ascolíquen *Sticta damaecornis* contém alditóis, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os oligossacarídeos, assim como os alditóis arabinitol, manitol e volemitol, foram obtidos por extração metanol-água sendo a mistura fracionada em colunas de carvão-Celite e celulose. Oligossacarídeos com R_I 1,17; 0,51 (0,74) e 0,25 foram obtidos com rendimentos de 0,21% , 0,11% e 0,04%, respectivamente. O componente com R_I 1,17 (D_1) contém galactose e glucose na proporção molar 1:1, estando a galactose na extremidade terminal não redutora, ligada (1 → 4) à glucose. Através de ^{13}C -n.m.r., g.l.c.-m.s., ponto de fusão e ponto de fusão da mistura, esse componente foi identificado como lactose (4-O- β -galactopiranosil-D-glucose). Os outros dois oligossacarídeos são constituídos de uma elevada proporção de glucose ligadas (1 → 2).

Uma fração polissacarídica obtida por extração aquosa (E) foi solúvel em solução de Fehling e isolada como sobrenadante do pH 12, quando tratada por Cetavlon. Com rendimento de 0,10% este componente continha arabinose (12%), manose (12%) galactose (49%) e glucose (27%).

O material remanescente foi submetido a extração com álcali a 100° e o extrato foi tratado com solução de Fehling. A fração polissacarídica, solúvel em Fehling e isolada como sobrenadante do pH 12 (rend. 0,16%, H) quando tratada por Cetavlon, apresentou arabinose (15%), manose (5%), galactose (56%) e glucose (24%). Este componente mostrou alguma similaridade com aquele obtido da extração aquosa (E), o que pode ser observado através de ^{13}C -n.m.r. e pela presença comum, de unidades β -galactofuranosí-

dicas e α -arabinofuranosídicas, através de análises por metilação-g.l.c.-m.s.

Uma fração polissacarídica obtida da extração alcalina, solúvel em Fehling precipitou em pH 8,5 (rend. 0,14%, G) quando tratada com tampão borato e mostrou-se constituída de manose (22%), galactose (56%) e glucose (22%). Esta fração se caracterizou pela elevada proporção de unidades α -galactofuranosídicas, de acordo com dados de ^{13}C -n.m.r. e metilação.

A fração polissacarídica F (rend. 1,04%) obtida da extração alcalina e insolúvel em solução de Fehling, foi precipitada em pH 8,5 quando tratada por tampão borato e mostrou-se constituída de manose (63%), galactose (21%) e glucose (16%). Estudos da degradação de Smith, indicaram uma elevada proporção de glicerol (81%). Por hidrólise ácida parcial, este polissacarídeo apresentou manose (71%), galactose (12%) e glucose (17%) e após metilação mostrou como maior componente o 2,3,4-tri-0-metil manitol, indicando predominantemente ligações (1 \rightarrow 6), no núcleo da manana. Com estudos de g.l.c.-m.s., ^{13}C -n.m.r., degradação de Smith e hidrólise ácida parcial-metilação, pode ser proposta a galactomanana uma estrutura cujo núcleo seria constituído de manose ligada (1 \rightarrow 6), parcialmente substituída com unidades β -D-galactopiranosil, manopiranosil e manobiosil ligadas em 4-0-e/ou 2-0 da cadeia principal, conforme Estruturas 8-11 (páginas 75-76).

S U M M A R Y

The ascolichen *Sticta damaecornis* contains alditols and oligo- and polysaccharides. The oligosaccharides, like the alditols arabinitol, mannitol, and volemitol, were obtained by methanol - water extraction followed by successive fractionations on columns of charcoal-Celite and cellulose. Oligosaccharide fractions having R_f 1.17, 0.51 (contaminated with 0.74), and 0.25 were isolated in yields of 0.21, 0.11, and 0.04% respectively. That with R_f 1.17 contained glucose and galactose in an equimolar ratio with glucose as the reducing end. Methylation-g.l.c.-m.s. analysis of the disaccharide indicated that galactopyranosyl units were linked (1 \rightarrow 4) to glucose and ^{13}C -n.m.r. data were consistent with a β - glycosidic linkage and to the structure of lactose (4-O- β -D-galactopyranosyl- $\alpha\beta$ -D-glucose). This was confirmed by the m.p. and mixed m.p. of a crystalline preparation. The oligosaccharides could not be purified by crystallization, but ^{13}C -n.m.r. evidence showed that they contained, in a high proportion, (1 \rightarrow 2)-linked gluco - pyranosyl structures with both α and β -configurations.

A polysaccharide Fraction E, obtained via hot aqueous extraction, was soluble in Fehling solution and purified by virtue of its solubility at pH 12 in the presence of borate and Cetavlon. The material (0.10% yield) contained arabinose (12%), mannose (12%), galactose (49%), and glucose (27%). The residual lichen was extracted with hot aqueous alkali and similarly fractionated to give Fraction H (0.16% yield) containing arabinose (15%), mannose (5%), galactose (56%), and glucose (24%). It also resembled closely Fraction E, by virtue of their ^{13}C -n.m.r. spectra and products

formed on methylation-g.l.c.-m.s. analysis, and contained high proportions of β -galactofuranosyl and α -arabinofuranosyl units.

A polysaccharide Fraction G (0.14% yield), prepared via successive alkaline extraction, treatment with Fehling solution, isolation from the supernatant, and precipitation with Cetavlon at pH 8.5 in the presence of borate, was composed of mannose (22%), galactose (56%), and glucose (22%). ^{13}C -n.m.r. and methylation-g.l.c.-m.s. data indicated that it contained a high proportion of α -galactofuranosyl units.

Another Fraction F (1.04% yield) was isolated, following alkaline extraction and precipitation of its insoluble copper complex formed with Fehling solution, by precipitation with Cetavlon at pH 8.5 in the presence of borate. It contained mannose (63%), galactose (21%), and glucose (16%) and a Smith degradation (strong hydrolytic conditions) gave 7% of tetritol corresponding to the presence of 4-O- and/or 4,6-di-O-substituted hexopyranosyl residues. Partial hydrolysis of Fraction F gave a core polysaccharide containing mannose (71%), galactose (12%), and glucose (17%), which gave, on methylation analysis, 2,3,4, -tri-O-methylmannitol acetate in a high yield indicating a main chain with predominant (1 \rightarrow 6)-linked mannopyranosyl residues. These studies, combined with those of methylation analysis and ^{13}C -n.m.r. spectroscopy carried out on Fraction F, show that it is composed principally of a galactomannan with the above mannan main-chain probably partially substituted with side chains containing β -D-galactopyranosyl, mannopyranosyl, and mannobiosyl units, as depicted in Structure 8-11 (page 75-76).

I N T R O D U Ç Ã O

A verdadeira natureza dos líquens só foi reconhecida em 1868, quando o biólogo suíço SCHWENDENER demonstrou tratar-se de uma simbiose entre alga e fungo, associados de tal forma que pareciam constituir um único vegetal. O fungo quase sempre envolve o componente algal da associação e do crescimento de ambos resulta um talo, de forma e estrutura interna constantes e definidas, que permitem o reconhecimento de gêneros e espécies. As algas são sempre clorofíceas ou cianofíceas e o fungo pode ser ficomiceto, ascomiceto, basidiomiceto ou um fungo imperfeito (43).

Na maior parte dos estudos químicos de líquens a atenção é voltada para dois grupos de substâncias: a) constituintes carboidratados e proteicos solúveis em água e b) os chamados ácidos liquênicos (17).

Dentre os constituintes carboidratados solúveis em água encontram-se os polióis, aldoses e cetoses, glicosil - alditóis, oligossacarídeos não redutores e redutores e polissacarídeos.

SMITH e colaboradores (47,77) estudaram extensivamente o metabolismo de carboidratos em líquens e verificaram que a identidade do carboidrato, transferido como nutriente do ficobionte ao micobionte, depende do gênero de alga presente. Em líquens contendo cinco gêneros diferentes de clorofíceas (algas verdes), os carboidratos produzidos por fotossíntese são transferidos ao fungo como polióis, sendo ribitol em *Trebouxia*, *Myrmecia* e *Coccomyxa*, eritritol em *Trentefolia* e sorbitol em *Hyalococcus*. Em alguns líquens cujos ficobiontes são cianofíceas como *Nostoc*,

Calothrix e *Scytonema*, a glucose é o carboidrato produzido pela alga. Usando técnicas com carbono radioativo, os autores acima estudaram o metabolismo nos simbiontes, isoladamente, e descobriram que a D-glucose inicialmente formada no ficobionte *Nostoc* é liberada ao fungo e convertida em D-manitol, enquanto que o ribitol formado na alga verde *Trebouxia* é transformado em D-manitol e D-arabinitol no fungo (77,78). Mais recentemente, SHIBATA e KOMIYA (44) estudaram o metabolismo de polióis em *Ramalina crassa* e *Ramalina subbreviscula*, assim como em seus ficobiontes e micobiontes, através de cromatografia líquido-gasosa após tri-fluoroacetilação dos metabólitos.

LINDBERG e colaboradores (51) examinaram sessenta espécies de líquens; todas apresentaram D-manitol e 90% delas também continham D-arabinitol, sendo que este último poliol ocorre em todos os líquens da ordem Gymnocarpeae examinados, porém não nos líquens da ordem Pyrenocarpeae. NISHIKAWA e colaboradores (63) verificaram que, através da análise em cromatografia líquido-gasosa do extrato metanol-água a quente, de oito líquens examinados, o conteúdo de arabinitol predomina sobre o de manitol em sete deles. Mais recentemente, GORIN e IACOMINI (40, 29) encontraram as seguintes percentagens de manitol e arabinitol, respectivamente, nos líquens: *Cladonia alpestris* (0,32%, 1,4%), *Cladonia confusa* (0,4%, 2,2%), *Cladonia amaurocraea* (0,4%, 1,5%), *Actinogyra muehlenbergii* (0,6%, 1,2%), *Peltigera aphthosa* (2,4%, 2,8%), *Usnea* sp (0,04%, 4,0%), *Letharia vulpina* (0,4%, 2,5%), *Parmelia sulcata* (0,3%, 2,5%) e *Stereocaulon paschale* (0,8%, 2,5%). Além desses dois polióis, outros também foram encontrados em líquens, como: glicerol, eritritol, ribitol, mio-inositol, sorbitol, xilitol (12,73), sifulitol (1-deoxi-D-glicero-D-talo-heptitol (50) e volemitol (D-glicero-D-talo-heptitol) (51, 48).

Dentre os monossacarídeos livres encontrados em líquens estão: glucose, galactose, manose, frutose, tagatose, arabinose, xilose, lioxose e ramnose (12,74).

A partir dos extratos de *Lichina pygmaea*, *Parmelia saxatilis* e *Xanthoria*, PUEYO (71,72) detectou a glucose por cromatografia em papel. SMITH e colaboradores (47,77) registraram a presença desse açúcar nos ficobiontes *Nostoc* e *Scytonema*. Em 1973, NISHIKAWA e outros (63), detectaram a glucose em mais sete espécies de líquens através de cromatografia líquido-gasosa.

O monossacarídeo galactose foi identificado por PUEYO (71,72) nos líquens *P.saxatilis* e *Umbilicaria pustulata* e posteriormente em *Xanthoria parietina*. LESTANG-LAISNÉ (46) assinalou a presença dessa hexose em *Lichina pygmaea*. A cromatografia em papel foi o método empregado para a análise desse açúcar. A manose foi encontrada livre pela primeira vez por SOLDBERG (83), no líquen *Lecanora myrini*.

Um grande número de investigações tem mostrado a presença de frutose livre em líquens. Dentre esses encontram-se *L. pygmaea*, *X.parietina*, *Cetraria islandica*, *Cladonia crispata*, *Cladonia rangiferina*, *Cladonia squamosa*, *P.aphthosa*, *P. nigripunctata*, *Umbilicaria caroliniana* e *Usnea rubescens*. A cromatografia em papel e cromatografia líquido-gasosa foram os métodos aplicados para a confirmação desse açúcar (71,72,46,84).

LINDBERG (48) estudando o líquen *Roccella linearis*, verificou que ele continha tagatose e galactose. A cetose foi identificada por cromatografia em papel através de seu R_f , pela cor vermelha obtida da revelação com resorcinol-ácido clorídico e pela cor amarela com fosfato de *p*-anisidina. A galactose foi identificada na forma derivatizada de cristais metilfenilhidrazona, com ponto de fusão entre 185º a 187º. Esses monossacarídeos também foram detectados por cromatografia em papel, no líquen *Roccella fucoformis*.

Embora haja registros das presenças de lixose em *St. paschale* e ramnose em *Rivularia bullata* (74) livres, estas ainda devem ser confirmadas.

O primeiro glicosil-alditol isolado de líquen foi a umbilicina (54), composta de uma unidade de β -D-galactofuranose (55, 56, 57) em ligação (1 \rightarrow 2) com uma unidade de D-arabinitol. O líquen inicialmente usado para o isolamento desse composto foi a *U. pustulata*, sendo posteriormente a mesma substância encontrada nos líquens *Usnea rigida*, *Haematomma ventosum* e *C. islandica* (51). Recentemente, em trabalho de tese (5) BARON isolou a umbilicina do *Stereocaulon ramulosum* a partir do extrato metanol-água 4:1. Pela passagem desse extrato em coluna de celulose, a substância foi obtida com 0.86% de rendimento e teve sua estrutura confirmada pela comparação de seu espectro de ressonância nuclear magnética de carbono 13 (^{13}C -n.m.r.) com o espectro da umbilicina isolada do líquen *A. muehlenbergii* (29). Esta técnica é útil para uma identificação preliminar de carboidratos em líquens.

PUEYO (70) isolou outro glicosil alditol do líquen *Peltigera horizontalis*, o qual denominou peltigerosideo. LINDBERG e colaboradores (53) esclareceram a estrutura desse composto como 3-O- β -D-galactofuranosil-D-manitol (ponto de fusão = 161 $^{\circ}$ a 163 $^{\circ}$; $[\alpha]_{\text{D}} = -64^{\circ}$). Outras espécies de *Peltigera* foram estudadas (53), porém mais nenhuma apresentou esse componente. LINDBERG e colaboradores (53), estudando o líquen *P. aphthosa* (L.) Willd., isolaram outro carboidrato de baixo peso molecular constituído de glucose e manitol, sendo sua estrutura esclarecida como 3-O- β -D-glucopiranosil-D-manitol e comprovada através de síntese e posterior redução do 4-O- β -D-glucopiranosil-D-manose. Tal glicosil-alditol também foi encontrado em outras oito espécies de *Peltigera* (53).

Duas outras substâncias foram isoladas do líquen *X. parietina* (22): O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-D-glicerol e 1-O- β -D-galactopiranosil-D-ribitol. A primeira, por hidrólise ácida, produziu D-galactose e glicerol nas proporções de 2:1, sendo seu ponto de fusão (190 $^{\circ}$ -193 $^{\circ}$) e infra -

vermelho idênticos a uma amostra autêntica de α -D-galactopiranosil-(1 → 6)-β-D-galactopiranosil-(1 → 1)-D-glicerol, que é um componente comum em glicolipídeos (59). A segunda substância (α = -39), que por hidrólise ácida forneceu quantidades equimoleculares de D-galactose e ribitol, foi analisada por r.n.m., oxidação com *meta*-periodato de sódio e finalmente teve sua estrutura confirmada através de síntese.

Os dissacarídeos não redutores sacarose (α -D-glucopiranosil (1 → 2)-β-D-frutofuranose) e trealose (α -D-glucopiranosil-(1 → 1)-α-D-glucopiranose) foram isolados de vários líquens. LINDBERG e outros (55) estudando a *U. pustulata* isolaram em pequenas quantidades α-trealose e sacarose. Essas duas substâncias não tinham sido, até então, isoladas de líquens, mas pelo fato da sacarose ocorrer quase que universalmente no reino vegetal e a trealose ser um constituinte comum dos fungos, esse resultado não foi totalmente surpreendente aos autores. Esses dois açúcares também foram encontrados em *C. rangiferina*, *Umbilicaria rigida*, *H. ventosum*, *C. islandica*, *Lecanora atra* (51) e *Dermatocarpon miniatum* (48). A sacarose foi ainda isolada do líquen *P. apthosa* (52) e *A. muehlenbergii* (29). Trealose foi encontrado no *St. ramulosum* (5), assim como no basidiolíquén *Cora pavonia* (92), neste último em percentagem elevada (4,4%) quando comparado às de outros líquens.

Um dissacarídeo e um trissacarídeo, aparentemente redutores, foram isolados dos líquens *Roccella hypomecha*, *R. linearis* e *R. fucoformis* (48), os quais, por hidrólise ácida, deram dois açúcares redutores, uma aldose e uma cetose, identificadas cromatograficamente como galactose e tagatose. Pela intensidade dos "spots", as proporções aldose: cetose foram estimadas em 1:1 no dissacarídeo e 2:1 no trissacarídeo. Acredita-se que uma investigação mais detalhada, do ponto de vista estrutural desses oligos

sacarídeos, seja necessária.

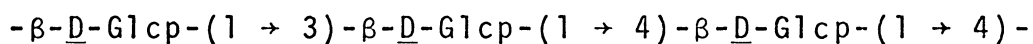
Valiosa ajuda para o estudo dos componentes químicos dos líquens foi dada através de revisões escritas por CHICITA CULBERSON (12, 11, 13), PUEYO (73, 74, 75) e GORIN e colaboradores (24).

Desde o trabalho pioneiro de BERZELIUS em 1815, vários polissacarídeos de líquens foram estudados. Os polissacarídeos solúveis em água são classificados quimicamente em três grupos: homoglicanas, heteroglicanas e glicopeptídeos. As homoglicanas foram as espécies mais estudadas; apesar disso, heteroglicanas e glicopeptídeos também encontram-se distribuídos em líquens.

A fim de determinar a origem dos polissacarídeos na associação alga-fungo, TAKAHASHI e colaboradores (87) em 1979, estudaram alguns líquens, assim como seus micobiontes e ficobiontes. Através de técnicas adequadas eles separaram os dois organismos da associação e os cultivaram em meios próprios. Após estudos de solubilidade em água, infravermelho (I.V.), rotação específica e composição em açúcares, verificaram que as estruturas parciais assim determinadas, dos polissacarídeos isolados dos micobiontes, apresentavam semelhanças com os polissacarídeos dos líquens originais. No fungo cultivado em laboratório, obtido a partir do líquen *Parmelia caperata*, foi isolada uma glucana insolúvel em água fria, idêntica a α glucana contendo ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) numa relação molar 1:1, encontrada no líquen original. A mesma semelhança foi observada com as glucanas insolúvel e solúvel obtidas do micobionte *Ramalina crassa*, praticamente idênticas às glucanas do líquen original. Por outro lado, os polissacarídeos isolados dos ficobiontes apresentaram características bem distintas daqueles dos líquens originais.

As primeiras constatações da presença de polissacarídeos foram feitas quando BERZELIUS estudando a *C. islandica* isolou um polissacarídeo através de sua precipitação por resfriamento do

extrato aquoso a quente (6). Em 1947, MEYER e GÜRTLER (66) ve-
rificaram que a liquenana, assim denominada, constituída unica -
mente de D-glucose, apresentava uma rotação específica de +89 ,
consistente com a configuração β e por análise dos produtos de
metilação apenas ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) mostravam estar pre-
sentes, as quais foram confirmadas na proporção molar de 3:7, pe-
los dados de oxidação quantitativa com periodato. Essa estrutura
foi comprovada por CHANDA e colaboradores (10) que purificaram
a liquenana (Estrutura 1) via seu complexo cúprico insolúvel, for-
mado com solução de Fehling. Através de hidrólise ácida parcial,
separação e identificação dos oligossacarídeos resultantes por
coluna de carvão-celite. PEAT e colaboradores (67) sugeriram
que a cadeia da liquenana seria constituída, predominantemente ,
de 3 unidades de β -D-glucopiranosose 4-O-substituídas regularmente
interceptadas por uma ligação (1 \rightarrow 3).

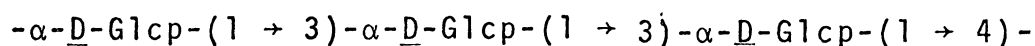


Estrutura 1

PERLIN e SUZUKI (69) estudaram a liquenana por hidrólise
enzimática utilizando as enzimas celulase e laminarinase e verifi-
caram, pelos fragmentos formados, que a constituição básica da mo-
lécua era semelhante à proposta acima, o que também foi confirma-
do pelos produtos formados através da degradação de Smith, incor-
porando condições hidrolíticas suaves (18).

Enquanto MEYER e GÜRTLER estudavam a liquenana, verifica-
ram que na solução sobrenadante havia uma mistura de polissacarí-
deos, que por hidrólise ácida produzia glucose, galactose e mano-
se; esses dois últimos açúcares em menores quantidades (61). Es-
sa mistura foi denominada de isoliquenana. CHANDA e colaboradores
(10) separaram a isoliquenana da liquenana por processos repetitivos

de congelamento e degelo para remover liquenana insolúvel, como já tinha sido feito por MEYER e GÜRTLER, assim como de outros polissacarídeos contaminantes removidos como complexos cúpricos insolúveis em álcali. A rotação específica da isoliquenana (Estrutura 2) foi de +255° e por hidrólise ácida produziu quase que exclusivamente D-glucose. Análise dos derivados metilados do polissacarídeo mostrou a presença de ligações (1 → 3) e (1 → 4), sendo a relação molar dessas ligações, determinada por oxidação quantitativa com *meta*-periodato de sódio, igual a 60:40. PEAT e colaboradores (68) submeteram o polímero em estudo à hidrólise ácida parcial e subsequente fracionamento em coluna de carvão-celite, formando o monossacarídeo D-glucose e os dissacarídeos nigerose {α-(1 → 3)} e maltose {α-(1 → 4)}. Pelo estudo do polissacarídeo através da oxidação quantitativa com *meta*-periodato de sódio, esses autores sugeriram a relação molar de 55:45 das ligações (1 → 3) e (1 → 4).



