

MADALENA BARON

Estudo Comparativo entre Carboidratos Isolados  
dos Liquens *Stereocaulon ramulosum* (SW.)  
Räusch, *Newropogon aurantiaco-ater* E  
*Actinogyra muehlenbergii*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

CURITIBA  
1989

## ERRATA

### Página

- x - Na 12ª linha, onde se lê "A.", leia-se "N."
- xxi - Na 1ª linha, onde se lê "mote", leia-se "more"; na 6ª linha, onde se lê "dymethyl sul", leia-se "dimethylsul".
- 74 - Na 9ª linha, onde se lê "alditóis", leia-se "polióis".
- 122 - Na 7ª linha, onde se lê "87,3", leia-se "78,3"; na 15ª linha, onde se lê "5,10", leia-se "4,36"; na 17ª linha, onde se lê "4,36", leia-se "5,10"; e na 18ª linha, onde se lê "5,10", leia-se "4,36".
- 123 - Na 1ª linha, onde se lê "r.m.n.-<sup>13</sup>C", leia-se "r.m.n.-<sup>1</sup>H".
- 124 - Na 3ª linha, onde se lê "com", leia-se "con".
- 135 - Na 29ª linha, onde se lê "qua", leia-se "que".

No texto, onde se lê "líquem", leia-se "líquen"; onde se lê "líquens", leia-se "líquens"; onde se lê "simbionte algal", leia-se "simbionte algico"; e onde se lê "simbionte fungal", leia-se "simbionte fúngico".

ORIENTADORES: Prof. Dr. Marcello Iacomini  
Prof. Dr. Philip A.J. Gorin

Para meu irmão  
Paulo Roberto Geyer,  
com gratidão.

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

Aos prof.<sup>s</sup> Dr. Marcello Iacomini e Dr. Philip Albert James Gorin pela orientação e assistência construtivas, tornando possível a realização desta tese.

Ao prof. Dr. José Domingos Fontana pelo cordial apoio oferecido como chefe do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Aos prof.<sup>s</sup> Dr. José Hazencleve Duarte, Gissélia Rabello Duarte, Maria Eugênia Rabello Duarte e Dr. Marco Aurélio Lacombe Feijó pelas sugestões oferecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos prof.<sup>s</sup> Dr. João Batista Chaves Corrêa, Dr.<sup>a</sup> Fany Reicher, Dr.<sup>a</sup> Maria Rita Sierakowski e P.<sup>e</sup> Guido Edgar Wenzel pela valiosa ajuda nas análises de c.f.g. e na determinação da distribuição de grupos O-acetílicos num dos polissacarídeos em estudo.

A Sandra Maria Warumby Zanin, Míriam Blümel Chociai, Maria de Lourdes C.C. da Silva e Mônica H. Cavichiolo Grochocki pela amizade.

Aos colegas do laboratório de M. Iacomini, Adirce Moreira Miceno, Geny Aparecida Cantos, Thereza Cristina Leal Brandão, Eliane de Oliveira, Simone Wanise Mello e Luciane Eid Massaaliki

pela colaboração e incentivo constantes na execução da parte experimental da tese.

Ao Dr. Carlos Abrão Celli, Dr. Adolfo Petikow, Cassio Marcelo Crestani, Haydê de Oliveira Noemberg, Josemar d'Almeida Gehrke e Francisca Santana de Jesus pelo agradável convívio no escritório de P. Geyer, durante a redação da presente tese.

Aos Dr. Mytosk Mazurek, Dr. Alexander P. Tulloch e Dr. Lawrence Hogge pelas análises de r.m.n. de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  e de c.f.g.-e.m. (pesquisadores de Plant Biotechnology Institute, National Research Council, Saskatchewan, Canadá).

A Doroty Kubicki pela colaboração no tratamento de heteropolissacarídeos com a enzima D-galactose oxidase.

A Thaís Liane Pie pela confecção dos desenhos apresentados nesta tese.

A prof.<sup>a</sup> Edith S.E. Fanta pela coleta do líquem antártico, Newropogon aurantiaco-ater (professora do Departamento de Biologia Celular da UFPR).

