

ADIRCE MOREIRA MICENO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
 $\alpha$ -D-GLUCANA E D-GALACTOMANANA DO LÍQUEN  
*Ramalina Ecklonii* (Spreng.) Mey. & Flot.

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

CURITIBA

1988

Orientadores: *Prof. Dr. Marcello Tacomini*  
*Prof. Dr. Philip Albert James Gorin*

*Dedico este trabalho à minha  
Deusa ISIS, aos meus sete fi  
lhos e aos meus pais.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcello Iacomini, por nos ter aceito como seu orientado, pela permanente assistência e orientação e sobretudo pela amizade que fez crescer no ambiente de trabalho, o que facilitou o desenvolvimento da nossa pesquisa e a elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. Philip Albert James Gorin, pela importante orientação, revisão do manuscrito e interpretação dos espectros de ressonância nuclear magnética de carbono treze, para o que foi sempre solícito, bem como ao apoio técnico dado na realização de análises efetuadas no Canadá.

Ao Prof. Dr. João Batista Chaves Corrêa, pelo apoio nas análises de cromatografia líquida-gasosa.

Aos Profs. Dr. Aguinaldo José do Nascimento, Dr. José Hazencleve Duarte, Dra. Fany Reicher e Dra. Maria Rita Sierakowski, pela colaboração que nos prestaram nas mais diversas situações.

A todos os professores diretamente envolvidos ou não com o Curso de Pós-Graduação, bem como aos funcionários, por toda forma de colaboração e pelo agradável convívio.

À colega e amiga pós-graduanda Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva, pela paciente e importante ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho e pela grande amizade.

A todos os colegas pós-graduandos, em especial à Madalena Baron, Geny Aparecida Cantos, Roberto Pontarolo, Maria Eugênia Rabello Duarte, Joana Léa Meira Silveira Ganter, Padre Guido Edgar Wenzel, bem como ao estagiário Miguel Nosedá e estagiárias Tereza Cristina Leal Brandão, Simone Wanise Mello e Luciane Eid Massabki.

À estagiária Thais Liane Pie, pela ajuda na confecção dos gráficos.

À Maria da Graça Zanetti, pela excelência do seu serviço de datilografia e carinho na confecção e montagem desta tese.

Ao Prof. Estefano Francisco Jablonski, da PUC do Paraná, com quem iniciei a coleta de líquens.

Ao Dr. M. Mazurek, of Plant Biotechnology Institute, National Research Council, Saskatoon, Canadá, pela análise de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r.

Aos Drs. Hector S. Osório do Departamento de História Natural - Montevideo - Uruguai e Mason E. Hale do National Museum of Natural History - Smithsonian Institute - Washington-USA, pela classificação sistemática do líquen *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas pela atenção com que sempre nos atendeu.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À Coordenação de Pós-Graduação da UFMS, pelo permanente apoio prestado.

Aos colegas do meu CEUL, pelo incentivo.

Acima de tudo agradeço ao Grande Arquiteto do Universo.

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS .....	<i>iii</i>
LISTA DE FIGURAS .....	<i>ix</i>
LISTA DE TABELAS .....	<i>xi</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	<i>xii</i>
LISTA DE FRAÇÕES .....	<i>xiv</i>
RESUMO .....	<i>xv</i>
SUMMARY .....	<i>xvi</i>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
2.1. LOCAL DE COLETA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DO LÍQUEN <i>Ramalina ecklonii</i> (Spreng.) Mey. and Flot. ....	21
2.2. TRATAMENTO PRÉVIO DO LÍQUEN <i>Ramalina ecklonii</i> (Spreng.) Mey. and Flot. ....	21
2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS .....	22
2.4. ISOLAMENTO DOS ALDITÓIS, OLIGOSSACARÍDEOS E POLIS SACARÍDEOS DO LÍQUEN <i>Ramalina ecklonii</i> (Spreng.) Mey. and Flot. ....	25
2.4.1. Extração benzeno-etanol .....	25
2.4.2. Extração metanol-água .....	25
2.4.2.1. Fracionamento dos alditóis e oli- gossacarídeos por cromatografia em coluna de carvão-celite (1:1). ....	26
2.4.2.2. Fracionamento dos alditóis e oli- gossacarídeos da fração-B pela cromatografia em coluna de celu- lose .....	26

2.4.3.	Extração aquosa .....	27
2.4.3.1.	Separação dos polissacarídeos do precipitado etanólico por congelamento e degelo .....	27
2.4.3.2.	Fracionamento dos polissacarídeos do sobrenadante aquoso por precipitação com solução de Fehling ..	28
2.4.3.3.	Fracionamento dos polissacarídeos purificados pela solução de Fehling, por precipitação com Cetavlon (brometo de hexadeciltrimetilamônio) .....	29
2.4.3.3.1.	Precipitado de Fehling..	29
2.4.3.3.2.	Sobrenadante de Fehling .....	30
2.4.3.4.	Resíduo liquênico após extração aquosa .....	30
2.4.3.5.	Sobrenadante etanólico da extração aquosa .....	31
2.4.3.6.	Precipitado resultado do gelo e degelo .....	31
2.4.4.	Extração alcalina .....	31
2.4.4.1.	Separação dos polissacarídeos do precipitado etanólico por congelamento e degelo .....	31
2.4.4.2.	Fracionamento dos polissacarídeos do sobrenadante alcalino por precipitação com solução de Fehling.	32
2.4.4.3.	Fracionamento dos polissacarídeos do precipitado de Fehling por tratamento com Cetavlon .....	33
2.5.	TESTES DE HOMOGENEIDADE APLICADOS AOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DAS EXTRAÇÕES AQUOSA E ALCALINA ....	34
2.5.1.	$\alpha$ -D-glucana .....	34
2.5.2.	Galactomananas da extração aquosa e com KOH a 2% aquoso .....	34
2.6.	HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DAS GALACTOMANANAS DA EXTRAÇÃO COM KOH A 2% AQUOSO E EXTRAÇÃO AQUOSA.....	34

2.7.	ACETÓLISE PARCIAL DA GALACTOMANANA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO COM KOH A 2% AQUOSO .....	35
2.7.1.	Fracionamento dos oligossacarídeos acetolisados, por cromatografia preparativa .....	36
2.8.	DETERMINAÇÕES DO CONSUMO DE META-PERIODATO DE SÓDIO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO PELOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DAS EXTRAÇÕES AQUOSA E ALCALINA ....	36
2.8.1.	Consumo de meta-periodato de sódio .....	36
2.8.2.	Produção de ácido fórmico .....	37
2.9.	DEGRADAÇÃO CONTROLADA TIPO SMITH DA $\alpha$ -D-GLUCANA..	37
2.10.	FRACIONAMENTO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA TIPO SMITH, DA $\alpha$ -D-GLUCANA POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA .....	38
2.11.	METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA E KOH 2% AQUOSO.....	39
2.11.1.	Polissacarídeos obtidos da extração aquosa e KOH 2% AQUOSO .....	39
2.11.2.	Oligossacarídeos obtidos da degradação de Smith da $\alpha$ -D-glucana .....	40
2.12.	ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DOS POLISSACARÍDEOS PER-O-METILADOS, NA FORMA DE ACETATO DE ALDITÓIS .....	40
2.13.	ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DOS OLIGOSSACARÍDEOS METILADOS, NA FORMA DE ACETATO DE ALDITÓIS .....	41
2.14.	DOSAGEM DE PROTEÍNAS E NITROGÊNIO TOTAL DOS POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA E KOH 2% AQUOSO...	41
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
3.1.	COMPONENTES SOLÚVEIS NO EXTRATO METANOL-AQUOSO...	44
3.2.	POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA .....	48
3.2.1.	Polissacarídeo do sobrenadante de gelo e degelo .....	48
3.2.1.1.	Polissacarídeo do sobrenadante de Fehling .....	48
3.3.	POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA E COM KOH AQUOSO A QUENTE .....	61
3.3.1.	Polissacarídeos do sobrenadante de gelo e degelo da extração com KOH aquoso .....	62

3.3.2. Precipitado de Fehling da extração aquosa e com KOH aquoso (galactomananas) .....	62
3.3.3. Sobrenadante de Fehling da extração com KOH aquoso .....	74
3.3.4. Polissacarídeos do precipitado obtido por congelamento e degelo do extrato aquoso e alcalino .....	75
CONCLUSÕES .....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Cromatogramas obtidos por g.l.c. do extrato metanol-água (Fração A): A - acetilada, B-reduzida e acetilada e C-hidrolisada, reduzida e acetilada .....	46
Figura 2 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarádeos do extrato aquoso (precipitado etanólico total) .....	49
Figura 3 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarádeos do sobrenadante de gelo e degelo do extrato aquoso .....	50
Figura 4 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total do polissacarídeo do sobrenadante de Fehling (extração aquosa) .....	51
Figura 5 - Cromatograma da $\alpha$ - <u>D</u> -glucana em Sephadex G-100 eluída com solução de cloreto de sódio 0,9%. Frações de 1 mL .....	53
Figura 6 - Espectro de $^{13}\text{C}$ -n.m.r. em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a $70^\circ\text{C}$ , da $\alpha$ - <u>D</u> -glucana.....	54
Figura 7 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de degradação tipo Smith da $\alpha$ - <u>D</u> -glucana .....	57
Figura 8 - Cromatogramas obtidos por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos produtos de degradação de Smith controlada da $\alpha$ - <u>D</u> -glucana .....	59

- Figura 9 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total da galactomanana da extração aquosa: A - precipitado de Fehling e B - precipitado de Fehling, seguindo de precipitação com Cetavlon em pH 8,5 ..... 63
- Figura 10 - Cromatogramas obtidos por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do extrato alcalino: A - precipitado etanólico total e B - galactomanana do precipitado de Fehling ..... 65
- Figura 11 - Cromatogramas das galactomananas em coluna de Sepharose 4B-200 (50 X 2,1 cm d.i.). As amostras analisadas (2 mg) foram eluídas com água destilada na velocidade de escoamento de 13 mL/h. Frações de 1 mL do eluato foram coletadas à temperatura ambiente. A - extração aquosa B - extração com KOH aquoso a 2% ..... 68
- Figura 12 - Espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) a  $70^\circ\text{C}$ , das galactomananas obtidas: A - via extração aquosa e B - via extração com KOH. Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m. .... 72
- Figura 13 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de hidrólise ácida total do oligossacarídeo obtido pela acetólise parcial da galactomanana extraída com KOH aquoso..... 73
- Figura 14 - Espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) a  $70^\circ\text{C}$  da mistura de glucanas extraída com KOH. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. .... 76

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela I - Análise por g.l.c. da fração-A obtida pela extração metanol-água do líquen <i>Ramalina ecklonii</i> (Spreng.) Mey. & Flot.....	47
Tabela II - Propriedades de alguns polissacarídeos obtidos por extração aquosa do líquen <i>Ramalina ecklonii</i> (Spreng.) Mey. and Flot.....	52
Tabela III - Sinais atribuíveis e de relevância estrutural de $^{13}\text{C}$ -n.m.r. e suas atribuições para $\alpha$ - <u>D</u> -glucana .....	55
Tabela IV - Propriedades de alguns polissacarídeos obtidos por extração com KOH do líquen <i>R. ecklonii</i> (Spreng.) Mey. and Flot. ....	66
Tabela V - Resultados da análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis parcialmente <u>O</u> -metilados, da galactomanana obtida com a extração alcalina .....	71
Tabela VI - Propriedades do oligossacarídeo dos produtos de hidrólise ácida total de oligossacarídeo obtido pela acetólise parcial da galactomanana extraída com KOH aquoso, na forma de seus acetatos de alditóis (OV-225 , 190°C) .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOH	- Ácido acético
AgNO <sub>3</sub>	- Nitrato de prata
α	- alfa
β	- beta
c.	- Concentração
cm <sup>3</sup>	- Centímetro cúbico
Cetavlon	- Brometo de hexadeciltrimetilamônio
<sup>13</sup> C-n.m.r.	- Ressonância nuclear magnética de carbono treze
cm	- Centímetro
c.p.	- Cromatografia em papel
D <sub>2</sub> O	- Óxido de deutério
δ	- Delta em p.p.m.
d.i.	- Diâmetro interno
g	- Grama
g.l.c.	- Cromatografia líquida-gasosa
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- Ácido sulfúrico
Hz	- Hertz
h	- Hora
KOH	- Hidróxido de sódio
L	- Litro
M	- Molaridade
m	- Metro
mg	- Miligrama
min	- Minuto
mL	- Mililitro
mm	- Milímetro
NaBH <sub>4</sub>	- Boroidreto de sódio
NaOD	- Hidróxido de sódio deuterado
nm	- Nanômetro
p.p.m.	- Parte por milhão
r.p.m.	- Rotação por minuto
R <sub>GAL</sub>	- Mobilidade em c.p. relativo à galactose

$R_{GE}$	- Mobilidade em c.p. relativa ao 2- <u>O</u> - $\beta$ -glucopiranosil- <u>D</u> -eritritol
s	- Segundo
T	- Tempo de retenção em g.l.c.
TFA	- Ácido trifluoracético
TMS	- Tetrametilsilano
$\mu$ g	- Micrograma
$\mu$ m	- Micrômetro
v/v	- Volume/volume

## LISTA DE FRAÇÕES

	Página
Fração A - Extrato metanol-aquoso total .....	25
A <sub>1</sub> - Extrato metanol-aquoso - eluato da coluna de carvão-celite .....	26
A <sub>2</sub> - Extrato metanol-aquoso - frações signifi- cativas do eluato .....	26
Fração B - Extrato aquoso - precipitado etanólico .....	27
B <sub>1</sub> - Extrato aquoso - sobrenadante de Fehling.	28
B <sub>1.1</sub> - Extrato aquoso - sobrenadante de Fehling - produtos da degradação de Smith	38
B <sub>2</sub> - Extrato aquoso - precipitado de Fehling..	29
B <sub>3</sub> - Extrato aquoso - precipitado de gelo/de- gelo .....	73
Fração C - Extrato alcalino - precipitado etanólico .....	31
C <sub>1</sub> - Extrato alcalino - precipitado de gelo/ degelo .....	32
C <sub>2</sub> - Extrato alcalino - sobrenadante de Fehling ..	32
C <sub>3</sub> - Extrato alcalino - precipitado de Fehling ...	32

## RESUMO

O líquen *Ramalina ecklonii* forneceu principalmente uma  $\alpha$ -D-glucana obtida pela extração aquosa, com o elevado rendimento de 25,7% e uma D-galactomanana, obtida através da extração alcalina, com rendimento de 3,7%

A  $\alpha$ -D-glucana tem uma estrutura linear em que as unidades de glucose encontram-se ligadas por  $\alpha$ -(1 + 3) e  $\alpha$ -(1 + 4) na relação molar de 3:1. A sequência das mesma foi verificada pela análise estrutural dos três oligossacarídeos obtidos pela degradação de Smith controlada, que demonstra estar estas ligações dispostas de forma irregular ao longo do polímero, estrutura típica da família de isolequenanas.

A galactomanana é formada por uma cadeia principal constituída por unidades  $\alpha$ -D-manopiranosídicas ligadas por (1 + 6) não substituídas, também mono-O-substituídas em O-4 e di-O-substituídas em O-2 e O-4, por unidades  $\beta$ -D-galactopiranosídicas.

Evidências preliminares foram obtidas quanto à presença de uma  $\beta$ -D-glucopiranana linear ligada por (1 + 3) e uma  $\alpha$ -D-glucopiranana (mycodextrana), nigerana, também linear, contendo ligações (1 + 3) e (1 + 4) com relação molar aproximadamente 1:1. Quanto a isto *R. ecklonii* contém uma acentuada diversidade em glucanas.

## SUMMARY

On hot aqueous extractions, the lichen *Ramalina ecklonii* provided principally an  $\alpha$ -D-glucan, isolated in a high yield of 25.7%. Also isolated via aqueous alkaline extraction was a galactomannan (3.7% yield).

The  $\alpha$ -D-glucan is linear with (1 + 3) and (1 + 4)-linkages in a molar ratio of 3:1. The arrangement of these linkages along the chain was shown by a controlled Smith degradation, to be irregular, typical of the family of isolichenans.

The galactomannan has a main chain consisting of (1 + 6)-linked  $\alpha$ -D-mannopyranosyl units, which are unsubstituted, mono-O-substituted at O-4, and di-O-substituted at O-2,4 by  $\beta$ -D-galactopyranosyl units. This type of disubstitution represents a hitherto unreported structure in lichen galactomannans.

Preliminary experiments showed the presence of a (1 + 3)-linked linear  $\beta$ -D-glucopyranan and an  $\alpha$ -D-glucopyranan with (1 + 3)- and (1 + 4)-linkages in a 1:1 ratio (mycodextran, nigeran). Thus *R. ecklonii* contains a diversity of glucans, which is rare in lichens.

## 1 INTRODUÇÃO

A primeira descrição dos líquens, segundo XAVIER L. FILHO e RIZZINI (95), que destacam o trabalho de inúmeros pesquisadores, foi feita por TOURNEFORT em 1764, que no entanto, não os distinguiu dos musgos. A verdadeira definição do termo "líquen" (do grego "lichen"), como planta rasteira ou lambechão, em que os apotécios foram chamados de receptáculos florais, foi feita em 1729 pelo biólogo italiano Micheli.

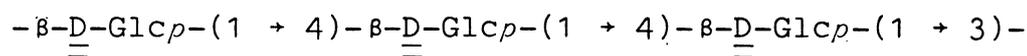
Quase um século depois, em 1815, é que BERZELIUS veio publicar o primeiro trabalho sobre o isolamento de um polisacarídeo via sua precipitação por resfriamento de um extrato aquoso quente, obtido do líquen *Cetraria islandica* "Iceland moss", dando com isso os primeiros passos no estudo dos componentes químicos dos líquens. Contudo, a verdadeira natureza dos líquens só viria ser conhecida em 1868, quando o biólogo suíço SIMON SCHWENDENER demonstrou tratar-se, não de uma entidade vegetal e sim, de uma simbiose complexa de fungo e alga; idéia que, entretanto, não foi bem aceita pelos botânicos da época. Todavia, quarenta anos antes da definição dada aos líquens por SCHWENDENER, MARTIUS, o precursor da botânica no Brasil, no seu livro "Icones Plant. Cryptog." de 1828, se reportava ao estudo de líquens brasileiros, possivelmente sem conhecer a sua estruturação de vegetal simbiote "alga-fungo", o que, entretanto, lhe valeu o título de "pioneiro dos estudos sobre líquens no Brasil".

Em 1833, F. ESCHWEILER, no seu livro "Lichens in Martius, Fl. Bras.", estaria publicando comentários sobre os trabalhos de Martius.

MARTIUS, em 1843, ao publicar um outro livro "Sist. Mat. Med. Brasil", se reporta à utilização dos líquens como medicamento, ao observar que a população de Minas Gerais utilizava-se dos mesmos no tratamento de "afta das crianças", observação confirmada em 1957 por FUJIKAWA et alii (29).

Mesmo sem o total conhecimento da estrutura liquênica, muitos pesquisadores apresentavam trabalhos sobre sistemática, mas só por volta de 1890 é que outros pesquisadores como W. ZOPF, daria a conhecer seus trabalhos sobre a estrutura química dos líquens.

Os estudos detalhados para determinação da estrutura fina dos componentes de líquens surgiram novamente na literatura em 1947 com MEYER e GÜRTLER (66), os quais, trabalhando com o líquen *C. islandica*, isolaram um polissacarídeo pelo mesmo procedimento de BERZELIUS, o qual foi denominado "lichénine", ou mais precisamente uma  $\beta$ -D-glucana linear contendo ligações (1 + 3) e (1 + 4), na proporção molar de 1:3. Estudos posteriores para determinação da sequência das ligações (1 + 3) e (1 + 4) deste polímero foram realizados em 1957 por CHANDA et alii (18), utilizando o mesmo procedimento de extração aquosa quente, precipitação por resfriamento e posterior fracionamento com solução de Fehling; PEAT et alii (73), em 1957, com estudos através de hidrólise ácida parcial; PERLIN e SUZUKI (75), em 1962, por processos de enzimólise seletiva com enzimas celulase e laminarinase; bem como FLEMING e MANNERS (26), em 1966, utilizando degradação de Smith controlada, concluiu-se por um polissacarídeo estruturalmente constituído por uma sequência de celotriosos, que indicam duas ligações consecutivas (1 + 4), alternada por uma ligação (1 + 3) isolada; porém, ocasionalmente, quatro monômeros consecutivos apresentavam-se unidos por ligações (1 + 4), sendo então sugerida a estrutura I como predominante:



(I)

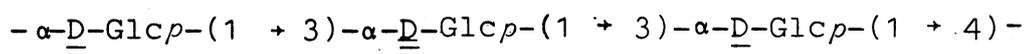
Em 1947, em outro trabalho sobre *Cetraria islandica*, MEYER e GÜRTLER (67) isolaram um polissacarídeo do sobrenadante aquoso frio, que foi denominado "l'isolichénine", o qual, por hidrólise ácida forneceu principalmente glucose, mas também traços de galactose e manose. Contudo, em 1957, CHANDA et alii (18), utilizando o mesmo procedimento de extração aquosa, obtiveram desse líquen um polissacarídeo similar ao isolado por MEYER e GÜRTLER, o qual, entretanto, ao ser tratado com solução de Feh-

ling, apresentou-se constituído apenas por resíduos de D-glucose. A análise por polarimetria, metilação e oxidação com periodato mostrou que este polímero é de configuração alfa com ligação (1 + 3) e (1 + 4), numa relação molar de 60:40.

Em 1961, PEAT et alii (74), após os estudos sobre os produtos de hidrólise ácida parcial da isoliquenana e oxidação com periodato confirmaram a presença das ligações  $\alpha$ -(1 + 3) e  $\alpha$ -(1 + 4), numa relação molar de 55:45.

Em 1966, FLEMING e MANNERS (27), efetuando também a degradação de Smith controlada sobre a isoliquenana, tal como já haviam feito com a liquenana, obtiveram desta os seguintes produtos:  $\alpha$ -nigerosil-eritritol (43%),  $\alpha$ -glucosil-eritritol (38%) e em menores quantidades - glicerol (3%), eritritol (6%), nigerose (3%) e um oligossacarídeo de peso molecular mais elevado (possivelmente nigerotriosil-eritritol) (5%). Assim, calcularam a proporção das ligações (1 + 3) e (1 + 4) em 57:43.

Face a esses resultados, concluiu-se que a estrutura da isoliquenana apresentava seqüências de um ou dois resíduos de glucose unidos por ligações  $\alpha$ -(1 + 3), alternados por resíduos de glucose unidos por ligações  $\alpha$ -(1 + 4). Todavia, a relação molar de ligações (1 + 3) e (1 + 4) presente na isoliquenana permanecia duvidosa até que, em 1984, GORIN e IACOMINI (34), empregando a espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. ao analisar os polissacarídeos de *C. islandica*, bem como o *R. usnea*, obtiveram de ambas, isoliquenanas que apresentaram espectro com sinais para C-3 ( $\delta$  82,1 e 81,9) e C-4 ( $\delta$  79,3) substituídos, numa relação molar de 66:34, indicando uma proporção superior de resíduos de glucose substituídos em C-3, ao contrário de 60% (18), 55% (74) e 57% (27), em que não havia sido empregado esse recurso para a química de carboidrato, sugerindo uma estrutura com duas ligações consecutivas  $\alpha$ -(1 + 3), alternada por uma ligação  $\alpha$ -(1 + 4) isolada (estrutura II), embora uma outra estrutura com seqüência alternada de ligações  $\alpha$ -(1 + 3) e  $\alpha$ -(1 + 4) também ocorresse ao longo do polímero.



(II)

Objetivando isolar outros componentes carboidratados de *C. islandica*, além dos já conhecidos, CHANDA et alli (18), através dos processos de extração e fracionamento descritos, separaram a liquenana da isoliquenana. Esta última, apresentava-se constituída principalmente por glucose, mas pequenas quantidades de galactose, manose e uma pentose, estavam presentes. Tratando este polissacarídeo com solução de Fehling, os autores obtiveram uma isoliquenana mais pura, segundo sua rotação específica, entretanto, traços de galactose e manose ainda permaneciam. Observações semelhantes já haviam sido feitas por KARRER e JOOS, em 1924 (54), os quais, ao isolar a liquenana da *C. islandica*, por resfriamento do seu extrato aquoso quente e tratamento do sobrenadante com solução de Fehling, obtiveram um complexo cúprico insolúvel, o qual, após decomposição por ação do ácido acético diluído, forneceu um polissacarídeo formado por glucose, galactose e manose, com relação molar 44:35:21, indicando uma co-precipitação de um heteropolissacarídeo contendo manose galactose, como complexos cúpricos, juntamente com uma liquenana residual.

Em 1933, BUSTON e CHAMBERS (17), empregando o processo de extração aquosa quente, em *C. islandica* seguido por extração a frio com solução aquosa de hidróxido de sódio a 4% e posteriormente a quente, isolaram do resíduo liquênico uma fração chamada hemicelulose, constituída particularmente por manose e galactose, bem como ácido urônico (galacturônico). É oportuno ressaltar que o termo "hemicelulose" utilizado por BUSTON e CHAMBERS como significado de substâncias resistentes à extração com água, mas solúvel em álcali diluído, deveria ser uma definição incorreta, uma vez que as hemiceluloses não poderiam ser definidas unicamente por suas propriedades de solubilidade.

Em 1943, GRANISCHSTÄDTEN e PERCIVAL (41), submetendo também, o líquen *C. islandica* à extração aquosa e alcalina, nas mesmas condições descritas por BUSTON e CHAMBERS não obtiveram resultados similares, como confirmação daquela propriedade atribuída às hemiceluloses, uma vez que o tratamento posterior do extrato alcalino com solução de Fehling forneceu um complexo cúprico insolúvel, o qual, após decomposição por ácido diluído, forneceu uma mistura de polissacarídeos constituída de glucose (89%), galactose (7%), manose (3%) e um ácido urônico (5%). Esta eleva-

da concentração de glucose no extrato alcalino mostrou uma diferença significativa em comparação ao extrato alcalino obtido por BUSTON e CHAMBERS (17), no qual a glucose se mostrou ausente, tendo sido revelada apenas no resíduo celulósico após extração e exaustiva com solução aquosa de hidróxido de sódio a 17%, quando pelo menos 80% desse resíduo forneceu glucose. Estes resultados discordam ainda daqueles relatados por ULANDER e TOLLENS (94), que em 1906 haviam relatado a presença de manose e galactose no resíduo líquênico de *C. islandica*, *C. rangiferina*, *Peltigera aphthosa* e outras espécies, bem como quantidade significativa de glucose, após a remoção de liquenana por extração aquosa quente, observação esta também confirmada por HESSE em 1916, segundo BUSTON e CHAMBERS (17).