Estrutura 2

FLEMING e MANNERS (19) efetuaram uma degradação de Smith controlada na isoliquena e concluíram, pelos resultados obtidos, que ligações (1 → 3) e (1 → 4) se encontravam numa proporção molar de 56,5 e 43,5, respectivamente.

Outras glucanas contendo ligações (1 → 3) e (1 → 4) foram encontradas. Em 1970, TAKEDA e colaboradores (89) estudando o líquen *P. caperata* isolaram, após extração aquosa e processos repetitivos de congelamento e degelo, uma glucana insolúvel em água fria, eletroforéticamente homogênea em presença de borato, que precipitou em solução de hidróxido de bário, mas não em solução de Fehling. A rotação específica de + 201° e o espectro de

infravermelho com absorções características em 925 , 845 e 780 cm^{-1} indicaram que a configuração α era predominante na molécula. Através da análise do produto metilado, a presença de iguais quantidades dos derivados 2,4,6 e 2,3,6-tri-0-metil glucose, assim como pequena quantidade de 2,3,4,6-tetra-0-metil glucose foi observada. Na oxidação quantitativa com *meta*-periodato de sódio houve consumo de 0,50 moles de reagente por molécula de glucose. Pelo procedimento da degradação de Smith controlada apenas α glucosil eritritol e aldeído glicólico foram detectados tanto por cromatografias em papel e camada delgada como g.l.c.. A partir dos resultados expostos, os autores concluíram que a α -homoglucana era linear com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) alternadas em proporção 1:1.

O mesmo grupo de autores (88) encontrou em 1972, duas α -glucanas no líquen *Evernia prunastri*. Através de processos repetidos de congelamento e degelo, uma α glucana, insolúvel em água fria, apresentou rotação específica de + 200°, contendo ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) nas proporções 4:1. A solução sobrenadante foi tratada com cetiltrimetilamônio precipitando uma β -glucana e deixando em solução uma α glucana com rotação específica + 164° e ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção de 3:2. No líquen *Acroscyphus sphaerophoroides*, uma α glucana constituída de ligações (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6) foi encontrada, pelos mesmos autores.

HAUAN e KJOLBERG (35), trabalhando com o líquen *St. paschale*, verificaram que, pelo tratamento de congelamento e degelo do extrato aquoso, não ocorria precipitação, o mesmo acontecendo pela adição de solução de Fehling. Dessa forma o material foi cromatografado em coluna de DEAE-celulose onde três componentes apareceram. O primeiro deles era constituído unicamente de glucose, enquanto os outros dois apresentavam manose, galactose e glucose. A fração que continha apenas glucose apresentou rota-

ção específica de + 2330, indicando ligação α -glicosídica. Após hidrólise do produto metilado os derivados obtidos foram: 2,3,6 (65%) e 2,4,6-tri-(25%), 2,3,4,6-tetra-0-metil glucose (3%) e pequenas quantidades de 2,3-di-0-metil glucose. Pelos resultados da oxidação quantitativa com *meta*-periodato de sódio, 30% de ligações (1 \rightarrow 3) estavam presentes, além de, na hidrólise ácida parcial, maltose e nigerose serem detectadas, estando o primeiro em maior quantidade. Pelos resultados acima obtidos. os autores concluíram tratar-se de uma α glucana com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção molar de 1:2,5.

NISHIKAWA e colaboradores (64) estudando os líquens do gênero *Cladonia* encontraram uma α -glucana, insolúvel em água fria, com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) alternadas, já encontrada por TAKEDA e colaboradores (89) na *P.caperata*. Mais recentemente IACOMINI e colaboradores (40) encontraram glucanas similares, insolúveis em água fria, nos líquens *C. alpestris* e *C. confusa*, a partir da extração aquosa. A glucana apresentava configuração α , uma vez que seu espectro de ^{13}C -n.m.r. continha dois sinais de C-1, tipicamente em campo alto, em δ 100,8 e 101,8. Por análise de metilação os acetatos de 2,3,6 e 2,4,6-tri-0-metil glucitol foram detectados e suas proporções relativas indicaram que as ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) eram de 1:1.

YOKOTA e SHIBATA (93) isolaram do líquen *Stereocaulon japonicum*, uma α -glucana, solúvel em água fria, a partir do extrato aquoso. Esse composto foi obtido por cromatografia em coluna de DEAE-celulose e após metilação, hidrólise e análise dos produtos por g.l.c. mostrou ser uma mistura constituída de uma α -glucana com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção 3:1, parcialmente ramificada nas posições 3e4 ou 2e3, acompanhada de quantidade menor de α glucana com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção 2:1.

TAKAHASHI e colaboradores (85) estudando polissacarídeos

dos líquens "*stereocaulaceous*" descobriram α glucanas com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção 3:1, em *St. japonicum*, *St. sorediiferum* e *St. exutum*. Mais recentemente BARON (5) isolou, do *St. ramulosum*, uma α glucana que de acordo com análises de metilação-g.l.c., espectroscopia de ^{13}C -n.m.r. e oxidação por periodato mostrou ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) que encontravam-se na proporção de 1,6:1.

Quando TAKEDA e colaboradores (88) isolaram do líquen *E. prunastrii* uma α -glucana, insolúvel em água fria, uma β -glucana, com rotação específica + 120°, encontrada no sobrenadante foi precipitada pela adição de hidróxido de cetiltrimetilamônio e mostrou ser constituída, após análise por metilação-g.l.c. assim como oxidação quantitativa com *meta*-periodato de sódio, de ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção 3:1. Uma β -glucana contendo ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção de 3:7 foi isolada da *Usnea rubescens* (64). GORIN e IACOMINI (27) isolaram da *L. vulpina* e *Usnea* sp a partir da extração com DMSO, um processo no qual se obtém a glucana mais pura que na extração aquosa, uma β -glucana. Análise dos derivados metilados por g.l.c.-m.s. mostrou a presença de ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção 1:3. Pela de-gradação de Smith, incorporando condições hidrolíticas suaves, apenas eritritol e 2-O- β -D-glucopiranosil-D-eritritol foram detectados comprovando a existência de uma β -glucopiranana linear.

Uma glucana insolúvel em água fria foi obtida do líquen *St. ramulosum* (5) e através de sua rotação específica + 30° e seu espectro de ^{13}C -n.m.r. a configuração β foi indicada para as unidades de glucose. Análises por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados mostraram apenas o componente 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil glucitol, indicando unicamente ligações (1 \rightarrow 3), o que pôde ser confirmado pelo não consumo do oxidante durante o tratamento do polímero com *meta*-periodato de sódio. Essa β -D-glucana foi isolada pela primeira

vez em líquens não tendo sido encontrada em fungos, embora possa ser produzida por outras fontes naturais como algas e bactérias.

A partir da extração aquosa da *U. pustulata*, LINDBERG e MCPHERSON (49) isolaram um polissacarídeo que por hidrólise ácida forneceu apenas glucose. A fim de estudar a estrutura da glucana, uma amostra foi parcialmente hidrolisada e os oligossacarídeos fracionados em coluna de carvão-Celite. Glucose, gentiobiose, gentiotriose e gentiotetraose foram detectados, não sendo observado mais nenhum oligossacarídeo, indicando com isso que a glucana, denominada pustulana, continha exclusivamente ligações β -(1 \rightarrow 6). Posteriormente, SHIBATA e colaboradores (82) isolaram dos líquens *Gyrophora esculenta* e *Lasallia papulosa* uma β -glucana (rotação específica - 37,5º) semelhante à pustulana isolada por LINDBERG, uma vez que por hidrólise ácida parcial e hidrólise enzimática { β -(1 \rightarrow 6) glucanahidrolase} a série de oligossacarídeos obtida foi idêntica aquela de LINDBERG. Dados de metilação mostraram que o polissacarídeo era constituído unicamente de ligações (1 \rightarrow 6). Essa glucana diferia da pustulana pelo fato de seu espectro de infravermelho mostrar bandas de absorção em 1735 e 1250 cm^{-1} . Quando tratada com carbonato de sódio a 2% para formar acetato de sódio, o produto desacetilado apresentava seu espectro de I.V. idêntico ao da pustulana. Estudos posteriores revelaram que a β -glucana (1 \rightarrow 6) linear possui aproximadamente 10% de unidades de glucose com grupos O-acetil na posição 3 (65). NISHIKAWA e colaboradores (65) investigando três espécies de líquens *Umbilicaria*, *U. angulata*, *U. caroliniana* e *U. polyphylla* através de hidrólise ácida parcial, I.V. e n.m.r. detectaram a β -glucana (1 \rightarrow 6) parcialmente acetilada. GORIN e IACOMINI (27) obtiveram esse composto por extração com DMSO do líquen *A. muehlenbergii*. Análises de metilação indicaram que todos os resíduos glucopiranosil eram 6-O-substituídos com configuração β , desde que a rotação específica da glucana foi de -42º e o espectro de ^{13}C -n.m.r. continha

um sinal de C-1 em campo baixo, igual δ 104,6. Uma pequena proporção de grupos acetil estava presente, o que pôde ser evidenciado por sinais em δ 22,1 (CH₃) e 175,3 (C=O).

ZANIN (92) obteve a partir do basidiolíquén *Cora pavonia* uma glucana com rotação específica + 139 e sinais de C-1 em campo baixo (δ 104,5) característicos de unidades em ligação β , além de de outro sinal em δ 86,5 correspondente a resíduos 3-O-substituídos de β -glucopirranose. Análises de metilação-hidrólise-g.l.c. - m.s. forneceram fragmentos correspondentes a 21% de grupos terminais não redutores, unidades de glucopirranose 3-O-(30%), 6-O-(30%) e 3,6-di-O-substituídos (19%). A β -glucana com ligações (1 \rightarrow 3) interceptadas por (1 \rightarrow 6) é uma estrutura altamente ramificada, típica de β -D-glucanas de basidiomicetos (25), porém diferentes das α e β -glucanas de ascomicetos, que são lineares ou apresentam menos de 10% de ramificações.

ULANDER e TOLLENS (91) registraram a presença de galactose e manose, além de glucose, no líquén *C. islandica*. Posteriormente BUSTON e CHAMBERS (9) detectaram a presença desses dois açúcares, assim como de ácido galacturônico, após remoção de liquenana e isoliquenana, em material obtido a partir da extração alcalina, o qual denominaram erradamente de hemicelulose. GRANCHSTÄDTEN e PERCIVAL (33) também encontraram manose, galactose e glucose e um ácido urônico, que acreditavam ser D-glucorônico.

MIČOVIČ e colaboradores (62) descobriram uma galactomanana acídica no extrato alcalino do líquén *E. prunastri*. O heteropolissacarídeo purificado por precipitação com hidróxido de bário, solução de Fehling e de iodo mostrou-se constituído de D-galactose (36%), D-manose (54%) e ácido galacturônico (10%). Com base em dados de metilação conclui-se que a galactomanana era altamente ramificada com grupos não redutores de manopirranose (11%) e de galactopirranose (36%), além de unidades de manopirranose 2-O-, 2,6-di-O-, 3,6-di-O e 2,3,6-tri-O-substituídos, sendo essa tri -

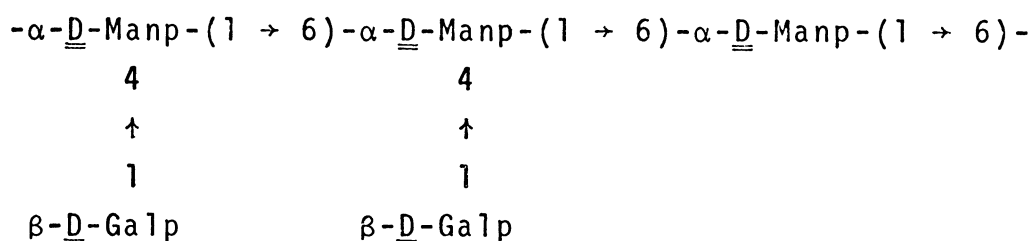
substituição encontrada pela primeira vez em líquens. Com base em dados de I.V. e hidrólise enzimática os resíduos de galactopiranosose apresentavam configuração β , enquanto os resíduos de manopiranosose apresentavam configuração predominantemente α .

NISHIKAWA e colaboradores (64) estudando quatro espécies de líquens do gênero *Cladonia*, *C. crispata*, *C. mitis*, *C. rangiferina* e *C. squamosa* verificaram a presença de heteroglicanas complexas, solúveis em água fria, constituídas principalmente de manose, galactose e glucose. Anteriormente, TAKAHASHI e colaboradores (87) provaram a existência de heteropolissacarídeo (manose-galactose 3:2), solúvel em água fria, obtido a partir de cultura de micobionte do líquen *Cladonia mitis*.

TAKAHASHI e colaboradores (85) estudando polissacarídeos de líquens "sterocaulaceus", solúveis em água e separáveis por processo de congelamento-degelo e cromatografia em DEAE-celulose, dividiu-os em dois grupos: glucanas e heteropolissacarídeos através de análises em composição de açúcar, conteúdo de nitrogênio, rotação específica e I.V. . As espécies *St. vesuvianum*, *St. tomentosum* e *St. intermedium* se caracterizam por β -heteroglicanas, contendo manose-galactose e glucose, este último açúcar possivelmente como contaminante.

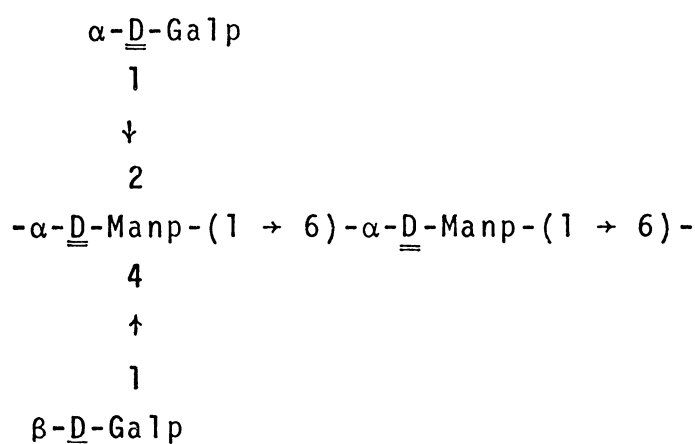
GORIN e IACOMINI (28) estudando a *C. islandica* e *Ramalina usnea* isolaram a partir da extração aquosa, seguida de procedimentos de congelamento degelo e precipitação em solução de Fehling, um heteropolissacarídeo constituído de manose, galactose e glucose. A hidrólise parcial do heteropolissacarídeo isolado da *R. usnea* forneceu um polímero residual com rotação específica de + 61º, contendo 17% de D-galactose e 83% de D-manose. De acordo com estudos de metilação mostrou ser constituído principalmente de resíduos de D-manopiranosil (66%) ligados (1 → 6), com grupos terminais não redutores D-manopiranosil (11%) e D-galactopiranosil (14%), assim como resíduos de D-manopiranosil 4,6-di-O-(7%) e 2,6-

di-O-substituídos (2%). O espectro de ^{13}C -n.m.r. da D-galacto-D-manana original mostrou D-galactopiranosil na configuração β (C-1 em δ 104,8). Após esses dados a cadeia básica da galactomana (Estrutura 3) pode ser representada como:



Estrutura 3

A galactomanana da *C. islandica* mostrou-se mais ramificada possuindo resíduos de β -D-galactopiranosil substituindo as posições 4 e 2 dos resíduos α -D-manopiranosil



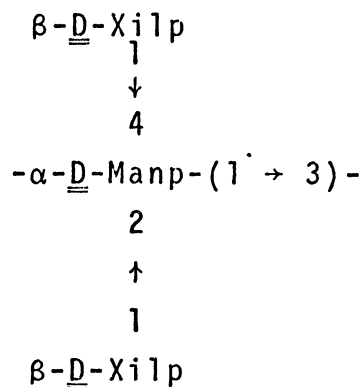
Estrutura 4

Seis outros líquens foram estudados por GORIN e IACOMINI (29), *Parmelia sulcata*, *St. paschale*, *Peltigera aphthosa*, *L. vulpina*, *A. muehlenbergii* e *Usnea* sp. onde galactomananas foram encontradas através de precipitação em solução de Fehling. Estudos analíticos mostraram que a cadeia principal era constituída de resíduos α -D-manopiranosil ligados (1 \rightarrow 6), substituídos nas

posições 2 ou 4 ou 2,4. Os substituintes era β -D-Galp (1 \rightarrow 4), α -D-Galp e α -D-Manp (1 \rightarrow 2) e β -D-Galf (1 \rightarrow 4).

Três espécies de *Cladonia* foram investigadas por IACOMINI e colaboradores (40), *C. alpestris*, *C. confusa* e *C. amaurocraea*. As duas primeira espécies apresentaram galactomananas a partir da extração com KOH aquoso e posterior formação de complexos cúpricos insolúveis pela adição de solução de Fehling. Análises baseadas na composição monossacarídica, hidrólise parcial, rotação específica, dados de metilação e acetólise parcial revelaram galactomananas contendo cadeias principais de α -D-manopiranosil (1 \rightarrow 6), sendo algumas 2-O-substituídas por α -D-manopiranosil ou 4-O-substituídas por β -D-galactopiranosil e algumas ainda 2,4-di-O-substituídas. Galactomananas estruturalmente diferentes foram obtidas no sobrenadante da solução de Fehling. *C. alpestris* continha galactose, manose e alguma glucose, com maior proporção de resíduos α -D-manopiranosil unidos em ligação (1 \rightarrow 2) e substituídos na posição 6 por β -D-galactofuranosil. *C. amaurocraea* apresentou uma galactomanana, porém através de seu espectro de ^{13}C -n.m.r. era estruturalmente diferente das outras galactomananas estudadas.

Um heteropolissacarídeo constituído de ramnose, fucose, xilose, manose, glucose e galactose, além de 5,1% de proteína, foi encontrado no líquen *Cora pavonia* (92). Este composto (Estrutura 5) após ser obtido por extração aquosa e sucessivos tratamentos com solução de Fehling formando complexo cúprico insolúvel, mostrou-se homogêneo na ultracentrifugação e, através de cromatografia em Sepharose Gel 4B-200 e eletroforese em tampão barbital, mostrou uma banda de açúcar e proteína. Tal estrutura é típica da parede celular de basidiomicetos (25).



Estrutura 5

Trabalhos já haviam sido realizados com líquens da família Stictaceae (86), em que glicopeptídeos foram encontrados em *Lobaria orientalis*, *Lobaria isidiosa*, *Lobaria pseudopulmonaria*, *Lobaria linita*, *Lobaria japonica*, *Sticta gracilis* e *Sticta wrightii*. Um estudo mais detalhado foi efetuado em *L. orientalis*. A fração polissacarídica foi obtida por adição de etanol ao extrato aquoso e posteriormente cromatografada em coluna de Sephadex G-200, fornecendo três frações distintas uma das outras. As frações coletadas e liofilizadas deram cada uma um único pico na ultracentrifugação e eletroforese. Duas delas mostraram ser glicopeptídeos, sendo a parte de carboidratos constituída principalmente de galactose e glucose, com menor quantidade de xilose, ramnose, arabinose e manose. Os valores de rotação específica e I.V. mostraram que a configuração β era predominante na molécula.

O crescente interesse pelo estudo dos líquens vem do fato de vários polissacarídeos, em maior ou menor grau, terem se mostrado ativos contra Sarcomas 180 implantados subcutaneamente em ratos.

Polissacarídeos derivados de fontes naturais como plantas superiores, fungos, leveduras e algas (20) mostraram inibir o crescimento de tumores transplantados. Trabalhos posterior-

res foram efetuados no sentido de isolar tais macromoléculas , a partir de líquens.

β -Glucanas (1 \rightarrow 6) parcialmente acetiladas obtidas de líquens *G. esculenta* (20), *U. angulata*, *U. caroliniana* e *U. polyphylla* (65), isoladas em estado puro, tiveram seu efeito antineoplásico testado, havendo alta proporção de inibição. Tal efeito também foi observado em liquenana e isoliquenana obtida de *C. islandica*, as quais apresentam ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) e mostraram uma inibição de 100 e 99,6%, respectivamente. Acreditava-se que a ação antineoplásica desses polissacarídeos esteja ligada a distribuição uniforme destas ligações ao longo da cadeia linear do polímero. O emprego da degradação de Smith e hidrólise ácida suave são importantes processos químicos utilizados na determinação da sequência das ligações na estrutura destes homopolímeros.

Heteropolissacarídeos encontrados em líquens do gênero *Cladonia* também apresentaram atividade, embora moderada, contra Sarcoma 180 (64).

A ação antineoplásica desses polissacarídeo parece ser mediada pelo hospedeiro, uma vez que a regressão do tumor não ocorre de imediato e sim após algum tempo. Nenhum efeito citotóxico foi observado.

O objetivo deste trabalho foi promover o isolamento e a análise estrutural de polissacarídeos obtidos por extrações aquosa e alcalina, assim como oligossacarídeos obtidos por extração metanol-água do líquen *Sticta damaecornis*. A importância primordial na caracterização estrutural destes componentes baseia-se no fato de que, futuramente, eles possam ser testados quanto às suas possíveis atividades antineoplásicas.