Aos prof.<sup>s</sup> Hector S. Osorio (professor do Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguai) e Dr. Mason E. Hale (professor do National Museum of Natural History, Washington, USA) pela identificação botânica dos líquens estudados.

A todos professores, funcionários e colegas de pós-graduação do Departamento de Bioquímica da UFPR pela contribuição na realização deste trabalho.

A equipe da biblioteca do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pela assistência.

# SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas .....	xi
Lista de figuras .....	xv
Lista de abreviaturas .....	xvii
Resumo .....	xix
Abstract .....	xxi
Introdução .....	1
1. Apresentação dos líquens .....	1
2. Principais componentes químicos em líquens ....	4
2.1. Ácidos liquênicos e carotenóides .....	4
2.2. Carboidratos .....	8
2.2.1. Carboidratos de baixo peso molecular .....	9
2.2.2. Polissacarídeos .....	12
3. Líquens <u>Stereocaulon ramulosum</u> (Sw.) Räsusch, <u>Newropogon aurantiaco-ater</u> e <u>Actinogyra muehlenbergii</u>	26
Objetivos .....	29
Materiais e métodos .....	31
1. Métodos analíticos gerais .....	31
1.1. Métodos cromatográficos .....	31
1.2. Métodos espectroscópicos .....	35
1.3. Métodos espectrofotométricos .....	36

1.4. Polarimetria	.....	37
1.5. Titulometria	.....	37
1.6. Métodos complementares	.....	37
2. Líquens em estudo e seus carboidratos	.....	38
2.1. Locais de coleta e características gerais dos líquens em estudo	.....	39
2.2. Isolamento de carboidratos dos líquens em estudo		40
2.2.1. Isolamento de polissacarídeos do líquem <u>St. ramulosum</u>	.....	40
2.2.1.1. Primeira série de etapas de extração	...	41
2.2.1.1.1. Extração benzeno-etanol	.....	41
2.2.1.1.2. Extração metanol-água	.....	41
2.2.1.1.3. Extração aquosa	.....	41
2.2.1.1.4. Extração alcalina	.....	44
2.2.1.2. Segunda série de etapas de extração	....	46
2.2.1.2.1. Extração benzeno-etanol	.....	46
2.2.1.2.2. Extração com dimetil-sulfóxido	.....	46
2.2.2. Isolamento de carboidratos de baixo peso molecular e de polissacarídeos do líquem <u>N. aurantiacater</u>	.....	46
2.2.2.1. Primeira série de etapas de extração	...	47
2.2.2.1.1. Extração benzeno-etanol	.....	47
2.2.2.1.2. Extração metanol-água	.....	47
2.2.2.1.3. Extração aquosa	.....	49
2.2.2.1.4. Extração alcalina	.....	50
2.2.2.2. Segunda série de etapas de extração	....	50
2.2.2.2.1. Extração benzeno-etanol	.....	50
2.2.2.2.2. Extração com dimetil-sulfóxido	.....	51
2.2.3. Isolamento de polissacarídeo do líquem <u>A. mueh</u>	-	



<u>lenbergii</u> .....	51
2.2.3.1. Extração com benzeno-etanol seguida por ex - tração com dimetil-sulfóxido .....	51
3. Análise estrutural dos carboidratos de baixo peso molecular e dos polissacarídeos isolados dos lí - quens em estudo .....	52
3.1. Composição em monossacarídeos dos carboidratos de baixo peso molecular e dos polissacarídeos	52
3.1.1. Hidrólise ácida total .....	52
3.1.2. Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida total .....	52
3.2. Testes de homogeneidade aplicados aos polissaca - rídeos .....	53
3.2.1. Eletroforese em acetato de celulose ....	53
3.2.2. Filtração em géis de Sepharose 4B-200 e de Se - pharose 6B .....	54
3.3. Metilação de polissacarídeos e de carboidratos de baixo peso molecular .....	54
3.4. Consumo de periodato de sódio e produção de áci - do fôrmico pelo heteropolissacarídeo (galactoma - nana) isolado por extração alcalina de <u>St. ramu -</u> <u>losum</u> .....	58
3.5. Degradação tipo Smith de polissacarídeos	59
3.6. Degradação de Smith branda de polissacarídeos	61
3.7. Pesquisa de amido (amilose) em homopolissacarí - deos ( $\alpha$ - <u>D</u> -glucanas) .....	63
3.8. Tratamento de heteropolissacarídeos (galactomana - nas) com enzima galactose oxidase .....	64
3.9. Pesquisa de açúcares aminados em heteropolissaca	