GRANICHSTÄDTEN e PERCIVAL (41), baseados nos dados de metilação foram os primeiros a encontrar uma possível estrutura de um heteropolímero de *Cetraria islandica*, embora o mesmo não tenha sido isolado no estado puro, uma vez que a glucose obtida do extrato alcalino certamente era oriunda da liquenana residual parcialmente extraída por água quente. Foi demonstrado por aqueles autores a presença do derivado metilado 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose, indicando que aquele polissacarídeo era ramificado, com unidades terminais não redutoras de D-galactopiranoose, enquanto que, os polissacarídeos isolados daquele líquen, eram todos lineares.

Além dos intensos trabalhos dirigidos para a determinação da estrutura química dos componentes de *Cetraria islandica*, as atenções dos pesquisadores se voltaram também para outros líquens. ASPINALL et alii (7), em 1955, trabalhando com o líquen *Cladonia alpestris*, submeteram-no a uma extração com solução aquosa de hidróxido de potássio a frio, e posteriormente o fracionaram via precipitação com solução de Fehling. Através desse processo, obtiveram uma mistura de polissacarídeo extremamente ramificado; o inicialmente precipitado com etanol continha glucose (51,4%), galactose (12,6%) e manose (34,2%), enquanto que, a fração correspondente ao complexo cúprico apresentou a composição: glucose (28,2%), galactose (15,2%) e manose (49,8%), mostrando que, embora reproduzível, não era um polissacarídeo homogêneo. Os dados de metilação desse material mostraram que a maioria dos resíduos de D-galactose ocupavam as posições terminais, bem como uma

pequena quantidade dos resíduos de D-glucose e D-manose, ao passo que a cadeia principal da estrutura molecular era constituída especialmente por resíduos de D-glucose e D-manose. O fato desse líquen conter mais que 90% de carboidrato, aumentou o interesse pelo seu estudo, supondo-se que ele pudesse servir como uma excelente fonte de alimento para as renas norueguesas. Surgiu daí o nome vulgar de "reindeer moss" relatado por HAUAN e KJÖLBERG (44).

LINDBERG e McPHERSON (61), em 1954, acreditando na presença de um polissacarídeo com unidades galactofuranosídicas no líquen *Umbilicaria pustulata*, face à ocorrência da umbilicina - um glicosídeo (galactofuranosídeo de D-arabinitol) - já detectado naquele líquen, embora não tivessem sido premiados nas tentativas de seu isolamento, encontraram, contudo, uma glucopirranana linear com ligações  $\beta$ -(1 + 6) e rotação específica  $-38^{\circ}$ , que segundo SHIBATA et alii (82), veio confirmar este achado, então anunciado por DRAKE em 1943 (83) de que o havia isolado daquele mesmo líquen, bem como de *Umbilicaria hirsuta*. Este polímero foi também isolado dos líquens *Gyrophora esculenta* e *Lasallia papulosa*, em 1968, por SHIBATA et alii (83), que apresentou ao infra-vermelho, bandas de absorção de éster em 1735 e 1250  $\text{cm}^{-1}$  para as glucanas destes líquens, ao passo que, as pustulanas isoladas de *U. pustulata* e *U. hirsuta*, por DRAKE, em 1943, não apresentaram espectros de absorção nestas regiões.

NISHIKAWA et alii, em 1970 (69), determinaram a estrutura dos polissacarídeos isolados dos líquens *Umbilicaria angulata*, *U. caroliniana* e *U. polyphylla*, sendo que de todos estes, eles isolaram glucanas tipo pustulana O-acetiladas, que lembram aquelas da *G. esculenta* e *L. papulosa*, isoladas por SHIBATA et alii (83), em que cerca de 10% das unidades de glucose carregam grupos O-acetil na posição 3.

Face a essas observações, pensou-se numa possível correlação entre a estruturação polissacarídica dos líquens e sua posição taxonômica, uma vez que as pustulanas parcialmente aciladas foram encontradas em três gêneros: *Gyrophora*, *Lasallia* e *Umbilicaria*, da família Gyrophoraceae, o que foi confirmado em 1974 por NISHIKAWA et alii (71) ao isolar glucana dessa natureza em outra espécie do gênero *Lasallia* - *L. pensylvanica*. Em contrapartida, as pustulanas isoladas de *U. pustulata* e *U. hirsuta* por

DRAKE, segundo SHIBATA (83), não eram aciladas.

Quanto à natureza acídica de certos polissacarídeos líquênicos, em 1969, MIĆOVIĆ et alii (68), provavelmente foram também os primeiros a isolar um heteropolissacarídeo puro dessa natureza, ao submeter o líquen *Evernia prunastri* a uma extração com solução aquosa de hidróxido de sódio, a frio, seguido de purificação por precipitação com hidróxido de bário; solução de Fehling e solução de iodo, cuja estrutura identificada apresentou D-galactose (36%), D-manose (54%) e ácido D-galacturônico (10%). Pela análise de metilação, verificou-se que esse polissacarídeo era abundantemente ramificado, com unidades terminais não redutoras de galactopiranosil, manopiranosil e ácido D-galacturônico apresentando ainda unidades de manopiranosil 2-O; 2,6-di-O; 3,6-di-O- e 2,3,6-tri-O-substituídas, sendo que a tri-O-substituição foi um achado inédito, uma vez que fora então observado pela primeira vez como constituinte destes polissacarídeos. Na oportunidade, foi ainda esclarecido pelos dados de espectroscopia de infra-vermelho e hidrólise enzimática, que os resíduos de galactose apresentavam-se com a configuração beta, ao passo que os de manose apresentavam-se com predominância a configuração alfa.

Posteriormente, TAKEDA et alii (91), estudando o líquen *E. prunastri*, obtiveram três polissacarídeos com estruturas diferentes, os quais foram isolados via processo repetitivo de congelamento e degelo, do seu extrato aquoso quente, em que foi fracionada uma  $\alpha$ -D-glucana com rotação específica  $+200^\circ$ , apresentando ligações (1 + 3) e (1 + 4) numa relação molar 4:1 e uma outra fração polissacarídica solúvel em água fria, a qual foi por sua vez purificada por precipitação com solução de hidróxido de cetiltrimetilamônio, fornecendo um componente insolúvel neste reagente, identificado como  $\beta$ -glucana com ligações (1 + 3) e (1 + 4) com relação molar 3:1 e rotação específica  $+12^\circ$  e ainda uma fração solúvel, constituída por um polissacarídeo apresentando ligações (1 + 3) e (1 + 4) com relação molar 3:2 e rotação específica  $+164^\circ$ , característica de  $\alpha$ -D-glucopiranosídeo. Ainda neste trabalho, em 1972, TAKEDA et alii (91), investigando os componentes químicos de *Acroscyphus sphaerophoroides*, verificaram que o mesmo apresentava uma glucana linear com bandas de absorção ao infra-vermelho de  $845\text{ cm}^{-1}$  e rotação específica  $+176^\circ$ , na qual aparecia também ligações  $\alpha$ -(1 + 6) na molécula, além daquelas  $\alpha$ -

(1 + 3) e  $\alpha$ -(1 + 4), já caracterizadas nos outros líquens. Quanto aos demais líquens objeto deste trabalho: *Alectoria sulcata* e *A. sarmentosa*, os mesmos apresentaram um polímero com ligações  $\beta$ -(1 + 3) e  $\alpha$ -(1 + 4) e rotação específica +18° e outro  $\alpha$ -(1 + 3) e  $\alpha$ -(1 + 4) com +272°, identificados como liquenana e isoliquenana, respectivamente, semelhantes àqueles da *Cetraria islandica*.

TAKARASHI et alii, em 1974 (87), estudando sete espécies de líquens da família Stictaceae, com objetivo de determinar os seus constituintes em açúcares. Os polissacarídeos obtidos eram constituídos por rhamnose, manose, arabinose, galactose, xilose, glucose e glucosamina, com rotação específica que variou de +28° a +49°, com bandas de absorção nas faixas de 877 cm<sup>-1</sup> a 890 cm<sup>-1</sup> ao infra-vermelho, levando estes pesquisadores a sugerir mais uma vez a correlação da estrutura química dos líquens, com sua posição taxonômica. Por outro lado, estes autores, trabalhando mais especificamente com uma fração do líquen *Lobaria orientalis*, daquele grupo, obtiveram pelo menos dois glicopeptídeos, os quais foram as primeiras amostras dessa classe de heteropolímero a ser detectadas com atividade anti-tumorígena. Um desses heteropolímeros, submetido a fracionamento por Sephadex G-200, forneceu três componentes com composição semelhantes às mencionadas acima; com bandas de absorção 875 a 895 cm<sup>-1</sup>; composição em açúcares bastante semelhantes e rotação específica de +28° a +50° indicando predominância de  $\beta$ -D-configuração na molécula. Estes resultados também levaram os autores a destacá-los como um novo ponto quimiotaxonômico, ao ressaltar ainda, como precedente, o encontro por eles mesmos de glicopeptídeos semelhantes, em líquens de Cladoniaceae.

Em 1973, NISHIKAWA et alii (70), ao estudar oito espécies de líquens, inclusive *C. islandica* pela análise de cromatografia líquido-gasosa do material obtido por extração a quente com metanol-água, verificaram a predominância de arabinitol sobre manitol, destacando ainda a presença de dissacarídeos, além dos monossacarídeos, já vistos como uma constância nos líquens. É oportuno ressaltar que já em 1953 LINDBERG et alii (62), trabalhando com sessenta espécies de líquens, através extração com éter e posteriormente com acetona, verificaram a presença marcante de D-manitol em todas e arabinitol em cerca de 90% delas.

Em 1985, GORIN e IACOMINI (35), trabalhando com seis espécies de líquens, através da análise do extrato metanol-água,

verificaram a presença de arabinitol e manitol em todas as espécies, sendo que o primeiro, em maior quantidade. Observação idêntica foi também relatada em 1985 por IACOMINI et alii ao trabalhar com o extrato metanol-água de três espécies de líquens do gênero *Cladonia*, confirmando assim, os resultados obtidos por NISHIKAWA.

Em 1974, NISHIKAWA et alii (71), trabalhando com seis espécies de líquens, dentre as quais, quatro do gênero *Cladonia*; *C. crispa*; *C. mitis*; *C. rangiferina* e *C. squamosa*, revelaram a presença de heteropolissacarídeo complexo solúvel em água fria, constituído principalmente por manose e galactose e predominância de glucose, bem como pequena quantidade de  $\alpha$ -D-glucanas, insolúveis em água fria, com rotação específica variando de  $\pm 215^\circ$  a  $\pm 245^\circ$ , em (1 M NaOH), a exemplo das glucanas tipo-nigerana apresentando ligações (1 + 3) e (1 + 4), alternadas. Os heteropolímeros isolados dos quatro líquens do gênero *Cladonia* apresentaram constituição bastante semelhante, em glucose, galactose, manose, bem como em relação aos de menores quantidades - arabinose, xilose e ramnose. Os dados de rotação específica e de infravermelho também se apresentaram bastante semelhantes. Esses resultados sugeriram que tais polímeros deveriam ocorrer sistematicamente como principais componentes carboidratados nos líquens do gênero *Cladonia*. Um outro líquen também estudado neste trabalho - *Usnea rubescens*, apresentou uma  $\alpha$ -D-glucana, linear com rotação específica  $+ 21^\circ$ , em (1M NaOH), insolúvel em água, com ligações (1 + 3) e (1 + 4), numa relação molar de 3:7, a qual foi identificada com a liquenana da *Cetraria islandica* ( $+ 18^\circ$ ) que, juntamente com a presença de uma isoliquenana ( $+ 272^\circ$ ), em menor quantidade, levou os autores a concluir também que uma pequena quantidade de isoliquenana co-existe com a liquenana em muitos líquens.

A idéia de uma relação quimiotaxonômica dos líquens levou LEWIS e SMITH, em 1967 (59), a estudar o metabolismo de car-

boidratos de líquens, verificando que o carboidrato transferido como nutriente do ficobionte ao micobionte, depende do gênero da alga. Com este trabalho, concluíram que em cinco líquens de gêneros diferentes de clorofíceas (algas verdes), os carboidratos formados na fotossíntese eram transferidos ao fungo como polióis ribitol em *Trebouxia*, *Myrmecia* e *Coccomyxa*; eritritol em *Trentelolia* e sorbitol em *Hyalococcus*. Em outros líquens, nos quais os ficobiontes são cianofícias, como *Nostoc*, *Colothrix* e *Scytonema*, a glucose é o carboidrato reduzido pela alga. Através de técnicas utilizando carbono radioativo, estes autores estudaram o metabolismo simbiote separadamente e descobriram que a D-glucose formada no ficobionte *Nostoc* é transferida ao fungo e convertida em D-manitol, ao passo que, o ribitol formado na alga verde *Trebouxia*, é transformada em D-manitol e D-arabinitol, no fungo, segundo RICHARDSON et alii, em 1967 e 1968 (76, 77).

Com relação ainda a essas recombinações metabólicas entre micobionte e ficobionte, TAKAHASHI et alii (88) 1979, compararam os polissacarídeos de micobiontes e ficobiontes, separadamente, dos líquens do gênero *Cladonia*, *Parmelia* e *Ramalina*, com os polissacarídeos solúveis em água, característicos destes líquens intactos. Micobiontes e ficobiontes desses líquens foram então isolados e cultivados separadamente, em meios de cultura específicos e em seguida foram extraídos, sequencialmente, com éter e etanol a 80% para remoção dos componentes lipofílicos e finalmente com água para extração dos polissacarídeos, os quais foram precipitados em excesso de etanol e por último submetidos ao processo de congelamento e degelo, fornecendo duas frações: uma solúvel e outra insolúvel em água fria, as quais pelas análises demonstraram que os polissacarídeos de micobiontes eram muito semelhantes àqueles dos líquens intactos, ao contrário dos polissacarídeos de ficobiontes que tinham características diferentes. Face a essas conclusões, sugeriram os autores que os polissacarídeos solúveis em água eram principalmente produzidos pelos micobiontes.

Mais recentemente, com auxílio constante da espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., o estudo estrutural dos polissacarídeos, bem como de outros componentes, passou a contar com mais esse poderoso recurso. YOKOTA et alii, em 1979 (104), utilizando-se da espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. puderam determinar as proporções relati-

vas das ligações existentes em homo-D-glucanas isoladas de seis espécies de líquens, demonstrando que a *Parmelia caperata* continha uma  $\alpha$ -D-glucana com ligações (1 + 3) e (1 + 4) numa relação molar 1:1, enquanto que a *Cetraria richardsonii* apresentava uma  $\beta$ -D-glucana e uma  $\alpha$ -D-glucana com ligações (1 + 3) e (1 + 4), nas proporções relativas de 3:7, 3:2, respectivamente, que a *Acroschypha* obtida de *Acroschyphus sphaerophoroides* era uma  $\alpha$ -D-glucana, com ligações (1 + 3) e (1 + 4) numa relação de 2:3 e que continha também 6% de ligações (1 + 6), confirmando e completando os dados obtidos anteriormente por TAKEDA et alii (90) em 1972, através de análise química, sem contudo determinar a proporção. Um polímero idêntico à *Acroschypha*, obtida do *A. sphaerophoroides*, foi também encontrado no *Sphaerophorus globosus*, ambos da mesma família. Utilizando-se da análise por  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., concluiu-se que o polissacarídeo isolado de *Pilophoron acicularis* era idêntico ao do *Stereocaulon japonicum*, que mostrou ser uma  $\alpha$ -D-glucana com ligações (1 + 3) e (1 + 4) com relação molar de 2:1, ambos da família Stereocaulaceae. De posse de mais esses dados, os autores concluíram por uma relação quimiotaxonômica dos líquens.

O estudo da estrutura química dos líquens e sua relação taxonômica na verdade teve seu início em 1906, quando ULANDER e TOLLENS (94), trabalhando com *St. paschale*, detectaram apenas manose e galactose. Em trabalhos posteriores, em 1951, SVENNINGSEN, conforme descrevem HAUAN e KJÖLBERG, em 1971 (44) mostrou que a glucose também ocorria em grande quantidade nesse líquen. Ainda HAUAN e KJÖLBERG, nesse mesmo trabalho, através de extração aquosa quente, purificação por congelamento e degelo e posterior fracionamento dos seus componentes em coluna de DEAE-celulose, obtiveram da fração principal uma  $\alpha$ -D-glucana com rotação específica + 233°, contendo ligações (1 + 3) e (1 + 4), numa relação molar 1:2,5; contendo ainda ligações (1 + 3) nos pontos de ramificação.

Em 1978, YOKOTA e SHIBATA (103), usando metodologia similar àquela empregada por HAUAN e KJÖLBERG, obtiveram de *St. japonicum* um polímero solúvel em água fria, identificado como  $\alpha$ -D-homoglucana com rotação específica + 201°, o qual por análise de metilação e metanólise, mostrou ser uma glucana parcialmente ramificada, contendo ligações (1 + 3) e (1 + 4) numa relação molar

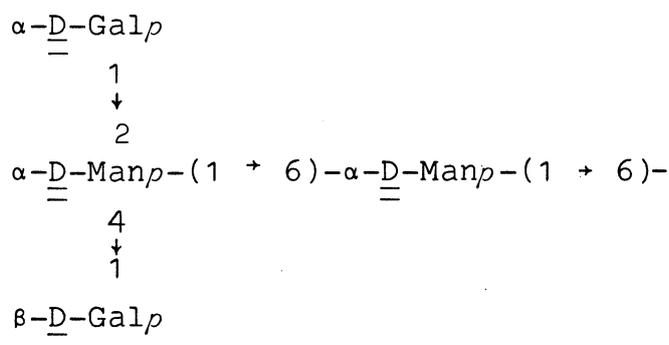
de cerca de 3:1. Entretanto, a degradação de Smith controlada deste polímero, acetilação e análise por espectrometria de massa dos produtos de degradação, evidenciaram a presença de um fragmento representado pelo  $\alpha$ -nigerosil-eritritol peracetato, indicando que a glucana era constituída por ligações (1 + 3) e (1 + 4), porém numa relação molar de 2:1. o que veio a ser confirmado em 1979, com os dados do espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., por YOKOTA et alii (104).

Importante observação quanto a relação quimiotaxonômica dos líquens vamos encontrar no trabalho de TAKAHASHI et alii (89), quando em 1981, estudaram os polissacarídeos de seis espécies de *Stereocaulon* obtidos por extração aquosa quente, purificados por congelamento e degelo e finalmente fracionamento por coluna de DEAE-celulose - a mesma metodologia empregada por HAUAN e KJÖLBERG (44), no estudo de *St. paschale*. Face aos resultados, estes autores dividiram as seis espécies em dois grupos, de acordo com a solubilidade de seus polissacarídeos, em água - um grupo constituído por *St. japonicum*, *St. sorediiferum* e *St. exutum*, contendo  $\alpha$ -glucana com ligações (1 + 3) e (1 + 4) na proporção de 3:1, característica de isoliquenana solúvel em água; outro constituído por *St. vesuvianum*, *St. tomentosum* e *St. intermedium*, caracterizados pela presença predominante de  $\beta$ -heteroglicano, contendo D-manose, D-galactose e D-glucose. Esses resultados forneceram uma importante orientação para futuras investigações quimiotaxonômicas dos líquens da família *Stereocaulaceae*. Entretanto BARON et alii (8), em 1988, trabalhando com o líquen *St. ramulosum* (coletado na Serra do Mar - estrada da Graciosa - PR, a 900 metros de altitude, obtiveram uma  $\beta$ -D-glucana apresentando apenas ligação (1 + 3), o que a diferencia daquelas espécies estudadas por TAKAHASHI et alii (89). BARON obteve ainda desse líquen uma  $\alpha$ -D-glucana apresentando ligações (1 + 3) e (1 + 4) que por sua disposição sequencial irregular no polímero, também a difere daquelas espécies estudadas por TAKAHASHI et alii (89).

GORIN e IACOMINI, em 1984 (34), pesquisaram os polissacarídeos dos líquens *C. islandica* e *Ramalina usnea*, objetivando um estudo mais completo e comparativo entre as galactomananas desses líquens, uma vez que esses polímeros até então não haviam sido obtidos no estado puro de *C. islandica*. Através de extração aquosa quente, purificação por congelamento e degelo e finalmen-

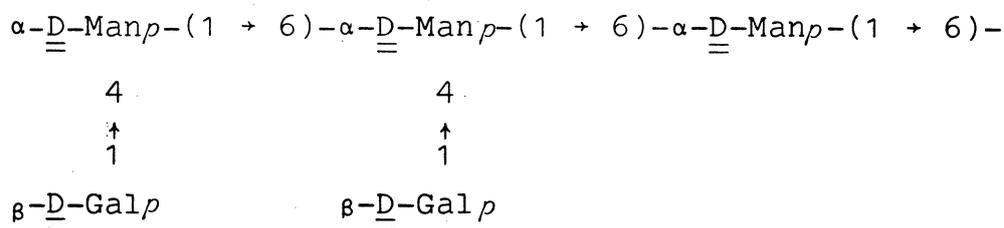
te tratamento dos sobrenadantes por solução de Fehling, obtiveram galactomananas na forma de complexo cúprico insolúvel, bastante semelhantes estruturalmente, com cadeias principais formadas por unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosil unidas por ligações  $\alpha$ -(1 + 6).

*Cetraria islandica* apresentou o polímero mais ramificado, com cadeias laterais de  $\alpha$ -D-Galp-(1 + 2) e  $\beta$ -D-Galp-(1 + 4) ligadas à mesma unidade de  $\alpha$ -D-manopiranosil, da cadeia principal (estrutura III).



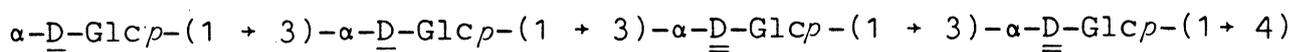
(III)

*Ramalina usnea*, por outro lado, apresentou uma galactomanana com apenas ramificações constituídas por grupos  $\beta$ -D-Galp-(1 + 4) ligados às unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosil da cadeia principal, unidas por ligações (1 + 6) (estrutura IV).



(IV)

Foi ainda observado que, ao contrário de *C. islandica*, o líquen *R. usnea* não continha  $\beta$ -D-glucana identificado como liquenana, mas sim, um polímero identificado como  $\alpha$ -D-glucopirana, apresentando ligações (1 + 3) e (1 + 4) na relação molar de 3:1 (estrutura V):



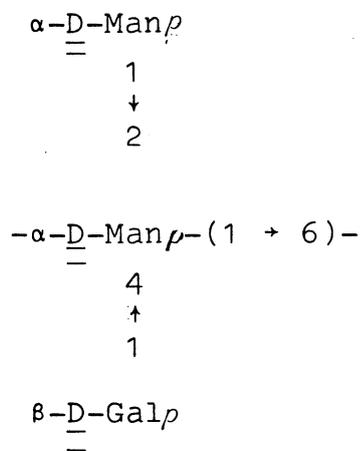
(V)

GORIN e IACOMINI, em 1985 (35), estudaram seis espécies de líquens comuns no Canadá tendo sido coletados na região central (Saskatchewan), exceto *Letharia vulpina* que foi coletada nas Montanhas Rochosas. *Parmelia sulcata*; *St. paschale*; *P. apthosa*; *Letharia vulpina*; *Actinogyra muehlenbergii* e *Usnea* sp, dos quais, através extração aquosa quente seguida por extração aquosa de hidróxido de potássio a 2%, nas mesmas condições, obtiveram polissacarídeos, cujas estruturas foram comparadas com as estruturas dos polissacarídeos anteriormente obtidos desses líquens. Os autores observaram que apenas *P. sulcata* continha galactomanana com estrutura idêntica a de *C. islandica*, mas pequena quantidade de de glucana (tipo liquenana), estava presente.

Ao contrário, *A. muehlenbergii* continha pequena quantidade de galactomanana e grande quantidade de glucana, a qual formava complexo cúprico insolúvel quando tratado com solução de Fehling, identificada como *pustulana* (insolúvel em água). Essa propriedade físico-química permitiu a separação da galactomanana, uma vez que esta é solúvel em água. GORIN e IACOMINI verificaram ainda com este trabalho, que a diversidade estrutural das galactomananas depende dos substituintes sobre as unidades  $\alpha\text{-D-Manp-(1 + 6)}$  da cadeia principal e que as cadeias laterais ocorrem como monosubstituintes ao 0-2 ou 0-4, como disubstituintes em 0-2 e 0-4 e ainda, frequentemente insubstituídas, concluindo por fim que oito tipos de substituição já foram reconhecidas nas quais,  $\beta\text{-D-Galp}$  tem ligação do tipo (1 + 4),  $\beta\text{-D-Galf}$  e  $\alpha\text{-D-Manp-(1 + 2)}$  (35).

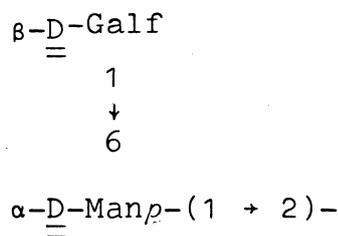
IACOMINI et alii (50), ainda em 1985, empregando os modernos recursos para análise de carboidratos, estudaram três espécies de líquens do gênero *Cladonia* como *C. confusa*, *C. amaurocraea* e *C. alpestris*, objetivando com isso comparar também os novos resultados, com aqueles obtidos por ASPINALL et alii (7) de *Cladonia alpestris*, estudado por eles em 1955. Pelo estudo comparativo dos resultados obtidos, os autores concluíram que há similitude entre *C. alpestris* e *C. confusa*, especialmente quanto à forma de crescimento. Não obstante possuem habitat diferen-

te, ambas contém ainda traços de nigerana. As galactomananas obtidas pura, via seus complexos cúpricos insolúveis por tratamento com solução de Fehling, não eram idênticas, mas eram relacionadas com as cadeias principais de  $\alpha\text{-D-Man}_p\text{-(1 + 6)}$ , substituídas em diferentes posições por grupos  $\beta\text{-D-Gal}_p$  e  $\alpha\text{-D-Man}_p$  (estrutura VI).



(VI)

O polissacarídeo de *C. alpestris* continha unidades consecutivas de  $\alpha\text{-D-Man}_p\text{-(1 + 2)}$  0-6 substituídas por  $\beta\text{-D-galactofurano}$  (estrutura VII).