M A T E R I A I S E M É T O D O S

1. MÉTODOS GERAIS

As rotações ópticas foram obtidas com polarímetro automático Perkin-Elmer, modelo 141 a 25°. Para estas determinações os polissacarídeos e oligossacarídeos foram solubilizados em água.

As evaporações foram realizadas em evaporador rotatório, modelo Büchi, à vácuo e em banho de água com temperatura nunca superior a 50°.

As medidas de pH foram tomadas à temperatura ambiente em aparelho Metrohm.

As determinações espectrofotométricas foram efetuadas em aparelho Coleman Junior, modelo 6A, para região do espectro visível.

A cromatografia líquida-gasosa (g.l.c.) foi realizada em Cromatógrafo Varian, modelo 2440, com detector de ionização de chama, usando-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, sendo utilizada para determinação quantitativa dos acetatos de alditóis (à temperatura de 180° ou com programação de temperatura de 130° a 180°, com variação de 4° por minuto, então mantido) e dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (à temperatura de 160°) sendo seus tempos de retenção (T) relativos ao do xilitol penta-O-acetato e do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, respectivamente. As determinações quantitativas dos materiais analisados por g.l.c. foram ob-

tidas de acordo com o método de triangulação, segundo SAWARDEKER e colaboradores (79).

A cromatografia líquida-gasosa acoplada a espectrometria de massa (g.l.c.-m.s.) foi realizada com os derivados acetatos de alditóis parcialmente metilados em espectrômetro marca Finigan, modelo 4000, dotado de um sistema de dados Incos 2300 e equipado com coluna capilar (30m x 0,25mm.d.i.) revestida com OV-225 e OV-17 na proporção de 3:1 (26) e DB-210. Os espectros foram obtidos por impacto de elétrons, repetitivamente a cada 2 segundos, desde massa 40 até 420. As injeções foram feitas diretamente na coluna a 50°, utilizando a técnica "split" (34) e então, o aparelho foi rapidamente programado (40°/min.) a 220° (então mantido), Hélio foi utilizado como gás de arraste com velocidade linear de 22 cm/s. A identificação final dos produtos foi realizada por co-injeção com padrões e as áreas dos picos foram obtidos por integração automática.

Os espectros de ressonância nuclear magnética de carbono ^{13}C (^{13}C -n-m.r.) foram obtidos pelo uso de um espectrômetro Bruker AM-360 WB incorporado ao transformador de Fourier. Oligossacarídeos e polissacarídeos (10-100 mg) foram examinados como soluções em D_2O . Estas soluções (2 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 foram: "spectral width" de 18.519 Hz, "acquisition time" de 0.44s, "pulse width" de 21,0 us e "number of transients" de 2.000 a 180.000, dependendo da quantidade de amostra utilizada. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (p.p.m.), relativos à ressonância do Me_4Si (TMS) determinada em experimento separado.

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

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

As cromatografias em papel (c.p.) foram efetuadas pelos métodos ascendente e descendente, utilizando-se como suporte papel Whatman nº 1, com os seguintes sistemas de solventes: Sistema I - benzeno-n-butanol-piridina-água (1:5:3:3, v/v, fase superior); e Sistema II - n-butanol-etanol-água (2:1:1, v/v). A visualização dos açúcares foi efetuada mergulhando as cromatografias em nitrato de prata alcalino (90) e nebulização por cloridrato de para-anisidina (14) para açúcares-redutores. A migração dos oligossacarídeos da extração metanol-água 4:1 foi relacionada à do inositol (R_I).

A determinação quantitativa de carboidratos totais foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico descrito por DUBOIS e colaboradores (16). A determinação quantitativa de proteínas foi feita com o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo processo descrito por LOWRY e colaboradores (58).

A composição em açúcares dos oligossacarídeos e polissacarídeos foi determinada da seguinte maneira:

1) Hidrólise ácida total: amostras de aproximadamente 5 mg foram tratadas com ácido sulfúrico (H_2SO_4) (2) 0,5M (2 mL) e aquecidas a 100° por cerca de 16 horas. Após esse tempo, a solução foi neutralizada com $BaCO_3$ e a suspensão filtrada. O filtrado foi passado por resina Dowex 50 W x 8 (forma H^+) para remoção de traços dos íons bário, concentrado a vácuo e cromatografado em papel para detecção dos monossacarídeos.

2) Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida total: as misturas de açúcares obtidas dos hidrolisados foram reduzidas com boridreto de sódio (81) à temperatura ambiente por 16 horas. Após esse período, com a finalidade de eliminar os cátions sódio, as soluções reduzidas foram tratadas com resina Dowex 50 W x 8 (forma H^+), que converteu o sal borato de sódio em ácido livre. As soluções foram, a seguir, filtradas por papel e os filtrados resultantes foram evaporados à secura. O ácido bórico re-

sultante deste tratamento foi evaporado a vácuo como éster volátil borato de trimetila , por sucessivas co-destilações com metanol. Os alditóis foram acetilados (97), usando-se anidrido - acético-piridina na proporção de 1:1 (v/v) à temperatura ambiente, durante 14 horas. Posteriormente, o processo de acetilação foi interrompido pela adição de gelo e os açúcares acetilados foram extraídos com clorofórmio. Por tratamentos sucessivos com ácido sulfúrico 0,5M, a piridina residual foi eliminada. 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. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO LÍQUEN *Sticta damaecornis* (Sw.) Ach.

O líquen *Sticta damaecornis*, bastante comum no sul do Brasil, foi coletado em Tomás Coelho, município de Araucária, Estado do Paraná, próximo à várzea do rio Passaúna. Dispõe-se sobre troncos, posicionando-se preferencialmente para o leste ou sudeste, ocupando geralmente baixas altitudes, em média até dois (2) metros, ambiente de sombra e elevado grau de umidade. Comumente encontra-se associado a musgos, ocorrendo em vales e próximo a córregos. Tem seu máximo crescimento em época de chuvas regulares, perdendo em tonalidade de cor esverdeada para um verde bem claro (cinza), passando a superfície inferior de amarela a esbranquiçada.

Esse líquen caracteriza-se por possuir um talo foliáceo assentado frouxamente ao substrato, por meio de seus feixes de rizóides (rizina) donde pode ser destacado facilmente. Faz parte dos Ascolíquens (os líquens são classificados primariamente pelo tipo de fungo que compõe a associação-ascomiceto) com a alga

componente da associação sendo uma clorofícea (algas verdes) do gênero *Pleurococcus* (17).

3. ISOLAMENTO DOS ALDITÓIS, OLIGOSSACARÍDEOS E POLISSACARÍDEOS DO LÍQUEN *Sticta damaecornis* (Sw.) Ach.

O líquen foi inicialmente limpo para a retirada de musgos e outros vegetais contaminantes. Lavado rapidamente, em água corrente, para a retirada de terra, seco por 48 horas à temperatura ambiente e após, em estufa a 50° por mais 5 horas. Posteriormente foi pulverizado em moído da marca Willy sob malha nº 20, a fim de que um pó mais fino fosse obtido para as extrações. Em seguida foi submetido a quatro diferentes processos de extração para a obtenção de seus constituintes químicos.

3.1 - EXTRAÇÃO BENZENO-ETANOL

O líquen limpo, completamente seco e moído (93,7 g) foi submetido ao primeiro processo de extração com a mistura benzeno-etanol (9:1, v/v, 1000 mL), sob refluxo, por 4 1/2 horas. Essa mistura tem a propriedade de extrair óleo, ceras e gorduras, além de possíveis ácidos liquênicos. Após filtração a quente, o extrato foi descartado, enquanto que o líquen residual foi seco em estufa a 50° por 1 hora, uma vez que a temperatura ambiente ele não secava completamente.

3.2 - EXTRAÇÃO METANOL-ÁGUA

O resíduo da extração benzeno-etanol (89,1 g) foi tratado com metanol-água (4:1, v/v 1000 mL), sob refluxo, por 5 horas. Foi filtrado a quente e o extrato resultante evaporado à secura, sendo posteriormente solubilizado em água e deionizado pelas resinas Dowex 50W x 8 (forma H⁺) e Dowex 2 x 8 (forma HCO₃⁻). Após

dessalificação o extrato foi evaporado *à secura* (7,3 g).

Fracionamento dos Alditóis e Oligossacarídeos por Cromatografia em Coluna de Carvão-Celite 1:1

Três gramas do extrato metanol-*água* foram aplicados a uma coluna de carvão-Celite com 40 mm x 95 mm, em funil de placa porosa, preparada de acordo com WHISTLER e DURSO (95). A eluição foi realizada, inicialmente, com 2 litros de *água* destilada, para obtenção dos alditóis e as frações coletadas foram de aproximadamente 250 mL. Após eluição com *água*, usou-se *água-etanol* a 30% (2500 mL), para obtenção dos oligossacarídeos. Cada fração (250 mL) foi sucessivamente concentrada a pequeno volume e cromatografada em papel, utilizando-se o sistema de solvente I e o revelador AgNO_3 . As frações F , F_1 , F_2 , F_3 , F_4 e F_5 foram eluídas com *água*; F_6 , F_7 e F_8 foram eluídas com *água-etanol* 30%.

As frações F_2 a F_5 foram reunidas, por apresentarem componentes semelhantes, deionizadas com as resinas catiônica e aniônica, e evaporadas *à secura* (126,0 mg). Da mesma forma as frações 6 a 8 também foram reunidas, deionizadas pelas resinas anteriormente citadas e evaporadas *a secura* (480,0 mg).

Para posterior separação dos oligossacarídeos, estes dois conjuntos de frações foram passados por coluna de celulose, separadamente.

Fracionamento dos Oligossacarídeos por Cromatografia em Coluna de Celulose.

Uma coluna de vidro (com 45 x 3,8 cm d.i.) foi empacotada com uma suspensão de celulose em acetona, observando a técnica descrita por WHISTLER e BeMILLER (94) e GARDELL (21). As frações 2 e 5 provenientes da coluna de carvão-Celite foram aplicadas *à*

coluna de celulose. A eluição foi realizada com acetona-água 10:1 (2000 mL), 7:1 (2000 mL) e 4:1 (1000 mL) e as frações coletadas com volume aproximado de 250 mL.

Uma nova coluna de celulose foi preparada para aplicação das frações 6 a 8. Inicialmente a eluição foi realizada apenas com acetona (500 mL), seguida de soluções de acetona-água 7:1 (2000 mL), 4:1 (1000 mL), 3:1 (1000 mL) e 2,5:1 (2000 mL), sendo o volume das frações coletadas de 50 mL (em 7:1 e 4:1) e 250 mL (em 3:1 e 2,5:1).

À medida que as frações eram eluídas, cromatografias descendentes foram efetuadas no sistema II e reveladas em AgNO_3 alcalino. O tempo de corrida foi de 48 horas.

Uma vez separados, o oligossacarídeo eluído com acetona-água 4:1 foi metilado segundo método de PURDIE modificado por KUHN e colaboradores (38,45), hidrolisado e analisado por g.l.c., na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

3.3 - EXTRAÇÃO AQUOSA

O resíduo liquênico seco (72,1 g), proveniente da extração benzeno-etanol e metanol-água, foi tratado com água a 100°, durante 7 horas, sendo filtrado ainda quente após esse período. O procedimento da extração foi repetido por mais 2 (duas) vezes. Os filtrados provenientes das três extrações foram combinados, concentrados a pequeno volume (mais ou menos 100 mL) e precipitados em excesso de etanol (1000 mL). Após centrifugação (2500 r.p.m., 20 minutos, 10°) foram separados o sobrenadante etanólico (1,2 g) e precipitado etanólico (6,1 g).

O precipitado etanólico foi hidrolisado e cromatografado em papel (Sistema I). Posteriormente, foi feita análise g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos por redução e acetilação dos produtos de hidrólise.

Purificação dos Polissacarídeos do Precipitado Etanólico
por Precipitação com Solução de Fehling

O precipitado etanólico da extração aquosa foi solubilizado em água (50 mL) e adicionado de solução de Fehling (100 mL). Com este procedimento houve formação imediata de um precipitado, e a mistura da reação foi mantida em geladeira por uma noite. Posteriormente foi centrifugado (10.000 r.p.m., 20 minutos, 50°), tendo o sobrenadante de Fehling sofrido um procedimento de neutralização com ácido acético concentrado, sob banho de gelo, dialisado e então deionizado pela resina Dowex 50W x 8 (forma H⁺) e Dowex 2 x 8 (forma HCO₃⁻). O precipitado de Fehling foi lavado sucessivamente com solução de hidróxido de potássio a 2% e metanol, sendo, em seguida, o complexo cúprico insolúvel decomposto por agitação numa suspensão aquosa de Dowex 50W x 8 (forma H⁺), durante duas horas, para posterior filtração. A purificação pela solução de Fehling foi repetida diversas vezes, até que o sobrenadante não mais mostrasse precipitado pela adição da solução de Fehling e, o precipitado não mais revelasse a presença de polissacarídeos solúveis na solução Fehling, que fossem evidenciados por cromatografia em papel do material hidrolisado por H₂SO₄ e detectados pelo teste fenol-ácido sulfúrico (16).

Uma vez que tanto precipitado quanto sobrenadantes da Fehling mostraram-se constituídos por diversos açúcares, um outro

procedimento de purificação foi aplicado através do uso de um sal de amônio quaternário (Cetavlon).

Fracionamento dos Polissacarídeos Obtidos do Precipitado e Sobrenadante de Fehling por Cetavlon (Brometo de Hexadecil trimetilamônio)

Tanto o precipitado quanto o sobrenadante de Fehling, solubilizados em água, foram submetidos a um processo de fracionamento, usando-se sal de amônio quaternário, em diferentes pH, como descrito por SCOTT (80) e DUARTE e JONES (15).

(a) Precipitado de Fehling Extração Aquosa

Em pH 7,0 houve formação de um precipitado que foi decomposto por solução aquosa de cloreto de sódio 4M, o qual foi novamente precipitado por excesso de etanol. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes fornecendo um resíduo com peso de 0,005 g.

O sobrenadante do pH 7,0 foi tratado com tampão borato 3%, pH 8,5 e o precipitado obtido como complexo polissacarídeo boratado com base quaternária, foi descomplexado com solução de ácido acético 2M. O polissacarídeo foi obtido pela adição de excesso de etanol, centrifugado e o processo de solubilização em ácido acético repetido por mais duas vezes. O produto final pesou 0,021 g.

O sobrenadante do precipitado em pH 8,5 foi tratado com alcali até pH 12,0 e, não havendo formação de precipitado, a solução foi neutralizada com ácido acético, em banho de gelo, e adicionada em excesso de etanol. O precipitado, após centrifugação foi submetido a dois tratamentos de dissolução com ácido acético 2M e precipitação em etanol. O precipitado resultante pesou 0,003 g.

(b) Sobrenadante de Fehling Extração Aquosa

Em pH 7,0 houve formação de um precipitado que foi decom -

posto por solução de cloreto de sódio 4M e precipitado por excesso de etanol. Esse procedimento de solubilização em cloreto de sódio e precipitação em etanol foi repetido por mais duas vezes, fornecendo um resíduo com 0,019 g.

O sobrenadante do pH 7,0 foi tratado com igual volume de borato 3% pH 8,5, resultando na formação de um precipitado (complexo polissacarídico boratado com base quaternária) que se desfez pela adição de solução de ácido acético 2M. A solução foi adicionada em excesso de etanol e o precipitado tratado por mais duas vezes como descrito, fornecendo um produto de 0,026 g.

O sobrenadante foi tratado com solução de NaOH aquosa a 40% para levar o pH até 12,0, não havendo porém formação de precipitado. Em seguida, a solução foi neutralizada com ácido acético, em banho de gelo, concentrada a pequeno volume e adicionada em excesso de etanol. Após centrifugação o precipitado foi dissolvido em ácido acético 2M e precipitado em excesso de etanol. A dissolução e precipitação foram repetidas por mais duas vezes, fornecendo um resíduo, que após liofilização, pesou 0,096g. O polissacarídeo foi submetido a hidrólise e cromatografia em papel (Sistema I), seguido de redução, acetilação e análise por g.l.c.

3.4 - EXTRAÇÃO ALCALINA

O resíduo liquênico proveniente da extração aquosa (55,8g) foi tratado com solução de hidróxido de potássio a 2%, 100g, durante 2 horas. Em seguida filtrou-se a quente, e o extrato resultante foi neutralizado com ácido acético concentrado, em banho de gelo, evaporado até pequeno volume e os polissacarídeos precipitados em excesso de etanol. O precipitado etanólico obtido após centrifugação (2500 r.p.m., 20 minutos, 10g) forneceu um produto de 24,10 g.

O precipitado etanólico foi hidrolisado e cromatografado

em papel (Sistema I). Posteriormente, foi feita análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos por redução e acetilação dos produtos de hidrólise.

Purificação dos Polissacarídeos do Precipitado Etanólico
com Solução de Fehling

O precipitado etanólico da extração alcalina foi solubilizado em água e colocado em diálise contra água corrente por uma noite e então, concentrado até pequeno volume e submetido a processo de purificação por congelamento e degelo à temperatura de 4°. Houve formação de resíduo de origem não carboidratada, de tal forma, que se estudou apenas o sobrenadante desse tratamento. O procedimento de gelo-degelo foi repetido por mais quatro vezes, até que nenhum resíduo se formasse. O sobrenadante foi concentrado a pequeno volume (100 mL) e adicionado de solução de Fehling (200 mL), onde houve formação imediata de um precipitado, ficando a mistura da reação por uma noite em geladeira. Posteriormente o material foi centrifugado (10.000 r.p.m., 20 min. 5°), tendo o sobrenadante de Fehling sofrido uma neutralização com ácido acético concentrado, sob banho de gelo, dialisado e então deionizado pelas resinas Dowex 50 W x 8 (forma H⁺) e Dowex 2 x 8 (forma HCO₃⁻). O precipitado de Fehling foi lavado sucessivamente com hidróxido de potássio aquoso 2% a frio e metanol. O complexo cúprico insolú

vel foi decomposto por agitação em suspensão aquosa de Dowex 50W x 8 (forma H^+) por aproximadamente duas horas, filtrado e concentrado a pequeno volume. A purificação pela solução de Fehling foi repetida por quatro vezes até que o sobrenadante de Fehling não mais formasse precipitado quando da adição de solução de Fehling e o precipitado, apresentasse a composição em açúcares constante.

Uma vez que tanto precipitado quanto sobrenadante de Fehling mostraram-se constituídos por diversos açúcares, um outro procedimento de purificação foi aplicado, através do uso de Cetavlon.

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

Sobrenadante e Precipitado de Fehling, solubilizados em água, foram submetidos a um processo de fracionamento, usando-se sal de amônio quaternário, em diferentes pH, como descrito por SCOTT (80) e DUARTE e JONES (15).

(a) Precipitado de Fehling Extração Alcalina

Em pH 7,0 formou-se um pequeno precipitado que foi decomposto por solução aquosa de cloreto de sódio 4M e precipitado em excesso de etanol. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes fornecendo um pequeno resíduo, de tal forma que não foi estudado.

O sobrenadante resultante da precipitação em pH 7,0 foi tratado com tampão borato a 3%, pH 8,5 onde houve formação de uma grande quantidade de precipitado, obtido na forma de complexo polissacarídico boratado com base quaternária, o qual foi desfeito pelo tratamento com ácido acético 2M. O material solúvel em ácido acético foi precipitado em excesso de etanol, centrifu-

gado e o processo de dissolução em ácido acético e precipitação em etanol foi repetido por mais duas vezes, fornecendo um resíduo final com peso de 0,978 g.

O sobrenadante resultante da precipitação em pH 8,5 foi tratado com NaOH aquoso a 40% até pH 12,0 onde houve formação de um precipitado, em pequena quantidade, de tal forma que não foi estudado.

Visto que os polissacarídeos precipitados em pH 7,0 e 12,0 apresentaram-se em quantidades mínimas, não tiveram suas estruturas investigadas.

O polissacarídeo resultante do pH 8,5 foi submetido a hidrólise e cromatografia em papel (Sistema I). Posteriormente foi efetuada uma análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos pela redução e acetilação dos produtos de hidrólise.

(b) Sobrenadante de Fehling Extração Alcalina

Em pH 7,0 houve formação de um precipitado que foi decomposto por cloreto de sódio aquoso 4M e precipitado por excesso de etanol. Esse procedimento de dissolução em cloreto de sódio e precipitação em etanol foi repetido por mais duas vezes, fornecendo em resíduo com 0,007 g.

O sobrenadante resultante da precipitação em pH 7,0 foi tratado com tampão borato a 3%, pH 8,5 onde houve formação de um precipitado, que se desfez pela adição de ácido acético 2M. A essa solução foi adicionado excesso de etanol e o precipitado resultante sofreu mais duas vezes a dissolução em ácido acético e precipitação em etanol, fornecendo um produto pesando 0,130 g. Posteriormente foi feita uma hidrólise e cromatografia em papel (Sistema I), seguido de análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos pela redução e acetilação dos produtos de hidrólise.

4. METILAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEO E POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO LIQUEN *Sticta damaecornis* (Sw.) Ach.