rīdeos (galactomananas) .....	64
3.10. Hidrōlise ācida parcial de heteropolissacarīdeos (galactomananas) .....	65
3.11. Acetōlise parcial do heteropolissacarīdeo (galac- tomanana) isolado por extração alcalina de <u>St. ra-</u> <u>mulosum</u> .....	66
3.12. Hidrōlise ācida, com liberaçāo de ācido acētico do homopolissacarīdeo ( $\beta$ - <u>D</u> -glucana) de <u>A. muelhen-</u> <u>bergii</u> .....	68
3.13. Localizaçāo de grupos <u>O</u> -acetīlicos no homopolissaca- rīdeo ( $\beta$ - <u>D</u> -glucana) de <u>A. muelhenbergii</u> ....	68
Resultados e discussāo .....	71
1. Carboidratos de baixo peso molecular .....	73
1.1. Isolamento e determinaçāo estrutural de carboidra- tos de baixo peso molecular .....	73
1.1.1. Līquem <u>St. ramulosum</u> .....	73
1.1.2. Līquem <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	74
1.1.3. Līquem <u>A. muelhenbergii</u> .....	76
1.1.4. Estudo comparativo entre carboidratos de baixo peso molecular isolados de līquens .....	77
1.2. Produçāo e funçāo de carboidratos de baixo peso <u>mo</u> lecular de līquens .....	81
2. Polissacarīdeos .....	84
2.1. Isolamento e determinaçāo estrutural de polissaca- rīdeos liquēnicos .....	84
2.1.1. $\alpha$ - <u>D</u> -Glucanas .....	85
2.1.1.1. Līquem <u>St. ramulosum</u> .....	85
2.1.1.2. Līquem <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	91
2.1.1.3. Līquem <u>A. muelhenbergii</u> .....	95

2.1.1.4. Estudo comparativo entre $\alpha$ - <u>D</u> -glucanas isoladas de líquens .....	96
2.1.2. Galactomananas .....	99
2.1.2.1. Líquem <u>St. ramulosum</u> .....	99
2.1.2.2. Líquem <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	128
2.1.2.3. Líquem <u>A. muehlenbergii</u> .....	136
2.1.2.4. Estudo comparativo entre galactomananas isoladas de líquens .....	138
2.1.3. $\beta$ - <u>D</u> -Glucanas .....	140
2.1.3.1. $\beta$ - <u>D</u> -Glucanas sem grupos <u>O</u> -acetil .....	141
2.1.3.1.1. Líquem <u>St. ramulosum</u> .....	141
2.1.3.1.2. Líquem <u>A. aurantiaco-ater</u> .....	142
2.1.3.1.3. Líquem <u>A. muehlenbergii</u> .....	149
2.1.3.1.4. Estudo comparativo entre $\beta$ - <u>D</u> -glucanas sem grupos <u>O</u> -acetil isoladas de líquens ..	149
2.1.3.2. $\beta$ - <u>D</u> -Glucanas com grupos <u>O</u> -acetil .....	151
2.1.3.2.1. Líquem <u>St. ramulosum</u> .....	151
2.1.3.2.2. Líquem <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	153
2.1.3.2.3. Líquem <u>A. muehlenbergii</u> .....	154
2.1.3.2.4. Estudo comparativo entre $\beta$ - <u>D</u> -glucanas com grupos <u>O</u> -acetil isoladas de líquens ..	167
2.2. Produção e função de polissacarídeos líquênicos	169
Conclusões .....	175
Referências bibliográficas .....	179
Publicações .....	198