(VII)

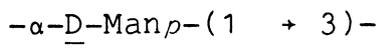
*C. confusa* apresentou uma galactomanana com ambas as formas - piranosídica e furanosídica. De *C. amaurocraea* também foi isolada uma  $\alpha\text{-D-glucana}$ , com bom rendimento, bem como uma  $\text{D-galacto-D-manana}$ , na forma de complexo cúprico insolúvel. A primeira foi identificada como *pustulana*, insolúvel em água, o que permitiu sua separação da galactomanana, a qual tinha em tudo uma estrutura semelhante àquelas de *C. alpestris* e *C. confusa*, mas que, de acordo com o espectro de  $^{13}\text{C-n.m.r.}$ , mostrou diferenças.

Por outro lado, seguindo o método de ASPINALL et alii (7), o extrato alcalino a quente, de *C. alpestris*, tratado com solução de Fehling forneceu um conteúdo de manose (66%), galactose (24%) e glucose (9%), e, através da análise de metilação, pelo menos onze alditois O-metil acetatos encontrados, indicam uma estrutura complexa muito diferente daquela D-galacto-D-manana obtida desse mesmo líquen por GORIN e IACOMINI, em 1984 (34). O líquen *C. confusa* também forneceu uma galactomanana que, purificada via seu complexo cúprico insolúvel, apresentou uma composição de manose (63%), galactose (33%) e glucose (4%). Esse resultado, juntamente com os do espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., revelou ser uma galactomanana similar àquela encontrada em *C. alpestris*, em que ambas contêm extremidades não redutora  $\alpha$ -D-manopiranosil e resíduos manopiranosil substituídos em O-6 e  $\bar{O}$ -2,6, indicando ser o polímero constituído por  $\alpha$ -D-Man $\beta$ -(1 + 6) com substituição de Gal $\rho$ -(1 + 2). Com esses dados, os autores concluíram que os heteropolímeros desses líquens estudados, eram representados principalmente por galactomananas estruturalmente relacionadas pela presença de cadeia principal constituída por unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosil com ligações (1 + 6), embora com algumas variações relacionadas às ramificações laterais, representadas principalmente por unidades de galactose.

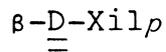
BARRETO-BERGTER e GORIN, em 1983 (11), descreveram uma  $\beta$ -glucana com ligações (1 + 3) interceptadas por (1 + 6), altamente ramificada, como típica de basidiomicetos e diferentes das  $\alpha$  e  $\beta$ -glucanas de ascomicetos, que são lineares e com muito pouca ramificação.

Em 1987, IACOMINI et alii (51), em um trabalho pioneiro, estudaram os componentes polissacarídicos do líquen *Cora pavonia*, em que a entidade simbiótica é representada por um micossimbionte basidiomiceto. Os autores verificaram que seus componentes químicos formavam-se mais no micobionte que no ficobionte. Uma  $\beta$ -D-glucana e um heteropolímero complexo foi obtido. A  $\beta$ -D-glucana é altamente ramificada com 21% de extremidades não redutoras, contendo unidades  $\beta$ -D-glucopiranosil 3-O-, 6-O-, e 3,6-di-O-substituídos, tendo cadeia principal formada por ligações (1 + 3) e (1 + 6). O heteropolissacarídeo continha principalmente manose e xilose, tendo um núcleo contendo manose e uma cadeia principal com preponderância de resíduos  $\alpha$ -D-manopirano -

sil ligados (1 + 3), dos quais (10%) eram não substituídos (estrutura VIII) enquanto que (10%) eram 4-O- (estrutura IX) e 2,4-di-O-substituídos (10%) continham resíduos de  $\beta$ -D-xilopirano se (estrutura X).



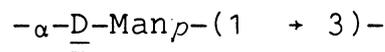
(VIII)



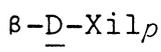
1

↓

4



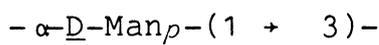
(IX)



1

↓

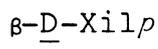
4



2

↑

1



(X)

A presença de heteropolímero com a cadeia principal formada por unidades  $\alpha$ -D-manopiranosil ligação (1 + 3); um dissacarídeo  $\alpha, \alpha$ -D-trealosê na quantidade de (4,4g%); o teor de proteína (36%); até então encontrado nos ascomicetos de (4 a 20%) e ainda com tirosina (10%), a qual nos ascomicetos foi encontrada com variação de (4 a 7%), revelou uma característica certamente peculiar aos basidiomicetos. Comparativamente com os resultados deste trabalho, IACOMINI et alii (51) relatam a presença da planta (*Selaginella lepidophylla*), no Sudoeste Americano, que apresentando apenas um teor de (2%) em  $\alpha, \alpha$ -D-trealose, foi contido sugerida como de interesse econômico.

A expectativa frente ao estudo dos componentes químicos dos líquens não se limita ao aspecto geral do enfoque de sua composição polissacarídica na relação taxonômica. Comparados a verdadeiros complexos laboratoriais, seus produtos podem repre

sentar grande fonte de compostos de ação farmacológica ou de valor comercial.

É oportuno ressaltar ainda a pesquisa de FUJIKAWA et alii (29), que em 1957, trabalhando com 128 espécies de líquens, em experimentos sobre a ação germicida dos mesmos, destacaram a ação bactericida sobre *Sarcina lutea* e ação fungicida sobre *Candida albicans*, função que atribuíram aos ácidos liquênicos.

A partir do final da década de 60, as pesquisas se concentraram nos testes visando a ação antineoplásica dos componentes liquênicos, conforme relatam WHISTLER et alii, 1976 (98), que muitos polissacarídeos, principalmente as glucanas já estavam sendo testadas na regressão do Sarcoma-180, implantados em camundongos, como tratamento experimental alternativo, face à insatisfação com a quimioterapia até então empregada, a qual, destruindo totalmente as células cancerígenas, poderia causar também a morte do paciente.

FUKUOKA et alii (30), em 1968, iniciaram testes com o mesmo objetivo usando preparações polissacarídicas isoladas de líquens, cujas frações polissacarídicas brutas foram inoculadas em ratos, previamente implantados subcutaneamente com Sarcoma - 180. Esse tipo de experiência não havia sido até então registrado, segundo os autores, embora testes nesse sentido já tivesse sido experimentado, com derivados de plantas superiores, fungos, leveduras, bactérias e algas, em que mostraram a capacidade inibidora desses componentes sobre o Sarcoma-180. Trabalhando com dez amostras de camundongos implantados com o Sarcoma-180, os autores obtiveram efetiva ação inibidora acima de 90% em 70% das amostras (sete camundongos).

Dos líquens estudados, empregando-se extração aquosa quente e precipitação em excesso de etanol - *Gyrophora esculenta* forneceu uma  $\beta$ -D-glucana com ligação (1 + 6), (pustulana) parcialmente acetilada que inoculada apresentou uma relação inibidora de 99,1%. A liquenana e isoliquenana isolada de *C. islandica* variedade *orientalis* apresentaram relação de inibição de 100% e 99,6%, respectivamente. Um heteropolímero obtido de *Cladonia mitis* mostrou uma relação de inibição de 99,4%. Esta última foi estudada em grupo com outras oito espécies de líquens, sendo

que, em algumas amostras destas, bem como das outras duas (*G. esculenta* e *C. islandica*), observou-se completa regressão dos tumores. Neste trabalho os autores ainda se reportam às observações de SHIBATA et alii (82), ao verificarem o efeito inibidor sobre o Sarcoma-180, de extratos obtidos de Basidiomicetos.

SHIBATA et alii (83), em 1968, utilizando uma  $\beta$ -glucana ligada (1 + 6) (pustulana), isolada dos líquens *Gyrophora esculenta* e *Lasallia papulosa*, verificaram uma efetiva ação desses polissacarídeos na inibição do Sarcoma-180, sendo que, o isolado de *G. esculenta* na sua fração parcialmente acetilada, apresentou uma atividade inibidora de 99,1%, enquanto que a fração principal de *L. papulosa* apresentou uma atividade de 98,4%.

Em 1970, NISHIKAWA et alii (69), trabalhando com três espécies de líquens do gênero *Umbilicaria*; *U. angulata*; *U. caroliniana* e *U. polyphylla*, obtiveram um polímero linear  $\beta$ -D-glucana ligada (1 + 6) (pustulana), com 10% das unidades de glucose contendo grupos O-acetil na posição-3 (O-3, substituído), solúvel em água. Esse polissacarídeo, injetado intraperitonealmente, na forma de suspensão em água destilada, em camundongo implantado subcutaneamente com Sarcoma-180 (forma sólida), observaram notável efeito daquele polissacarídeo contra tais tumores.

Em 1972, TAKEDA et alii (91), trabalhando com os líquens *Evernia*, *Acroscyphus* e *Alectoria*, isolaram, pela metodologia tradicional, de *E. prunastri*, uma  $\beta$ -D-glucana ligada (1 + 3) e (1 + 4) numa relação molar de 4:1, insolúvel em água e uma  $\beta$ -D-glucana ligada (1 + 3) e (1 + 4), numa relação molar de 3:1, solúvel em água, segundo os autores; de *A. sphaerophoroides* isolaram uma  $\alpha$ -D-glucana ligada (1 + 3), (1 + 4) e (1 + 6), solúvel em água, segundo os autores, e ainda um glicopeptídeo; de *A. sulcata* e *A. sarmentosa*, isolaram (liquenana) e (isoliquenana). Inoculados esses polissacarídeos 150 mg/kg em camundongos implantados com Sarcoma-180, os autores observaram uma inibição que variou de 84 a 100% e uma significativa regressão; apenas a isoliquenana de *A. sarmentosa*, embora com inibição de 87%, nenhuma regressão produziu.

Em 1974, NISHIKAWA et alii (71), trabalhando com seis espécies de líquens dos gêneros *Lasallia*, *Usnea* e *Cladonia*, já citados anteriormente nas considerações estruturais, empregan

do as pustulanas e liquenanas obtidas desses líquens, em experimentos sobre Sarcoma-180, implantado em camundongos, observaram uma inibição variável de 67 a 100% em todas as amostras e regressão de até 100% em alguns casos.

Ainda em 1974, TAKAHASHI et alii (87), pesquisando sete espécies de líquens da família Stictaceae, isolaram polissacarídeos e glicopeptídeos, que além de representar aspectos importantes do ponto de vista quimiotaxonômicos, conforme descrito anteriormente, quando inoculados, por sua vez, em camundongos implantados com Sarcoma-180, observaram significativa inibição do Sarcoma e razoável regressão.

Ao que se sabe, os polissacarídeos atuam por uma ação imunológica e quanto a isso, é importante destacar o trabalho de BISHOP e JENNINGS, de 1982 (14), em que relatam aspectos imunológicos dos polissacarídeos componentes estruturais de bactérias, leveduras e fungos, nas doenças humanas, os quais são bastante similares estruturalmente aos encontrados nos líquens.

É oportuno ressaltar que nenhum trabalho nesse sentido, foi encontrado até o presente, sobre polissacarídeos de *Ramalina ecklonii*.

Em trabalho recente, de 1987, CZECZUGA e CORONA (21), relatam haver isolado 23 carotenoides de 12 espécies de líquens coletados na província de Corrientes - Argentina, dentre eles, *Ramalina ecklonii*, demonstrando o interesse dos pesquisadores para outros aspectos da constituição química dos líquens.

Finalmente, com o estudo do líquen *Ramalina ecklonii*, o isolamento e purificação de polissacarídeo com nova composição estrutural, provavelmente servirá como subsídio, não só quanto aos estudos estruturais e quimiotaxonômicos, mas também como instrumento útil para o tratamento de tumores do tipo Sarcoma - 180, conforme está sendo testado.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. LOCAL DE COLETA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DO LÍQUEN *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot.

O líquen *Ramalina ecklonii* faz parte dos Ascolíquens, caracterizando-se pelo seu aspecto arbustivo, fixado fortemente às árvores, em geral por um único talo achatado ou anguloso em forma de curto pecíolo que se alarga discretamente como uma bainha rizínica. O cortex talino tem consistência de cartilagem. Os apotécios são biatorínicos e os esporos em geral fusiformes (95).

A classificação sistemática do líquen foi confirmada através o envio da amostra ao Departamento de História Natural, Montevideo - Uruguai, na colaboração do Professor Hector S. OSÓRIO, assim como ao National Museum of Natural History - Smithsonian Institution - Washington - USA, na colaboração do Dr. Mason E. HALE.

O líquen *Ramalina ecklonii* é bastante comum no Estado do Paraná e provavelmente em outras regiões do país, sendo encontrado às margens dos lagos e orla dos bosques, onde o ambiente é rico em umidade e ao mesmo tempo amplamente exposto à luz solar, tendo sido coletado, com a devida autorização da Secretaria do Meio Ambiente da Prefeitura - Setor de Parques e Jardins, nos Parques João Paulo II, São Lourenço, Barreirinha e em especial, no Parque Barigui, Curitiba - PR.

### 2.2. TRATAMENTO PRÉVIO DO LÍQUEN *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot.

Antes de ser submetido aos processos analíticos gerais, o líquen coletado passou por um processo de limpeza manual para

retirada de musgos e outros líquens, após o que foi então lavado cuidadosamente em água corrente e seco à temperatura ambiente. Finalmente, foi pulverizado em moinho marca Willy sob malha nº 20, fornecendo 269,7g de líquen na forma de pó seco.

**2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS**

As evaporações foram efetuadas sob pressão reduzida, em evaporador rotatório modelo FISATOM-802, em banho de água em temperaturas próximas de 40°C.

As medidas de pH foram determinadas em aparelho "IONALYZER" modelo 399, na temperatura ambiente.

As rotações específicas foram determinadas com o polarímetro automático "PERKIN-ELMER" modelo 141, a 25°C, em água, em concentrações de 0,1 a 0,5% e ou solução de hidróxido de sódio a 1% para polímeros insolúveis.

As análises espectrofotométricas foram efetuadas em aparelho "COLEMAN JÚNIOR" modelo 6-A, na região do espectro visível.

As cromatografias líquido-gasosa (g.l.c.), foram realizadas utilizando-se o cromatógrafo "VARIAN" modelo 2440, com detector de ionização de chama, usando nitrogênio como gás de arraste (37,5 mL/minuto) e temperaturas da câmara de injeção e do detector à 200°C e 250°C, respectivamente (4) e coluna de aço inoxidável (200 x 0,15 cm d.i.) revestida com OV-225.

Para determinação quantitativa dos acetatos de alditóis a temperatura empregada foi de 190°C, enquanto que os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram determinados na temperatura de 170°C, sendo seus tempos de retenção (T) relativos ao xilitol penta-O-acetato e do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, respectivamente. A composição molar de cada componente analisado por g.l.c. foi calculada segundo o método de triangulação preconizado por SAWARDEKER et alii (79) e SNYDER e KIRKLAND (85).

Os espectros de ressonância nuclear magnética de carbono 13 (<sup>13</sup>C-n.m.r.) foram obtidos pelo uso do espectrômetro Bruker AM-360 WB, incorporado ao transformador de Fourier. Os polissacarídeos insolúveis em água foram examinados como soluções em

$D_2O$  contendo NaOD a 2%, enquanto que os polissacarídeos solúveis em água foram examinados como soluções em  $D_2O$ . Essas soluções (2 mL) foram colocadas em tubo de 200 mm de comprimento e 10 mm de diâmetros e mantidas a  $33^\circ C$ , para serem analisadas no espectrômetro, cujos deslocamentos químicos foram por fim corrigidos para temperatura de  $70^\circ C$ .

Os parâmetros espectrais empregados 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 da amostra utilizada. Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  (p.p.m.), relativos à ressonância do  $Me_4Si$  (TMS) determinada em experimento separado.

As liofilizações das soluções contendo os oligossacarídeos ou polissacarídeos foram feitas no aparelho Virtis, modelo 10-145 MR-BA.

As análises cromatográficas em papel (c.p.) foram efetuadas em papel Whatman nº 1, com os 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 com os reagentes de nitrato de prata alcalino (48,92) e cloridrato de para-anisidina (22) para açúcares redutores.

A migração dos produtos de degradação de Smith controlada da  $\alpha$ -D-glucana foi relacionada à do 2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-eritritol ( $R_{GE}$ ), enquanto que a migração dos componentes extraídos com a mistura de solvente metanol-água 4:1 foi relacionada à da D-galactose ( $R_{GAL}$ ).

A determinação quantitativa de carboidratos totais foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico, descrito por DUBOIS et alii (24) e o complexo colorido resultante da conjugação do hidroximetilfurfural com o fenol, foi lido a 490 nm, no espectrofotômetro Coleman Jr., usando-se como padrão a D-galactose na faixa de 10 a 100  $\mu g$ /ensaio.

O teste de homogeneidade foi realizado por gel-filtração em coluna de Sephadex G-100 para a  $\alpha$ -D-glucana, eluída com solução de cloreto de sódio a 0,9% e Sepharose 4B-200 para a galactomanana, eluída com água destilada, de acordo com o método descri

to por WHITAKER (100).

A acetólise parcial foi levada a efeito com anidrido acético e ácido acético, em meio fortemente acidificado com ácido sulfúrico, conforme o método de LEE e BALLOU (57) e ALLSO-BROOK et alii (5).

A composição química dos alditóis, oligossacarídeos e polissacarídeos foi determinada pelos seguintes procedimentos:

**. Hidrólise ácida**

As amostras analisadas (5 mg) foram tratadas com 2,0 mL de ácido trifluoroacético (TFA), solução 2 M e mantidas em estufa a 100°C por 5 horas (50). Após esse tempo de hidrólise, o excesso de TFA era removido por evaporações até secura, sendo a operação repetida por mais três vezes com água destilada. Os resíduos foram dissolvidos em água e cromatografados em papel.

**. Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida total**

As misturas de açúcares hidrolisados foram reduzidas com boroidreto de sódio, segundo WOLFROM & THOMPSON (101) à temperatura ambiente por um período de 16 horas, findo o qual, o excesso de boroidreto de sódio foi decomposto com ácido acético 1 M e as soluções foram a seguir tratadas com resina Dowex 50 X 8 forma H<sup>+</sup>, que converteu o sal borato de sódio ainda existente, em ácido livre. Após filtração por papel, as soluções foram evaporadas à secura e o ácido bórico formado durante este tratamento foi eliminado, na forma de éster volátil borato de trimetila, por sucessivas co-destilações com metanol.

Os alditóis obtidos, foram submetidos à acetilação segundo o método de WOLFROM & THOMPSON (102) com uma mistura de anidrido acético-piridina, na proporção de 1:1 (v/v, 1,0 mL de cada), à temperatura ambiente durante 14 horas ou a 100°C por uma hora, após o que, o processo de acetilação era interrompido por adição de gelo ao sistema reagente e os açúcares acetilados extraídos com clorofórmio.

A piridina residual era finalmente eliminada do meio na forma de sal de piridônio por sucessivos tratamentos com solução aquosa de sulfato de cobre a 2% e finalmente por água destilada para eliminação do cobre remanescente. Após a evaporação do

solvente (clorofórmio), os acetatos de alditóis obtidos, foram a nalisados por (g.l.c.), nas condições já descritas.

#### 2.4. Isolamento dos alditóis, oligossacarídeos e polissacarídeos do líquen *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot.

O líquen pó seco foi submetido a quatro processos físico-químicos de extração.

##### 2.4.1. Extração benzeno-etanol

A deslipidificação prévia do material foi feita por tratamento do líquen (244,7 g) com o solvente benzeno-etanol (9:1, v/v, 1,00 L), durante 4 horas, sob refluxo, à 80°C. O material foi filtrado enquanto ainda quente e após evaporado à secura forneceu (2,49 g) de material o que corresponde a 1,01% do líquen o riginal.

##### 2.4.2. Extração metanol-água

O resíduo liquênico proveniente da extração benzeno-e-tanol (238,65 g) foi tratado com a mistura extratora metanol - á-gua (4:1, v/v, 1,20 L), durante 4 horas, sob refluxo, à 80°C e filtrado ainda quente.

O resíduo da primeira extração foi submetido a uma se-gunda extração nas mesmas condições anteriores. Os extratos foram reunidos e evaporados até pequeno volume e então deionizados pe-las resinas Dowex 50 W x 8 (forma H<sup>+</sup>) e Dowex 2 x 8 (forma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) para dessalificação, após o que foi novamente concentrado a volu-me reduzido e liofilizado, fornecendo 35,45 g de material (Fra-ção A). Uma alíquota desta foi submetida à c.p. (Sistema II), revelando grande quantidade de arabinitol, razoável quantidade de manitol e discreta quantidade de um componente com mobilidade inferior, o qual não foi caracteriza-do. Nenhum açúcar redutor foi visualizado quando este material foi tratado por cloridrato de para-anisidina.

Em virtude da grande quantidade de arabinitol nesse ma-terial, seguiu-se o fracionamento por coluna de carvão-celite e posteriormente de celulose, objetivando isolar os componentes de

presentes em pequenas quantidades, especialmente os oligossacarídeos.

#### **2.4.2.1. Fracionamento dos alditóis e oligossacarídeos por cromatografia em coluna de carvão-celite (1:1)**

A amostra do material (6,0 g) (Fração A), extraída com a mistura de solvente metanol-água, foi aplicada a um funil de Buchner medindo (4 x 9,4 cm d.i.), de placa porosa (preparado como adaptação ao preconizado por WHISTLER & DURSO (96).

O fracionamento foi realizado em três etapas: a primeira com (4,50 L) de água destilada para eluição de alditóis, sendo a primeira fração coletada de (1,00 L) e as demais de (500 mL); a segunda com (2,40 L) de etanol-água a 30%, com o objetivo de eluir os oligossacarídeos, sendo as frações coletadas de (400 mL); e a terceira, com uma única fração de (400 mL) de etanol-água a 50% para eluição do restante dos componentes.

As frações foram concentradas a pequeno volume e retiradas das alíquotas para c.p. (Sistema I) e visualização com solução de  $\text{AgNO}_3$  alcalino.

As frações F1 a F7 foram eluídas com água; F8 a F13, foram eluídas com etanol-água a 30% a F14 foi eluída com etanol-água a 50%.

As frações F1 a F7 foram reunidas por apresentarem componentes semelhantes por cromatografia em papel e após deionização com resinas catiônicas e aniônicas para dessalificação e ou posteriormente liofilizadas, forneceu 3,63 g de material - (Fração  $A_1$ ), a qual é formada principalmente por arabinitol e manitol.

As frações F8 a F10 também foram reunidas por apresentam componentes semelhantes, que após tratamento idêntico ao dado às frações anteriores, apresentaram um rendimento de 732 mg de material - (Fração  $A_2$ ).

#### **2.4.2.2. Fracionamento dos alditóis e oligossacarídeos da fração- $A_2$ pela cromatografia em coluna de celulose**

Uma coluna de vidro (58 x 3,0 cm d.i.) foi empacotada

com suspensão de celulose em acetona de acordo com a técnica descrita por WHISTLER e BeMILLER (97) e GARDELL (31). O pó de celulose Whatman (Grau CF 11), previamente lavado e seco em estufa a 50°C, foi suspenso em acetona e aplicada na coluna cromatográfica até a altura de 50 cm (volume de 353,43 cm<sup>3</sup>). O leito de celulose foi lavado com três vezes o seu volume, em acetona (1,10 L) e a seguir (600 mg da Fração A<sub>2</sub>) foi aplicada, de forma que a altura do leito de celulose alcançou 54 cm, elevando o volume do leito para (381 cm<sup>3</sup>). A eluição foi efetuada com a mistura de solventes acetona-água (7:1, v/v, 1,00 L) e (4:1, v/v, 1,00 L), em ambas, com frações coletadas de (100 mL); (3:1, v/v, 1,00 L) e (2:1, v/v, 1,00 L), estas com frações coletadas de (300 mL).

Enquanto as frações eram eluídas, cromatografias descendentes foram efetuadas no (Sistema II) e visualizadas com solução de AgNO<sub>3</sub> alcalino. Os produtos de hidrólise ácida foram analisados por g.l.c. (Fig. 1-A, B e C) (Tabela I).

**2.4.3. Extração aquosa**

O líquen residual remanescente das extrações "benzeno-etanol" e "metanol-água" (203,2 g), foi posteriormente tratado com (1,20 L) de água a 100°C por 8 horas, sob refluxo. Findo esse tempo, o sistema foi filtrado ainda quente. Esse procedimento de extração foi repetido por mais quatro vezes. Os extratos foram sequencialmente concentrados a pequeno volume (cerca de 200 mL) e precipitados em excesso de etanol, sendo a seguir centrifugados (3.000 rpm, 20 min.). Este precipitado depois de solubilizado em água e liofilizado apresentou um rendimento de 91,4 g de material (Fração B). Cromatografia em papel (c.p.) (Sistema I), do precipitado etanólico, hidrolisado com TFA 2 M por 5 horas, a 100°C, revelou principalmente glucose, manose e galactose. Essa amostra, após redução e acetilação, foi posteriormente analisada por g.l.c. (Fig. 2).

**2.4.3.1. Separação dos polissacarídeos do precipitado etanólico por congelamento e degelo**

Uma alíquota do precipitado etanólico (85,0 g) foi solubilizada em 300 mL de água, aquecida a 100°C por 30 minutos, e a seguir submetida ao processo de congelamento e posterior degelo

à temperatura ambiente, resultando na formação de um precipitado insolúvel em água fria, que foi separado dos componentes solúveis por centrifugação (10.000 rpm, 10 min. 4°C), segundo a metodologia de GORIN & IACOMINI (34). Este precipitado por último formado com o congelamento e degelo, foi submetido a esse procedimento de congelamento e degelo por várias vezes, até que o sobrenadante límpido não mais apresentasse polissacarídeo detectável pela reação do fenol-sulfúrico (24).

O sobrenadante aquoso, após c.p. (Sistema I), do material hidrolisado, mostrou ser constituído principalmente de glucose e em menor proporção manose e galactose, essa amostra após redução e acetilação, foi analisada por g.l.c. (Fig. 3). Em razão disso, o material foi submetido ao processo de purificação por precipitação em solução de Fehling, conforme preconizado por GORIN & IACOMINI (35); JONES & STOODLEY (53).

**2.4.3.2. Fracionamento dos polissacarídeos do sobrenadante aquoso por precipitação com solução de Fehling**

A medida que se efetuava o processo de congelamento e degelo, os sobrenadantes aquosos eram concentrados e reunidos. No final dessa fase de purificação, o volume total do concentrado (1,40 L), foi tratado com (2,80 L) da solução de Fehling (53). Após repouso por uma noite a 4°C, verificou-se abundante precipitado, por sua vez separado por centrifugação (8.000 rpm, 10 min., 4°C).

O sobrenadante de Fehling foi neutralizado com ácido acético glacial, em banho de gelo e posteriormente dialisado em água corrente por 72 horas, concentrado e deionizado pelas resinas Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>) e Dowex 2 x 8 (forma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). O material, após liofilização apresentou um rendimento de 58,5 g de material (Fração B<sub>1</sub>), que por cromatografia em papel e análise por g.l.c. na forma de acetatos de alditois, mostrou ser um homopolímero constituído por glucose.