4.1. METILAÇÃO DO OLIGOSSACARÍDEO OBTIDO NA EXTRAÇÃO METANOL-ÁGUA

Uma amostra liofilizada do oligossacarídeo (5 mg) eluido com acetona-água 4:1, dissolvida em N,N dimetil formamida (2 mL), foi deixada em agitação por quatro horas e posteriormente em banho maria a 100°, por uma hora. Após o material estar totalmente solubilizado, foram adicionados 2 mL de iodeto de metila e rapidamente 1 g de óxido de prata, de acordo com método descrito por PURDIE e modificado por KUHN e colaboradores (38,45). Nos quatro dias seguintes foram adicionados óxido de prata (1,0 g), por dia, sendo sempre o sistema mantido em agitação constante e em ausência de luz. Vinte e quatro horas após a última adição de óxido de prata. o processo foi interrompido pela extração exaustiva do material com diclorometano, seguida da filtração em papel. O filtrado foi evaporado a secura e o oligossacarídeo metilado foi convertido em acetatos de alditóis parcialmente metilado, como será descrito , posteriormente.

4.2 - METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS NA EXTRAÇÃO AQUOSA (Sobrenadante pH 12,0) E ALCALINA (Precipitação pH 8,5, Sobrenadante pH 8,5 e Sobrenadante pH 12,0).

Uma amostra de cada polissacarídeo (20 mg) foi reduzida com boroidreto de sódio, à temperatura ambiente, por aproximadamente 16 horas, sendo posteriormente neutralizada com ácido acético 2M, em banho de gelo e dialisada em água corrente durante uma noite. A fração não dialisável foi evaporada à secura e submetida à metilação, segundo processo descrito por Haworth (37, 38).

O material, em balão de evaporação, foi dissolvido em 15 ml de NaOH aquoso a 33%, sob agitação. Dez adições de sulfato de dimetila (0,5 mL) foram feitas em intervalos de 20 minutos. Este processo foi repetido por três dias consecutivos, ficando o material em agitação, em balão completamente vedado. O processo de metilação foi interrompido no 4º dia consecutivo pelo aquecimento do balão a 100º, durante 30 minutos com o objetivo de decompor o excesso de sulfato de dimetila. Após o material estar resfriado, foi neutralizado com ácido acético concentrado, sob banho de gelo, e dialisado em água corrente por três dias e em água destilada por um dia. Após o período de diálise o polissacarídeo parcialmente metilado foi liofilizado e submetido ao tratamento com Ag₂O e iodeto de metila, de acordo com o método de PURDIE modificado por KUHN e colaboradores (38,45).

O processo de KUHN foi exatamente como descrito para o oligossacarídeo, apenas com três adições de Ag₂O, ao invés de cinco. Os produtos metilados foram extraídos com diclorometano e con

vertidos em acetatos de alditóis.

5. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DOS OLIGOSSACARÍDEO E POLISSACARÍDEOS METILADOS NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS

A hidrólise foi efetuada de acordo com SELVENDRAN e colaboradores (81). Em tubo selado, contendo material metilado (10 mg para polissacarídeos e 3 mg para oligossacarídeo), foi adicionado H_2SO_4 aquoso (0,5 mL) a 72%, em banho de gelo, agitando suavemente, até total solubilização. O material permaneceu em repouso por uma hora, e então foram adicionados 4 mL de água destilada para diluir o ácido (até ~ 0,5M). O tubo, completamente vedado, foi colocado em estufa a 100° por 18 horas. Após esse tempo o excesso de ácido sulfúrico foi neutralizado com $BaCO_3$ e o filtrado deionizado através de resina Dowex 50W x 8 (forma H^+). Após concentração do material a pequeno volume, foi feita uma redução com boroidreto de sódio, à temperatura ambiente, durante 15 horas. Os íons sódio foram eliminados pelo tratamento com resina Dowex 50W x 8 (forma H^+) e o ácido bórico eliminado sob forma de borato de trimetila, por co-destilação com metanol. A acetilação dos alditóis metilados foi realizada pela adição de anidrido acético-piridina 1:1 (1 mL).

Os produtos metilados na forma de acetatos de alditóis foram analisados por g.l.c. em coluna convencional de ECNSS-M 3% em Gas Chrom. Q e por g.l.c.-m.s. em colunas capilares revestidas com OV-225 - OV-17 3:1 e DB 210.

6. DEGRADAÇÃO TIPO SMITH DO POLISSACARÍDEO

O polissacarídeo (30 mg) que precipitou em pH 8,5 (obti-

do do precipitado de Fehling extração alcalina), solubilizado em água (25 mL), foi oxidado com *meta*-periodato de sódio 0,05M (25 mL) por 96 horas, à temperatura de 0° - 4° e na ausência de luz (36). O excesso de agente oxidante foi destruído pela adição de etileno-glicol (3 mL) e em seguida dialisado contra água corrente por aproximadamente 15 horas. Posterior a diálise o polialdeído foi reduzido com boroidreto de sódio (1,39), durante 15 horas, à temperatura ambiente. A redução foi interrompida pela adição de ácido acético 2M, em banho de gelo, até pH 6,0 e a solução novamente dialisada por mais 15 horas. A fração não dialisável foi concentrada a 2 mL e em seguida hidrolisada pela adição de H₂SO₄ 0,5M (2 mL), 100°, 5 horas. Após o período de hidrólise o meio ácido foi neutralizado com BaCO₃ e filtrado, sendo este deionizado com resina Dowex 50W x 8 (forma H⁺), evaporado a pequeno volume e cromatografado em papel (Sistema I). O material hidrolisado foi reduzido com boroidreto de sódio e acetilado com anidrido acético-piridina 1:1. Os acetatos de alditóis foram analisados por g.l.c. em coluna convencional ECNSS-M 3% em Gas Chrom. Q., com programação de temperatura de 130-180°, (então constante) pela variação de 4° por minuto.

7. HIDRÓLISE PARCIAL DO POLISSACARÍDEO PRECIPITADO EM pH 8,5. OBTIDO DO PRECIPITADO DE FEHLING DA EXTRAÇÃO ALCALINA

O polissacarídeo (100 mg) foi tratado com H₂SO₄ 0,16M (10 mL) por 18 horas a 100° (40). O hidrolisado foi neutralizado com BaCO₃ e o filtrado deionizado por resina Dowex 50W x 8 (forma H⁺). Após o material ser concentrado a pequeno volume (2 mL), foi precipitado em excesso de etanol (10 mL), centrifugado, solubilizado em água e novamente precipitado em etanol.

O precipitado etanólico, após ser pesado (17 mg, 17%), te

ve uma alíquota de 5 mg retirada para hidrólise com H_2SO_4 . O excesso do ácido foi neutralizado com $BaCO_3$ e o filtrado deionizado com resina Dowex 50W x 8 (forma H^+). Em seguida, o material foi concentrado a pequeno volume e reduzido com boroidreto de sódio, à temperatura ambiente, durante 10 horas. Os íons sódio foram eliminados pelo tratamento com resina Dowex 50W x 8 (forma H^+) e o ácido bórico eliminado sob a forma de borato de trimetila, por co-destilação com metanol. A acetilação dos alditóis foi realizada pela adição de anidrido acético-piridina 1:1 (1 mL).

Cinco (5) miligramas deste material foram metilados (41) e analisados por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

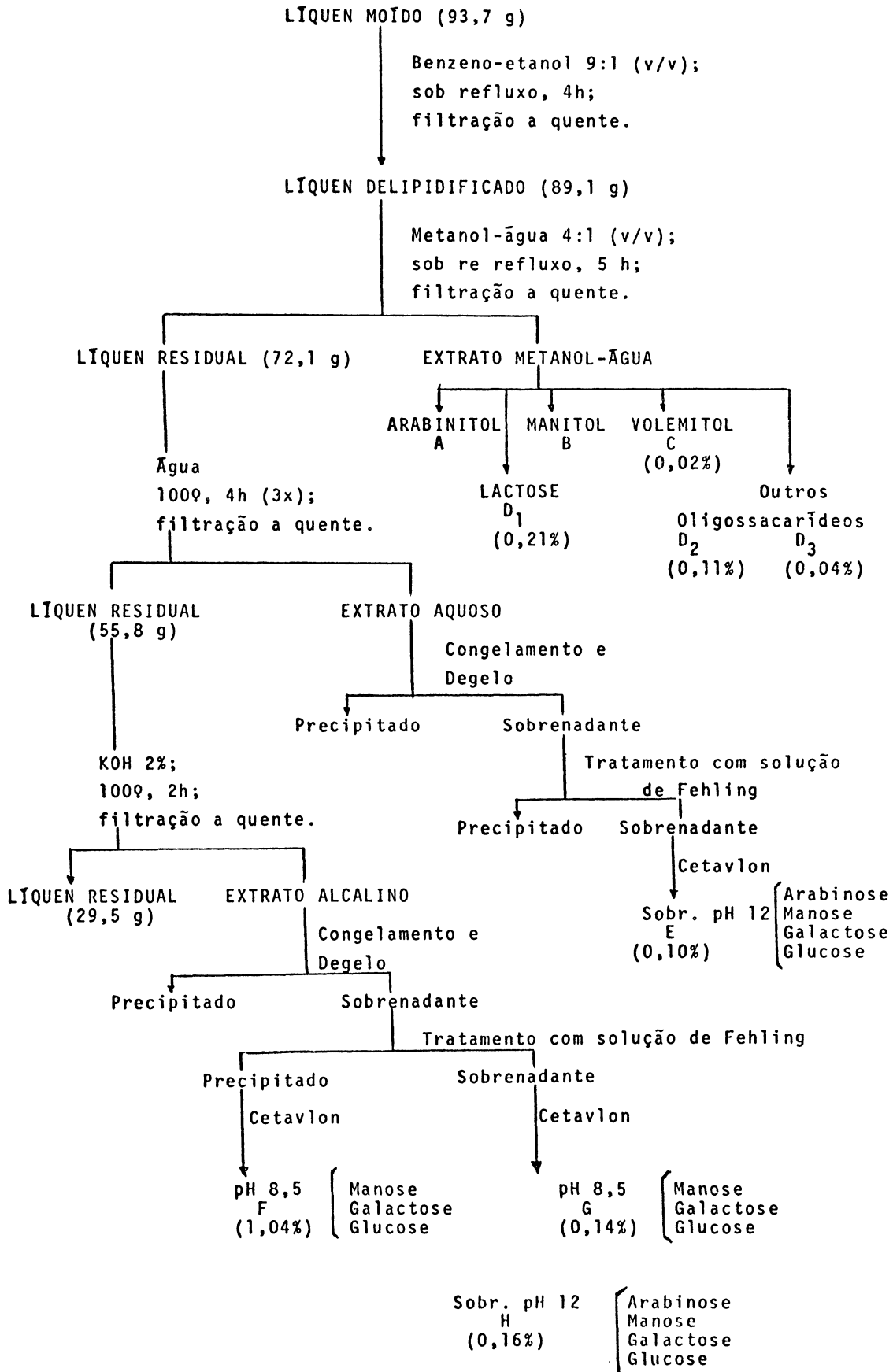
R E S U L T A D O S E D I S C U S S Ã O

Sticta damaecornis é um líquen foliáceo, mais ou menos esverdeado, dotado de odor desagradável. Tem como micobionte um ascomiceto, ainda desconhecido, sendo a alga componente da associação uma clorofícea do gênero *Pleurococcus* (17). Há informações na literatura (3) que alguns líquens da família Stictaceae, como *Lobaria scrobiculata*, *Sticta fuliginosa* e *Sticta* spp., têm como ficobiontes algas verde-azuladas do gênero *Nostoc*. Até o presente momento a espécie *damaecornis* não foi estudada em relação aos seus componentes carboidratados, embora alguns líquens da família Stictaceae tenham sido estudados por TAKAHASHI e colaboradores (86), quanto a possível atividade antineoplásica dos polissacarídeos deles obtidos.

O líquen *Sticta damaecornis* (Sw.) Ach., frequentemente encontrado no sul do Brasil, foi coletado em Tomás Coelho, município de Araucária, Estado do Paraná, próximo a várzea do rio Passaúna. Foi limpo para a retirada de musgos, lavado em água corrente, seco e moído. Posteriormente foi submetido a quatro processos diferentes de extração, como mostrado a seguir (Esquema I).

ESQUEMA - I

PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES QUÍMICOS EXISTENTES NO LÍQUEN *Sticta damacornis* (Sw.) Ach.



1. COMPONENTES SOLÚVEIS NO EXTRATO METANOL-ÁGUA

O líquen inicialmente extraído com benzeno-etanol para remoção de material apolar (4,9%) foi tratado com metanol-aquoso a 80% sob refluxo, para extração de carboidratos de baixo peso molecular.

1.1 - CARACTERIZAÇÃO DOS ALDITÓIS ARABINITOL E MANITOL

O extrato metanol-água, após deionização, (7,3 g, rendimento 7,8 g%) forneceu por cromatografia em papel (sistema I) e revelação por AgNO_3 alc. arabinitol (R_I 4,4), manitol (R_I 3,5) e um componente com mobilidade próxima a do inositol. A análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos após acetilação do extrato metanol-água forneceu somente arabinitol (43%, $T = 0,72$) e manitol (57%, $T = 2,0$), porém nada correspondente ao inositol, conforme Tabela 1. Os acetatos de polióis obtidos após redução e acetilação encontravam-se na mesma proporção da fração apenas acetilada, o que nos levou a concluir na ausência de monossacarídeos livres, em solução. Após hidrólise ácida e posterior análise dos acetatos de alditóis, glucose e galactose também foram detectadas, além de arabinitol e manitol (Tabela 1) sugerindo a existência de oligossacarídeos nesse extrato.

Com o objetivo de separar oligossacarídeos de alditóis, três (3,0) gramas de extrato metanol-água deionizado, foram adicionados a uma coluna de carvão-Celite 1:1. A eluição foi inicialmente realizada com dois litros de água destilada e as frações coletadas com volume aproximado de 250 mL. As frações eluídas com água destilada foram denominadas de F até F₅.

Por cromatografia em papel (Sistema I) e revelação por

TABELA 1

ANÁLISE POR G.L.C. (a) DO EXTRATO METANOL-ÁGUA 4:1 do LÍQUEN *S. damaecornis*.

Componentes	T (b)	Composição relativa %		
		MA ₁	MA ₂	MA ₃ ^(c)
Arabinitol	0,7	43	44	45
Manitol	2,0	57	56	48
Galactose	2,5	-	-	5
Glucose	2,9	-	-	2

(a) Coluna convencional de ECNSS-M a 3% (p/p) em Gas Chrom. Q. com temperatura de 180°.

(b) Tempos de retenção, em relação ao do xilitol penta-0-acetato, dos acetatos de alditóis derivados.

(c) Para obtenção do gráfico com material hidrolisado, reduzido e acetilado a temperatura da coluna foi de 155°.

MA₁ - Material simplesmente acetilado.

MA₂ - Material reduzido e acetilado.

MA₃ - Material hidrolisado, reduzido e acetilado.

AgNO₃ alc. as frações F e F₁ apresentaram unicamente arabinitol e manitol. A F₂ apresentou arabinitol, manitol e um componente com R_I 1,94. F₃, F₄ e F₅ apresentaram esse último componente e traços de arabinitol.

As frações eluídas com água-etanol a 30% foram denominadas F₆ a F₈. Por cromatografia em papel (Sistema I) e revelação por AgNO₃ alc. mostraram um componente principal com R_I 1,17, além de traços de dois outros com R_I 0,51 (contaminado com R_I 0,75) e R_I 0,25.

1.2 - CARACTERIZAÇÃO DO VOLEMITOL

Com a finalidade de se obter o componente com R_I 1,94 livre de arabinitol e manitol, as frações F₂ a F₅ foram reunidas e o produto (126 mg) submetido a cromatografia de partição em coluna de celulose, sendo a eluição realizada com soluções de acetona - água (v/v) em proporções crescentes de água.

A medida que as frações eram eluídas e concentradas, cromatografias descendentes (Sistema II) foram efetuadas. Arabinitol e manitol foram eluídos com acetona-água 10:1, e o componente com R_I 1,94 (denominado C segundo Esquema I, 21,0 mg) foi eluído com acetona-água 7:1. O teste negativo pela revelação com cloridrato de *p*-anisidina indicou tratar-se de um açúcar não redutor. Por cromatografia em papel o componente C se movia mais lentamente que o manitol e por análise em g.l.c. do acetato derivado, seu tempo de retenção era maior que os dos hexacetatos de hexitóis. Em virtude destes resultados, supôs-se que se tratava de um heptitol, desde que na literatura já havia sido encontrado álcoois com sete carbonos como volemitol (48) e sifulitol (50).

O espectro de ¹³C-n.m.r. do composto C (Figura 1A) foi comparado ao de um padrão autêntico de volemitol (Figura 1B, Estrutura 6) isolado do líquen *Dermatocarpon miniatum* (48). Os seis si-

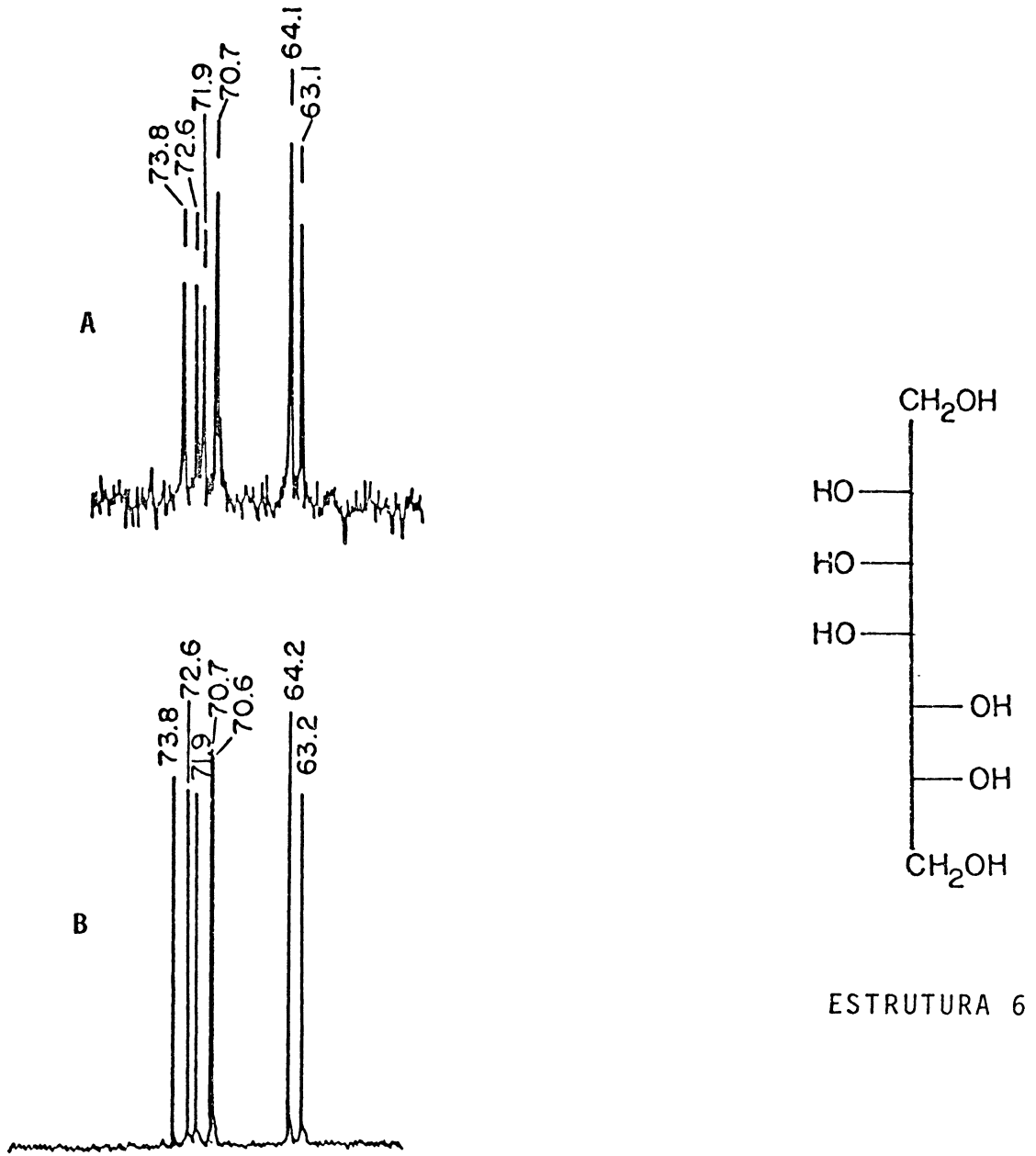


Figura 1 - Espectros de ^{13}C -n.m.r. dos alditóis volemitol, em óxido de deutério (D_2O), a 70º. Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

- A - Isolado do líquen *S. damaecornis*
- B - Isolado do líquen *Dermatocarpon miniatum*

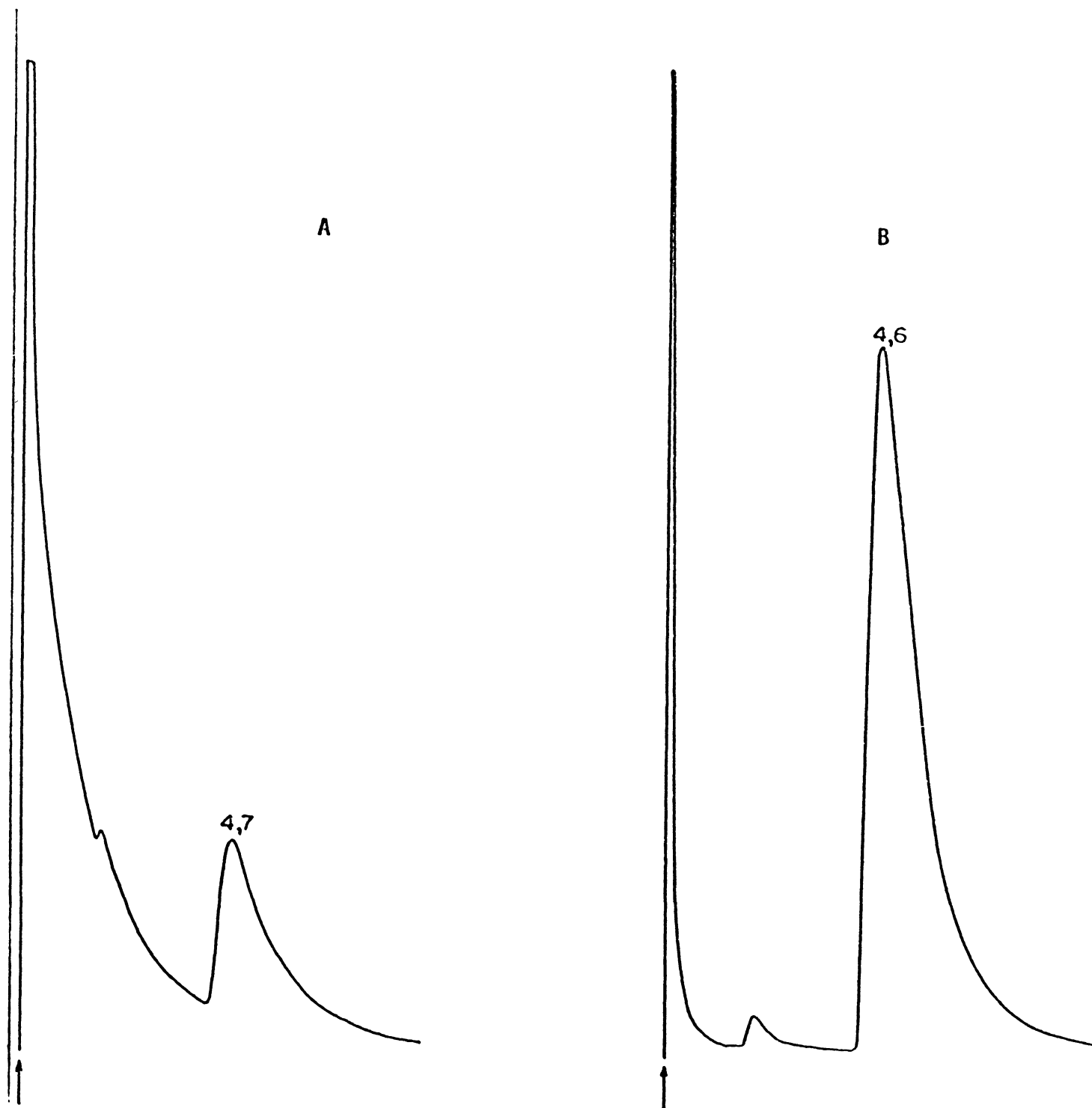


Figura 2 - Cromatogramas obtido por g.l.c. dos produtos de acetilação do volemitol (A e B). (coluna ECNSS-M a 3%/gás chrom.Q, 1900.