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

TABELA		Página
I	Principais ácidos liquênicos isolados de líquens	6
II	Distribuição de carotenóides em alguns líquens do Brasil .....	7
III	Carboidratos de baixo peso molecular isolados de líquens .....	11
IV	$\alpha$ -D-Glucanas com ligações (1 → 3) e (1 → 4) isoladas de líquens .....	16
V	$\beta$ -D-Glucanas com ligações (1 → 3) e (1 → 4) isoladas de líquens .....	17
VI	$\beta$ -D-Glucanas com apenas ligações (1 → 6), preferencialmente <u>O</u> -acetiladas, isoladas de líquens	18
VII	Galactomananas com cadeias principais de $\alpha$ -D-manopiranas (1 → 6) isoladas de líquens ....	21
I'	Análise por c.f.g. dos acetatos de alditóis obtidos a partir do extrato metanol-aquoso de <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	75
II'	Composições em carboidratos de baixo peso molecular dos líquens <u>St. ramulosum</u> , <u>N. aurantiaco-ater</u> e <u>A. muehlenbergii</u> .....	78
III'	Movimento de carboidratos da alga (fotobionte) para o fungo (micobionte) em algumas espécies de	

	líquens .....	83
IV'	Propriedades das $\alpha$ -D-glucanas isoladas de líquens e estudadas estruturalmente no presente trabalho .....	88
V'	Propriedades gerais das galactomananas isoladas de líquens e estudadas estruturalmente no presente trabalho .....	101
VI'	Análise por c.f.g.-e.m. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da metilação da galactomanana obtida por extração aquosa de <u>St. ramulosum</u> .....	105
VII'	Sinais e suas atribuições observados nos espectros de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ de polissacarídeo residual resultante da hidrólise ácida parcial da galactomanana obtida por extração aquosa de <u>St. ramulosum</u> e de uma $\alpha$ -D-manopirranana (1 $\rightarrow$ 6) .....	109
VIII'	Análise por c.f.g.-e.m. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da metilação da galactomanana obtida por extração alcalina de <u>St. ramulosum</u> .....	114
IX'	Análise por c.f.g. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da metilação do polissacarídeo residual proveniente da hidrólise ácida parcial da galactomanana obtida por extração alcalina de <u>St. ramulosum</u> .....	116
X'	Análise por c.f.g. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da metilação dos oligossacarídeos provenientes da acetólise parcial da galactomanana obtida por extra	

	ção alcalina de <u>St. ramulosum</u> .....	121
XI'	Análise por c.f.g.-e.m. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da metilação da galactomanana obtida por extração aquosa de <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	132
XII'	Análise por c.f.g. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da metilação do polissacarídeo residual proveniente de hidrólise ácida parcial da galactomanana obtida por extração aquosa de <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	134
XIII'	Propriedades gerais da $\beta$ - <u>D</u> -glucana sem grupos <u>O</u> -acetil isolada de líqüem e estudada estruturalmente no presente trabalho .....	143
XIV'	Sinais e suas atribuições observados nos espectros de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ das $\beta$ - <u>D</u> -glucanas dos líqüens <u>N. aurantiaco-ater</u> e <u>C. islandica</u> .....	146
XV'	Propriedades gerais da $\beta$ - <u>D</u> -glucana com grupos <u>O</u> -acetil isolada de líqüem e estudada estruturalmente no presente trabalho .....	156
XVI'	Sinais e suas atribuições observados nos espectros de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ da $\beta$ - <u>D</u> -glucana parcialmente <u>O</u> -acetilada de <u>A. muehlenbergii</u> e de uma $\beta$ - <u>D</u> -glucopiranana (1 $\rightarrow$ 6) ou pustulana .....	158
XVII'	Sinais e suas atribuições observados nos espectros de r.m.n. de $^{13}\text{C}$ e de $^1\text{H}$ do ácido acético liberado por hidrólise ácida da $\beta$ - <u>D</u> -glucana parcialmente <u>O</u> -acetilada de <u>A. muehlenbergii</u> e do ácido acético autêntico .....	160
XVIII'	Análise por c.f.g.-e.m. dos acetatos de aldi -	