Embora esse polímero se apresentasse aparentemente puro, foi ainda submetido ao processo de purificação por precipita-

ção em Cetavlon, bem como a teste de homogeneidade em coluna de Sephadex G-100, a serem descritos adiante e tendo-se apresentado homogêneo, foi considerado próprio para estudos estruturais.

O precipitado de Fehling foi lavado sucessivamente com solução de KOH a 2% e metanol (3 vezes cada), sendo centrifugado em cada operação, nas mesmas condições que o sobrenadante. O complexo cúprico insolúvel foi decomposto por agitação numa suspensão aquosa de resina Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>), por 20 minutos em agitador magnético, após o que foi filtrado e esgotado até reação negativa por fenol-ácido sulfúrico. Esse processo de precipitação por solução de Fehling foi repetido por mais duas vezes, para se obter completa purificação desta fração, que depois de liofilizada, apresentou um rendimento de 4,8 g de material (Fração B<sub>2</sub>). Por c.p. (Sistema I) de uma amostra submetida à hidrólise ácida total, revelou manose, galactose e arabinose, sendo então posteriormente analisada por g.l.c. na forma de seus acetatos de alditóis (Fig. 10-A).

Este componente apresentou rotação específica + 60.

#### **2.4.3.3. Fracionamento dos polissacarídeos purificados pela solução de Fehling, por precipitação com Cetavlon (brometo de hexadeciltrimetilamônio).**

##### **2.4.3.3.1. Precipitado de Fehling**

Embora o componente constituído pelo precipitado de Fehling se apresentasse como uma galactomanana pura (Fig. 10-A), uma alíquota (500 mg) foi submetida a um outro fracionamento por precipitação em sal de amônio quaternário (Cetavlon), conforme prescreve SCOTT (80); DUARTE & JONES (23).

Em pH 7,0 não houve formação de precipitado. Entretanto, o sistema foi centrifugado para que se tivesse a certeza de trabalhar com o sobrenadante absolutamente límpido, o qual a seguir foi tratado com tampão borato a 3%, pH 8,5, verificando-se a formação de um precipitado na forma de complexo polissacarídico boratado com base quaternária. Esse composto foi descomplexado com solução de ácido acético 2 M. A solução polissacarídica foi finalmente tratada por excesso de etanol formando novo precipitado. Es

te procedimento foi repetido por mais duas vezes fornecendo 415 mg de material. Cromatografia em papel desta fração (Sistema I), bem como g.l.c. dos seus acetatos de alditóis, revelou um polímero com grau de pureza idêntico ao utilizado neste processo de precipitação (Fig. 10-B).

Ao sobrenadante resultante da precipitação em pH 8,5 foi adicionado solução de NaOH a 40%, elevando-se o pH até 12. A este pH verificou-se um discreto precipitado, o qual foi separado por centrifugação. Após tratamento semelhante àquele dado ao precipitado em pH 8,5, apresentou um rendimento de 48 mg de material, que após hidrólise ácida total e c.p. (Sistema I), mostrou ser heteropolímero constituído por glucose e manose. Essa fração não foi estudada, bem como o sobrenadante final em virtude da pequena quantidade.

#### **2.4.3.3.2. Sobrenadante de Fehling**

Embora o sobrenadante de Fehling apresentasse um único componente, que por cromatografia em papel e pela análise por g.l.c. do seu componente na forma de acetato de alditol, revelasse uma glucana aparentemente pura (Fig. 4), uma alíquota (500 mg) foi submetida a fracionamento por Cetavlon, nas mesmas condições citadas para o precipitado de Fehling.

Em pH 7,0 não houve precipitação, entretanto, o material foi centrifugado para se ter a certeza de trabalhar com o sobrenadante absolutamente límpido.

O sobrenadante límpido foi tratado com tampão borato pH 8,5 nas mesmas condições já descritas para o precipitado de Fehling, formando-se abundante precipitado, que ao final da operação, rendeu 478 mg de material. Por cromatografia em papel e análise por g.l.c. do seu componente na forma de acetato de alditol, revelou ser uma glucana com grau de pureza muito semelhante a já obtida anteriormente com a solução de Fehling.

#### **2.4.3.4. Resíduo liquênico após extração aquosa**

O resíduo liquênico resultante da extração aquosa, depois de seco pesou (109,9 g). Este resíduo foi reservado para extração com KOH aquoso.

#### **2.4.3.5. Sobrenadante etanólico da extração aquosa**

Esta fração após ser evaporada à secura apresentou um rendimento de 7,41 g de material, que não foi estudado neste trabalho.

#### **2.4.3.6. Precipitado resultante do gelo e degelo**

O precipitado do gelo e degelo, correspondente ao componente insolúvel em água fria, apresentou um rendimento de 5,0 g de material, que por c.p. (Sistema I) e posterior g.l.c. dos seus componentes na forma de acetatos de alditóis mostrou ser constituído por glucose, conforme mostra a Tabela II.

#### **2.4.4. Extração alcalina**

O resíduo liquênico (109,9 g), resultante da extração aquosa, foi tratado com solução aquosa de hidróxido de potássio a 2%, a 100°C, durante uma hora, sob refluxo. Em seguida, filtrou-se ainda quente e o resíduo foi submetido a uma segunda extração, nas mesmas condições, após o que os extratos resultantes foram neutralizados com ácido acético concentrado, em cuba de gelo, evaporados a vácuo até pequeno volume e os polissacarídeos foram precipitados em excesso de etanol e finalmente separados por centrifugação (3.000 rpm, 20 min.). O precipitado formado, depois de solubilizado em água e liofilizado, apresentou um rendimento de 14,4 g de material - (Fração C). Uma alíquota foi hidrolisada por TFA 2 M, cromatografada em papel (Sistema I), revelando manose, galactose, glucose e ramnose. Posteriormente foi analisada por g.l.c., na forma de seus respectivos acetatos de alditóis (Fig. 9-A) e (Tabela IV).

O resíduo liquênico após essas duas extrações, foi descartado.

##### **2.4.4.1. Separação dos polissacarídeos do precipitado etanólico por congelamento e degelo**

O precipitado etanólico da extração alcalina (14,4 g) foi solubilizado em água destilada e colocado em diálise contra água corrente por 48 horas, sendo a seguir concentrado a pequeno

volume e então submetido ao processo de purificação por congelamento e degelo, nas condições já descritas para o precipitado etanólico da extração aquosa, verificando-se a formação de precipitado, que foi centrifugado (10.000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C). Este processo foi repetido por várias vezes, sendo os precipitados e sobrenadantes reunidos, separadamente.

O precipitado, constituído pelo componente solúvel em água quente, mas insolúvel em água fria, após liofilisação forneceu 1,8 g de material - (Fração C<sub>1</sub>). Uma alíquota foi hidrolisada com TFA 2 M por 5 horas a 100°C, cromatografada por papel (Sistema I) e posteriormente analisada por g.l.c. na forma de seus acetatos de alditóis, revelando ser uma glucana.

O espectro de <sup>13</sup>C-n.m.r. revelou ser uma mistura de  $\alpha$  e  $\beta$  -glucana, embora apresente sinais em campo alto para C-1 e outro em campo baixo (Fig. 13).

Os sobrenadantes alcalinos foram reunidos e concentrados a um volume de 400 mL. Uma alíquota desse material foi hidrolisada com TFA 2 M nas condições já descritas e por c.p. (Sistema I), revelou ser constituída principalmente por manose, galactose e glucose.

#### **2.4.4.2. Fracionamento dos polissacarídeos do sobrenadante alcalino por precipitação com solução de Fehling**

Os polissacarídeos constantes do sobrenadante, concentrados a um volume de (400 mL), foram tratados com solução de Fehling (1,20 L) e finalmente centrifugados (8.000 rpm, 10 minutos, a 4°C) (53). Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram reunidos, neutralizados, dialisados contra água corrente por 24 horas e concentrados conforme descrito na extração aquosa, fornecendo 1,42 g de material - (Fração C<sub>2</sub>). Uma alíquota foi hidrolisada e por c.p. (Sistema I), revelou ser um heteropolissacarídeo constituído principalmente por manose, galactose e glucose.

O precipitado de Fehling foi tratado conforme descrito para material idêntico obtido na extração aquosa e após liofilisação forneceu 9,1 g de material - (Fração C<sub>3</sub>). A c.p. (Sistema I) revelou principalmente manose e galactose. Esta fração foi posteriormente analisada por g.l.c. (Fig. 9-B ) e Tabela III.

A rotação específica + 57°, apresentada por este componente, é compatível com galactomanana de líquens, conforme citado adiante.

Este polímero, embora se apresentasse aparentemente puro, foi submetido a fracionamento por Cetavlon (brometo de hexadeciltrimetil-amônio), bem como a teste de homogeneidade química em coluna de Sepharose 4B-200, a serem descritos adiante, no que, tendo-se apresentado homogêneo, nas condições empregadas, foi considerado próprio para estudos estruturais.

#### **2.4.4.3. Fracionamento dos polissacarídeos do precipitado de Fehling por tratamento com Cetavlon**

Embora o componente constituído pelo precipitado de Fehling se apresentasse como uma galactomanana aparentemente pura (Fig. 9-B) uma alíquota (500 mg) foi submetida a outro fracionamento, por precipitação em "Cetavlon", conforme prescrevem SCOTT (80); DUARTE & JONES (23).

Em pH 7,0 houve turvação da solução que foi centrifugada (8.000 rpm, 10 min. a 20°C) e o precipitado insignificante, foi desprezado.

O sobrenadante de pH 7,0 foi a seguir tratado com tampão borato a 3% (pH 8,5), verificando-se à formação de abundante precipitado na forma de complexo polissacarídico boratado com base quaternária. Esse composto foi descomplexado com solução de ácido acético 2 M. A solução polissacarídica foi finalmente tratada por excesso de etanol, formando novo precipitado. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, recuperando-se (460 mg) do material.

Ao sobrenadante resultante da precipitação em pH 8,5 foi adicionado solução de NaOH a 40%, elevando-se o pH até 12, no qual ocorreu então um discreto precipitado, que separado por centrifugação e liofilização forneceu 35 mg de material. Cromatografia em papel (Sistema I) revelou ser este material representado por um heteropolímero constituído por manose, galactose e glucose.

## 2.5. TESTES DE HOMOGENEIDADE APLICADOS AOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DAS EXTRAÇÕES AQUOSA E ALCALINA

### 2.5.1. $\alpha$ -D-glucana

Uma amostra (2 mg) da glucana obtida por purificação com solução de Fehling e Cetavlon foi aplicada a uma coluna de Sephadex G-100 (50 x 2,1 cm d.i.), empacotada de acordo com WHITAKER (100) e eluída com solução de cloreto de sódio a 0,9%, na velocidade de escoamento de 32,5 mL/hora. Frações de 1 mL do eluato foram coletadas à temperatura ambiente e o açúcar total determinado pelo método de DUBOIS et alii (24).

O volume morto da coluna foi determinado pelo "blue dextran", eluído com pico máximo em 57 mL.

### 2.5.2. Galactomananas da ~~extração aquosa e com KOH aquoso a 2%~~

Amostras das galactomananas (2 mg) foram dissolvidas em água e aplicadas separadamente, em coluna de Sepharose 4B-200 (50 x 2,1 cm d.i.), conforme o método de WHITAKER (100). As amostras foram eluídas com água destilada na velocidade de escoamento de 13 mL/hora. Frações de 1 mL dos eluatos foram coletadas e o açúcar total foi determinado pelo método de DUBOIS et alii (24). O volume morto da coluna foi determinado pelo "blue dextran", eluído com pico máximo em 49 mL.

## 2.6. HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DAS GALACTOMANANAS DA EXTRAÇÃO COM KOH A 2% AQUOSO E EXTRAÇÃO AQUOSA

A uma alíquota de cada amostra (100 mg) juntou-se (10 mL) de  $H_2SO_4$  0,16 M e os sistemas foram então mantidos em estufa a  $100^\circ C$  por 18 horas (34). Após esse tempo de hidrólise, as soluções foram neutralizadas por carbonato de bário e filtradas. Os filtrados límpidos foram concentrados e deionizados pela resina Dowex 50W x 8 (forma  $H^+$ ) e novamente filtrados, concentrados a pequeno volume e finalmente submetidos à precipitação em excesso de etanol (5:1). Os precipitados foram separados por centrifugação (3.000 rpm, 20 min.), apresentando o rendimento de (48 e 44 mg) ,

respectivamente. Alíquotas dessas amostras foram tomadas e hidrolizadas com TFA 2 M a  $100^{\circ}\text{C}$ , cromatografadas em papel (Sistema I) e posteriormente acetiladas e analisadas por g.l.c. (Tabelas II e IV). Outras alíquotas foram tomadas para rotação óptica.

## 2.7. ACETÓLISE PARCIAL DA GALACTOMANANA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO COM KOH A 2% AQUOSO

Uma alíquota (150 mg) da (Fração  $\text{C}_3$ ) foi tratada com uma mistura reagente contendo (8 mL de anidrido acético, 8 mL de ácido acético e 0,8 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado) durante 96 horas, sob agitação, na temperatura ambiente, conforme o preconizado por LEE & BALLOU (57). Após esse tempo de reação, o material foi centrifugado para separar a fração por ventura não acetolisada.

A reação foi interrompida pela adição de gelo picado ao sobrenadante contendo o material acetolisado. Em seguida a solução foi neutralizada com bicarbonato de sódio.

A extração dos oligossacarídeos foi feita com clorofórmio (60 mL), em balão de separação, que após agitação suficiente, permaneceu por uma noite. Após esse tempo, a camada aquosa foi separada, repetindo-se a operação anterior com a fase clorofórmica. Após essa segunda etapa, a camada clorofórmica foi desidratada por adição de sulfato de sódio anidro, agitação e filtração por algodão. O filtrado foi evaporado e liofilizado, fornecendo (201 mg) de material, o qual foi desacetilado com a mistura reagente (15 mL de clorofórmio para dissolução do material, 15 mL de metanol e 15 mL de metóxido de sódio), com agitação e repouso por uma hora. Por último, o pH foi corrigido para 7,0 com ácido acético, em banho de gelo, após o que foi evaporado a quase secura. Foi adicionado pequena quantidade de água e o material foi então deionizado por um pool de resina (catiônica e anônica), seguido por filtração, evaporação e liofilização, fornecendo (132 mg) de material.

Cromatografia em papel sistema de (solvente-II) após 72 horas de corrida e visualizada por  $\text{AgNO}_3$  amoniacal (22), revelou manchas  $R_{\text{GAL}} 1,63$ ,  $R_{\text{GAL}} 1,0$ ,  $R_{\text{GAL}} 0,25$ .

### 2.7.1. Fracionamento dos oligossacarídeos acetolisados, por cromatografia preparativa em papel

O produto da acetólise parcial (132 mg) foi submetido à cromatografia em papel Whatman nº 3, (Sistema II), por 72 horas e visualização, conforme descrito (22). A fração com  $R_{GAL}$  0,25 foi eluída em água, concentrada e liofilizada, fornecendo (19 mg).

Alíquotas desta fração foram retiradas para acetilação, bem como para metilação e análise por (g.l.c.).

### 2.8. DETERMINAÇÕES DO CONSUMO DE META-PERIODATO DE SÓDIO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO PELOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DAS EXTRAÇÕES AQUOSA E ALCALINA

Uma alíquota (50 mg) de cada amostra,  $\alpha$ -D-glucana obtida da extração aquosa e da galactomanana da extração com KOH a 2%, do líquen *Ramalina ecklonii*, foi dissolvida em (10 mL) de água destilada e oxidada com solução de meta-periodato de sódio 0,1 M (10 mL), durante 96 horas, em balão protegido contra a luz e mantido a uma temperatura próxima de 2°C, conforme prescreve HAY et alii (46) e DYER (25).

#### 2.8.1. Consumo de meta-periodato de sódio

No decorrer da oxidação, alíquotas de (1 mL) das misturas em reação foram retiradas para determinação do consumo de periodato. As titulações foram feitas com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1 M, em meio fortemente ácido, usando como indicador gotas de solução aquosa de amido a 1% (p/v).

O cálculo do número de moles de periodato reduzido por mol de hexose anidra foi feito empregando-se a fórmula abaixo:

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

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

B = Volume da solução de tiosulfato consumido na titulação do branco;

A = Volume da solução de tiosulfato consumido na titulação das alíquotas, nos diferentes intervalos de tempo.

$M \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  - Molaridade da solução de tiosulfato de sódio x fator de correção.

162 = PM da hexose anidra, por unidade no polímero.

Com base no consumo de periodato, expresso em moles de meta-periodato de sódio consumido por mol de hexose anidra, em diferentes intervalos de tempo, obteve-se gráficos, em que o valor real da quantidade de periodato necessária para a oxidação completa de cada polissacarídeo, foi obtido pela extrapolação da curva para o tempo zero.

### 2.8.2. Produção de ácido fórmico

Ao final de cada oxidação com meta-periodato, alíquotas de 1 mL foram retiradas e tituladas com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,01 M, usando-se como indicador gotas de solução aquosa de fenolftaleína a 1%.

O cálculo do número de moles de ácido fórmico liberado por mol de hexose anidra foi feito utilizando-se a fórmula abaixo:

$$Y = \frac{(A - B) \times \text{volume total da solução oxidante} \times \underline{M} \text{ NaOH} \times 162}{\text{mL da alíquota titulada} \times \text{g de amostra oxidada} \times 1.000}$$

Y = Número de moles de ácido fórmico liberado por mol de hexose anidra;

A = Volume da solução de NaOH consumida na titulação das alíquotas coletadas no final da oxidação;

B = Volume da solução de NaOH encontrada para a titulação do branco;

$\underline{M} \text{ NaOH}$  = Molaridade da solução de NaOH x fator de correção.

### 2.9. DEGRADAÇÃO CONTROLADA TIPO SMITH DA $\alpha$ -D-GLUCANA

Uma amostra do polissacarídeo (250 mg) foi oxidada com

meta-periodato de sódio 0,05 M (250 mL), durante 134 horas, à temperatura próxima de 4°C e na ausência de luz. O excesso do agente oxidante foi destruído pela adição de etileno-glicol (10 mL) e após 30 minutos na obscuridade, foi o sistema dialisado contra água corrente por 24 horas. O conteúdo não dialisado foi concentrado a pequeno volume e o polialdeído foi então reduzido com boridreto de sódio à temperatura ambiente, por 16 horas (34). A redução foi interrompida por adição de ácido acético 2 M, em banho de gelo até pH 6,5 e o material foi novamente dialisado por 72 horas contra água corrente.

A fração não dialisável foi concentrada a volume reduzido (3 mL) e o poliol foi em seguida parcialmente hidrolisado em pH 2,0 (pH ajustado com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M) e então mantido na estufa à 100°C por 40 minutos, segundo o método adotado por GORIN & IACOMINI (34). Após a hidrólise ácida parcial, o meio foi neutralizado com carbonato de bário, seguido por filtração em papel. O filtrado límpido contendo os oligossacarídeos foi deionizado pelas resinas Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>) e Dowex 2 x 8 (forma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e após filtração, foi concentrado a volume reduzido e liofilizado fornecendo um rendimento de 211 mg de material (Fração B<sub>1.1</sub>). Cromatografia em papel (Sistema I) apresentou quatro componentes com R<sub>GE</sub> 1,58, 1,00, 0,66 e 0,37, reveladas por nitrato de prata alcalino e não visualizadas por cloridrato de para-anisidina, sugerindo o fracionamento desses componentes por coluna de celulose.

**2.10. FRACIONAMENTO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA TIPO SMITH, DA α-D-GLUCANA POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA**

A montagem da coluna de celulose, bem como a preparação e aplicação da amostra foi feita conforme descrito para o fracionamento dos alditois e oligossacarídeos da fração A<sub>2</sub>, obtida pela extração metanol-água 4:1.

Após o empacotamento da coluna e lavagem do leito de celulose (altura do leito 48 cm, com um volume de 339 cm<sup>3</sup>) com três vezes o volume total, com acetona, foi então aplicada a amostra (211 mg) com que a altura da coluna foi elevada para 52 cm, correspondendo a um volume de leito igual a 367 cm<sup>3</sup>.

A eluição foi realizada inicialmente com acetona - água (v/v), nas proporções de 9:1 (1,00 L); 7:1 (1,00 L); 4:1 (1,00 L) e 2:1 (1,00 L). As frações coletadas no volume de (200 mL) foram e vaporadas a pequeno volume para então serem cromatografadas em papel (Sistema I) e visualizadas com  $\text{AgNO}_3$  alcalino. Pela cromatografia em coluna de celulose esta fração, além de glicerol e eritritol, forneceu três componentes de maior peso molecular, os quais foram eluídos com acetona-água 7:1, com  $R_{GE}$  1,00 (5 mg) por acetona-água 4:1; com  $R_{GE}$  de 0,66 (25 mg) e por acetona - água 2:1, com  $R_{GE}$  de 0,37 (70 mg).

Os componentes com  $R_{GE}$  1,0;  $R_{GE}$  0,66 e  $R_{GE}$  0,37, já analisados por cromatografia em papel, foram então acetilados e analisados por g.l.c. na forma de seus acetatos de alditóis e posteriormente metilados (45, 47, 56, 60) e analisados na forma de seus acetatos de alditóis parcialmente metilados (81).

## 2.11. METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA E KOH 2% AQUOSO

### 2.11.1. Polissacarídeos obtidos da extração aquosa e KOH 2%

Uma amostra (100 mg) de cada polissacarídeo obtidos da extração aquosa ( $\alpha$ -D-glucana) e da extração com KOH aquoso e mistura de  $\alpha$  e ( $\beta$ -D-glucana e galactomanana), foi reduzida por boroidreto de sódio durante 16 horas à temperatura ambiente, após o que foi neutralizada com ácido acético 2 M, em banho de gelo e colocada em diálise contra água corrente por 24 horas.

As frações não dialisáveis dos polissacarídeos foram evaporadas a quase secura e os produtos finalmente solubilizados em 20 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 33,3% (p/v), sob agitação magnética, após o que foram submetidos à metilação com sulfato de dimetila, em meio alcalino, segundo o processo descrito por HAWORTH (45); HIRST & PERCIVAL (47). Aos resíduos, mantidos em balões de metilação, então dissolvidos com 20 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 33,3%, foram feitas 10 adições de 1 mL de sulfato de dimetila, com intervalos de 20 minutos e mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido por mais dois dias consecutivos. A metilação foi interrompida por aquecimento dos balões à 100°C, duran-

te trinta minutos, para decomposição do excesso de sulfato de dimetila. Em seguida, os polissacarídeos foram resfriados em banho de gelo e neutralizados com ácido acético 2 M, dialisados contra água corrente durante 72 horas e por último, em água destilada durante 36 horas. Após a diálise os polissacarídeos parcialmente metilados foram liofilizados e submetidos a tratamento com óxido de prata e iodeto de metila, de acordo com o método de PURDIE (47) modificado por KUHN et alii (56).

Os polissacarídeos foram dissolvidos em 5 mL de dimetilformamida e em seguida adicionou-se 2 mL de iodeto de metila, bem como 2 gramas de óxido de prata, sendo o sistema mantido na temperatura ambiente sob agitação magnética e protegido da luz. Esse procedimento se repetiu por mais dois dias. Após 72 horas, o processo foi interrompido pela extração exaustiva dos polissacarídeos metilados, com clorofórmio e filtração por papel. Os filtrados foram evaporados à secura e os polissacarídeos permetilados foram convertidos em acetatos de alditóis parcialmente metilados, como será descrito adiante.

### 2.11.2. Oligossacarídeos obtidos da degradação de Smith da $\alpha$ -D-glucana

Uma alíquota de cada componente obtido da coluna de celulose foi tomada nas seguintes proporções: componente de  $R_{GE}$  1,00, 4 mg;  $R_{GE}$  0,66, 5 mg e  $R_{GE}$  0,37, 20 mg. Respeitadas as proporcionalidades, estas amostras foram submetidas à metilação segundo o método de PURDIE (47) modificado por KUHN et alii (56), descrito no item anterior.

Os oligossacarídeos permetilados foram convertidos em acetatos de alditóis parcialmente metilados, conforme descrito abaixo para os polissacarídeos.

### 2.12. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DOS POLISSACARÍDEOS PER-O-METILADOS, NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS

Uma amostra de cada polissacarídeo metilado (10 mg) foi submetido à hidrólise de "Saeman" segundo ADAMS (2) por adição de 0,5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 72% (p/v), selan-

do-se os tubos, os quais foram então mantidos inicialmente em cuba de gelo por uma hora, com agitação periódica. Após esse tempo, adicionou-se em cada tubo 4,5 mL de água destilada, tornando a concentração do ácido a 8% (0,5 M). O sistema foi mantido assim por 18 horas em estufa a 100°C. O excesso de ácido sulfúrico foi eliminado com carbonato de bário, separado no final, por filtração. O filtrado límpido foi deionizado pela resina catiônica Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>) e agitação constante por uma hora. Em seguida à nova filtração, o filtrado límpido foi evaporado a uma temperatura de 37°C, até pequeno volume, após o que foi tratado com boróxido de sódio, na temperatura ambiente, por 16 horas. Findo esse tempo, os íons sódicos foram removidos por tratamento com a resina Dowex 50W x 8 (forma H<sup>+</sup>) e o ácido bórico formado no processo, foi eliminado na forma de borato de metila, por sucessiva co-destilação com metanol. Finalmente os alditóis parcialmente metilados foram acetilados pela mistura anidrido acético e piridina 1:1, método já descrito anteriormente.

Os produtos, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados, foram extraídos com clorofórmio e analisados por g.l.c. em coluna capilar revestida com OV-225, conforme métodos analíticos gerais.

### **2.13. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA DOS OLIGOSSACARÍDEOS METILADOS, NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS**

Os oligossacarídeos obtidos da  $\alpha$ -D-glucana da extração aquosa, fracionados na coluna de celulose, após metilação de KUHN, foram hidrolisados e acetilados de acordo com o método descrito no item anterior e seus produtos, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados, analisados por g.l.c.

### **2.14. DOSAGEM DE PROTEÍNAS E NITROGÊNIO TOTAL DOS POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA E KOH 2%**

Uma alíquota (10 mg) de cada amostra ( $\alpha$ -D-glucana e galactomananas da extração aquosa e KOH 2%) foram tomadas e o teor de proteínas e nitrogênio total, determinado pelo Reagente de Folin, de acordo com o método de LOWRY et alii (65), usando como padrão albumina bovina.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Ramalina ecklonii* é um líquen com micobionte ascomice-  
to, sobre o qual nenhum trabalho foi encontrado na literatura,  
quanto aos seus componentes carboidratados.