A - Volemitol obtido do líquen *S. damaecornis*

B - Volemitol obtido do líquen *Dermatocarpon miniatum*.

nais encontrados no espectro da amostra 873,8; 72,6; 71,9; 70,7; 64,1 e 63,1 correspondem aos seis sinais do padrão, sendo a ausência do sinal em 70,6 devido, provavelmente, a resolução incompleta da amostra. A análise por g.l.c. do acetato de volemitol (Figura 2B) confirmou que os tempos de retenção do padrão e do componente C (Figura 2A) eram idênticos.

Este heptitol já foi encontrado nos líquens: *Dermatocarpon miniatum*, *D. lachneum*, *D. fluviatile*, *D. vellereum*, *Endocarpon adscendens* e *Physcia setosa* (73). LINDBERG e colaboradores (51) investigaram constituintes carboidratados de baixo peso molecular em 60 líquens diferentes. Verificaram que os líquens pertencentes a ordem Gymnocarpeae (atualmente chamada Lecanorales) apresentavam arabinitol e manitol, porém não apresentavam volemitol, enquanto os pertencentes a ordem Pyrenocarpeae (atualmente Verrucariales) continham manitol e volemitol, mas não arabinitol.

O líquen *Sticta damaecornis*, ordem Lecanorales, ao contrário dos demais, apresentou os três alditóis: arabinitol, manitol e volemitol.

1.3 - FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES OLIGOSSACARÍDEOS

As frações F₆ a F₈ obtidas da coluna de carvão-Celite e eluídas com água-etanol a 30% foram reunidas e cromatografadas em coluna de celulose. A eluição desse material foi efetuada inicialmente com acetona e posteriormente com soluções de acetona-água em proporções crescentes de água. Pequenas quantidades de arabinitol (R_I 2,3) e manitol (R_I 1,9) foram eluídos com acetona-água 7:1. Três frações com R_I 1,17 (200 mg), R_I 0,51 contaminado com R_I 0,74 (100 mg) e R_I 0,25 (40 mg) foram eluídas respectivamente com soluções de acetona-água 4:1, 3:1 e 2,5:1. Após hidrólise ácida e cromatografia em papel (Sistema I) o componente com R_I 1,17 mostrou-se constituído de galactose, glucose e traços

de manose, enquanto os dois outros componentes com R_f 0,51 (0,74) e R_f 0,25 apresentaram principalmente glucose, com traços de galactose e manose. Essas observações foram efetuadas em função da intensidade dos "spots".

O teste positivo pela revelação com cloridrato de *p*-anisidina indicou que os componentes de cada fração continham unidades terminais redutoras. Após redução e acetilação do material hidrolisado, foi efetuada análise por g.l.c. (Tabela 2) dos acetatos de alditóis.

1.4 - CARACTERIZAÇÃO DA LACTOSE

A fim de verificar qual monossacarídeo fazia parte da extremidade redutora, o composto com R_f 1,17 foi reduzido, hidrolisado, cromatografado (Sistema I) em papel e revelado com cloridrato de *p*-anisidina. O teste positivo para a galactose e negativo para a glucose (convertida a glucitol), mostrou a presença de galactose na extremidade terminal não redutora. Este oligossacarídeo, denominado D_1 segundo Esquema I, foi metilado e o produto convertido em acetatos de alditóis parcialmente metilados (Tabela 3).

Os dados de metilação confirmaram que a galactose e a glucose encontravam-se, respectivamente, nas extremidades terminais não redutora e redutora na proporção molar de 1:1, além de mostrar que a ligação entre as unidades de galactopiranosose e glucose era do tipo(1 → 4).

Analisando o espectro de ^{13}C -n.m.r. deste composto, ele pode ser identificado como lactose (Figura 3), uma vez que apresentou sinais com deslocamentos químicos característicos e semelhantes aos da lactose (88, Tabela 4). Os sinais em δ 103,0; 95,8 e 91,8 são característicos de C-1, estando o primeiro deles relacionado ao resíduo β -D-galactopiranosil e os outros dois a C-1 de β e

TABELA 2

ANÁLISE POR G.L.C. ^(a) DOS HIDROLISADOS PROVENIENTES DOS OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS DO LÍQUEN *S. damaecornis*.

Componentes	T ^(b)	Composição relativa dos oligossacarídeos ^(c) .		
		R _I 1,17	R _I 0,51 (+R _I 0,74)	R _I 0,25
Manose	1,8	2	2	2
Galactose	2,0	42	10	5
Glucose	2,3	56	88	93

- (a) Coluna convencional de ECNSS-M 3% (p/p) em Gas Chrom. Q, com programação de temperatura de 130º a 170º, pela variação de 4º por minuto.
- (b) Tempos de retenção (T), em relação ao do xilitol penta-0-acetato, dos acetatos de alditois derivados.
- (c) Os oligossacarídeos foram hidrolisados, reduzidos e acetilados.

TABELA 3

ANÁLISE POR G.L.C.-M.S. (a) DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE O-METILADOS OBTIDOS DO OLIGOSSACARÍDEO D₁

<u>O</u> -Metil Alditol	T (b)	p (c)
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	0,96	8,0
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,00	44,0
2,3,6-Me ₃ -Glc	1,24	48,0

(a) G.l.c.-m.s. em coluna capilar revestida com OV-17-OV-225 1:3, p/p.

(b) Tempos de retenção (T) relativos ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol.

(c) Percentagens total das áreas dos picos do oligossacarídeo metilado.

TABELA 4

SINAIS DE ^{13}C -n.m.r. E SUAS ATRIBUIÇÕES PARA O DISSACARÍDEO
LACTOSE

Atribuição de Sinais	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
(a)						
β -Gal-(1 \rightarrow 4)	103,0	71,1	72,6	68,6	75,4	61,1
α -Glc	91,9	70,2	71,2	78,4	71,5	60,2
β -Gal-(1 \rightarrow 4)	103,0	71,1	72,6	68,6	75,4	61,1
β -Glc	95,8	73,9	74,5	78,4	74,9	60,2
(b)						
β -Gal-(1 \rightarrow 4)	103,0	71,0	72,6	68,6	75,3	61,0
α -Glc	91,8	70,1	71,2	78,6	71,4	60,2
β -Gal-(1 \rightarrow 4)	103,0	71,0	72,6	68,6	75,3	61,0
β -Glc	95,8	73,9	74,4	78,6	74,8	60,2

(a) Dados obtidos da referência 8.

(b) Dissacarídeo obtido do líquen *S. damaecornis*

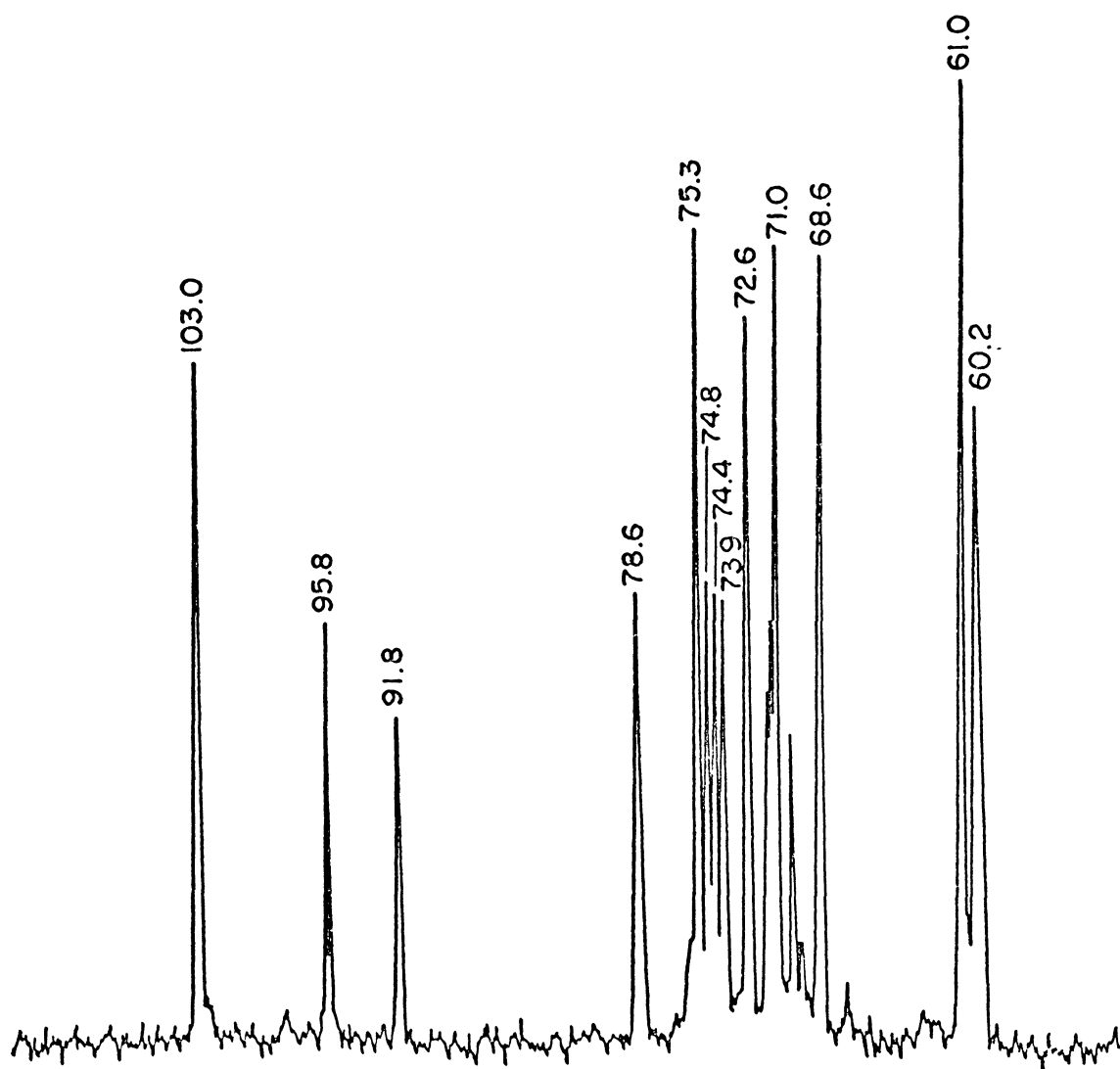


Figura 3 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. do oligossacarídeo lactose do líquen *S. damaecornis*, em óxido de deutério (D_2O), a 70°. Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

α -D-glucopiranosil, respectivamente. Os cinco sinais δ 75,3; 72,6; 71,0; 68,6 e 61,0 correspondem, respectivamente, aos átomos de carbono 5,3,2,4 e 6 não substituídos do resíduo β -D-galactopiranosil. Os sinais δ 74,8; 74,4; 73,9 e 60,2 correspondem, respectivamente a C-5, C-3, C-2 e C-6 do resíduo β -D-glucopiranosil, assim como os sinais δ 71,4; 71,2; 70,1 e 60,2 correspondem a C-5, C-3, C-2 e C-6 do resíduo α -D-glucopiranosil. O sinal em δ 78,6 está relacionado a C-4 substituído dos resíduos α e β -D-glucopiranosil.

A confirmação final da identidade da lactose foi efetuada pela cristalização do material (2x) a partir de metanol aquoso, com ponto de fusão 200 ϕ -206 ϕ e na mistura com padrão não houve abaixamento do ponto de fusão.

Embora a lactose seja um açúcar comum na natureza, presente em leite de mamíferos numa concentração aproximada de 5%, é relativamente rara em plantas e fungos, tendo sido encontrada no pólen de flôres de alguns gêneros de plantas oleáceas, bem como no fruto de *Achras sapota* (66). Este dissacarídeo também foi encontrado em folhas de algumas variedades de trigo e folhas de centeio, estando suas quantidades aumentadas nos meses de inverno(4).

Até o presente momento, não foi encontrado na literatura estudos a respeito da presença de lactose em líquens, sendo a *S. damaecornis* o primeiro líquen a apresentá-la.

1.5 - ESTUDOS PRELIMINARES DAS FRAÇÕES D₂ e D₃

A fração D₂ (Esquema I) apresentou-se como uma mistura desde que por cromatografia em papel apareceram duas manchas correspondendo a R_I 0,51 e R_I 0,74. Os dois componentes são redutoras, pois forneceram reação positiva frente ao cloridrato de *p*-anisidina. Após hidrólise, a fração D₂ mostrou-se constituída principalmente de glucose (88%) com menores quantidades de galactose (10%) e manose (2%).

Análise do espectro de ^{13}C -n.m.r. (Figura 4) mostrou uma região de C-1 bastante complexa com sinais em δ 103,3 e 104,1 correspondendo a unidades β hexopiranosídicas: δ 98,5; 96,6 e 92,5 a resíduos α -hexopiranosídicos, e a unidades redutoras β e α , respectivamente. A presença dos dois sinais em δ 76,5 e 76,3, provavelmente, correspondem a unidades hexopiranosídicas 2-0 substituídas, e a possibilidade de quantidades apreciáveis de unidades 6-0 substituídas é pequena, desde que sinais fortes de C-6 não substituídos encontram-se em δ 61,2 e 61,4. A ausência de sinais em δ 79-83 comprovam a não existência de resíduos 3-0 e 4-0 substituídos nestes oligossacarídeos (8).

A fração D_3 (Esquema I) correspondendo a R_1 0,25 forneceu reação positiva com cloridrato de *p*-anisidina. Após hidrólise apresentou principalmente glucose (93%) além de traços de galactose (5%) e manose (2%).

O espectro de ^{13}C -n.m.r. desta fração (Figura 5) mostrou-se bastante semelhante a fração D_2 , com sinais δ 103,3; 98,5; 96,3 e 92,7 correspondendo, respectivamente, a unidades β e α -hexopiranosídicas e a grupos redutores de α e β hexopiranosose, em uma proporção molar 2:2:1, aproximadamente, sugerindo a existência de pentassacarídeo (s). Sinais de intensidades iguais em δ 76,3 e 76,5 correspondem a unidades hexopiranosídicas 2-0 substituídas.

A ausência de sinais na região de 3-0 e 4-0 e a presença de sinais intensos de C-6 não substituídos, levam a crer na existência da oligossacarídeos ligados (1 \rightarrow 2).

Desde que essas frações não foram obtidas em estado puro e não puderam ser cristalizadas, análises de metilação não foram realizadas.

Tentativas serão efetuadas, futuramente, no sentido de se obter esses componentes puros para caracterização estrutural dos oligossacarídeos.

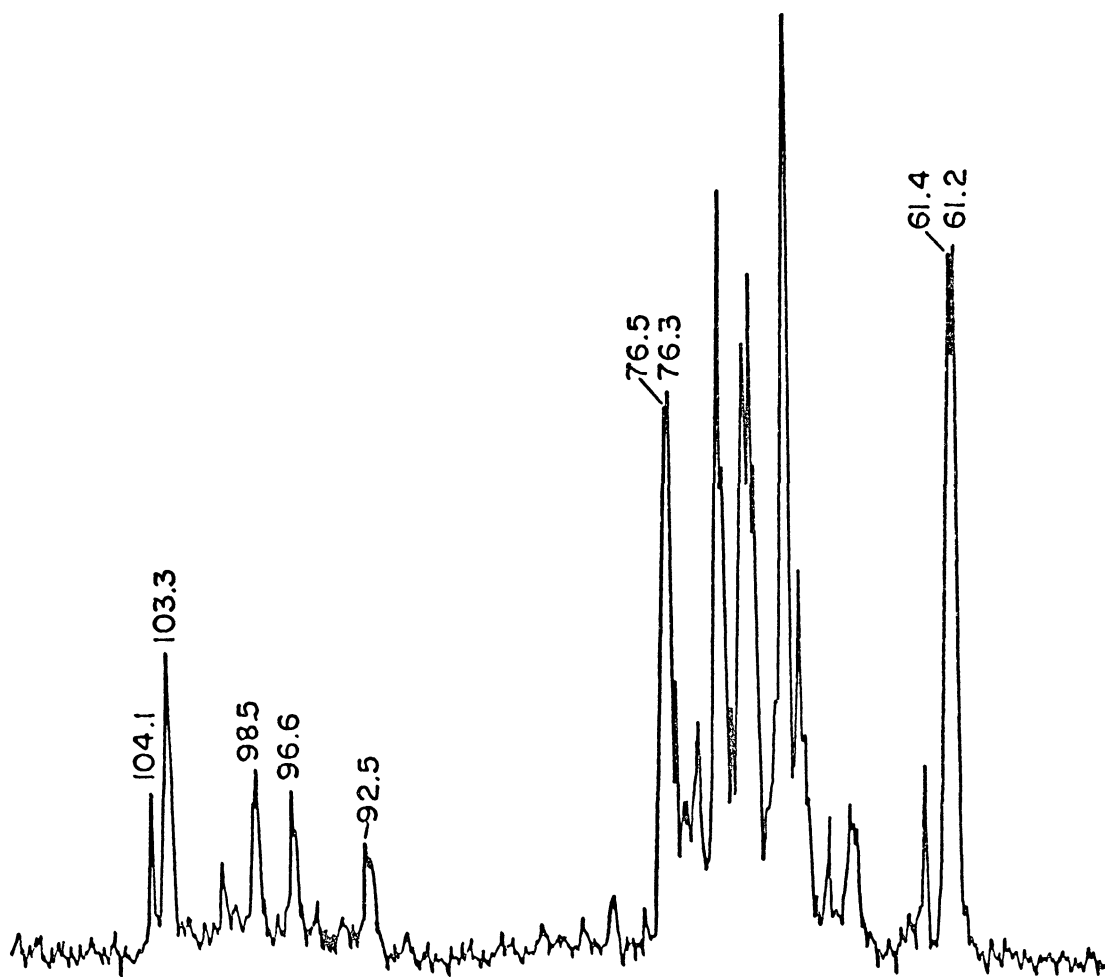


Figura 4 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. do componente D_2 obtido do líquen *S. damaecornis*, em óxido de deutério (D_2O), a 70° . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