	tõis parcialmente metilados resultantes das metodologias de BOUVENG e de CORRÊA <u>et al.</u> para a localizaçãõ de grupos <u>O</u> -acetil na $\beta$ - <u>D</u> -glucana parcialmente <u>O</u> -acetilada obtida por extraçãõ com dimetil-sulfõxido de <u>A. muehlenbergii</u> .....	162
XIX'	Deslocamentos da ressonãncias de $^{13}\text{C}$ obser_vados pela mono- <u>O</u> -acetilaçãõ do metil $\beta$ - <u>D</u> -glucopiranosídeo .....	165
XX'	Propriedades quĩmicas e fĩsico - quĩmicas de polissacarĩdeos do lĩquem <u>Ramalina crassa</u> intacto e de seus simbiontes .....	170
XXI'	Carboidratos isolados dos lĩquens <u>St. ramulosum</u> , <u>N. aurantiaco-ater</u> e <u>A. muehlenbergii</u> .....	176

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

Figura		Página
1	Espectros de r.m.n.- <sup>13</sup> C das $\alpha$ -D-glucanas obtidas de <u>St. ramulosum</u> e de <u>C. islandica</u> .....	89
2	Cromatogramas da $\alpha$ -D-glucana de <u>N. aurantiaco-ater</u> em colunas de géis de Sepharose 6B e de Sepharose 4B-200 .....	93
3	Espectro de r.m.n.- <sup>13</sup> C da $\alpha$ -D-glucana de <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	92
4	Cromatogramas da galactomanana obtida por extração aquosa de <u>St. ramulosum</u> em colunas de géis de Sepharose 6B e de Sepharose 4B-200 .....	103
5	Espectro de r.m.n.- <sup>13</sup> C da galactomanana obtida por extração aquosa de <u>St. ramulosum</u> .....	106
6	Espectros de r.m.n.- <sup>13</sup> C dos polissacarídeos residuais resultantes da hidrólise ácida parcial das galactomananas de <u>St. ramulosum</u> (extração aquosa) e de <u>Peltigera aphthosa</u> .....	108
7	Cromatogramas da galactomanana obtida por extração alcalina de <u>St. ramulosum</u> em colunas de géis de Sepharose 6B e de Sepharose 4B-200 .....	112
8	Espectro de r.m.n.- <sup>13</sup> C da galactomanana obtida por extração alcalina de <u>St. ramulosum</u> .....	118



9	Espectro de r.m.n.- <sup>13</sup> C de oligossacarídeos presentes na Fração com $R_{\text{Man}}^3$ 0,44 - F <sub>3</sub> , provenientes de acetólise parcial da galactomanana obtida por extração alcalina de <u>St. ramulosum</u> .....	120
10	Espectros de r.m.n.- <sup>1</sup> H de oligossacarídeos provenientes de acetólise parcial da galactomanana obtida por extração alcalina de <u>St. ramulosum</u> .....	123
11	Cromatogramas da galactomanana de <u>N. aurantiaco-ater</u> em colunas de géis de Sepharose 6B e de Sepharose 4B-200 .....	130
12	Espectro de r.m.n.- <sup>13</sup> C da galactomanana de <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	133
13	Cromatogramas da β-D-glucana de <u>N. aurantiaco-ater</u> em colunas de géis de Sepharose 6B e de Sepharose 4B-200 .....	144
14	Espectro de r.m.n.- <sup>13</sup> C da β-D-glucana de <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	145
15	Espectro de r.m.n.- <sup>13</sup> C da mistura de polissacarídeos obtida por extração com dimetil-sulfóxido do líquidum <u>St. ramulosum</u> .....	152
16	Espectro de r.m.n.- <sup>13</sup> C da mistura de polissacarídeos obtida por extração com dimetil-sulfóxido do líquidum <u>N. aurantiaco-ater</u> .....	154
17	Espectro de r.m.n.- <sup>13</sup> C da β-D-glucana parcialmente O-acetilada de <u>A. muehlenbergii</u> .....	157
18	Sequência de reações utilizadas para determinar a distribuição dos grupos O-acetil na β-D-glucana O-acetilada de <u>A. muehlenbergii</u> , de acordo com as metodologias de BOUVENG e de CORREA <u>et al.</u> ....	163