Este líquen foi coletado nos bosques da Região Metro-  
politana de Curitiba - PR., especialmente no Parque Barigui (or-  
la do bosque e às margens do lago).

Após devidamente limpo, seco e reduzido a pó, 244,7 g do  
mesmo foram submetidas a quatro processos de extração (Esquema  
I).



### 3.1. COMPONENTES SOLÚVEIS NO EXTRATO METANOL-AQUOSO

O resíduo liquênico (238,6 g), proveniente da extração com benzeno-etanol quente, um processo que removeu 1,01% de componentes apolares, como graxas, gorduras, ácidos liquênicos e compostos carotenoides, foi tratado com metanol contendo 20% de água (v/v), a quente, para extração de constituintes carboidratados de baixo peso molecular. O extrato metanol-aquoso resultante, após deionizado e liofilizado, forneceu 35,45 g de material, que correspondeu a 14,4% do peso do líquen original.

Este extrato (Fração A), por c.p. (Sistema II), apresentou principalmente arabinitol ( $R_{GAL}$  1,15), manitol ( $R_{GAL}$  1,02) e dois outros componentes ( $R_{GAL}$  0,96 e 0,79), todos revelados por  $AgNO_3$  e não visualizados por cloridrato de *p*-anisidina.

A análise por g.l.c. (Fig. 1-A), dos acetatos de poliois obtidos simplesmente por acetilação da Fração-A, confirmou a presença de arabinitol (87,88%) e manitol (12,11%), numa relação molar de 7:1, cujos tempos de retenção estão relacionados na Tabela I. A tabela mostra ainda que os acetatos de poliois obtidos após redução e acetilação desta fração (Fig. 1-B), foram também representados por arabinitol e manitol nas mesmas proporções, ficando demonstrado, dessa forma, que esta fração não era constituída por monossacarídeos redutores livres, comprovado por cloridrato de *p*-anisidina, o que só foi evidenciado após hidrólise ácida e posterior análise dos acetatos de alditois, por g.l.c. (Fig. 1-C), a qual mostrou ainda que além dos alditois mencionados, também foram evidenciados galactitol e glucitol, sugerindo a presença de um glicosídeo e oligossacarídeo na Fração-A.

Na tentativa de isolar os componentes presentes em menor quantidade, como glicosídeos e oligossacarídeos, conforme já relatado por BARON et alii (8), os quais trabalhando com o *St. ramulosum*, isolaram através do extrato metanol-água, o glicosídeo umbilicina, bem como IACOMINI et alii (51), que através do mesmo procedimento isolaram de *C. pavonia* o oligossacarídeo  $\alpha$ - $\alpha$ -D-trealose, procedeu-se o fracionamento por uma coluna de carvão celite. A um funil de Büchner empacotado com carvão-celite (1:1) foi aplicado uma amostra (6,00 g) da Fração-A, a qual foi eluí-

da com etanol-água (v/v) em proporções crescentes de etanol.

Por esta cromatografia de adsorção separou-se as frações constituídas por arabinitol e manitol (Fração  $A_1$  com 3,60g) e frações contendo ainda altas concentrações de ambos, mas também contendo os outros dois componentes já mencionados, (Fração  $A_2$  com 732 mg).

Com o objetivo de separar os componentes da Fração- $A_2$ , (600 mg) da mesma foram eluídas da coluna de celulose (31,97) com acetona-água e c.p. (Sistema II) das frações, eluídas com acetona-água 7:1 e 4:1, revelou principalmente arabinitol e manitol, bem como traços dos outros dois componentes, oligossacarídeos, anteriormente citados, eluídos com acetona-água 4:1, os quais não foram caracterizados estruturalmente devido a pequena quantidade. Entretanto, o componente de  $R_{GAL}$  0,96, por c.p. (Sistema II) apresentou a mesma mobilidade observada para o glicosídeo umbilicina, isolado de *St. ramulosum* (8) e por hidrólise ácida e g.l. c. dos seus componentes na forma de acetato de alditóis, apresentou galactitol e arabinitol em iguais quantidades. Por sua vez, o componente de  $R_{GAL}$  0,79 e mobilidade igual a do padrão trealose, não visualizado anteriormente por cloridrato de *p*-anisidina, após hidrólise ácida e c.p. (Sistema II), apresentou exclusivamente glucose, como açúcar redutor.

Os compostos carboidratados de baixo peso molecular, obtidos do líquen *Ramalina ecklonii*, tem sido isolados de inúmeras espécies de líquens. LINDBERG et alii (62) investigando 60 espécies de líquens, verificaram a presença dos alditóis manitol em todas as espécies estudadas, bem como arabinitol em 90% delas. O volemitol foi encontrado em apenas cinco espécies da família Pyrenocarpeae, exatamente naqueles em que o arabinitol se mostrou ausente.

O resultado obtido com a extração metanol-água de *R. ecklonii*, conforme (Tabela I), está coerente com o relatado por GORIN & IACOMINI (35), que ao estudar seis espécies de líquens, encontraram arabinitol e manitol também com predominância do primeiro, bem como aqueles resultados encontrados por IACOMINI, SCHNEIDER & GORIN (50) em três espécies do gênero *Cladonia*.

SILVA (84), trabalhando com *Sticta damaecornis*, além de oligossacarídeos, isolou também componentes de baixo peso mo-

lecular como volemitol, arabinitol e manitol, embora com predomi-  
nância deste último.

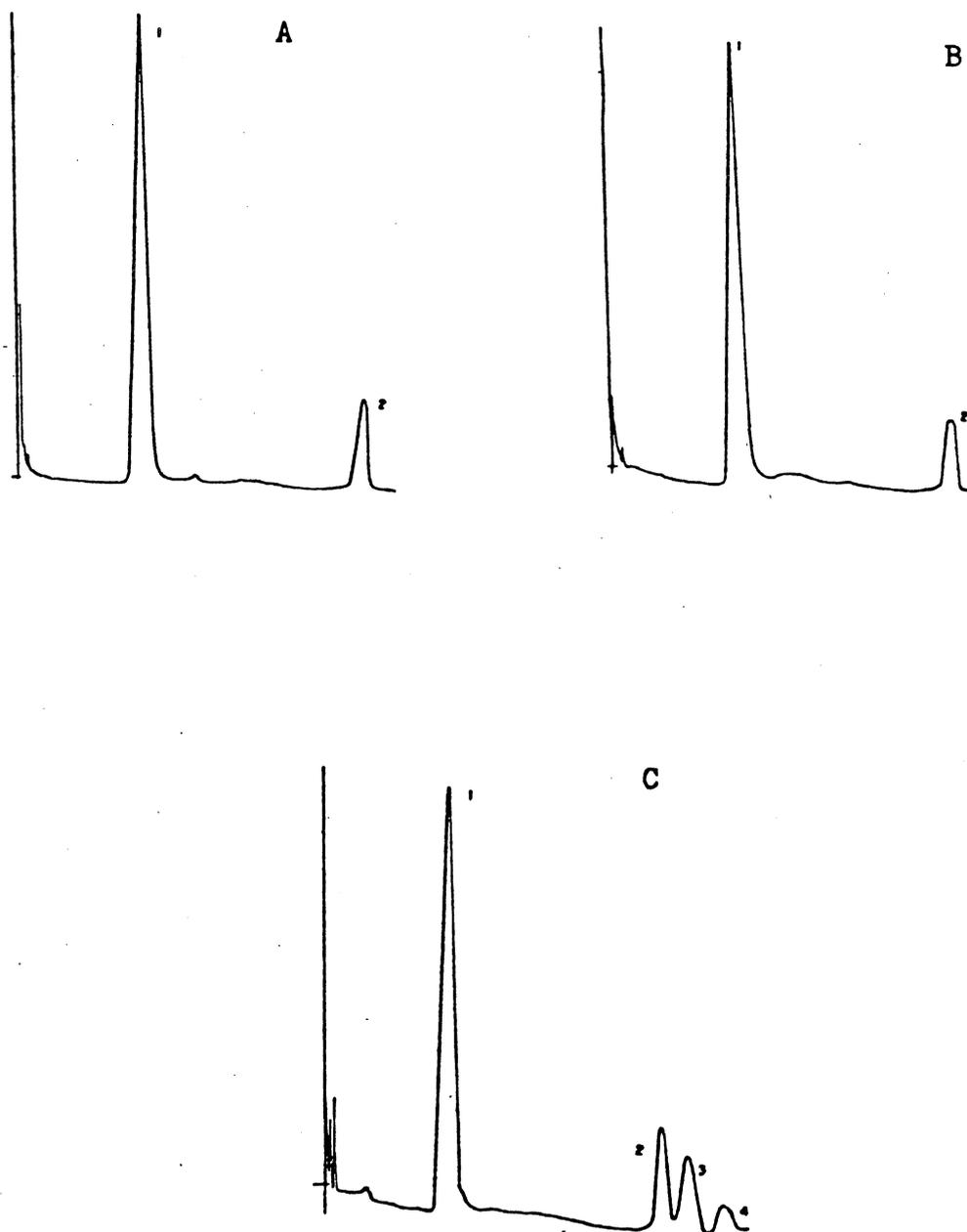


Figura 1 - Cromatogramas obtidos por g.l.c. do extrato metanol-á-  
gua (Fração A), na forma de acetatos de alditóis (colu-  
na OV-225): A - acetilada; B - reduzida e acetilada e  
C - hidrolisada, reduzida e acetilada (dados na Tabe-  
la I).

- A e B - 1 - Arabinitol penta-O-acetato  
2 - Manitol hexa-O-acetato  
C - 1 - Arabinitol penta-O-acetato  
2 - Manitol hexa-O-acetato  
3 - Galactitol hexa-O-acetato  
4 - Glucitol hexa-O-acetato

A similaridade mais significativa com relação a estes constituintes de *R. ecklonii* (Tabela I), vamos encontrar no líquen *Stereocaulon ramulosum*, estudado por BARON, GORIN & IACOMINI (9), que do extrato metanol-água, na fração hidrolisada, reduzida e acetilada, obtiveram arabinitol 65,70%, manitol 8,06%, galactose 20,70% e glucose 5,53%.

Estes resultados nos levam a pensar que os líquens de fato mantém uma similaridade com relação aos seus constituintes alditois e que o sistema de solvente metanol-água é sem dúvida o mais indicado para extração desses componentes de baixo peso molecular.

TABELA I - ANÁLISE POR g.l.c.<sup>(1)</sup> DA FRAÇÃO-A OBTIDA PELA EXTRAÇÃO METANOL-ÁGUA 4:1 DO LÍQUEN *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey & Flot.

Componentes	T <sup>(2)</sup>	Composição relativa %		
		I	II	III
Arabinitol	0,74	87,88	87,58	77,76
Manitol	2,14	12,11	12,18	11,72
Galactitol <sup>(*)</sup>	2,35	-	-	7,25
Glucitol <sup>(*)</sup>	2,68	-	-	3,25

(\*) Galactitol e glucitol - designativo dessas hexoses, após redução e acetilação.

(1) Coluna revestida com OV-225, 190°C.

(2) Tempos de retenção em relação ao do xilitol penta-O-acetato.

I - Fração-A acetilada.

II - Fração-A reduzida e acetilada.

III - Fração-A hidrolisada, reduzida e acetilada.

### 3.2. POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA

O líquen residual após a extração com benzeno-etanol e metanol-água (203,2 g), foi submetido a tratamento com água quente e o extrato aquoso resultante, depois de concentrado foi precipitado em excesso de etanol.

O precipitado etanólico forneceu 91,4 g de material, que correspondeu a 37,1% do peso do líquen original - (Fração B). A análise por g.l.c. (Fig. 2) dos acetatos de alditóis dessa fração revelou ramnitol, arabinitol, xilitol, manitol, galactitol e glucitol numa relação molar de 0,5:2,0:1,0:6,0:5,0:85,5 (Tabela II).

Uma alíquota (85,0 g) do precipitado etanólico foi submetida ao processo de purificação por congelamento e degelo, fornecendo sobrenadante e um precipitado insolúvel em água fria.

#### 3.2.1. Polissacarídeo do sobrenadante de gelo e degelo

A c.p. (Sistema I) dos sobrenadantes, após hidrólise, revelou principalmente glucose, manose e galactose. Esta fração quando analisada por g.l.c. (Fig. 3), apresentou ramnitol, arabinitol, xilitol, manitol, galactitol e glucitol numa relação molar de 0,7:1,5:1,2:7,5:6,2:83,0 (Tabela II).

Como esta fração revelou-se constituída por mais de um polissacarídeo, a mesma foi então submetida a tratamento com solução de Fehling, que forneceu um precipitado polissacarídico na forma de complexo cúprico insolúvel e o sobrenadante contendo o polissacarídeo solúvel neste reagente.

##### 3.2.1.1. Polissacarídeo do sobrenadante de Fehling

O sobrenadante de Fehling, após os tratamentos descritos na metodologia, forneceu 58,5 g de material, que correspondeu a 25,7% do líquen original (Fração B<sub>1</sub>). Esta fração polissacarídica por hidrólise ácida total e c.p. (Sistema I), revelou apenas glucose, o que foi ainda confirmado por g.l.c. dos seus componentes na forma de acetatos de alditóis, que também apresentou exclusivamente glucitol (Fig. 4). Embora as cromatografias re

velassem um polissacarídeo aparentemente puro após o tratamento com solução de Fehling, uma alíquota desse material (500 mg) foi tomada e submetida à precipitação com Cetavlon, o qual em pH 8,5 forneceu um precipitado que pesou 478 mg. A análise por g.l.c. desta fração não apresentou nenhuma alteração em relação ao estado de pureza já registrado com a solução de Fehling.

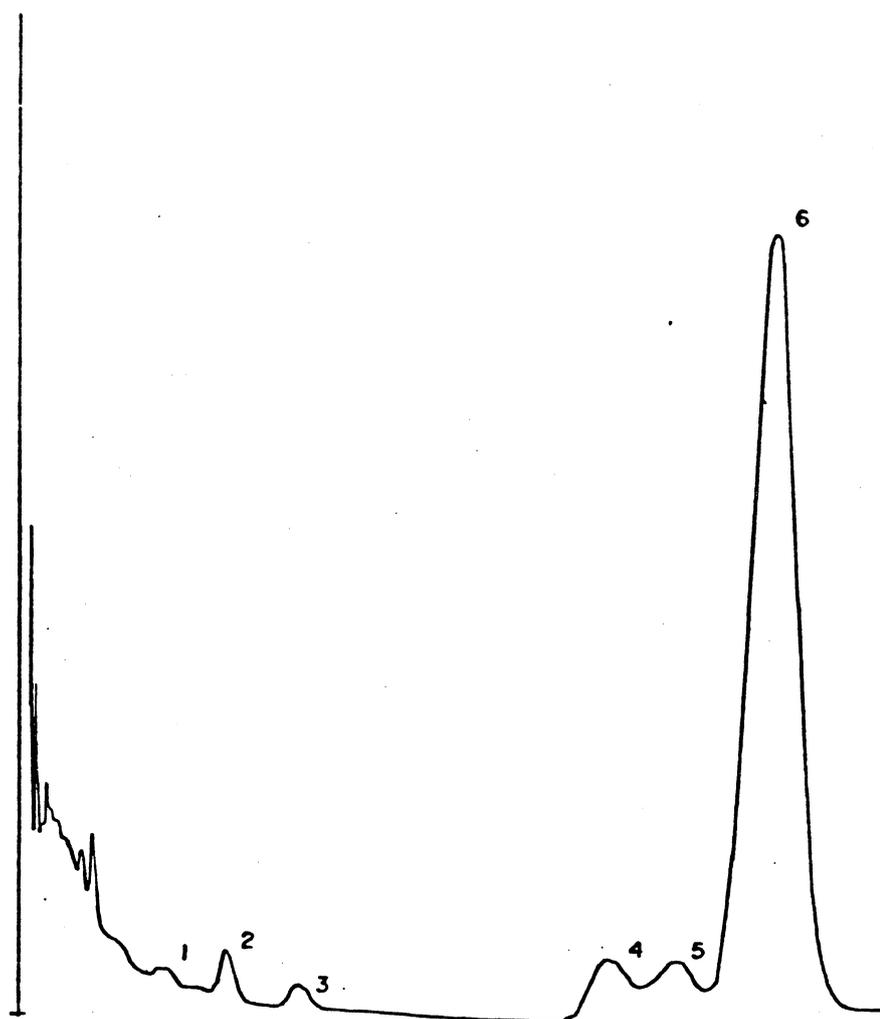


Figura 2 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do extrato aquoso (precipitado etanólico total), na forma de acetatos de alditóis (coluna OV - 225, 190°C).

1. Rhamnitol penta-O-acetato	(0,5%)
2. Arabinitol penta-O-acetato	(2,0%)
3. Xilitol penta-O-acetato	(1,0%)
4. Manitol hexa-O-acetato	(6,0%)
5. Galactitol hexa-O-acetato	(5,0%)
6. Glucitol hexa-O-acetato	(85,5%)

Entretanto, a importância da purificação de polissacarídeos por tratamento com Cetavlon foi registrada com o líquen *St. ramulosum* (8), quando através deste processo, em pH 12,0, uma  $\alpha$ -D-glucana foi isolada do precipitado de Fehling.

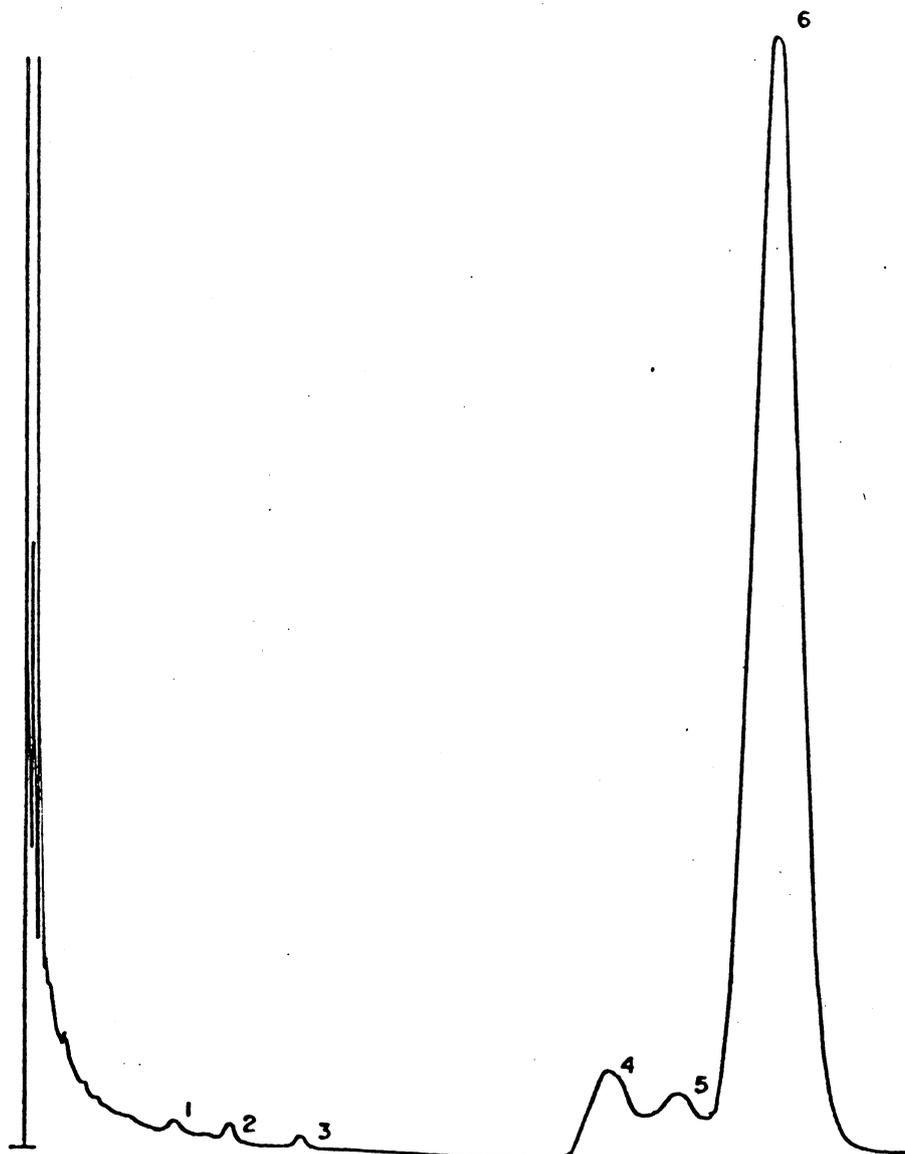


Figura 3 -Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do sobrenadante de gelo e degelo do extrato aquoso, na forma de acetatos de alditóis (OV-225, 190°C).

- |   |         |
|---|---------|
| 1 - Rhammitol penta- <u>O</u> -acetato  | (0,7%)  |
| 2 - Arabinitol penta- <u>O</u> -acetato | (1,5%)  |
| 3 - Xilitol penta- <u>O</u> -acetato    | (1,2%)  |
| 4 - Manitol hexa- <u>O</u> -acetato     | (7,5%)  |
| 5 - Galactitol hexa- <u>O</u> -acetato  | (6,2%)  |
| 6 - Glucitol hexa- <u>O</u> -acetato    | (83,0%) |

Alguns dados importantes sobre as propriedades e purificação dos polissacarídeos obtidos com a extração aquosa podem ser observados na Tabela II, como os resultados das dosagens de proteínas, realizadas de acordo com o método de LOWRY et alii (65) e rotação específica.

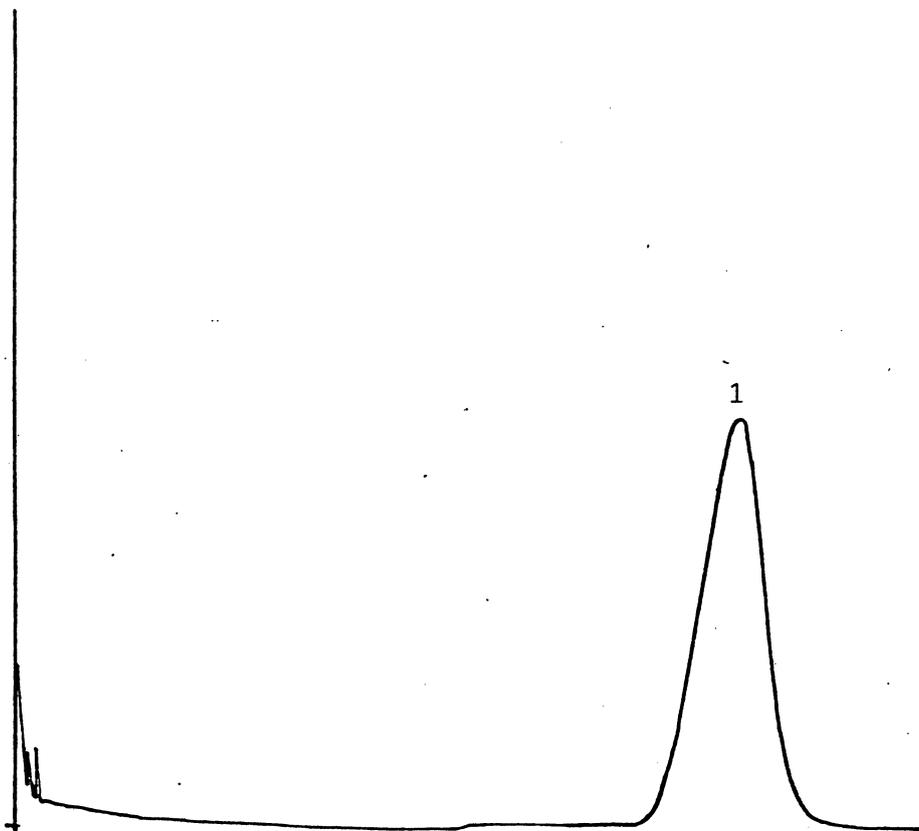


Figura 4 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de hidrólise ácida total do polissacarídeo do sobrenadante de Fehling (extração aquosa), na forma de acetatos de alditóis (OV-225, 190°C).

1. Glucitol hexa-O-acetato.

Não obstante a análise por g.l.c. evidenciasse um polímero puro como foi dito, estes dados foram ainda complementados pela passagem desse material em coluna de Sephadex G-100. A amostra analisada (2 mg), foi eluída nos volumes 54 a 72 mL do eluato e a determinação dos carboidratos totais das frações e-

TABELA II - PROPRIEDADES DE ALGUNS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA DO LÍQUEN  
*Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot.

FRAÇÃO POLISSACARÍDICA	N %	Proteínas Totais %	$[\alpha]_D^{25}$	Componentes em monossacarídeos (%)						Rendimento em relação ao pe- so do líquen original (%)
				Glc	Man	Gal	Xil	Ara	Rha	
Precipitado etanólico (Fração B)	-	-	-	85,5	6,0	5,0	1,0	2,0	0,5	-
Sobrenadante gelo/de- gelo	-	-	-	83,0	7,5	6,2	1,2	1,5	0,7	-
Sobrenadante de Feh- ling ( $\alpha$ -D-glucana) (Fração $\overline{B}_1$ )	0,05	0,3	+213 <sup>o</sup>	100	-	-	-	-	-	25,7
Precipitado gelo/de- gelo ( $\beta$ -D-glucana) (Fração $\overline{B}_3$ )	-	-	-	100	-	-	-	-	-	2,2
Precipitado de Feh- ling (galactomanana) (Fração B <sub>2</sub> )	-	-	-	-	54,0	37,0	-	9,0	-	2,1
Galactomanana (ppt. Cetavlon)	0,43	2,7	+ 60 <sup>o</sup>	-	54,0	46,0	-	-	-	-
Galactomanana após hidrólise par- cial	-	-	+ 80 <sup>o</sup>	-	72,0	28,0	-	-	-	-

luídas (24) revelou uma eluição máxima em 61 mL (Fig. 5). A determinação do carboidrato total indicou ainda a recuperação de 100% do polissacarídeo e, tendo sido considerado homogêneo, foi o mesmo indicado para análise estrutural.