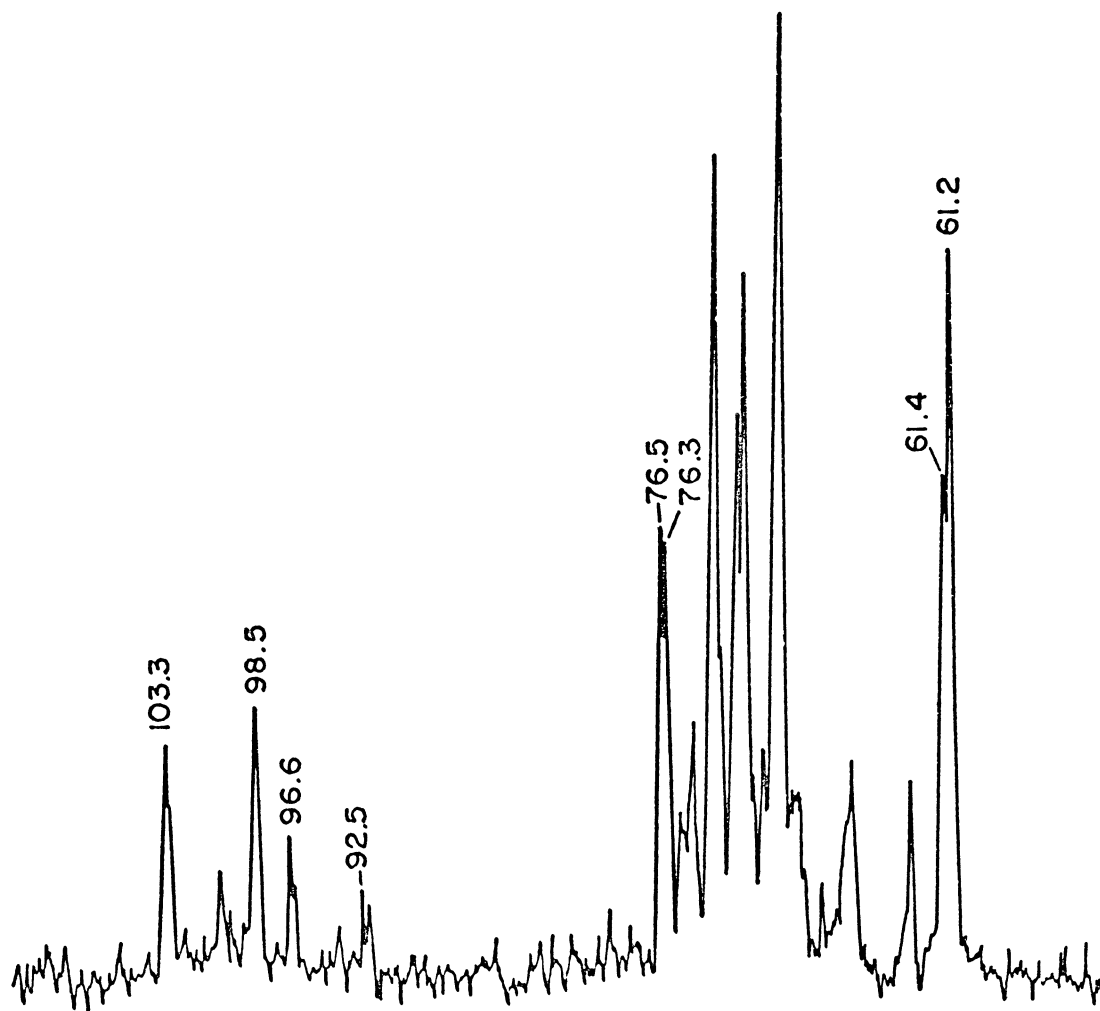


Figura 5 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. do composto D_3 obtido do líquen *S. damaecornis*, em óxido de deutério (D_2O), a 70° . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

2. POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA

O líquen residual, após extração benzeno-etanol e metanol-água, foi submetido à extração aquosa, a quente, com posterior precipitação dos polissacarídeos resultantes deste tratamento, pela adição em excesso de etanol. O precipitado etanólico pesou 6,05 g correspondendo a 6,5% do peso do líquen original. Pela análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos do material hidrolisado, os açúcares encontrados, de acordo com seus T_r , foram arabinose (35%), xilose (9%), manose (24%), galactose (22%) e glucose (10%).

Posteriormente, uma solução aquosa do material foi submetida a procedimentos de congelamento e degelo. Um precipitado não carboidratado se formou, em consequência deste tratamento, sendo desprezado. Pela adição de solução de Fehling ao sobrenadante aquoso, houve formação de um complexo cúprico insolúvel (precipitado de Fehling) cujos polissacarídeos foram analisados por g.l.c., na forma de acetatos de alditóis (Tabela 5) e mostraram-se constituídos de arabinose, xilose, manose, galactose e glucose. Os polissacarídeos do sobrenadante de Fehling continham os mesmos açúcares, em diferentes proporções (Tabela 5).

Pode ser visto a partir da Tabela 5 que a precipitação em solução de Fehling resultou num fracionamento de polissacarídeos, em que uma percentagem muito maior de manose encontra-se no complexo cúprico insolúvel, em relação à encontrada no sobrenadante de Fehling.

TABELA 5

ANÁLISE POR G.L.C. (a) DOS ACETATOS DE ALDITÓIS OBTIDOS DOS POLISACARÍDEOS ISOLADOS DO COMPLEXO CÚPRICO INSOLÚVEL E DO SOBRENADANTE DE FEHLING, A PARTIR DA EXTRAÇÃO AQUOSA.

Componentes	T ^(b)	Composição relativa (%) dos componentes monossacarídicos encontrados nos polissacarídeos do	
		Precipitado de Fehling	Sobrenadante de Fehling
Arabinose	0,84	14	16
Xilose	1,00	4	10
Manose	1,51	41	23
Galactose	1,70	24	32
Glucose	1,87	17	19

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

(b) Tempos de retenção (T), em relação ao do xilitol penta-0-acetato, dos acetatos de alditóis derivados.

2.1 - POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO PRECIPITADO DE FEHLING

Em decorrência da mistura complexa de açúcares encontrada nos polissacarídeos obtidos do precipitado de Fehling, o uso de um outro processo de purificação tornou-se necessário. Pela adição de sal de amônio quaternário-Cetavlon à solução polissacarídica houve formação de precipitado em pH 7,0 (5,0 mg, 0,005%). Ao sobrenadante do precipitado em pH 7,0 foi adicionado tampão borato com formação de precipitado em pH 8,5 (21,0 mg; 0,022%) e pH 12,0 (3,0 mg; 0,003%). O baixo rendimento destes polissacarídeos determinou a não continuidade do estudo dos mesmos.

2.2 - POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO SOBRENADANTE DE FEHLING

Também em decorrência da mistura complexa de açúcares encontrada no sobrenadante de Fehling, foi necessário o fracionamento por Cetavlon. Houve formação de precipitado em pH 7,0 (19,6 mg; 0,021%). Pela adição de tampão borato ao sobrenadante do precipitado em pH 7,0, formou-se um precipitado em pH 8,5 (25,9 mg; 0,028%). Em decorrência do baixo rendimento, estes componentes não foram estudados. A fração polissacarídica resultante do tratamento de pH 12,0 (denominada E, segundo Esquema I) pesou 96,0 mg (0,10%).

2.2.1 - ESTUDO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA E

Após hidrólise e análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis resultantes (Tabela 6) a fração E apresentou arabinose, xilose, manose, galactose e glucose e um conteúdo protéico de 9,3%.

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados derivados

TABELA 6

ANÁLISE POR G.L.C. ^(a) DOS ACETATOS DE ALDITÓIS OBTIDOS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA E, APÓS CETAVLON, ENCONTRADA NO SOBRENADANTE DE FEHLING DA EXTRAÇÃO AQUOSA.

Componentes	T ^(b)	Composição relativa (%) dos componentes monossacarídicos encontrados na fração polissacarídica E.
Arabinose	0,72	35 (~12) ^(c)
Xilose	1,00	20 (--)
Manose	1,88	6 (12)
Galactose	2,19	25 (49)
Glucose	2,47	14 (27)

(a) Coluna convencional de ECNSS-M a 3% (p/p) em Gas Chrom. Q , com temperatura de 180°.

(b) Tempos de retenção (T), em relação ao do xilitol penta-0-aceta-to, dos acetatos de alditóis derivados.

(c) Os valores entre parêntesis se referem às percentagens dos componentes monossacarídicos obtidas através de g.l.c.-m.s.

da fração polissacarídica totalmente metilada, foram analisados por g.l.c.-m.s., usando-se colunas capilares revestidas com OV - 17 — OV - 225 1:3 e DB-210. Pelos resultados obtidos, verificou-se que a primeira coluna apresentou melhor resolução que a segunda, uma vez que os derivados 2,3,4,6-Me₄-Man e 2,3,5,6-Me₄ - Gal foram detectados na OV-17 — OV-225, havendo sobreposição na DB-210. Os fragmentos resultantes e suas proporções são apresentados na Tabela 7.

Embora a coluna OV-17 — OV-225 tenha sido mais eficiente na separação dos dois derivados tetrametilados, assim como na maior detecção de dimetilados, a discussão será realizada baseando-se na DB-210, pois uma fração polissacarídica metilada, obtida na extração alcalina (H) semelhante a esta fração em estudo (E) foi analisada apenas pela coluna DB-210.

Os principais componentes encontrados segundo a coluna DB-210 (Tabela 7) foram grupos terminais não redutores de arabinofuranose (9%), manopiranosose e galactofuranose (22%), galactopiranosose (7%), além de resíduos de galactofuranose 6-0 (10%), galactopiranosose 6-0 (5%) e 4-0 (6%) e 4,6-di-0 (5%) substituídos.

Pôde ser observada a ausência de acetatos de xilitol, assim como uma menor percentagem de acetatos de arabinitol (11-13%) parcialmente metilados (Tabela 7) quando comparado aos valores encontrados para os correspondentes pentaacetatos de pentitóis (Tabela 6). Isto, provavelmente, ocorreu em virtude da presença de alguns componentes não carboidratados com tempos de retenção semelhantes aos dos dois compostos acima. A composição monossacarídica da fração E (Tabela 6) deve, por essa razão, ser corrigida usando-se dados de metilação, (Tabela 7), os quais encontram-se entre parêntesis.

O valor relativamente baixo da rotação específica, - 32° (c.0,3 em H₂O) se deve provavelmente a contribuição negativa das estruturas β-D-galactofuranose e/ou α-L-arabinofuranose.

TABELA 7

ANÁLISE POR G.L.C.-M.S. ^(a) DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE O-METILADOS OBTIDOS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA E, TOTALMENTE METILADA.

<u>O</u> -Metil Alditol	OV-17 — OV-225		DB-210	
	T ^(b)	p ^(c)	T ^(b)	p ^(c)
2,3,5-Me ₃ -Ara	0,783	13	0,868	9
2,3,4-Me ₃ -Ara	-	-	0,921	2
2,3,4,6-Me ₄ -Man	0,985	10	-	-
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	1,001	15	1,004	22
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,023	7	1,030	7
2,3,4-Me ₃ -Man	1,286	4	1,257	3
3,4,6-Me ₃ -Man	-	-	1,190	3
2,4,6-Me ₃ -Glc	-	-	1,201	4
2,3,6-Me ₃ -Gal	1,302	3	1,244	6
2,3,5-Me ₃ -Gal	-	-	1,297	10
2,3,4-Me ₃ -Gal	1,428	6	1,342	5
4,6-Me ₂ -Hex	1,478	1	-	-
3,6-Me ₂ -Hex	1,603	1	-	-
2,3-Me ₂ -Man	1,709	1	1,503	2
2,3-Me ₂ -Gal	-	-	1,624	5
3,4-Me ₂ -Hex	1,735	3	-	-
2,4-Me ₂ -Hex	1,882	4	-	-
2-Me-Hex	2,144	3	-	-
3-Me-Hex	2,307	3	1,969	3
Hexitol	2,664	7	-	-
Glucitol	2,802	19	2,295	19

(a) G.l.c.-m.s. em colunas capilares revestidas com OV-17 — OV-225 1:3 (p/p) e DB-210.

(b) Tempos de retenção (T) dos componentes relativos ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

(c) Proporção das áreas dos picos obtidos da fração E metilada (%).

O espectro de ^{13}C -n.m.r. da fração polissacarídica E (Figura 6) apresentou 3 sinais em campo baixo δ 109,4, 109,1 e 107,8 correspondendo a C-1 de grupos não redutores de β -D-galactofuranose (32) e α -L-arabinofuranose (31). O sinal em δ 64,4 corresponde a C-6 livre de galactofuranose enquanto δ 62,6 a C-6 de todas as unidades hexopiranosídicas e a C-5 de α -L-arabinofuranose (32) não substituídos.

Embora alguns polissacarídeos líquênicos apresentem estruturas β -galactofuranosídicas (40, 29) a ocorrência de arabinofuranose nesta fração E, é inédita, uma vez que não havia sido descrita em líquens.

3. POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO ALCALINA

O líquen residual da extração aquosa foi submetido à extração com hidróxido de potássio aquoso a 100°, e o extrato alcalino após neutralização com AcOH, foi adicionado em excesso de etanol, com formação de um precipitado pesando 24,10 g correspondendo a 26% do peso do líquen original. Pela análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis obtidos do material hidrolisado, os açúcares encontrados foram arabinose (5%), fucose (1%), xilose (2%), manose (36%), galactose (23%) e glucose (33%).

Posteriormente, uma solução aquosa do material foi submetida a processos repetidos de congelamento e degelo. Um precipitado não carboidratado se formou em consequência deste tratamento, sendo desprezado. Pela adição de solução de Fehling ao sobrenadante aquoso, houve formação de um complexo cúprico insolúvel (precipitado de Fehling 2,04 g; 2,18%) cujos polissacarídeos foram analisados por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis (Tabela 8) e mostraram-se constituídos de arabinose, manose, galactose e glucose. Os polissacarídeos do sobrenadante de Fehling (0,70 g; 0,75%) continham os açúcares acima e xilose (Tabela 8).

Da mesma forma que na extração aquosa o fracionamento de

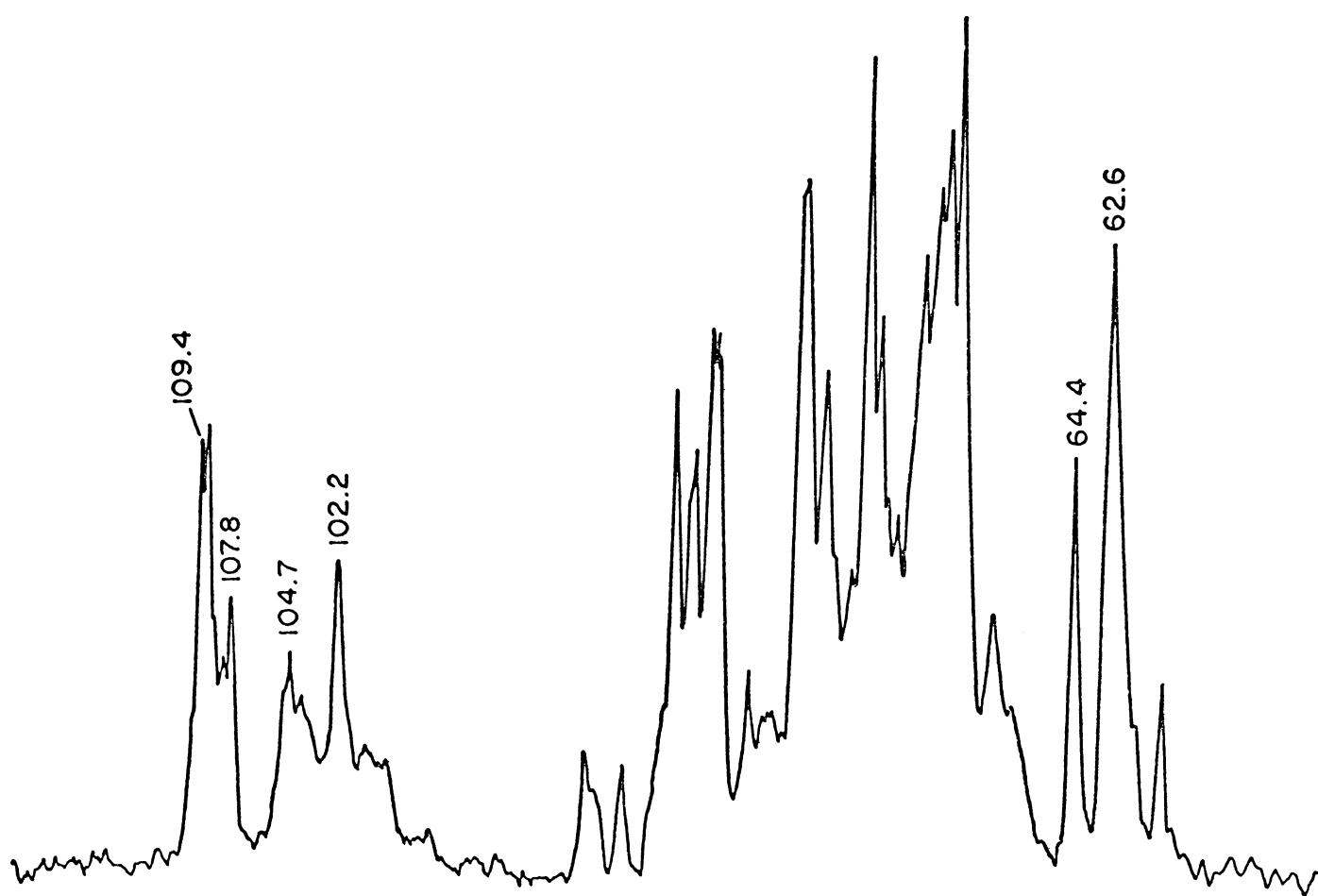


Figura 6 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. da fração polissacarídica E do líquen *S. damaecornis*, em óxido de deutério (D_2O), a 70° . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

TABELA 8

ANÁLISE POR G.L.C. ^(a) DOS ACETATOS DE ALDITÓIS OBTIDOS DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DO COMPLEXO CÚPRICO INSOLÚVEL E DO SOBRENADANTE DE FEHLING, A PARTIR DA EXTRAÇÃO ALCALINA.

Componentes	T ^(b)	Composição relativa (%) dos componentes monossacarídicos encontrados nos polissacarídeos do	
		Precipitado de Fehling	Sobrenadante de Fehling
Arabinose	0,86	2	15
Xilose	1,00	-	7
Manose	1,51	53	24
Galactose	1,72	25	34
Glucose	1,89	20	20

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

(b) Tempos de retenção (T), em relação ao do xilitol penta-0-acetato, dos acetatos de alditóis derivados.

polissacarídeos pela solução de Fehling forneceu uma maior porcentagem de manose no complexo cúprico insolúvel, do que no sobrenadante de Fehling.

3.1 - POLISSACARÍDEO OBTIDOS DO PRECIPITADO DE FEHLING

Em decorrência da mistura complexa de açúcares encontrada no precipitado de Fehling, foi necessário um outro processo de purificação com Cetavlon, idêntico ao realizado para o precipitado de Fehling da extração aquosa. Com adição de tampão borato ao pH 7,0, houve formação de um precipitado em pH 8,5 (978,7 mg; 1,04%) que após hidrólise e análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis mostrou-se constituída de arabinose (9%), manose (47%), galactose (23%) e glucose (21%). Esta fração foi denominada F, segundo esquema I, e será discutida posteriormente.

3.2 - POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO SOBRENADANTE DE FEHLING

Como tentativa para separar os polissacarídeos, um sal de amônio quaternário-Cetavlon foi adicionado à solução polissacarídica do sobrenadante de Fehling. Houve formação de um precipitado em pH 7,0 (6,9 mg; 0,007%). Este componente não foi estudado devido ao baixo rendimento. Pela adição de tampão borato ao sobrenadante do pH 7,0, formou-se um precipitado em pH 8,5 (130,0 mg; 0,14%). Ao sobrenadante do pH 8,5 foi adicionado NaOH a 40% até pH 12,0, como não houve formação de precipitado a solução foi neutralizada com AcOH, sob banho de gelo, concentrada e precipitada em excesso de etanol (148,0 mg; 0,16%). Estas duas últimas frações, pH 8,5 e sobrenadante pH 12,0, foram denominadas, respectivamente, G e H segundo Esquema I.

3.2.1 - ESTUDO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA G

Após hidrólise e análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis (Tabela 9) a fração polissacarídica G apresentou manose, galactose e glucose. Esta fração, como pode ser visto (Tabela 9) contém uma elevada proporção de galactose (56%) e 2,7% de proteína.

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados derivados da fração polissacarídica G, totalmente metilada, foram analisados por g.l.c.-m.s. usando-se coluna capilar revestida com DB-210. Os fragmentos resultantes e suas proporções são apresentados na Tabela 10. Os principais fragmentos encontrados foram grupos terminais não redutores de galactofuranose (31%) e galactopiranosose (10%), além de resíduos manopiranosil 2-0- (16%) e galactofuranosil 2,6 - di-0 (5%) substituído.

O valor da rotação específica desta fração polissacarídica foi de + 14° (c. 0,3 H₂O). Em vista da elevada proporção de grupos terminais não redutores de galactofuranose, é interessante observar que o espectro de ¹³C-n.m.r. (Figura 7) não contém nenhum sinal de C-1 entre δ 106,6 e 109,4 (32) correspondendo a ligações β. O sinal em δ 102,2 deve vir de estruturas galactofuranosídicas com configuração α. O sinal em δ 88,9 pode corresponder a C-2 de unidades galactofuranosídicas 2,6-di-0-substituídas, uma vez que o derivado 3,5-di-0-metil-galactitol acetato foi detectado em análise de metilação (Tabela 10). Os sinais δ 64,4 e 62,5 correspondem, respectivamente, a C-6 de unidades α-galactofuranosídicas e hexopiranosídicas não substituídas em 6.

Um polissacarídeo contendo estrutura galactofuranosídica foi isolado por JANSSEN e LINDBERG (42) a partir do *Penicillium varians*. Este polímero constituído por galactose, glucose e manose nas proporções 70:15:15 foi submetido a análises de metilação,

TABELA 9

ANÁLISE POR G.L.C. (a) DOS ACETATOS DE ALDITÓIS OBTIDOS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS G E H DO SOBRENADANTE DE FEHLING DA EXTRAÇÃO ALCALINA, APÓS TRATAMENTO POR CETAVLON.