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AcOH - Ácido acético.
- C' - Carbono com grupo O-acetil.
- c.c.d. - Cromatografia em camada delgada.
- Cetavlon - Brometo de hexadeciltrimetilamônio.
- c.f.g. - Cromatografia em fase gasosa.
- c.f.g.-e.m. - Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa.
- $\bar{C}H_2SOCH_3$  - Ion metil sulfinil carbânion.
- c.p. - Cromatografia em papel.
- d.i. - Diâmetro interno.
- DMS - Sulfato de dimetila.
- DMSO - Dimetil-sulfóxido.
- D<sub>2</sub>O - Óxido de deutério.
- F<sub>3</sub> - Fração com  $R_{Man}^3$  0,44 proveniente de acetólise parcial da galactomanana obtida por extração alcalina de St. ramulosum.
- F<sub>4</sub> - Fração com  $R_{Man}^4$  0,43 proveniente de acetólise parcial da galactomanana obtida por extração alcalina de St. ramulosum.
- FIS - Fenilisocianato.
- Fração de pH 8,5-H<sub>2</sub>O - Fração de pH 8,5 que apresenta galactomanana obtida por extração aquosa de St. ramulosum.
- Fração de pH 8,5-KOH - Fração de pH 85, que apresenta galactoma-

nana obtida por extração alcalina de St. ramulosum.

J - Constante de acoplamento.

KOD - Hidróxido de potássio deuterado.

$m/z$  - Relação massa/carga.

$\text{NaBH}_4$  - Boroidreto de sódio.

$\text{NaIO}_4$  - meta-Periodato de sódio.

NaOD - Hidróxido de sódio deuterado.

PhNCO - Fenilisocianato.

r.m.n. - Ressonância magnética nuclear.

T - Tempo de retenção.

TFA - Ácido trifluoracético.

THF - Tetraidrofurano.

TMS - Tetrametilsilano.

$\delta$  (p.p.m.) - Delta (parte por milhão).

## RESUMO

Três espécies de líquens com micobiontes ascomicetos, Stereocaulon ramulosum (Sw.) Räsusch, Newropogon aurantiaco-ater e Actinogyra muehlenbergii, coletados de locais com características geográficas e climáticas distintas, a saber, Brasil, Antártida e Canadá, foram submetidas à investigações químicas para elucidação das estruturas de seus carboidratos, principalmente as dos polissacarídeos encontrados em maiores concentrações nos referidos líquens.

A partir do líquem St. ramulosum foram isoladas por extração alcalina quente (100°C), uma  $\alpha$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{25} + 151^\circ$ ; 3,06 g%) do tipo isoliquenana, estruturalmente semelhante à previamente obtida por extração aquosa quente do mesmo líquem, que mostrou ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação molar de 1,6:1, e também uma galactomanana ( $[\alpha]_D^{25} + 49^\circ$ ; 3,48 g%), relacionada à obtida por extração aquosa quente do líquem acima, com cadeia principal constituída por unidades de  $\alpha$ -D-manopiranoose unidas por ligações (1 → 6) e com cadeias laterais de  $\alpha$ -D-manopiranoose ligada (1 → 2) e de  $\beta$ -D-galactopiranoose ligada (1 → 4) à  $\alpha$ -D-manopiranoana (1 → 6).

Do estudo pioneiro com o líquem N. aurantiaco-ater foram obtidos por extração aquosa quente (100°C), três polissacarídeos correspondentes a uma  $\alpha$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{25} + 174^\circ$ ; 3,73 g%) do ti

po isoliquenana, mostrando ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação de 1,5:1, a uma β-D-glucana ( $[\alpha]_D^{25} + 14^0$ ; 27,02 g%) do tipo liquenana, apresentando ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação aproximada de 1:2, e a uma galactomanana ( $[\alpha]_D^{25} + 76^0$ ; 1,20 g%) com cadeia principal de α-D-manopirana (1 → 6) parcialmente substituída nas posições 2 ou 4 por cadeias laterais, com mais de uma unidade, constituídas predominantemente por unidades terminais não redutoras de α-D-galactopirano. No supracitado líquem foram também encontrados os polióis arabinitol (2,66 g%), manitol (0,15 g%) e inositol (0,06 g%) e possivelmente o glicosídeo de polioli umbilicina (0,06 g%).