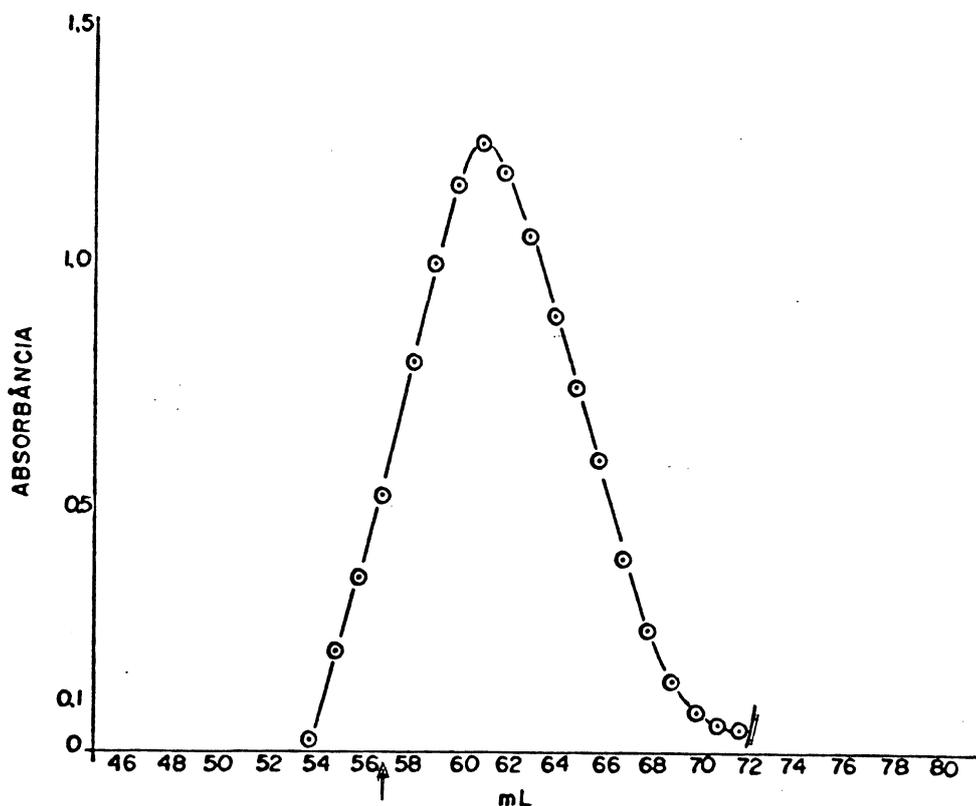


Figura 5 - Cromatograma da  $\alpha$ -D-glucana em Sephadex G-100 (93). Eluição com solução de cloreto de sódio 0,9%. Frações de 1 mL.

A rotação específica com o alto valor + 213°, indicou uma configuração  $\alpha$ -D para as unidades de glucose.

O espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. deste polissacarídeo (Fig. 6) que forneceu quatro sinais em  $\delta$  101,3, 100,41, 100,35 e 100,04 para C-1 das unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosil; três sinais em  $\delta$  81,44, 81,26 e 81,02 para C-3 O-substituído; um sinal em  $\delta$  78,46 para C-4 O-substituído das unidades de glucopiranosil e dois sinais em  $\delta$  61,60 e 61,40 para C-6 não O-substituído, indicou, uma glucana com ligações  $\alpha$ -(1 + 3) e (1 + 4) na relação molar de 3:1 (Tabela III).

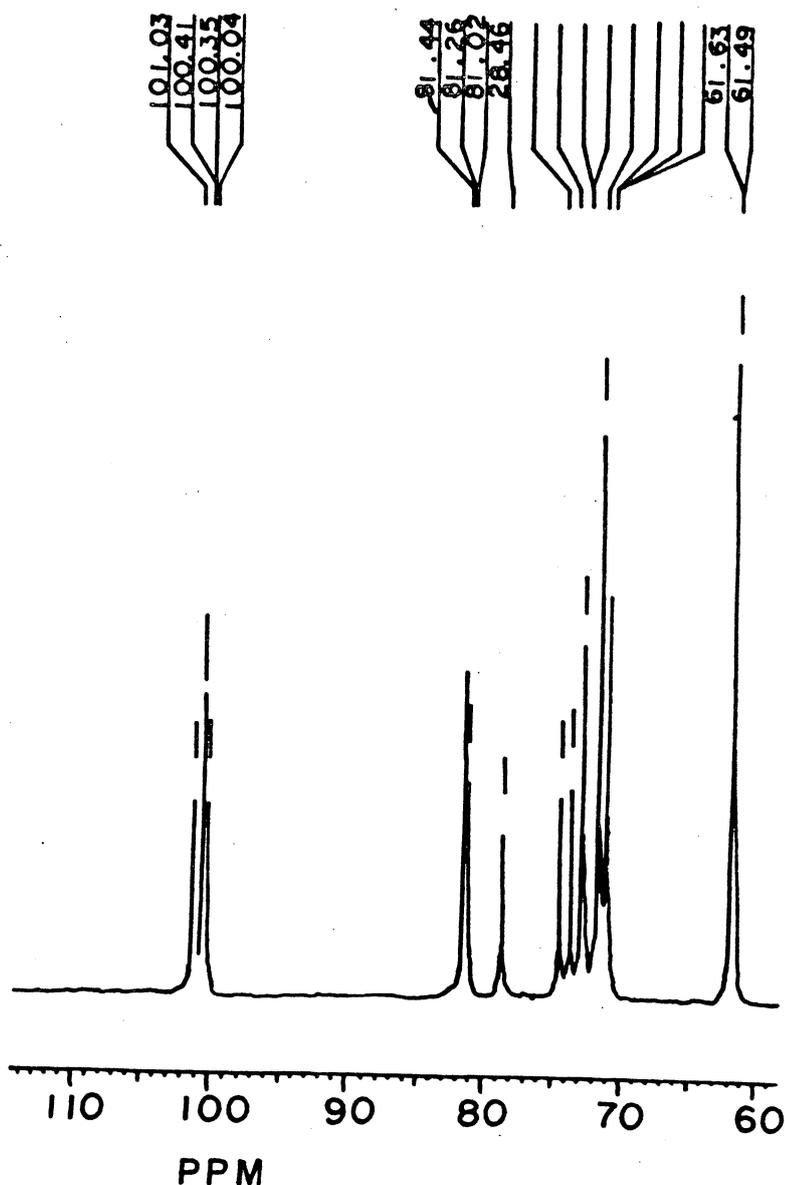


Figura 6 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. da  $\alpha$ -D-glucana, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

A atribuição de sinais para esta glucana foi ainda facilitada pela comparação do seu espectro com outros de glucanas lineares com ligações  $\alpha$ -(1 + 3) e (1 + 4), embora na proporção de 2:1, como as obtidas de *C. islandica* e *R. usnea* (18, 34) e ainda de *St. ramulosum* (8), particularmente quanto aos sinais a tribuídos para C-1, C-3 e C-4.

A análise por g.l.c. (OV-225,  $170^\circ\text{C}$ ) dos produtos de hidrólise da glucana, na forma de acetato de alditóis parcialmente metilados apresentou os componentes 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (2,0%); 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-

TABELA III - SINAIS ATRIBUÍVEIS E DE RELEVÂNCIA ESTRUTURAL DE  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. E SUAS ATRIBUIÇÕES PARA  $\alpha$ -D-GLUCANA\*

Atribuições de sinais	C-1	C-3	C-4	C-6
Unidades de $-(1 \rightarrow 3)\text{-}\underline{\text{D}}\text{-Glc}\rho\text{-}$	101.03	81.02 81.26 81.44	-	61.49
Unidades de $-(1 \rightarrow 4)\text{-}\underline{\text{D}}\text{-Glc}\rho\text{-}$	100.41 100.35 100.04	-	78.46	61.63

(\*) Sinais em  $\delta$  p.p.m.

O-metil-D-glucitol (72,0%) e 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol (26,0%), e relação molar 2,8:1 o que está de acordo com o resultado de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r.

Este polímero quando oxidado, apresentou um consumo de 0,30 moles de periodato de sódio por mol de hexose anidra e a produção de ácido fórmico foi de 0,03 moles por mol de hexose anidra. O consumo de periodato de sódio se deu pela unidade de glucose 4-O-substituído, o que é consistente com a relação 3:1.

Os produtos da degradação de Smith, glucose (75%) e eritritol (25%) (Fig. 7), este último proveniente das unidades de glucose 4-O-substituídos, mostram um polímero com cerca de 75% de unidades de glucose refratárias à oxidação com periodato, o que vem corresponder com as ligações (1 + 3) apresentadas pelo espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. que lhe atribuiu uma proporção de 3:1 em relação às ligações (1 + 4), bem como com o consumo de periodato que foi de 0,30 moles por mol de hexose anidra e ainda com a análise de metilação dos produtos de hidrólise, que apresentou (72%) do componente 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol, correspondente àquelas unidades de glucose com ligação (1 + 3) que não consumiram periodato; bem como os (25%) de eritritol correspondendo às unidades de glucose com ligações (1 + 4), que foram oxidadas mas não produzem ácido fórmico e estão também de acordo com a análise de metilação que apresentou (26%) do componente 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol, caracteriza um polímero ligado por (1 + 3) e (1 + 4) nas proporções indicadas pelo espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. Por último, a baixa produção de ácido fórmico com apenas 0,03 moles por mol de hexose anidra, está também de acordo com a análise de metilação a qual apresentou (2%) do componente 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, que no caso deste polímero, só poderia ter origem das extremidades não redutoras.

A somatória destes resultados reforçam as evidências de uma estrutura linear para esta  $\alpha$ -D-glucana, com predominância de ligações (1 + 3) sobre (1 + 4).

Como era de se esperar, os dados da degradação de Smith deste polímero apresentam uma certa diferença em relação ao encontrado para *St. ramulosum* (8), com (61,77 e 38,23%) para glucose e eritritol, respectivamente, uma vez que naquele líquen

a relação das ligações (1 + 3) e (1 + 4) é de 1,6:1.

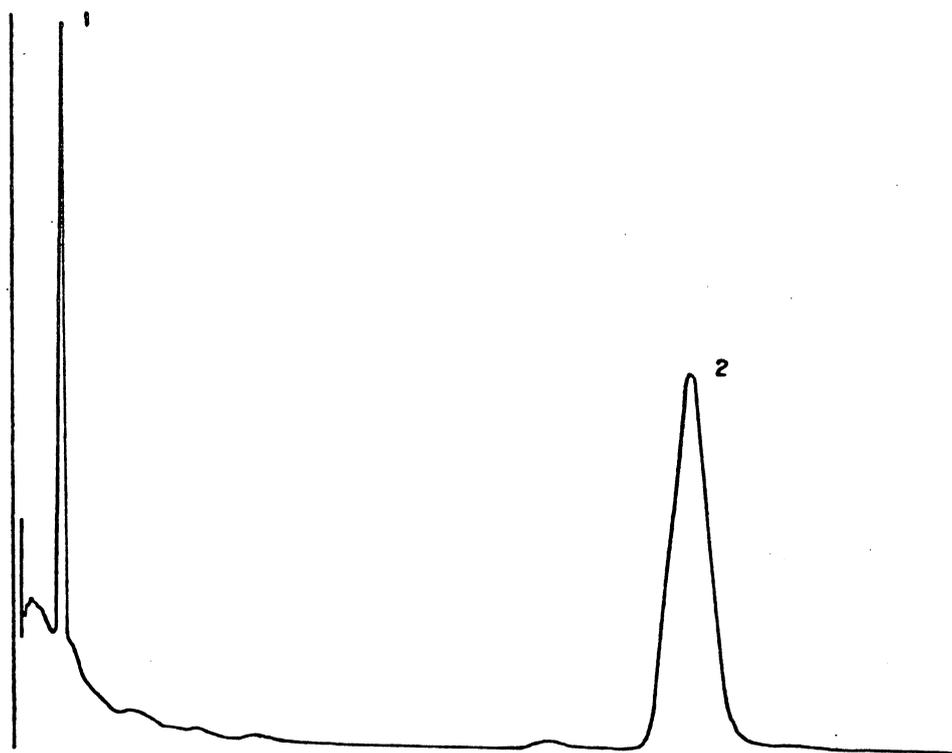


Figura 7 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de de gradação tipo Smith da  $\alpha$ -D-glucana, na forma de acetatos de alditóis: (OV-225, 190°C).

1. Eritritol tetra-O-acetato (25,0%)
2. Glucitol hexa-O-acetato (75,0%)

Objetivando determinar a sequência das ligações  $\alpha$ -(1 + 3) e  $\alpha$ -(1 + 4) no arranjo estrutural desta glucana, foi realizada a degradação controlada tipo Smith, deste polímero. A hidrólise ácida branda (pH 2,0, 100°C, 40 min.), do poliol resultante da oxidação, seguida por redução do material (Fração B<sub>1.1</sub>), não apresentou glucose livre e nem oligossacarídeos redutores, demonstrando que o polímero havia sido degradado como era esperado, apenas nas unidades susceptíveis à oxidação. Essa fração submetida a fracionamento em coluna de celulose forneceu três componentes principais quando revelados por AgNO<sub>3</sub> alcalino e não visualizados por cloridrato de *p*-anisidina, apresentando R<sub>GE</sub> 1,0 (5 mg), R<sub>GE</sub> 0,66 (25 mg) e R<sub>GE</sub> 0,37 (70 mg), eluídos

com acetona-água nas proporções de 7:1, 4:1 e 2:1, respectivamente. A análise por g.l.c. desses componentes na forma de seus respectivos acetatos de alditóis (Fig. 8-A, B e C), apresentou glucose e eritritol nas relações molares de 1:1 para o componente de  $R_{GE}$  1,0; 2:1 para o componente de  $R_{GE}$  0,66 e de 3:1 para o componente de  $R_{GE}$  0,37. Após metilação o componente de  $R_{GE}$  1,0 apresentou somente o 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, o glicosídeo de  $R_{GE}$  0,66 apresentou 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol e 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol numa relação molar de 1:1 e o componente de  $R_{GE}$  0,37 apresentou os mesmos derivados metilados, porém numa relação de 2:1, que está de acordo com ligações (1 + 3) e (1 + 4) na relação molar 3:1.

Estes resultados são similares aos da  $\alpha$ -D-glucana de *St. ramulosum* (8), embora aquela, por degradação de Smith tenha apresentado apenas dois componentes, com  $R_{GE}$  1,08 e 0,66 e ligações (1 + 3) e (1 + 4) na relação molar de 1,6:1.

Maior similaridade estrutural com a  $\alpha$ -D-glucana de *R. ecklonii* vamos encontrar na isoliquenana de *C. islandica*, que apresenta ligações (1 + 3) e (1 + 4) na relação de 3:2, bem como com a isoliquenana de *R. usnea* que apresenta ligações (1 + 3) e (1 + 4) na relação de 3:1 (34) e ainda com a isoliquenana obtida de *St. japonicum*, *St. sorediiferum* e *St. exutum* (89), que também apresentam ligações (1 + 3) e (1 + 4) na relação molar de 3:1.

Entretanto, quanto ao rendimento obtido em  $\alpha$ -D-glucana os mais significativos até então registrados pela literaturas dão como aqueles obtidos dos líquens *Sphaerophorus globosus* - 6,6% (104); *St. japonicum* - 6,1% (89) e 5,5% (103); *St. exutum* - 5,4% (89); *Pilophoron acicularis* - 5,0% (89); ; *St. ramulosum* - 4,48% (8) ; *St. sorediiferum* - 1,8% (89); *R. usnea* - 2,0% (34); *C. amaurocraea* - 1,0% (50); *C. islandica* - 1,14% (67); e outros com rendimento menos expressivos, como os obtidos ainda de *C. islandica* - 0,55% (67) e 0,07% (18), bem como de *E. prunastri* - 0,75% (91); *C. confusa* - 0,3% (50) e *C. alpestris* - 0,12% (50).

Comparado com os resultados registrados, o rendimento de 25,7% em  $\alpha$ -D-glucana obtido com o líquen *Ramalina ecklonii* foi um achado inédito que o indica como grande fonte desse importante polissacarídeo.

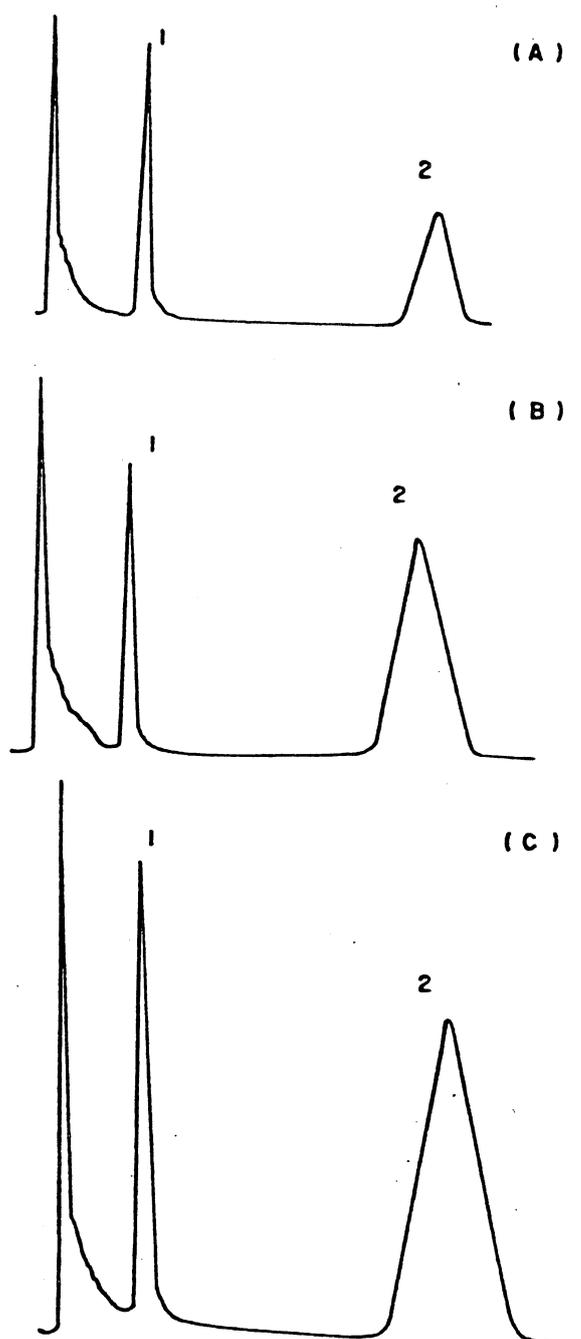


Figura 8 - Cromatogramas obtidos por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos produtos de degradação de Smith controlada da  $\alpha$ -D-glucana, na forma de acetatos de alditóis (OV-225, 190°C).

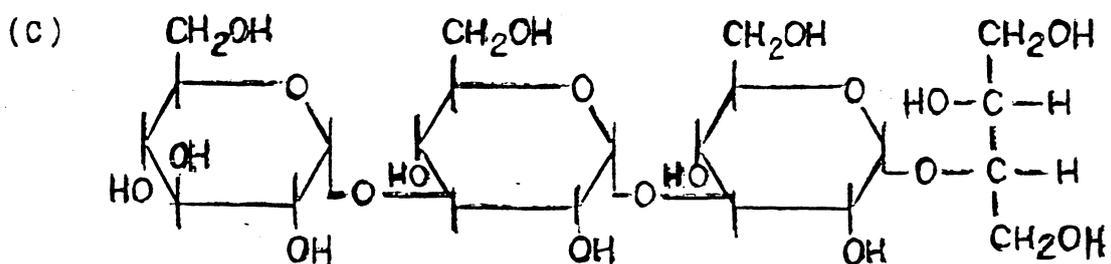
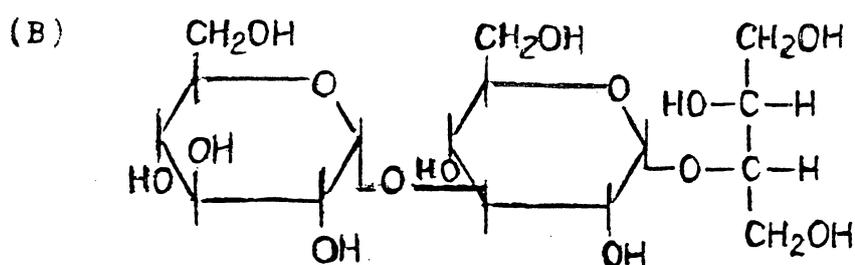
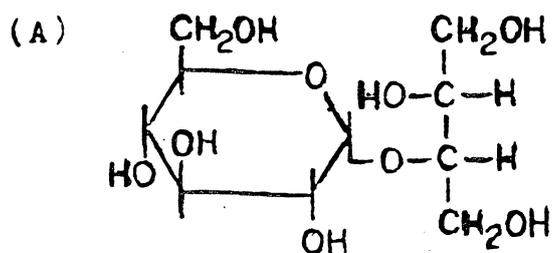
A - Componente com  $R_{GE}$  de 1,00, eluído por acetona-água 7:1.

B - Componente com  $R_{GE}$  de 0,66, eluído por acetona-água 4:1.

C - Componente com  $R_{GE}$  de 0,37, eluído por acetona-água 2:1.

A, B e C) 1. Eritritol tetra-O-acetato.

2. Glucitol hexa-O-acetato.



Estrutura XI - A, B e C - Oligossacarídeos obtido de *R. ecklonii* por degradação de Smith e coluna de celulose:

A - Componente de  $R_{GE}$  1,00

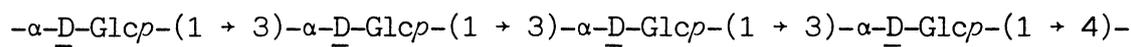
B - Componente de  $R_{GE}$  0,66

C - Componente de  $R_{GE}$  0,37

Como vimos anteriormente, os produtos da degradação de Smith forneceram (75%) de unidades de glucose e (25%) de eritritol, o que foi coerente com os espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. e também está de acordo com a análise por g.l.c. dos oligossacarídeos obtidos pela degradação controlada tipo Smith.

Pelos resultados de metilação dos oligossacarídeos o componente de  $R_{\text{GE}}$  1,00 foi identificado como sendo o glicosídeo 2- $\underline{\text{O}}-\alpha-\underline{\text{D}}$ -glucopiranosil- $\underline{\text{D}}$ -eritritol, o componente de  $R_{\text{GE}}$  0,66 como sendo o oligossacarídeo  $\underline{\text{O}}-\alpha-\underline{\text{D}}$ -glucopiranosil (1 + 3)- $\underline{\text{O}}-\alpha-\underline{\text{D}}$ -glucopiranosil-(1 + 2)- $\underline{\text{D}}$ -eritritol e o componente de  $R_{\text{GE}}$  0,37 como sendo o oligossacarídeo  $\underline{\text{O}}-\alpha-\underline{\text{D}}$ -glucopiranosil-(1 + 3)- $\underline{\text{O}}-\alpha-\underline{\text{D}}$ -glucopiranosil-(1 + 3)- $\underline{\text{O}}-\alpha-\underline{\text{D}}$ -glucopiranosil-(1 + 2)- $\underline{\text{D}}$ -eritritol.

Diante desses resultados, embora sem poder definir exatamente a sequência das ligações ao longo do polímero, foi sugerida a Estrutura XII como a principal estrutura para a  $\alpha-\underline{\text{D}}$ -glucana de *Ramalina ecklonii*.



#### Estrutura XII

### 3.3. POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA E COM KOH AQUOSO A QUENTE

O precipitado etanólico da extração com KOH aquoso a 2% forneceu 14,4 g de material (Fração C), que correspondeu a 5,8% do peso do líquen original, enquanto que o precipitado etanólico previamente obtido da extração aquosa (Fração B), forneceu 91,4 g ou 37,3% do peso do líquen original, gerando 58,5 g de  $\alpha-\underline{\text{D}}$ -glucose, que corresponde a 25,7% do peso do líquen original.

A análise por g.l.c. (Fig. 9-A) dos acetatos de alditóis derivados do hidrolisado do precipitado etanólico da extração com KOH aquoso indicou ramnose, manose, galactose e glucose numa relação molar de 2:42:37:19 (Tabela IV), enquanto que

o precipitado etanólico da extração aquosa conteve ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose numa relação molar de 0,5:2,0:1,0:6,0:5,0:85,5 (Fig. 2) e (Tabela II).

Pela relação molar dos componentes obtidos pelos dois processos de extração, observamos a predominância de glucose na extração aquosa e manose juntamente com galactose na extração alcalina. Como já foi discutido anteriormente a glucose corresponde à  $\alpha$ -D-glucana, que representa 25,7% em relação ao peso do líquen original, enquanto que a manose e galactose que são os componentes da galactomanana, representam apenas 3,7%.

Os produtos da extração com KOH, tal como procedido com os da extração aquosa, foram em seguida submetidos a sucessivos processos de congelamento e degelo, fornecendo também polissacarídeos solúveis em água fria (sobrenadante) e insolúveis (precipitado).

### **3.3.1. Polissacarídeos do sobrenadante de gelo e degelo da extração com KOH aquoso**

O sobrenadante de gelo e degelo, por c.p. (Sistema I), visualização com  $\text{AgNO}_3$  alcalino e cloridrato de *p*-anisidina, revelou ser uma mistura de polissacarídeos constituídos principalmente por manose, galactose e em menor quantidade glucose e ramnose. Este extrato foi então submetido a três sucessivas precipitações com solução de Fehling, conforme procedido com os da extração aquosa, fornecendo sobrenadante e precipitado.

### **3.3.2. Precipitado de Fehling da extração aquosa e com KOH aquoso (galactomananas).**

O precipitado de Fehling da extração aquosa forneceu 4,8 g de material (Fração B<sub>2</sub>), enquanto que o da extração com KOH aquoso forneceu 9,1 g (Fração C<sub>3</sub>), que corresponde respectivamente a 2,1 a 3,7%, do peso do líquen original.