Componentes	T ^(b)	Composição relativa (%) dos componentes monossacarídicos das frações	
		Polissacarídica G (pH 8,5)	Polissacarídica H (Sobr.pH 12,0)
Arabinose	0,85	-	16 (15)
Xilose	1,00	-	17 (-)
Manose	1,52	22	4 (5)
Galactose	1,71	56	44 (56)
Glucose	1,88	22	19 (24)

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

(b) Tempos de retenção (T), em relação ao do xilitol penta-0-acetato, dos acetatos de alditóis derivados.

(c) Os valores entre parêntesis se referem às percentagens dos componentes monossacarídicos obtidos através de g.l.c.-m.s.

TABELA 10

ANÁLISE POR G.L.C.-M.S. (a) DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE O-METILADOS OBTIDOS DA FRAÇÃO G, TOTALMENTE METILADA

<u>O</u> -Metil Alditol	T (b)	p (c)
2,3,5-Me ₃ -Ara	0,848	4
2,3,4-Me ₃ -Xil	0,916	1
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	1,004	31
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,029	10
3,4-Me ₂ -Fuc	1,053	1
3,4,6-Me ₃ -Man	1,210	16
2,3,6-Me ₃ -Glc	1,263	6
2,3,4-Me ₃ -Man	1,280	3
4,6-Me ₂ -Hex	1,381	12
3,6-Me ₂ -Hex	1,501	4
2,3-Me ₂ -Hex	1,550	1
3,5(2,4)-Me ₂ -Gal	1,600	5
3,4-Me ₂ -Hex	1,696	5
3-Me-Hex	2.040	1

(a) G.l.c.-m.s. em coluna capilar revestida com DB-210

(b) Tempos de retenção relativos ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol

(c) Proporção das áreas dos picos obtidos da fração G metilada %.

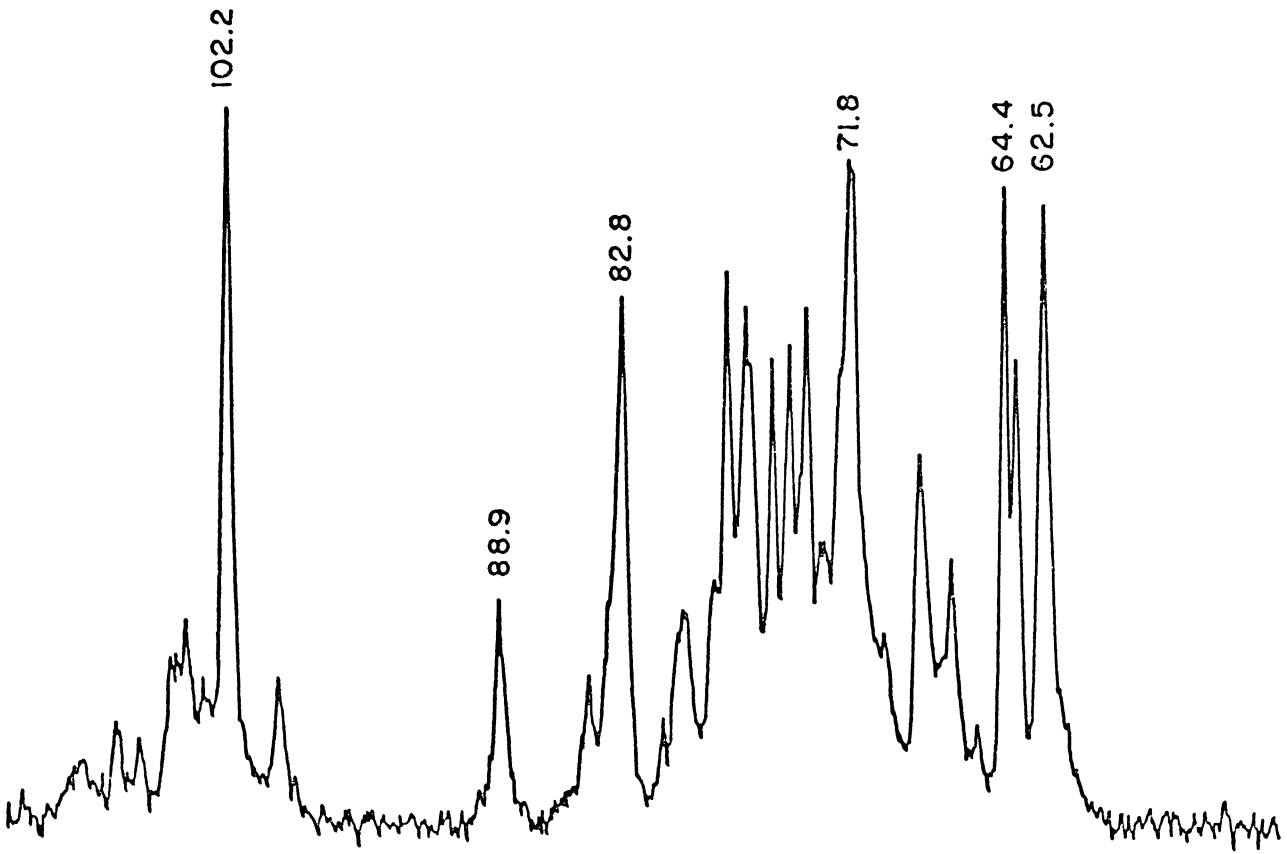
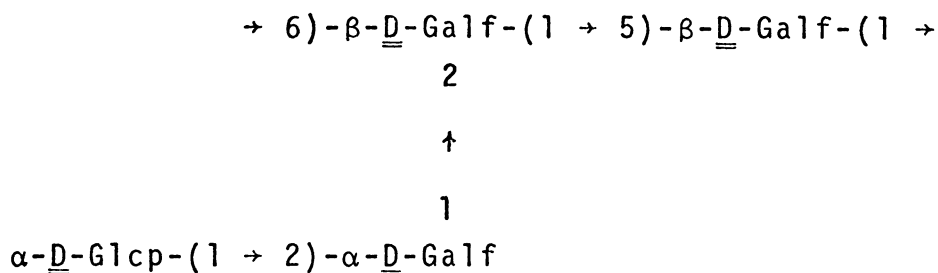


Figura 7 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. da fração polissacarídica G obtida do líquen *S. damaecornis*, em óxido de deutério (D_2O), a 70° . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

degradação de Smith e estudos de ressonância nuclear magnética ficando estabelecido que sua estrutura parcial seria constituída de resíduos β -D- e α -D-galactofuranosil (Estrutura 7).



Estrutura 7

A varianose foi o primeiro carboidrato natural em que ambos os resíduos β e α -D-galactofuranosídicos foram observados.

GORIN e IACOMINI (40) estudando o líquen *Cladonia confusa* encontraram no sobrenadante de Fehling um polissacarídeo (0,15%) contendo galactose (86%), manose (4%) e glucose (10%). A galactana continha sinais de C-1 em campo baixo δ 107,0-111,0, concordando com a elevada proporção de unidades β -D-galactofuranosídicas (30%), segundo análise por g.l.c.-m.s., além de sinais em δ 102,2 e 88,9 correspondendo, respectivamente, a C-1 de α -D-galactofuranose e a C-2 de galactofuranose 2,6-di-O-substituída. Por ter sido esse polissacarídeo obtido em baixo rendimento, os autores acima, não puderam identificá-lo estruturalmente.

3.2.2 - ESTUDO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA H

Após hidrólise e análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis (Tabela 9) a fração H apresentou arabinose, xilose, manose, galactose e glucose e um conteúdo protéico de 5,3%.

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados derivados da fração H, totalmente metilada, foram analisados por g.l.c.-m.s.em

coluna capilar DB-210. Os fragmentos resultantes e suas proporções são apresentados na Tabela 11. Os principais fragmentos encontrados foram grupos terminais, não redutores de arabinofuranose (15%), galactofuranose (31%) e galactopiranosose (6%), além de resíduos galactopiranosil e galactofuranosil 6-O-substituído (7,0 e 12,0%, respectivamente). Da mesma forma que no sobrenadante do pH 12,0 da extração aquosa, observou-se a ausência de acetato de xilitol parcialmente metilado (Tabela 11). A presença do penta-acetato de xilitol se deve a existência de algum componente não carboidratado com mesmo tempo de retenção.

O valor relativamente baixo da rotação específica -599° (c. 0,5 em H_2O) se deve provavelmente, a contribuição negativa das estruturas β -D-galactofuranose e/ou α -L-arabinofuranose. O espectro de ^{13}C -n.m.r. da fração polissacarídica H (Figura 8) apresentou três sinais em δ 109,4, 109,1 e 107,8 correspondendo a C-1 de grupos terminais não redutores de β -D-galactofuranose (32) e α -L-arabinose (31). O C-6 de galactofuranose e hexopiranoses não substituídas em 6, são representados pelos sinais em δ 64,4 e 62,7 respectivamente.

As frações E e H (sobrenadantes do pH 12 das extrações aquosa e alcalina, respectivamente) são bastante similares de acordo com os dados de metilação (Tabelas 7 e 11) e ^{13}C -n.m.r. (Figuras 6 e 8), exceto pelo fato da fração H possuir uma maior proporção de unidades furanosídicas.

As três frações polissacarídicas E, G e H não foram completamente estudadas em virtude dos baixos rendimentos, o que impediu investigações usando técnicas como degradação de Smith, hidrólise ácida parcial, acetólise, etc. Estudos posteriores serão efetuados no sentido de se chegar o mais próximo possível à estrutura química de cada um dos polissacarídeos componentes destas frações.

TABELA 11

ANÁLISE POR G.L.C.-M.S.^(a) DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE O-METILADOS OBTIDOS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA H, TOTALMENTE METILADA

<u>O</u> -Metil Alditol	T ^(b)	p ^(c)
2,3,5-Me ₃ -Ara	0,845	14
2,3,4-Me ₃ -Ara	0,909	1
2,3,4,6-Me ₄ -Man	1,004	-
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	1,004	29
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,030	6
2,4,6-Me ₃ -Man	1,096	2
3,4,6-Me ₃ -Man	1,210	6
2,3,6-Me ₃ -Gal	1,272	4
2,3,4-Me ₃ -Man	1,291	4
2,3,5-Me ₃ -Gal	1,335	12
2,3,4-Me ₃ -Gal	1,342	7
2,6-Me ₂ -Hex	1,464	1
3,6-Me ₂ -Hex	1,515	2
2,3-Me ₂ -Hex	1,566	1
2,4-Me ₂ -Hex	1,675	4
2,3-Me ₂ -Hex	1,707	4
2-Me-Hex	1,887	2
3-Me-Hex	2,107	1

(a) G.l.c.-m.s. em coluna capilar revestida com DB-210

(b) Tempos de retenção (T) em relação ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol

(c) Proporção das áreas dos picos obtidos da fração H metilada.

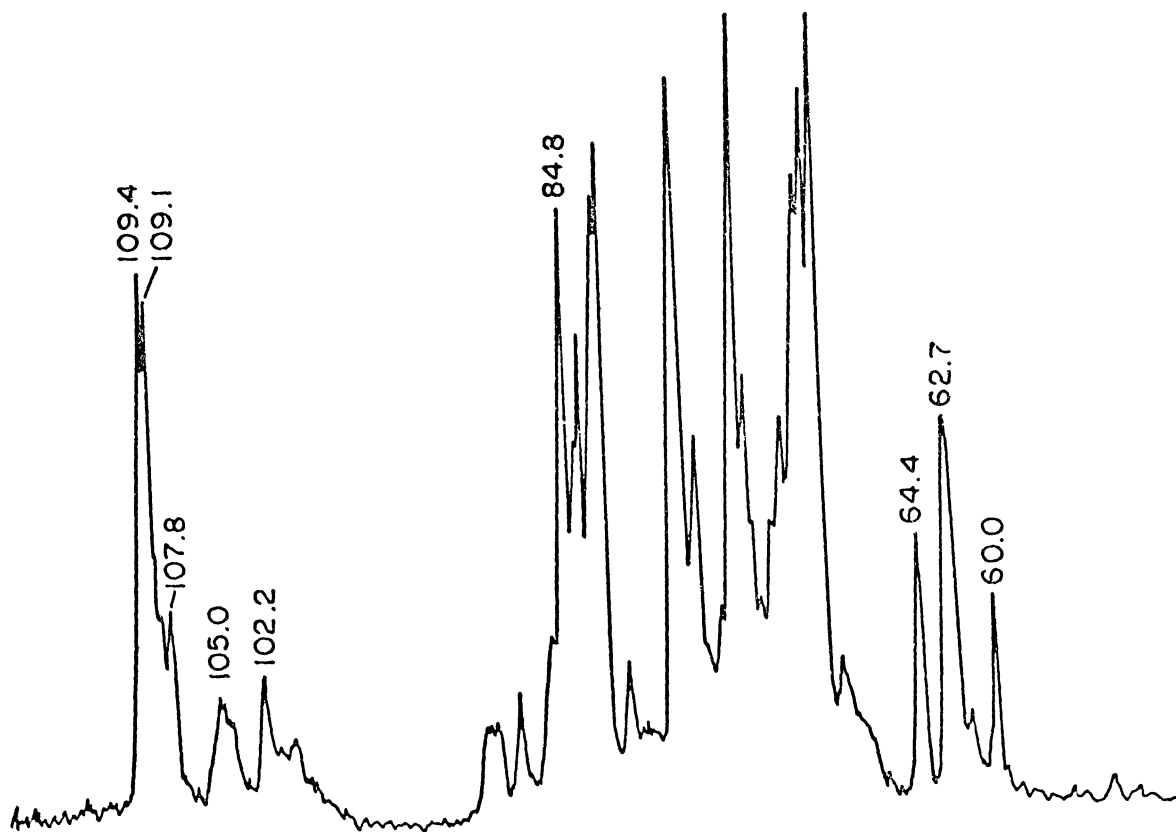


Figura 8 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. da fração polissacarídica H, obtida do líquen *S. damaecornis*, em óxido de deutério (D_2O) a 70° . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

3.2.3 - ESTUDO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA F

Após análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis resultantes da fração F, foram encontrados os açúcares arabinose (6%), manose (59%), galactose (20%) e glucose (15%) e 4,2% de proteína.

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados, derivados da fração F, totalmente metilada, foram analisados por g.l.c.-m.s em colunas capilares revestidas com OV-17 — OV-225 1:3 e DB - 210 (Tabela 12). Os principais fragmentos encontrados segundo coluna OV-17 OV-225 correspondiam a grupos terminais não redutores de manopiranose (26%) e galactopiranose (19%), além de resíduos 2-0 (10%), 6-0 (8%), 4,6-di-0 (8%), 2,6-di-0 (7%) e 2,4,6-tri-0 (13%) substituídos de manopiranose.

A ausência de acetato de arabinitol parcialmente metilado, quando comparado ao valor encontrado para o pentaacetato de arabinitol (6%) se deve, a presença de algum componente não carboidrado com tempo de retenção semelhante ao do arabinitol.

O valor da rotação específica da fração F é de + 69° (c . 0,4 H₂O).

O espectro de ¹³C-n.m.r. (Figura 9) mostrou sinais característicos de C-1 em δ 104,6 e 103,7 correspondendo a grupos terminais não redutores de β-D-galactopiranose e α-D-manopiranose, enquanto δ 102,1; 100,6 e 99,5 estão relacionados, respectivamente, a resíduos manopiranosil 2-0, 6-0 e 2,6-di-0-substituídos (40) . O sinal em δ 62,5 refere-se a C-6 livre de hexopiranoses (23).

A fração em estudo foi submetida a degradação tipo Smith , e os produtos resultantes analisados por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis. Os açúcares encontrados foram glicerol (81%), eritritol ou treitol (7%), manose (8%), galactose (1%) e glucose(3%). A presença de 81% de glicerol indica uma elevada proporção de gruu

TABELA 12

ANÁLISE POR G.L.C.-M.S. (a) DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE O-METILADOS OBTIDOS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA F, TOTALMENTE METILLADA

<u>O</u> -Metil Alditol	OV-17—OV-225 1:3		DB - 210	
	T(b)	p(c)	T(b)	p(c)
2,3,4,6-Me ₄ -Man	0,985	26,0	0,995	25,0
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,030	19,0	1,029	20,0
3,4,6-Me ₃ -Man	1,201	10,0	1,153	12,0
2,3,6-Me ₃ -Man (Gal)	1,240	4,0	-	-
2,4,6-Me ₃ -Glc	1,257	1,0	1,186	1,0
2,3,4-Me ₃ -Man	1,289	8,0	1,252	8,0
3,6-Me ₂ -Hex	1,599	3,0	1,451	3,0
2,3-Me ₂ -Man	1,662	8,0	1,495	8,0
3,4-Me ₂ -Man	1,740	7,0	1,622	7,0
3-Me-Man	2,318	13,0	1,964	13,0
Glc	2,485	1,0	2,265	3,0

(a) G.l.c.-m.s. em colunas capilares revestidas com OV-17—OV-225 e DB-210

(b) Tempos de retenção dos componentes relativos ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol

(c) Proporção das áreas dos picos obtidos da fração polissacarídica F.

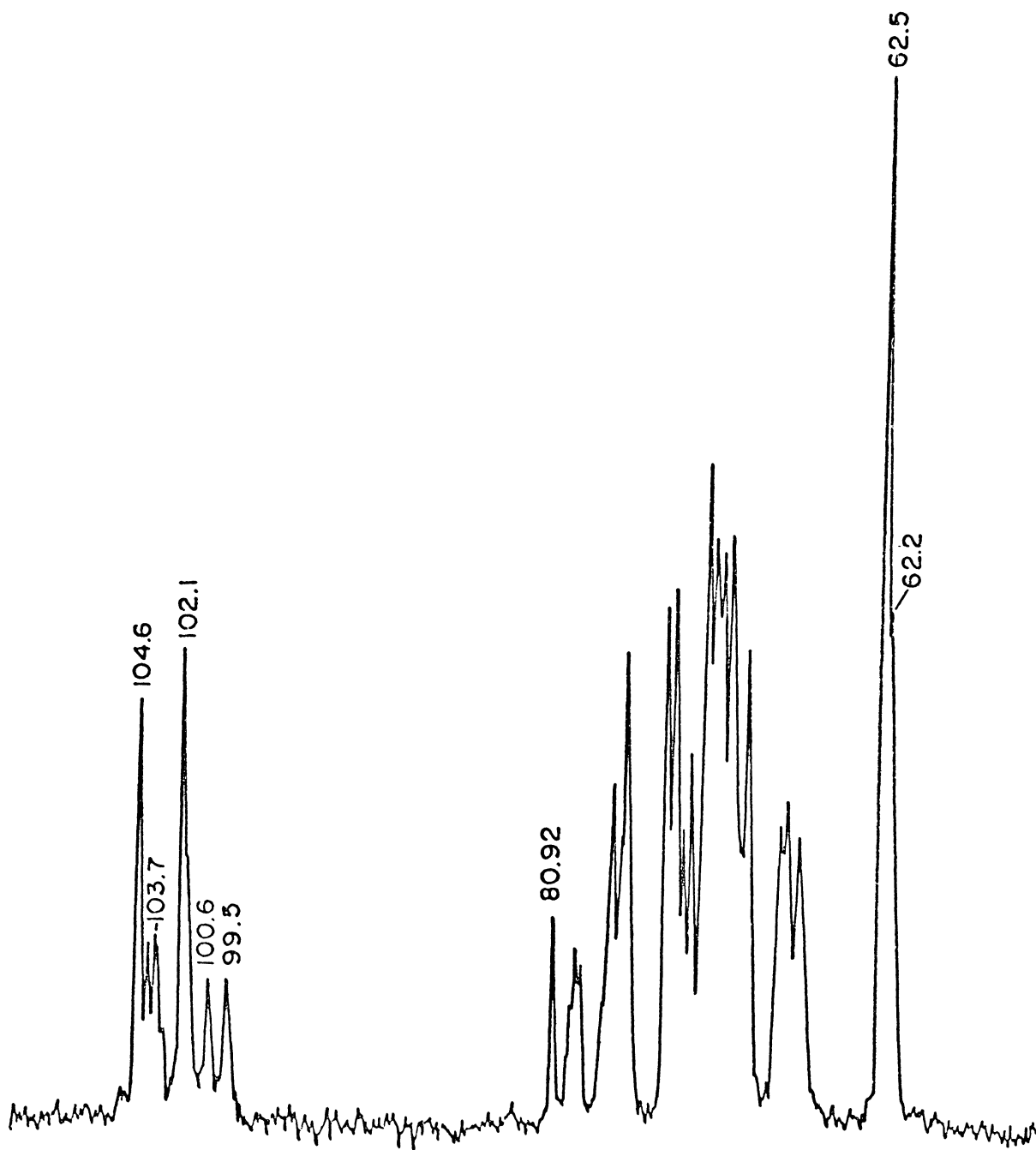
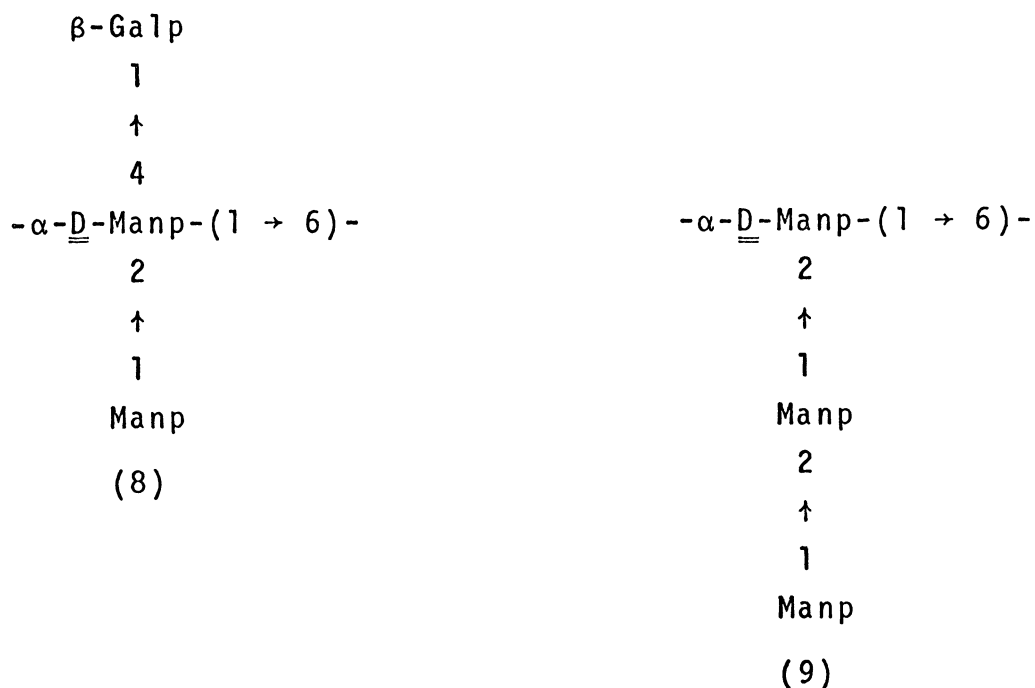


Figura 9 - Espectro de ^{13}C -n.m.r. da fração polissacarídica F obtida do líquen *S. damaecornis*, em óxido de deutério (D_2O), a 70° . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

pos terminais não redutores, além de ligação (1 → 2) e/ou (1 → 6), que pôde ser confirmada pela presença dos correspondentes acetatos de alditóis parcialmente metilados (Tabela 12), segundo análise por metilação-g.l.c.-m.s. A presença de eritritol (ou treitol) é consistente com a identificação (metilação-g.l.c.-m.s. de resíduos manopiranosil 4,6-di-0-substituídos e resíduos manopiranosil (ou galactopiranosil) 4-0-substituídos.

Em seguida, a fração F foi submetida à hidrólise parcial e o produto resultante precipitado em excesso de etanol. O precipitado etanólico foi analisado por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis e os açúcares encontrados foram manose (71%), galactose (12%) e glucose (17%). Posteriormente, o material foi metilado e analisado por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados, onde o derivado 2,3,4-tri-0-metil manitol, foi o maior componente encontrado.

Com os resultados de hidrólise ácida parcial-metilação, de gradação tipo Smith, análise de ^{13}C -n-m.r. (Figura 9) e g.l.c. - m.s. (Tabela 12) é bastante provável que a fração F contenha como principal componente uma galactomanana com núcleo constituído de unidades de manose ligadas (1 → 6), conforme estruturas 8,9,10,11.





GORIN e IACOMINI (29) estudaram seis espécies de líquens com micobiontes ascomicetos e, verificaram a existência de D-galactose-D-mananas cujas cadeias principais eram constituídas de unidades $\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-manopiranosídicas}$ ligadas (1 → 6). As cadeias laterais ocorriam como monossbstituintes nas posições 0-2 ou 0-4 ou ainda como dissubstituintes em 0-2,4. Oito tipos de substituições foram reconhecidas, pelos autores acima, nas quais $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Galp}$ (1 → 4), $\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Galp}$ e $\alpha\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Manp}$ (1 → 2) e $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-Galp}$ (1 → 4) encontravam-se ligadas à cadeia principal de manopiranose.

Galactomananas e mananas são constituintes da parede celular de fungos e líquens (25), tendo sido encontradas num grande número de líquens cujos micobiontes são ascomicetos. Acredita-se que as galactomananas, como as mananas de levedura de padaria (25) façam parte de um complexo peptídico (30) mas que durante o processo de extração com álcali ocorra liberação da parte carboidratada.

TAKAHASHI e colaboradores (27) isolaram polissacarídeos , a partir de micobiontes de algumas espécies de *Cladonia* constituídos, principalmente, de manose e galactose e menor proporção de glucose. Os mesmos autores isolaram do ficobionte da *Ramalina crassa*, uma galactana cuja estrutura $\beta\text{-}\underline{\underline{D}}\text{-furanosídica}$ pôde ser proposta em virtude da rotação específica negativa - 85° (96). A descoberta de TAKAHASHI é surpreendente, uma vez que não havia sido encontrado, em plantas, polissacarídeos com unidades galactofuranosídi-

cas. Entretanto, a presença de unidades α -arabinofuranosídicas, estruturas comuns em plantas, juntamente com unidades galactofuranosídicas nas frações E e H, reforçaram a descoberta de TAKAHASHI.

Baseando-se nestas informações é provável que as frações polissacarídicas E e H constituídas principalmente de galactofuranose e arabinofuranose sejam produzidas pelo componente ficobionte do líquen *Sticta damaecornis*, enquanto a fração F, deve ser produzida pelo micobionte.

C O N C L U S Ã O

O líquen *Sticta damaecornis* foi extraído com metanol-água e o extrato resultante apresentou os componentes comuns arabinitol e manitol, além de volemitol, lactose e oligossacarídeos constituídos de glucose ligados (1 → 2) com mistura de ligações α e β. Pela primeira vez foram encontrados lactose em líquens e volemitol em líquens da família Stictaceae.

Três diferentes polissacarídeos foram obtidos neste líquen e tentativas foram realizadas para isolá-los puros. Duas frações (E e H) foram encontradas nos extratos aquoso e alcalino, respectivamente, estruturalmente semelhantes, com elevada proporção de unidades β-galactofuranosídicas e α-arabinofuranosídicas. Por analogia com β-galactofurananas previamente obtidas de ficobiontes e, desde que estruturas α-arabinofuranosídicas são comuns em plantas, é bastante provável que esses polissacarídeos se originem do componente ficobionte da *S. damaecornis*. Também foi isolada uma fração G com unidades α-galactofuranosídicas que já tinham sido observadas previamente, porém, somente em presença de unidades β-galactofuranosídicas. Finalmente, uma galactomanana da parede celular do micobionte, foi isolada como fração F, cujo núcleo é constituído de unidades D - manopiranosídicas ligadas (1 → 6), com resíduos D-manopiranosil e D-galactopiranosil ligados em 2-O e/ou 4-O da cadeia principal. Este componente é comum em ascolíquens.

R E F E R Ê N C I A S B I B L I O G R Á F I C A S

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. ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. Meth.Carbohydr.Chem., 5: 269-276, 1965.
3. AHMADJIAN, V. & HALE, M.E. The Lichens. Academic Press, New York, 1973.
4. ATANASIU, L., Variations of the amounts of soluble carbohydrates in the leaves of some conifers and winter cereals during the winter. Stud.Cercet.Biol., Ser. Bot. 20 (6): 503-507, 1968.
5. BARON, M. Isolamento e caracterização de α -D-glucana, laminaria, umbilicina e trealose do líquen *Stereocaulon ramulosum*. Tese-U.F.PR., 1985.
6. BERZELIUS, J.J. Versuche über die Mischung des Isländischen Moores und seine Anwendung als Nahrungsmittel. J. Chem. Phys., 17: 317-52, 1815.
7. BOCK, K. & PEDERSEN, C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. Adv.Carbohydr.Chem. Biochem., 41: 27-66, 1983.
8. BOCK, K.; PEDERSEN, C.; PEDERSEN, H. Carbon -13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides Adv. Carbohydr.Chem.Biochem., 42: 193-225, 1984.

9. BUSTON, H.W.; CHAMBERS, V. H. CCXXX . Some cell - wall constituents of *Cetraria islandica* (Iceland Moss). Biochem. J., 27: 1691-702, 1933.
10. 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.
11. CULBERSON, C.F. Chemical and botanical guide to lichen products. University of North Carolina Press, Chapel Hill, 1969.
12. _____ . First supplement to "Chemical and Botanical Guide to Lichen Products" Bryologist ., 73-177, 1970.
13. CULBERSON, C.F., CULBERSON, W.L.; JOHNSON, A. Second supplement to "Chemical and Botanical Guide to Lichen Products ". The American Bryological and Lichenological Society, Botanical Garden, St. Louis, 1977.
14. DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K. M. Data for Biochemical Research., 29 ed. Oxford, Clarendon Press, p. 541-2, 1969.
15. 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.
16. 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.
17. FILHO, L. & RIZZINI, C.T. Manual de Liquenologia Brasileira. Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, 1976. p.1-205.

18. FLEMING, M. & MANNERS, D.J. A comparison of the fine - structure of lichenin and barley glucan. Biochem.J., 100, 4p, 1966.
19. _____ . The fine structure of isolichenin. Biochem.J., 100: 24p, 1966.
20. FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M.; SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M. Polysaccharides in lichens and fungi. II. Antitumor activities on Sarcoma-180 of polysaccharide preparations from *Gyrophora esculenta* Miyoshi, *Cetraria islandica* (L). Ach. var. *Orientalis* Asahina, and some other lichens. Gann., 59: 421-32, 1968.
21. GARDELL, S. Fractionation on cellulose columns. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 9-14, 1965.
22. GAREGG, P.J.; LINDBERG, B.; NILSSON, K.; SWAHN, C.G. 1-O- β -D-Galactopyranosyl-D-ribitol from *Xanthoria parietina*. Acta. Chem. Scand., 27: 1595-1600, 1973.
23. GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 38: 13-104, 1981.
24. GORIN, P.A.J.; BARON, M.; IACOMINI, M. Storage products of lichens: high and low molecular weight carbohydrates, amino acids, and proteins. C.R.C. Press, no prelo.
25. GORIN, P.A.J & BARRETO-BERGTER, E. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 41: 67-103, 1983.

26. GORIN, P.A.J.; GIBLIN, E.M.; SLATER, G. P.; HOGGE, L .
Improved resolution of O-methyliditol acetates by gas -
liquid chromatography or capillary columns with blended coatings of
OV-17 and OV-225. Carbohydr. Res., 106: 235-8, 1982.
27. GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Novel glucans obtained on
dimethyl sulfoxide extraction of the lichens *Letharia*
vulpina, *Actinogyra muehlenbergii*, and *Usnea* sp. Carbohydr.
Res., submetido para publicação.
28. GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Polysaccharides of the
lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. Carbohydr.
Res., 128: 119-32, 1984.
29. GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Structural diversity of D -
galacto-D-mannan components isolated from lichens having
ascomycetous mycosymbionts. Carbohydr. Res., 142: 253 -
67, 1985.
30. GORIN, P.A.J. & LaRUE, T.M., dados não publicados.
31. GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Carbon-13 and proton nuclear
resonance studies on methyl aldofuranosides and their O-
alkyl derivatives. Carbohydr. Res., 48: 171-186, 1976.
32. GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Further studies on the
assignments of signals in ¹³C magnetic resonance spectra
of aldoses and derived methyl glycosides. Can.J.Chem.,
53: 1212-23, 1975.
33. GRANICHSTÄDTEN, H. & PERCIVAL, E.G.V. The polysaccharides

- of Iceland Moss (*Cetraria islandica*). Part. I. Preliminary study of the hemicelluloses. J.Chem.Soc., 54-58, 1943.
34. GROB, K. & GROB, K. JR. Isothermal analysis on capillary columns without stream splitting. J.Chrom., 94: 53 -64 , 1974.
35. HAUAN, E. & KJÖLBERG, O. Studies on the polysaccharides of lichens. I. The structure of a water-soluble polysaccharide in *Stereocaulon paschale* (L.)Fr. Acta.Chem.Scand., 25 : 2622-28, 1971.
36. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides general procedures. Meth.Carbohydr.Chem., 5: 357-60, 1965.
37. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars . J.Chem.Soc., 107: 8-16, 1915.
38. HIRST, E.L. & PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. Meth . Carbohydr.Chem., 5: 287-296, 1965.
39. 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.
40. IACOMINI, M.; SCHNEIDER, C.L.; GORIN, P.A.J. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer moss), *Cladonia confusa* and *Cladonia amaurocraeae*. Carbohydr.Res., 142: 237-51, 1985.
41. JANSSON, P.E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. Chem.Commun.B., 70 p., 1976.

42. JANSSON, P-E. & LINDBERG, B. Structural studies of varianose. Carbohydr.Res., 82: 97-102, 1980.
43. JOLY, A.B. Introdução a Taxonomia Vegetal-Botânica. Companhia Editora Nacional-Editora da Universidade de São Paulo, 29 ed. 1975.
44. KOMIYA, T. & SHIBATA, S. Polyols produced by the cultured phyco and mycobionts of some *Ramalina* sp. Phytochem., 10: 695-99, 1971.
45. KUHN, R.; TRISCHMANN, H.; LÖW, I. Zur Permethylierung von Zuckern und Glykosiden. Angew.Chem., 67 (1): 32, 1955.
46. LESTANG-LAISNÉ, G. Sur l'interférence du métabolisme glucidique d'un champignon ascomycète et du métabolisme glucidique d'une algue bleue dans un lichen: *Lichina pygmaea* Agardh. Rev.Bryol.Lichénol., 34: 346-69, 1966.
47. LEWIS, D.H. & SMITH, D.C. Sugar alcohols in fungi and green plants. New Phytol., 66: 143-84, 1967.
48. LINDBERG, B. Studies on the chemistry of lichens. VIII . Investigation of a *Dermatocarpon* and some *Roccella* sp. Acta.Chem.Scand., 9: 917-19, 1955.
49. LINDBERG, B. & McPHERSON, J. Studies on the chemistry of lichens. VI. The structure of pustulan. Acta.Chem.Scand., 8 (6): 985-88, 1954.
50. LINDBERG, B. & MEIER, H. Studies on chemistry of lichens. Siphulitol, a new polyol from *Siphula ceratites*. Acta Chem.Scand., 16 (3): 543-47, 1962.
51. LINDBERG, B.; MISIORNY, A.; WACHTMEISTER, C.A. IV. Investigation of the low-molecular carbohydrates of different lichens . Acta.Chem.Scand., 7: 591-5, 1953.

52. LINDBERG, B.; SILVANDER, B.G.; WACHTMEISTER, C.A. Studies on the chemistry of lichens. 18. 3-O- β -D-Glucopyranosyl-D-mannitol from *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. Acta.Chem.Scand., 17: 1348-50, 1963.
53. LINDBERG, B.; SILVANDER, B.G.; WACHTMEISTER, C.A. Studies on the chemistry of lichens. 19. Mannitol glycosides in *Peltigera* species. Acta.Chem.Scand., 18: 213-216, 1964.
54. LINDBERG, B.; 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: 1052-55, 1952.
55. LINDBERG, B. & WICKBERG, B. Studies on the chemistry of lichens. III. Disaccharides from *Umbilicaria pustulata* (L.) Hoffm. Acta.Chem.Scand., 7: 140-142, 1953.
56. LINDBERG, B. & WICKBERG, B. Studies on the chemistry of lichens. V. The furanoside structure of Umbilicin. Acta.Chem.Scand. 8: 821-24, 1954.
57. LINDBERG, B. & WICKBERG, B. Studies on the chemistry of lichens. 17. The structure of Umbilicin. Acta.Chem.Scand., 16: 2240-44, 1962.
58. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193: 265-75, 1951.
59. MCKIBBIN, J.M. The Carbohydrates. Academic Press. New York. 1972. Vol. IIB:
60. MEYER, K. & GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXI. La constitution de la lichénine. Helv.Chim.Acta., 30: 751-60, 1947.
61. MEYER, K.H. & GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXII. L'isolichénine. Helv.Chim.Acta., 30: 761-65, 1947.

- STOJANOVIĆ, J. Structural study of polysaccharides from oak lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach.. Carbohydr. Res. , 10: 525-33, 1969.
63. NISHIKAWA, Y.; MICHISHITA, K.; KURONO, G. Studies on the water soluble constituents of lichens. I. Gas chromatographic analysis of low molecular weight carbohydrates. Chem. Pharm.Bull., 21 (5): 1014-19, 1973.
64. NISHIKAWA, Y.; OHKI, K.; TAKAHASHI, K.; KURONO, G.; FUKUOKA, F.; EMORI, M. Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea* and *Cladonia* species. Chem.Pharm.Bull., 22 (11) : 2692-702, 1974.
65. NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. IV. Antitumor active O-acetylated pustulan-type glucans from the lichens of *Umbilicaria* species. Chem.Pharm.Bull., 18 (7): 1431-34, 1970.
66. PAZUR, J.H. Oligosaccharides. Carbohydr.Chem.Biochem. , 29 ed. vol. IIA, Academic Press, 1970, 69-137.
67. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; ROBERTS, J.G. The structure of lichenin. J.Chem.Soc., 3916-24, 1957.
68. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; TURVEY, J.R.; MORGAN, K. The structure of isolichenin. J.Chem.Soc., 623-29, 1961.
69. PERLIN, A.S. & SUZUKI, S. The structure of lichenin: selective enzymolysis studies. Can.J.Chem., 40: 40 - 56, 1962.
70. PUEYO, G. Présence de mannitol et d'arabitol dans de

nouvelles espèces des lichens. Un hétéroside nouveau (peltigéroside) dans *Peltigera horizontallis* Hoffm. Rev.Bryol.Lichénol., 29: 124-129, 1960.

71. PUEYO, G. Identification par chromatographie en papier des glucides solubles des lichens, I.Sucres. Rev.Bryol.Lichénol., 32: 279-84, 1963.
72. PUEYO, G. Identification par chromatographie sur papier des glucides de *Xanthoria parietina* Belr. de diverses stations. Bull.Cent.Etud.Rech.Sc.Biarritz. 5: 97-101, 1964.
73. PUEYO, G. Constituants glucidiques dans les lichens.Poly alcools. Ann.Fals. Exp.Chim., 73:Nº787,331-37, 1980.
74. PUEYO,G. Constituants glucidiques dans les lichens. II. Oses. Ann.Fals.Exp.Chim., 73:Nº789,509-13, 1980..
75. PUEYO, G. Constituants glucidiques dans les lichens.III, Osides. Ann.Fals.Exp.Chim., 74:Nº797,343-347, 1981.
76. QUILLET, M. & LESTANG-LAISNÉ, G. Convenance glucidique de l'association symbiotique cyanophycée-ascomycète . Bull.Soc.Bot.Fr.Mém., 135-140, 1968.
77. RICHARDSON, D.H.; HILL, D.H.; SMITH, D. C. : Lichen physiology XI- The role of the alga in determining the pattern of carbohydrate movement between lichen symbionts. New Phytol., 67: 469 -486, 1968.
78. RICHARDSON, D.H.S.; SMITH, D.C.; LEWIS, D.H. Carbohydrate movement between the symbionts of lichens. Nature, 214: 879-882, 1967.
79. 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.
80. SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. Meth.Carbohydr.Chem., 5: 38-44, 1965.
81. SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber Anal. Biochem., 96: 282-292, 1979.
82. SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; FUKUOKA, F.; NAKA - NISHI, 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.
83. SOLDBERG, Y.J. Studies on the chemistry of lichens. VII . Chemical investigations of the lichen species *Lecanora (aspicilia) myrinii*. Nyl.Z. Nature, 24: 447-451, 1969.
84. SOLDBERG, Y.J. Studies on the chemistry of lichens. VIII. An examination of the free sugars and ninhydrin-positive compounds of several Norwegian lichen species. Lichenol., 4: 271-82, 1970.
85. 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.
86. TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S.; INOMATA, M., FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi VI. Antitumor active polysaccharides of lichens *Stictaceae*. Chem.Pharm. Bull., 22 (2): 404-08, 1974.

87. TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S. Polysaccharides of lichen symbionts. Chem.Pharm.Bull., 27(1): 238 - 41, 1979.
88. TAKEDA, T.; FUNATSU, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi V. Antitumor active polysaccharides of lichens of *Evernia*, *Acroscyphus* and *Alectoria* spp. Chem.Pharm. Bull. 20 (11): 2445-49, 1972.
89. TAKEDA, T.; NISHIKAWA, Y.; SHIBATA, S. A new α glucan from the lichen *Parmelia caperata* (L.) Ach. Chem.Pharm.Bull., 18 (5): 1074-75, 1970.
90. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.F.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444, 1950.
91. ULANDER, A. & TOLLENS, B. Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten. Chem.Ber., 19: 401, 1906.
92. ZANIN, S.M.W. Isolamento e caracterização dos componentes β -D-glucana, heteropolissacarídeo e α - α -trealose do líquen basidiomiceto *Cora pavonia* (Sw.) Fr., Tese de Mestrado-UFPR., 1985.
93. YOKOTA, I. & SHIBATA, S. A polysaccharide of the lichen, *Stereocaulon japonicum*. Chem.Pharm.Bull., 26 (9):2668-70, 1978.
94. WHISTLER, E.L. & BeMILLER, J.N. Cellulose column chromatography. Meth.Carbohydr.Chem., 1: 47-50, 1962.
95. WHISTLER, R.L. & DURSO, D.F. Chromatographic separation of sugars on charcoal. J.Am.Chem.Soc., 72: 677-9, 1950.
96. WHISTLER, R.L. & SMART, C.L. Polysaccharide chemistry , Academic Press, New York, 1953, 493 p.

97. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. Meth.Carbohydr. Chem., 2: 211-15, 1963.