Por c.p. (Sistema I), os produtos de hidrólise ácida total do precipitado de Fehling da extração com KOH aquoso a 2% quente, visualização por  $\text{AgNO}_3$  alcalino e cloridrato de *p*-anisidina e ainda análise por g.l.c. dos respectivos acetatos de

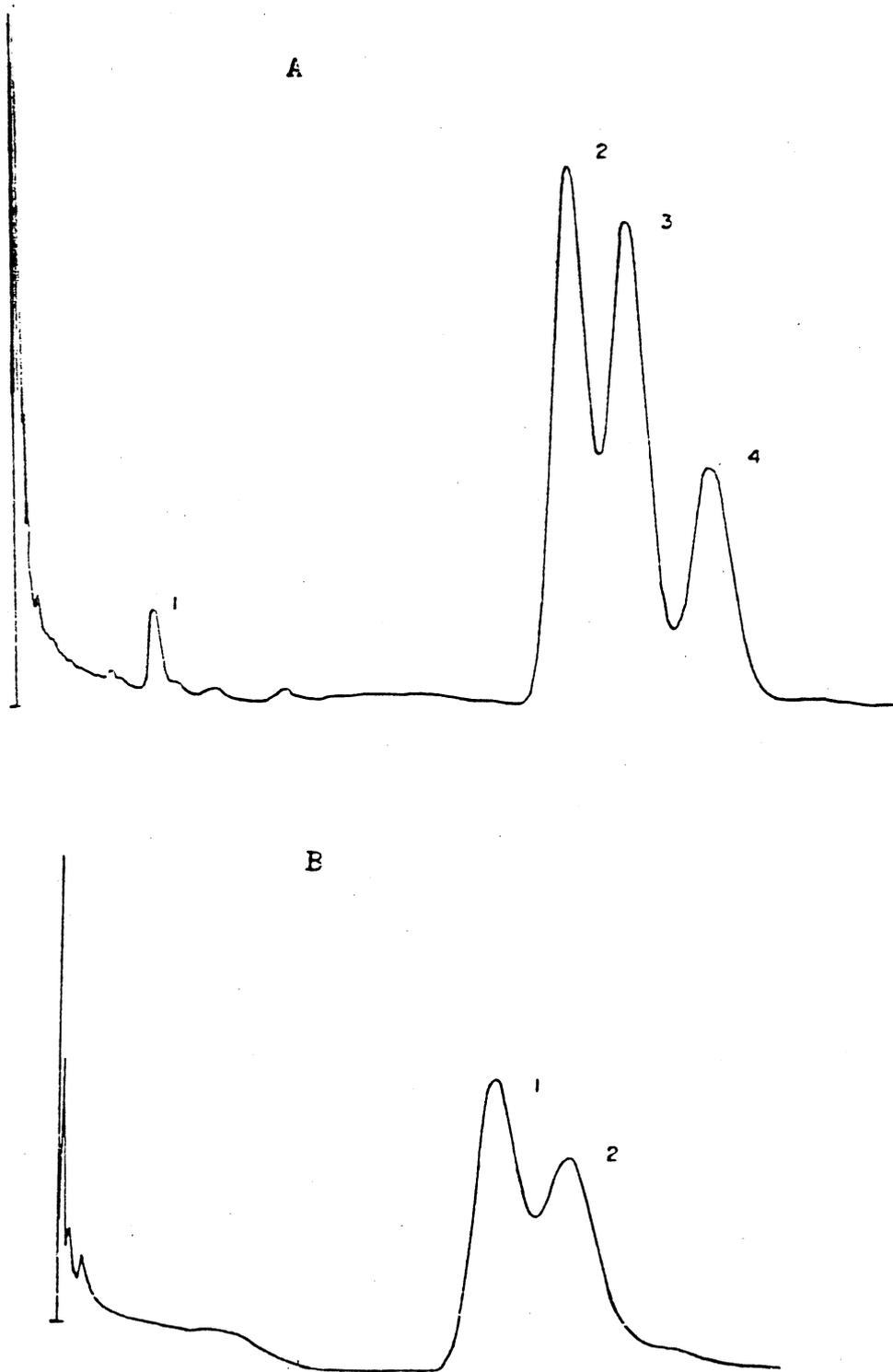


Figura 9 - Cromatogramas obtidos por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos polissacarídeos do extrato alcalino: A - precipitado etanólico total e B - galactomanana do precipitado de Fehling e Cetavlon, na forma de seus acetatos de alditóis (OV-225, 190°C).

- |     |    |                           |       |
|-----|----|---------------------------|-------|
| A - | 1. | Rhamnitol penta-O-acetato | ( 2%) |
|     | 2. | Manitol hexa-O-acetato    | (42%) |
|     | 3. | Galactitol hexa-O-acetato | (37%) |
|     | 4. | Glucitol hexa-O-acetato   | (19%) |
| B - | 1. | Manitol hexa-O-acetato    | (57%) |
|     | 2. | Galactitol hexa-O-acetato | (43%) |

alditóis, revelaram manose e galactose numa relação molar de 57:43 (Fig. 9-B) e (Tabela IV), mostrando a remoção dos resíduos de ramnose e glucose (Fig. 9-A), enquanto que o precipitado de Fehling da extração aquosa quente, pelos mesmos sistemas de cromatografias mostrou arabinose, manose e galactose numa relação molar de 9:54:37 (Fig. 10-A) e (Tabela II). Os resultados das dosagens de proteínas totais, relacionados nas (Tabelas II e IV), respectivamente para as galactomananas da extração aquosa e com KOH aquoso, foram considerados normais.

Alíquotas (500 mg) de cada fração ( $B_2$  e  $C_3$ ), foram tratadas por Cetavlon o qual, em pH 8,5 em presença de borato forneceu para ambas um precipitado que rendeu 415 e 460 mg, respectivamente.

A análise por g.l.c. da (Fração  $B_2$ ) (Fig. 10-B), revelou apenas manose e galactose numa relação molar de 54:46, mostrando que o fracionamento por Cetavlon removeu as unidades de arabinose, comprovando que o mesmo não deveria fazer parte da estrutura da galactomanana, devendo portanto ter sido removido com alguma fração do Cetavlon, não estudada. Por outro lado, a análise por g.l.c. da (Fração  $C_3$ ), como era de se esperar, não apresentou qualquer modificação, uma vez que o tratamento com a solução de Fehling já havia fornecido uma galactomanana aparentemente pura.

É importante ressaltar, entretanto, que a  $\alpha$ -D-glucana obtida do sobrenadante de Fehling via extração aquosa, quando tratada pelo Cetavlon, foi também fracionada em pH 8,5 em presença de borato. Desta forma se conclui que o tratamento prévio deste material por solução de Fehling revelou-se como um processo eficaz no fracionamento destes polímeros, uma vez que não fosse esse tratamento, a purificação desses polissacarídeos exclusivamente por Cetavlon, seria impossível.

Estas galactomananas apresentaram rotação específica muito próximas, sendo  $+60^\circ$  e  $+57^\circ$ , para as frações  $B_2$  e  $C_3$ , respectivamente, mostrando uma similaridade entre ambas frente a essa propriedade física. Esses dados de rotação específica das galactomananas de *R. ecklonii*, por sua vez, são coerentes com os resultados observados em algumas galactomananas de líquens como de *R. usnea* +  $63^\circ$  (34); *C. alpestris* +  $52^\circ$  e *C. confusa* +  $52^\circ$

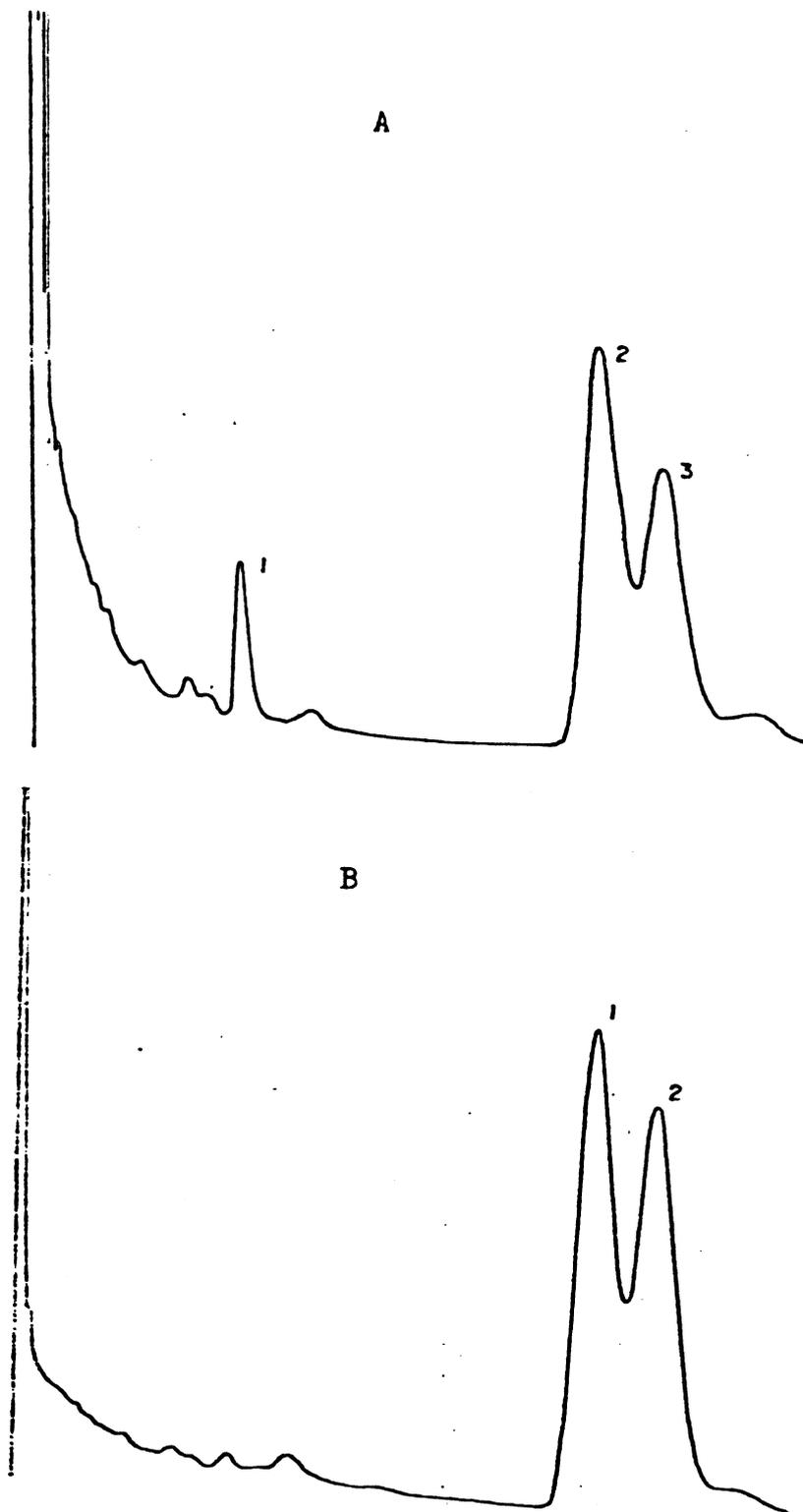


Figura 10 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total da galactomanana da extração aquosa: A - precipitado de Fehling e B - precipitado de Fehling, seguido de precipitação com Cetavlon em pH 8,5, em presença de borato na forma de seus respectivos acetatos de alditóis (OV-225, 190°).

A - 1.	Arabinitol penta-O-acetato	( 9%)
2.	Manitol hexa-O-acetato	(54%)
3.	Galctitol hexa-O-acetato	(37%)
B - 1.	Manitol hexa-O-acetato	(54%)
2.	Galactitol hexa-O-acetato	(46%)

TABELA IV - PROPRIEDADES DE ALGUNS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM KOH DO LÍQUEN *R. ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot.

Fração polissacarídica	N (%)	Proteínas totais (%)	$[\alpha]_D^{25}$	Componentes em monosacarídeos (%)				Em relação ao líquen original (%)
				Man	Gal	Glc	Rha	
Precipitado etanólico (Fração C)	-	-	-	42	37	19	2	5,8
Precipitado de Fehling (galactomanana) (Fração C <sub>3</sub> )	0,6	3,9	+57°	57	43	-	-	3,7
Galactomanana (após hidrólise parcial) (Fração C <sub>3</sub> )	-	-	+74°	80	20	-	-	-
Precipitado de gelo/degelo ( $\beta$ -D-glucana) (Fração C <sub>1</sub> )	-	-	+41°(1)	-	-	100	-	0,4

(1) Após tratamentos com solução de Fehling.

e *C. amaurocraea* + 46°(50) e *St. paschale* + 63° (35).

Alíquotas (2 mg) de cada fração (B<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>), fracionadas por Cetavlon, quando aplicadas em coluna de Sepharose 4B-200, foram eluídos com pico máximo em 55 e 57 mL, respectivamente, mostrando mais uma vez a identidade existente entre as duas, comprovando ainda ser ambas homogêneas, pelo que foram consideradas adequadas para estudos estruturais. Todavia, em virtude da similaridade verificada entre as duas, relativamente aos dados físico-químicos, como rotação específica e comportamento na cromatografia em coluna de Sepharose, os estudos complementares da análise estrutural tiveram prosseguimento apenas com o polímero extraído com KOH aquoso devido ao maior rendimento desta (3,7 contra 2,1%), embora alguns outros testes tenham sido executados com aquela da extração aquosa, na tentativa de melhor justificar a semelhança entre ambas.

A galactomanana obtida por extração alcalina foi submetida à análise de metilação e g.l.c. dos derivados O-metil acetatos de alditois, indicando os seguintes fragmentos: 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol (2,0%), o 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol (41,0%), o 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-manitol (20,0%), o 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-manitol (24,5%) e o 1,2,4,5,6-penta-O-acetil-3-O-metil-D-manitol (8,5%) (Tabela V). Estes resultados mostram um polímero bastante ramificado, conforme se verifica pela elevada percentagem dos grupos terminais não redutores, representados pelos componentes tetra-O-metilados, bem como pela presença dos di e mono-O-metil. Os resultados de metilação mostram que as ramificações ocorrem principalmente em O-4, embora algumas di-O-substituições também ocorram envolvendo o O-2, em particular.

Os dados de oxidação deste polímero com metaperiodato de sódio apresentaram um consumo de 1,60 moles de periodato por mol de hexose anidra e a produção de 0,70 moles de ácido fórmico por mol de hexose. Tal consumo de periodato e produção de ácido fórmico estão de acordo com os resultados de metilação anteriormente discutidos que preveem valores de 1,53 moles/mol e 0,63 moles/mol, respectivamente.

Os produtos de degradação tipo Smith, que após redução

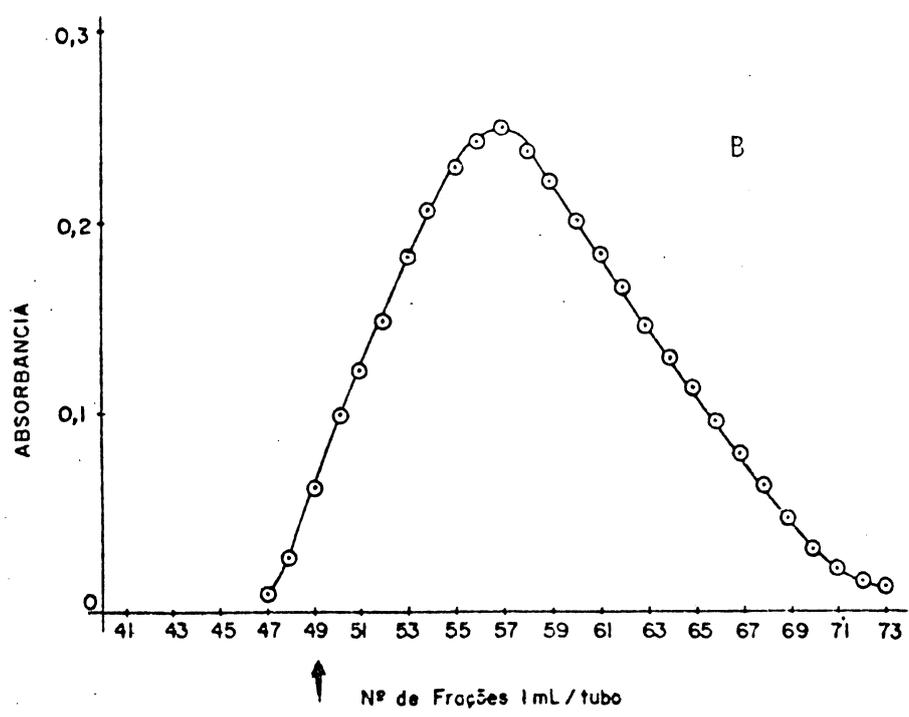
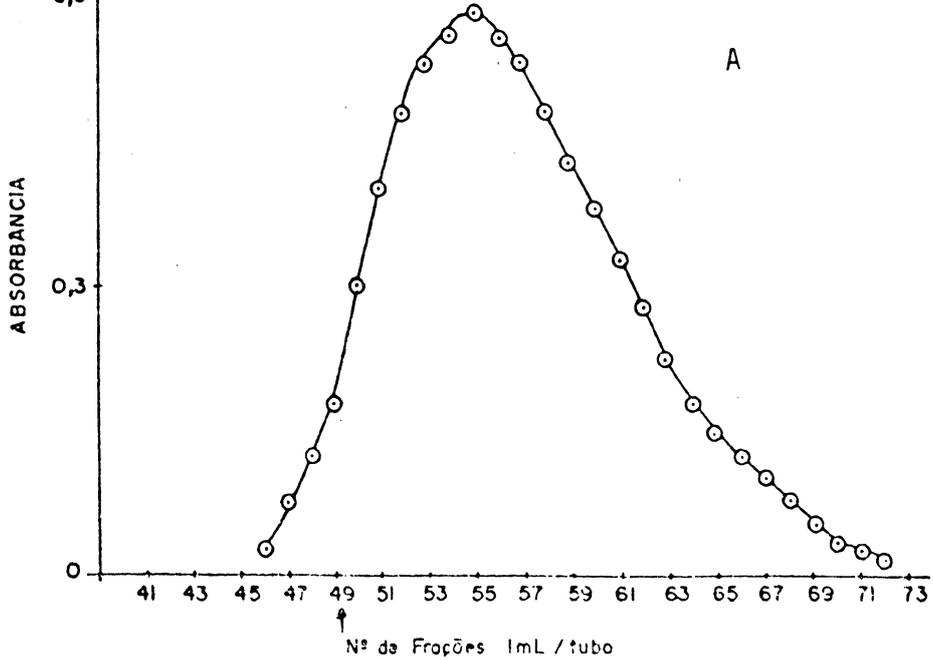


Figura 11 - Cromatogramas das galactomananas em coluna de Sepharose 4B-200 (50 x 2,1 cm d.i.). As amostras analisadas (2 mg) foram eluidas com água destilada na velocidade de escoamento de 13 mL/h. Frações de 1 mL do eluato foram coletadas à temperatura ambiente.

- A - extração aquosa.
- B - extração com KOH aquoso a 2%.

e acetilação forneceram glicerol (65,0%), eritritol (22,0%), manitol (11,0%) e galactitol (2,0%) também estão de acordo com os resultados de metilação e oxidação. O glicerol obtido é proveniente das extremidades terminais não redutoras e dos resíduos mono-substituídos em C-6, enquanto que o eritritol é proveniente dos resíduos de manopiranosil di-O-substituídos correspondentes ao 2,3-di-O-metil-D-manose. A presença de manitol nos produtos da degradação de Smith é proveniente dos resíduos de manose tri-O-substituídos que após metilação correspondeu ao derivado 1,2,4,5,6-penta-O-acetil-3-O-metil-D-manitol. Este componente entretanto, poderia ser um derivado do 3-O como do 4-O-metil-manose. O hidrolisado obtido da galactomanana O-metilada tratada sucessivamente com metanol-HCl sob refluxo e acetilado com anidrido acético-piridina (34), por g.l.c. o produto mostrou um pico em T = 25 min. correspondente ao padrão metil 2,4,6-tri-O-acetil-3-O-metil-manopiranosídeo e não ao seu isômero 4-O-metil-manopiranosídeo que apresentou um pico em T = 35 min. Desta forma o derivado mono-metilado encontra-se substituído em O-2, O-4 e O-6.

Desejando alcançar a estrutura da cadeia principal das galactomananas (Frações B<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>), amostras das mesmas foram submetidas à hidrólise parcial, após o que, a análise por g.l.c. das mesmas revelou para a Fração B<sub>2</sub> - manitol e galactitol numa relação molar de 72:28 (Tabela II) e para a Fração C<sub>3</sub> - manitol e galactitol na relação de 80:20 (Tabela IV) e rotação específica de + 80° e + 74°, respectivamente, para as Frações B<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>, o que indica uma configuração alfa para as unidades de manopiranse de ambas as galactomananas.

Os valores apresentados pela rotação específica, bem como a relação molar manose e galactose apresentada por ambas as galactomananas indicam a existência de uma semelhança entre elas, que por último são similares aos dados encontrados para as galactomananas obtidas dos líquens *C. alpestris* + 69°, *C. confusa* + 77° e *C. amaurocraea* + 76° (50), também após hidrólise ácida parcial.

A análise de metilação por g.l.c. (OV-225, 170°C) dos produtos de hidrólise da galactomanana da extração com KOH (Fração C<sub>3</sub>), após a hidrólise ácida parcial, na forma de acetato de

alditóis parcialmente metilados, apresentou o 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol (4,0%), o 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol (11,0%), o 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-manitol (70,0%) e o 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-manitol (13,0%) (Tabela V). Isto indica que a cadeia principal da galactomanana (Fração C<sub>3</sub>) é formada predominantemente por unidades manopiranosídicas ligadas por (1 + 6).

O espectro de <sup>13</sup>C-n.m.r. da galactomanana obtida por extração com KOH aquoso (Fig. 12-B), apresentou dois sinais em  $\delta$  104,75 e 101,93 para C-1, sendo o sinal em campo baixo  $\delta$  104,75, proveniente dos grupos  $\beta$ -D-galactopiranosil ligados por (1 + 4) e (1 + 2) aos resíduos  $\alpha$ -D-manopiranosil, enquanto que o sinal em campo alto  $\delta$  101,93 foi atribuído aos resíduos  $\alpha$ -D-manopiranosil ligados por (1 + 6) não substituídos e substituídos em O-4. A ocorrência de um sinal em campo mais alto que  $\delta$  101,93, ou seja  $\delta$  100,9, provavelmente correspondendo ao C-2 das unidades manopiranosídicas substituídas em O-2,4,6, é devido a um efeito de  $\beta$ -substituição (39). Observa-se ainda um forte sinal em  $\delta$  77,86 para  $\alpha$ -D-manopiranosil 4-O-substituídos (9) e outro  $\delta$  77,13 do C-5 das unidades  $\beta$ -D-galactopiranosídicas (32). Estes resultados são similares aos encontrados para D-galactomananas de *R. usnea* e *C. islandica* (34) e ainda da *P. aphthosa* (35).

O espectro de <sup>13</sup>C-n.m.r. da galactomanana da extração aquosa (Fig. 12-A), também apresentou dois sinais em  $\delta$  104,82 e 101,90, porém a presença de outros sinais nesta, indica que a galactomanana obtida por extração alcalina apresenta uma estrutura mais pura.

Objetivando ainda determinar o arranjo estrutural desta galactomanana, uma alíquota da mesma foi submetida à acetólise parcial (57) e após desacetilação, a c.p. (Sistema II), revelou manose, galactose e principalmente um componente de R<sub>GAL</sub> 0,25, o qual foi posteriormente obtido no estado puro por cromatografia preparativa em papel, no mesmo sistema de solventes.

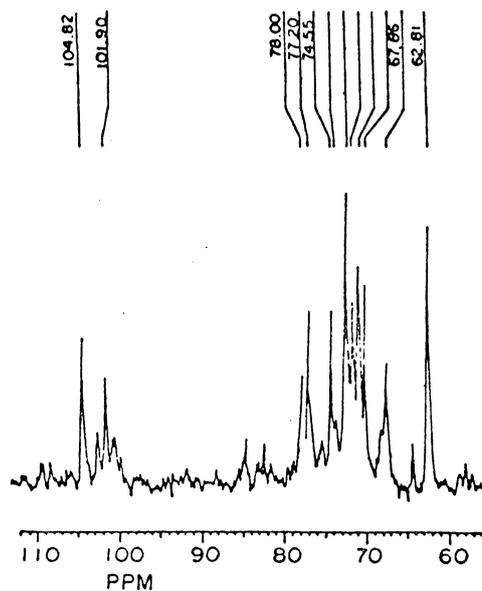
A análise por g.l.c. dos produtos de hidrólise ácida total do componente de R<sub>GAL</sub> 0,25 apresentou manose e galactose na relação molar de 1:1 (Fig. 13). O mesmo apresentou rotação específica -15° (Tabela VI). Desejando-se conhecer a ponta terminal não redutora deste dissacarídeo, foi o mesmo reduzido

TABELA V - RESULTADOS DA ANÁLISE POR G.L.C. DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE O-METILADOS, DA GALACTOMANA-NA OBTIDA COM A EXTRAÇÃO ALCALINA.

<u>O</u> -Metil -alditóis	T <sup>(1)</sup>	Percentagem dos picos	
		Precipitado de Fehling	Após hidrólise parcial
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0,99	2,0	4,0
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1,17	42,0	11,0
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	2,24	20,0	70,0
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	4,12	24,5	13,0
3-Me-Man	6,7	8,5	-

T<sup>(1)</sup> - Tempo de retenção em relação ao 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

A



B

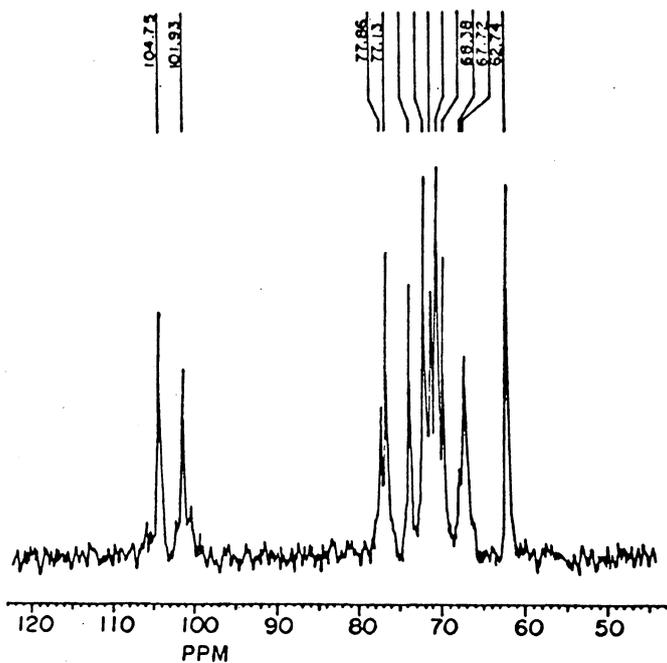


Figura 12 - Espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) a  $70^\circ\text{C}$ , das galactomananas obtidas: A - via de extração aquosa e B - via extração com KOH aquoso. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  em p.p.m.



Figura 13 - Cromatograma obtido por g.l.c. dos produtos de hidrólise ácida total de oligossacarídeo obtido pela acetólise parcial da galactomanana extraída com KOH aquoso, na forma de seus acetatos de alditóis (OV-225, 190°C):

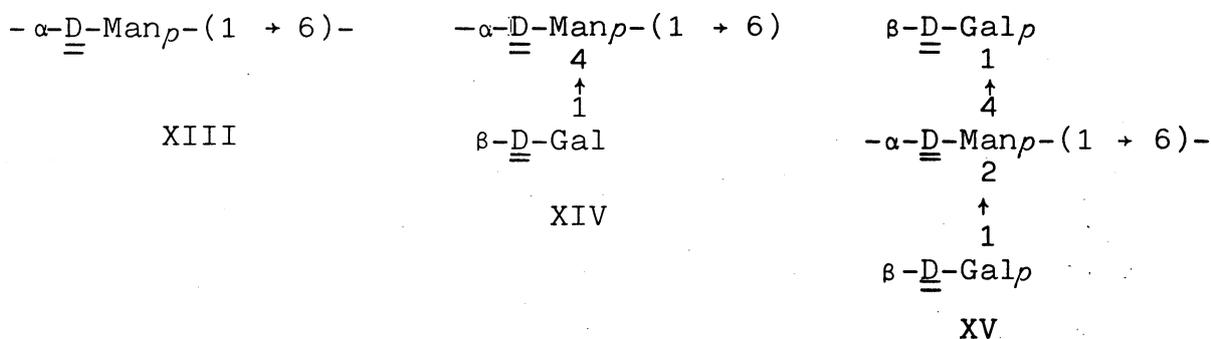
- 1 - Manitol hexa-O-acetato (50,0%)  
 2 - Galactitol hexa-O-acetato (50,0%)

TABELA VI - PROPRIEDADES DO OLIGOSSACARÍDEO OBTIDO POR ACETÓLISE PARCIAL DA GALACTOMANANA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO COM KOH AQUOSO A 2%, DO LÍQUEN *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot.

Fração polissacarídica	$[\alpha]_D^{25}$	Componente em monossacarídeo (%)	
		Man	Gal
Dissacarídeo (Fração C <sub>3</sub> )	-15°	50	50

com NaBH<sub>4</sub> e em seguida submetido à hidrólise ácida total. A c.p. (Sistema I) do material hidrolisado e visualização com o cloridrato *p*-anisidina mostrou apenas galactose como açúcar redutor, indicando que a galactose encontra-se na extremidade terminal não redutora do dissacarídeo. A análise de metilação deste dissacarídeo por g.l.c. (OV-225, 170°C) dos produtos de hidrólise na forma de seus respectivos acetatos de alditóis parcialmente metilados forneceu o 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol, o 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-manitol e traços do 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil-D-manitol.

Os dados da análise de metilação são consistentes com a estrutura 4-O-galactopiranosil-manose. Objetivando determinar a configuração da ligação glicosídica, foi verificada a rotação específica que revelou ser -15°, um valor que se situa numa faixa de -30° a +30°, devido a baixa concentração da amostra e perda da sensibilidade do polarímetro. Entretanto, este valor está próximo de +27° registrado para 4-O-β-D-galactopiranosil-D-manose (43) e bem abaixo de +125° e +76° encontrados para 6-O-D-manose (99) e 2-O-α-D-galactopiranosil-D-manose (39), respectivamente. Desta forma, a estrutura do presente dissacarídeo é 4-O-β-D-galactopiranosil-D-manose, indicando que a galactomanana tem cadeia lateral constituída por β-D-Gal<sub>p</sub> ligada por (1 + 4) à cadeia principal de α-D-manopiranosose ligada (1 + 6), cujas ligações são preferencialmente clivadas sob as condições de acetólise parcial, indicando três prováveis seguimentos para a estrutura dessa galactomanana.



### 3.3.3. Sobrenadante de Fehling da extração com KOH

Os sobrenadantes de Fehling da extração com KOH aquoso a 2% forneceram 1,4 g de material (Fração C<sub>2</sub>) que corresponde a 0,58% do líquen original. Esta fração que por c.p. (Sistema I), visualização por AgNO<sub>3</sub> e cloridrato de *p*-anisidina, revelou uma mistura de polissacarídeos constituída por ramnose, manose, galactose e glucose, não foi estudada em virtude do baixo rendimento apresentado.

### 3.3.4. Polissacarídeos do precipitado obtido por congelamento e degelo do extrato aquoso e alcalino

Os precipitados resultantes do congelamento e degelo dos extratos aquoso e alcalino, constituídos pelo componente insolúvel em água fria, apresentaram rendimento de 5,0 g de material (Fração B<sub>3</sub>), que corresponde a 2,2% do peso do líquen original (Tabela II) e 1,8 g (Fração C<sub>1</sub>), que corresponde a 0,73% do peso do líquen original (Tabela II). A c.p. (Sistema I) de ambas as frações revelou apenas glucose, o que foi confirmado pela análise por g.l.c. dos seus componentes na forma de acetatos de alditóis, que apresentou apenas glucitol.

Em virtude da insolubilidade desses polissacarídeos em água (Frações B<sub>3</sub> e C<sub>1</sub>), tentou-se outra alternativa para o seu fracionamento. Foi desenvolvida uma extração com álcali aquoso quente e o extrato, neutralizado e dialisado, resultou na formação de um precipitado, o qual, contendo 95% de glucose, apresentou rotação específica + 167°, sugerindo uma  $\alpha$ -glucana diferente estruturalmente da isoliquenana solúvel em água. Estas características físico-químicas suscitaram a possibilidade da presença de micodextrana (nigerana) insolúvel em água, que é constituída por unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosídicas ligadas alternadamente por (1 + 3) e (1 + 4), a qual foi isolada de *Aspergillus niger* (10) e do líquen *Cladonia alpestris*. Entretanto, sua rotação específica em NaOH aquoso é extremamente alta + 283°, sugerindo contaminação da  $\alpha$ -glucana com outro componente provavelmente uma  $\alpha$ -glucana. As frações acima (B<sub>3</sub> e C<sub>1</sub>) foram então submetidas à sucessivos tratamentos de congelamento e degelo e os produtos constituídos pelo precipitado insolúvel, com baixo rendimento, apresentaram uma queda para +41° na rotação específica, indicando a remoção de  $\alpha$ -D-glucana, devido aos inúmeros tratamentos de gelo/degelo.

Assim, estas frações devem ser constituídas por uma mistura de micodextrana com rotação específica + 283° e  $\beta$ -glucana + 3° (8) em proporções variadas, tendo sido o último componente concentrado pelo congelamento e degelo, uma vez que é mais insolúvel em água do que a mycodextrana.

O espectro de <sup>13</sup>C-n.m.r. da Fração C<sub>1</sub> (Fig. 13), apresentou sinais em  $\delta$  101,56 e 102,36, semelhantes àqueles de micodextrana (50), juntamente com outro em  $\delta$  105,20, similar ao en-

contrado na  $\beta$ -D-glucopirranana linear 3-O-substituída, de *St. ramulosum* (8). As diferenças nos deslocamentos químicos dos três sinais previamente observados (8,34), talvez se explique pelo uso de NaOH aquoso como solvente na análise por n.m.r. Todavia, uma correspondência exata dos deslocamentos químicos provavelmente não tenha ocorrido devido a presença de NaOH que age como reagente deslocador no caso de ligações (1 + 3) e (1 + 4).

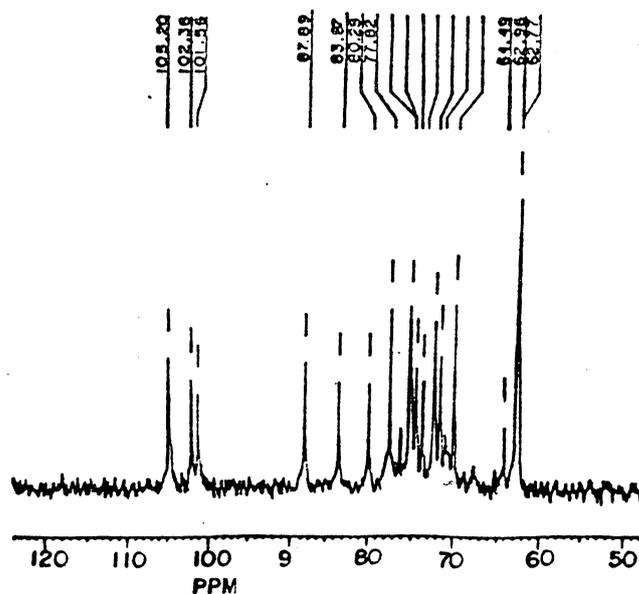


Figura 14 - Espectros de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) a  $70^\circ\text{C}$ , da mistura de glucanas extraída com KOH aquoso. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

## CONCLUSÕES

*Ramalina ecklonii*, um líquen ascomiceto, foi submetido a uma extração com benzeno-etanol para remover material apolar (1,0%) e o resíduo foi tratado com metanol aquoso a quente, cujo extrato mostrou-se constituído principalmente por arabinitol e manitol numa relação molar de 7,3:1.

Extração aquosa a quente do líquen remanescente forneceu uma mistura de glucana e galactomanana. Por tratamento com solução de Fehling, o complexo cúprico da galactomanana foi precipitado e a glucana foi isolada do sobrenadante com alto rendimento de (25,7%). O espectro de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. da glucana mostrou sinais de C-1 em campo alto e dos demais carbonos correspondendo às ressonâncias de carbonos 3-O e 4-O-substituídos de  $\alpha$ -D-glucopiranosose numa relação molar de 3:1. A configuração glicosídica foi confirmada pela rotação específica de  $+213^\circ$  bem como a relação molar por análise de metilação e degradação de Smith empregando hidrólise ácida forte. A degradação controlada de Smith forneceu glucosil-eritritol, glucobiosil-eritritol e glucotriosil-eritritol, indicando que as ligações (1 + 3) e (1 + 4) estão distribuídas de forma irregular ao longo da cadeia linear, semelhante a família das isoliquenanas.

Uma galactomanana foi recuperada do complexo cúprico insolúvel e purificada pelo precipitado formado com Cetavlon em pH 8,5, em presença de borato. O rendimento foi de 2,1%, enquanto que a extração alcalina forneceu 3,7% de galactomanana, cujo espectro  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. apresentou menos sinais de C-1 é aparentemente mais pura. Portanto, foi escolhida para as demais análises estruturais. A preparação apresentou unidades de galactose e manose na relação molar de 57:43 e rotação específica  $+57^\circ$ . A cromatografia em coluna de Sepharose 4B-200 mostrou ser um polissacarídeo homogêneo.

A análise do produto de hidrólise parcial mostra que a galactomanana é formada por uma cadeia principal constituída por unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosose ligadas por (1 + 6). Os dados da análise de metilação, oxidação com metaperiodato de sódio e acetólise parcial para formar dissacarídeo indicam uma galactomanana estruturalmente inédita, devido às substituições em 2-O e 4-O das unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosose, por unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose (Estruturas XIII, XIV e XV).

A degradação de Smith utilizando condições hidrolíticas fortes forneceu glicerol (65%), eritritol (22%), manose (11%) e galactose (2%). A formação de eritritol (22%) corresponde a 44% de estrutura XIV na galactomanana, bem como a produção de 11% de manose indica que 33% de estrutura XV está também presente. Os dados de metilação mostram que a estrutura XIII (~8,5%) é outro componente significativo no polissacarídeo.

Resultados preliminares mostram que o líquen contém outras glucanas que foram isoladas por extração com álcali aquoso a quente, como precipitado formado no saco de diálise após neutralização. Estas são aparentemente micodextrana (nigerana) e uma  $\beta$ -D-glucopiranosana linear 3-O-substituída, de acordo com as evidências de  $^{13}\text{C}$ -n.m.r.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J.K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F.  
A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. J. Amer. Chem. Soc., 74: 4970 - 4971, 1952.
2. ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. Methods Carbohydr. Chem., 5: 269-276, 1965.
3. AHMADJIAN, V. & HALE, M.E. The Lichens. Academic Press, New York, p. 273, 1973.
4. ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res., 5:340-345, 1967.
5. ALLSOBROOK, A.J.R.; NUNN, J.R.; PAROLIS, H. Investigation of the acetolysis products of the sulphated polysaccharides of *Aeodes ulvoida*. Carbohydr. Res., 40:337-343, 1974.
6. AMARAL, D.; KELLY-FALCOZ, F.; HORECKER, B.L. Galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. Meth. Enzymol., 9:87-92, 1966.
7. ASPINALL, G.O.; HIRST, E.L.; WARBURTON, M. The alkali-soluble polysaccharides of the lichen *Cladonia alpestris* (Reindeer Moss). J. Chem. Soc., 651-655, 1955.
8. BARON, M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Isolation and identification of a linear (1 + 3)-linked- $\beta$ -D-glucan and other carbohydrate components of the lichen *Stereocaulon ramulosum* (SW.) Räsusch. Carbohydr. Res., 177:235-239, 1988.
9. BARON, M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structural studies on a galactomannan isolated from the lichen *St. ramulosum*. 1988. Submetido à publicação.
10. BARKER, S.A.; BOURNE, E.J.; STACEY, M. Studies on *Aspergillus niger*. Part 1. The structure of the polyglucosan synthesised by *Aspergillus niger* 152. J. Chem. Soc., 3084 - 3090 (1953).

11. BARRETO-BERGTER, E. & GORIN, P.A.J. The Chemistry of Polysaccharides of Fungi and Lichens. The Polysaccharides, 2:365 - 400, 1983.
12. BeMILLER, J.N. Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. Adv. Carbohydr. Chem., 22:25-108, 1967.
13. BERZELIUS, J.J. Versuch uber die Mischung des Islandischen Mooses und seine Anwendung als Nahrungsmittel. J. Chem. Phys., 7:317-352, 1815.
14. BISHOP, C.T. & JENNINGS, H.J. Immunology of Polysaccharides. The Polysaccharides, 1: 291-325, 1982.
15. BOCK, K. & PEDERSEN, C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 41: 27-65, 1983.
16. BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. Hydrolysis of methylated polysaccharides. Methods Carbohydr. Chem., 5: 296-298, 1965.
17. BUSTON, H.W. & CHAMBERS, V.H. Some cell-wall constituents of *Cetraria islandica* "Iceland Moss". Biochem. J., 27: 1691-1702, 1933.
18. CHANDA, N.B.; HIRST, E.L.; MANNERS, D.J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland Moss (*Cetraria islandica*). J. Chem. Soc., 1951-1958, 1957.
19. COLSON, P.; JENNINGS, H.J.; SMITH, I.C.P. Composition, sequence, and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by carbon 13 nuclear magnetic resonance. J. Amer. Chem. Soc., |96:26|: 8081-8087, 1974.
20. CULBERSON, C.F. Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. North Carolina, University of North Carolina Press. 73-89, 1970.
21. CZECZUCA, B. & CORONA, L.F. Carotenoids in Lichens from Argentina. Biochem. System. Ecol., 15(5):519-522, 1987.
22. DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOT, W.H.; JONES, K.M. Data for Biochemical Research. 2<sup>a</sup> ed. Oxford, Clarendon Press. 541-542, 1969.
23. DUARTE, J.H. & JONES, J.K.N. Some structural studies on the galactan form the albumen glands of the snail, *Strophocheilus oblongus*. Carbohydr. Res., 16: 327-335, 1971.

24. 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: 350-356, 1956.
25. DYER, J.R. Periodate oxidations in biochemical analysis. Meth. Biochem. Anal., 3:112-149, 1956.
26. FLEMMING, M. & MANNERS, D.J. A comparison of the fine structure of lichenin and barley glucan. Biochem. J., 100: 4p, 1966.
27. FLEMING, M. & MANNERS, D.J. The fine structure of isolichenin. Biochem. J., 100: 24p, 1966.
28. FONTANA, J.D.; DUARTE, J.H.; GALLO, C.B.H.; IACOMINI, M., GORIN, P.A.J. Occurrence of  $\beta$ -D-galactopyranosyl units esterified at O-6 with 2-aminoethylphosphonic Acid in the D-galactan of albumen glands of the snail *Megalobulimus paraguensis*. Carbohydr. Res., 143: 175-183, 1985.
29. FUJIKAWA, F.; HITOSA, Y.; YAGI, Y.; NAKAZAWA, S.; OMATSU, T. Antibacterial and antifungal action of lichen substances and their derivatives. Yakugaku Zasshi., 77: 307-309, 1957.
30. FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M.; SHIBATA, S.; NISHIKAWA, F.; TAKE-DA, T.; TANAKA, M. Polysaccharides in lichens and fungi. II. Antitumor activities on sarcoma - 180 of the polysaccharide preparations from *Gyrophora esculenta* Miyoshi, *Cetraria islandica* (L.) Ach. var. *orientalis* Asahina, and some other lichens. Gann, 59:421-432, 1968.
31. GARDELL, S. Fractionation on cellulose columns. Methods Carbohydr. Chem., 5: 9-14, 1965.
32. GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 38: 13-104, 1981.
33. GORIN, P.A.J.; GIBLIN, E.M.; SLATER, G.P.; HOGGE, L. Improved resolution of O-methylalditol acetates by gas-liquid chromatography on capillary columns with blended coatings of OV-17 and OV-225. Carbohydr. Res. 106:235-238, 1982.
34. GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens, *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. Carbohydr. Res., 128: 119-132, 1984.

35. GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Structural diversity of galactomannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. Carbohydr. Res., 142:253-267, 1985.
36. GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance studies on methyl aldofuranosides and their O-alkyl derivatives. Carbohydr. Res., 48:171 - 186, 1976.
37. GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. Can. J. Chem., 53: 1212-1223, 1975.
38. GORIN, P.A.J.; BARON, M.; IACOMINI, M. Storage products of lichens: high and low molecular weight carbohydrates, amino acids, and proteins. CRC Press. Aceito para publicação.
39. GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.F.T.; MAGUS, R.J. Comparison of proton magnetic resonance spectra of cell wall mannans and galactomannans of selected yeasts with their chemical structures. Can. J. Chem., 47:3569-3576 (1969).
40. GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Assignment of carbon-13 signals in nuclear magnetic resonance spectra of D-galactopyrano- $\alpha$ -D-mannopyranans from yeasts. Carbohydr. Res., 105:283-287 (1982).
41. 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.
42. GRANATH, K.A. Gel filtration. Methods Carbohydr. Chem., 5: 20-34, 1965.
43. HASKINS, W.T.; HANN, R.M.; HUDSON, C.S. Epi-lactose, synthesis of epi-lactose and lactose. J. Amer. Chem. Soc., 64:1852-1856 (1942).
44. 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: 2622-2628, 1971.
45. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J. Chem. Soc., 107:8-16, 1915.
46. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. Methods Carbohydr. Chem. 5: 357-360, 1965.

47. HIRST, E.L. & PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. Methods Carbohydr. Chem., 5: 287-296, 1965.
48. HOUGH, L. & JONES, J.K.N. Chromatography on paper. Methods Carbohydr. Chem., 2: 21-30, 1962.
49. 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):1373-1380, 1981.
50. IACOMINI, M.; SCHNEIDER, C.L.; GORIN, P.A.J. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer Moss), *Cladonia confusa* and *Cladonia amaurocraea*. Carbohydr. Res., 142:237-251, 1985.
51. IACOMINI, M.; ZANIN, S.M.W.; FONTANA, J.D.; HOGGE, L.; GORIN, P.A.J. Isolation and characterization of  $\beta$ -D-Glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. Carbohydr. Res., 168: 55-65, 1987.
52. JANSSON, P.E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. Chem. Commun. Univ. Stockholms. 8: 1-70, 1976.
53. JONES, J.K.N. & STOODLEY, R.J. Fractionation using copper complexes. Methods Carbohydr. Chem., 5:36-38, 1965.
54. KARRER, P. & JOSS, B. Polysaccharide. XXX. Zur Kenntnis des Isolichenins. Z. Physiol. Chim., 141:311-315, 1924.
55. KOMIYA, T. & SHIBATA, S. Polyols Produced by the cultured phyco and mycobionts of some *Ramalina species*. Phytochemistry, 10:695-699, 1971.
56. KUHN, R.; TRISCHMANN, M.; LÖW, I. Zur Permethylierung von Zuckern und Glikosiden. Angew. Chem., 67(1):32, 1955.
57. LEE, Y-C. & BALLOU, C.E. Preparation of mannobiose, mannotriose, and a new mannotetraose from *Saccharomyces cerevisiae* Mannan. Biochemistry, 4: 257-264, 1965.
58. LEONTEIN, K.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols. Carbohydr. Res., 62: 359-362, 1978.

59. LEWIS, D.H. & SMITH, D.C. Sugar alcohols in fungi and green plants. New Phytol., 66: 143-184, 1967.
60. LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. Methods Enzymol., 28: 178-195, 1972.
61. LINDBERG, B. & McPHERSON, J. Studies on the Chemistry of lichens. VI. The structure of pustulan. Acta Chem. Scand., 8: 985-988, 1954.
62. LINDBERG, B.; MISIORNY, A.; WACHTMEISTER, C.A. Studies on the chemistry of lichens. IV. Investigation of the low-molecular carbohydrate constituents of different lichens. Acta Chem. Scand., 7(4): 591-595, 1953.
63. 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: 1052-1055, 1952.
64. LINDBERG, B. & WICKBERG, B. The structure of umbilicin. Acta Chem. Scand., 16: 2240-2244, 1962.
65. LOWRY, O.L.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
66. MEYER, K.H. & GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXI. La constitution de la lichénine. Helv. Chim. Acta., 30: 751-761, 1947.
67. MEYER, K.H. & GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXII. L'isolichénine. Helv. Chim. Acta, 30: 761-765, 1947.
68. MIĆOVIĆ, V.M.; HRANISAVLJEVIĆ-JAKOVLJEVIĆ, M.; MILJKOVIĆ-STOJANOVIĆ, J. Structural study of polysaccharides from the oak lichen *Evernia prunastri* (L.). Ach. Carbohydr. Res., 10: 525-533, 1969.
69. NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. IV. Antitumour active O-acetylated pustulan - type glucans from the lichens of *Umbilicaria Species*. Chem. Pharm. Bull. 18 (7): 1431-1434, 1970:
70. 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): 1014-1019, 1973.

71. NISHIKAWA, Y.; OHKI, K.; TAKAHASHI, K.; KURONO, G.; FUKUOKA, F.; EMORI, M. Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Anti-tumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea* and *Cladonia* species. Chem. Pharm. Bull. 22(11):2692-2702, 1974.
72. PAROLIS, H. & MCGARVIE, D. G.l.c. of partially methylated alditol acetates. Carbohydr. Res., 62:363-367, 1978.
73. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; ROBERTS, J.G. The structure of lichenin. J. Chem. Soc., 3916-3924, 1957.
74. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; TURVEY, J.R.; MORGAN, K. The structure of isolichenin. J. Chem. Soc., 623-629, 1961.
75. PERLIN, A.S. & SUZUKI, S. The structure of lichenin:selective enzymolysis studies. Can. J. Chem., 40:50-56, 1962.
76. RICHARDSON, D.H.S.; SMITH, D.C.; LEWIS, D.H. Carbohydrate movement between the symbionts of lichens. Nature, 214:879-887, 1967.
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. SAITÔ, H.; OHKI, T.; SASAKI, T. A  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance study of gel-forming (1 + 3)- $\beta$ -D-glucans. Evidence of the presence of single-helical conformation in a resilient gel of a curdlan-type polysaccharide 13140 from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* IFO 13140. Biochemistry, 16(5):908-913, 1977.
79. SAWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal. Chem., 37: 1602-1604, 1965.
80. SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. Methods Carbohydr. Chem., 5:38-44, 1965.
81. SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING, S.G. Determination of aldoses and uronic content of vegetable fiber. Anal. Biochem., 96:282-292, 1979.
82. SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M. Studies on the chemical structures of the new glucans isolated from *Gyrophora esculenta* Miyoshi and *Lasallia papulosa* (Ach.) Llano and their inhibiting effect on implanted sarcoma-180 in mice. Chem. Pharm. Bull. 16:1639-1641, 1968.

83. SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M. Polysaccharides in lichens and fungi I. Antitumour active polysaccharides of *Gyrophora esculenta* Miyoshi and *Lasallia papulosa* (Ach.). Llano. Chem.Pharm. Bull., 16(12):2362-2369, 1968.
84. SILVA, M.L.C.C. Estudo dos componentes carboidratados do líquen *Sticta damaecornis* (Sw.) Ach. Tese-U.F.P.R., 1986.
85. SNYDER, L.R. & KIRKLAND, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Wiley-Interscience Publication. New York, 431-445, 1974.
86. SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. J.Biol. Chem., 195: 19-23, 1952.
87. TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S.; INOMATA, M.; FUKUOKA, F. Polysaccharides in lichens and fungi. VI. Antitumour active polysaccharides of lichens of stictaceae. Chem.Pharm.Bull., 22(2):404-408, 1974.
88. TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S. Polysaccharides of lichen symbionts. Chem. Pharm. Bull., 27(1):238-241, 1979.
89. TAKAHASHI, K.; KON, T.; YOKOTA, I.; SHIBATA, S. Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of stereocaulaceous lichens. Carbohydr. Res., 89:166-173, 1981.
90. TAKEDA, T.; NISHIKAWA, Y.; SHIBATA, S. A New  $\alpha$ -glucan from the lichen *Parmelia caperata* (L.) Ach. Chem. Pharm. Bull., 18(5): 1074-1075, 1970.
91. TAKEDA, T.; FUNATSU, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. V. Antitumour active polysaccharides of lichens of *Evernia*, *Acroscyphus* and *Alectoria* spp. Chem. Pharm. Bull. 20: 2445-2449, 1972.
92. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444, 1950.
93. UKAI, S.; YOKOYAMA, S.; HARA, C.; KHIO, T. Structure on and alkali-soluble polysaccharide from the fruit body of *Gnoderma japonicum*. Lloyd. Carbohydr. Res., 105:237-245, 1982.
94. ULANDER, A. & TOLLENS, B. Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten. Chem. Ber., 39:401-409, 1906.
95. XAVIER-FILHO, L. & RIZZINI, C.T. Manual de Liquenologia Brasileira, 1ª ed. Pernambuco. U.F. Pernambuco, 1976, p.1-205.

96. WHISTLER, R.L. & DURSO, D.F. Chromatographic separation of sugars on charcoal. J. Amer. Chem. Soc., 72:677-679, 1950.
97. WHISTLER, R.L. & BeMILLER, J.N. Cellulose column chromatography. Methods Carbohydr. Chem., 1:47-50, 1962.
98. WHISTLER, R.L. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32:235-275, 1976.
99. WHISTLER, R.L.; DURSO, D.F. The isolation and characterization of two crystalline derivatives partial acid hydrolysis of guaran. J. Amer. Chem. Soc., 73:4189-4190 (1951).
100. WHITAKER, J.R. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. Anal. Chem., 35:1950-1953, 1963.
101. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. Methods Carbohydr. Chem., 2:65-67, 1963.
102. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. Methods Carbohydr. Chem., 2: 211-215, 1963.
103. YOKOTA, I. & SHIBATA, S. A polysaccharide of the lichen. *Stereocaulon japonicum*. Chem. Pharm. Bull., 26:2668-2670, 1978.
104. YOKOTA, I.; SHIBATA, S.; SAITÔ, H. A  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. Carbohydr. Res., 69: 252-258 , 1979.