E, do líquem A. muehlenbergii foi isolada por extração com dimetil-sulfóxido, a frio (~ 20°C), uma β-D-glucana ( $[\alpha]_D^{25} - 42^0$ ; 38,00 g%) do tipo pustulana, com apenas ligações (1 → 6) entre as unidades de glucose e contendo grupos O-acetil (~ 3%) como monossubstituintes nas posições 0-2, 0-3 e 0-4, sendo a última posição ocupada em menor quantidade.

## A B S T R A C T

Three species of lichens with ascomycetous mycobionts, St. ramulosum (Brasil), N. aurantiaco-ater (Antártida) and A. muelenbergii (Canadá), were analyzed chemically in order to elucidate the structures of their carbohydrate components, namely polysaccharides and alditols encountered in large quantities.

From St. ramulosum, were isolated by hot aqueous alkaline extraction, an isolichenan-type  $\alpha$ -D-glucan ( $[\alpha]_D^{25} + 151^\circ$ ; 3.06 g%) structurally related to that previously obtained by hot aqueous extraction from the same lichen, and containing (1  $\rightarrow$  3)- and (1  $\rightarrow$  4)-linkages in a 1.6:1 ratio, and a galactomannan ( $[\alpha]_D^{25} + 49^\circ$ ; 3.48 g%) related to that obtained by hot aqueous extraction. It has a main chain with (1  $\rightarrow$  6)-linked  $\alpha$ -D-mannopyranosyl residues and side chains of  $\alpha$ -D-Manp linked (1  $\rightarrow$  2) and  $\beta$ -D-Galp linked (1  $\rightarrow$  4) to the main chain.

In the first study on an Antarctic lichen, N. aurantiaco-ater, hot aqueous extraction gave rise to three polysaccharides corresponding to an isolichenan-type  $\alpha$ -D-glucan ( $[\alpha]_D^{25} + 174^\circ$ ; 3.73 g%) with (1  $\rightarrow$  3)- and (1  $\rightarrow$  4)-linkages in a 1.5:1 ratio and a lichenan-type  $\beta$ -D-glucan ( $[\alpha]_D^{25} + 14^\circ$ ; 27.02 g%) with (1  $\rightarrow$  3)- and (1  $\rightarrow$  4)-linkages in a ~ 1:2 ratio. A galactomannan was also obtained ( $[\alpha]_D^{25} + 76^\circ$ ; 1.20 g%) having a main chain of (1  $\rightarrow$  6)-linked  $\alpha$ -D-mannopyranosyl units frequently unsubstituted and

substituted at 0-2 or 0-4 by side chains containing more than one unit and predominantly with nonreducing  $\alpha$ -D-Galp end-groups. Also, the lichen contained the low molecular weight carbohydrates arabinitol (2.66 g%), mannitol (0.15 g%), inositol (0.06 g%), and probably umbilicin (0.06 g%).

From A. muehlenbergii, was isolated by cold dimethyl sulfoxide extraction, a pustulan-type  $\beta$ -D-glucan ( $[\alpha]_D^{25} - 42^\circ$ ; 38.00 g%) with (1  $\rightarrow$  6)-linkages between glucose units and containing 0-acetyl groups exclusively as monosubstituents at 0-2, 0-3 and with a smaller proportion at 0-4.

# I N T R O D U Ç Ã O

## 1. APRESENTAÇÃO DOS LÍQUENS<sup>34,53,110</sup>

Um líquem consiste de uma alga (fotobionte<sup>42</sup>) e de um fungo (micobionte), vivendo em associação simbiótica complexa. O fotobionte é geralmente uma alga verde (ficobionte) do gênero Trebouxia ou uma alga azul-esverdeada (cianobionte) principalmente dos gêneros Nostoc ou Scytonema, enquanto que o micobionte é normalmente uma espécie de ascomiceto ou menos comumente uma espécie de basidiomiceto ou de deuteromiceto. Dependendo da espécie de fungo, os líquens são divididos em ascolíquens, basidiolíquens e deuterolíquens, e segundo a classificação geral de vegetais, os líquens são classificados como criptógamos, uma classe de vegetais inferiores que inclui também algas, fungos e musgos.

O fungo normalmente envolve o simbiote algal da associação e como resultado do crescimento de ambos, há formação de um talo (arbustivo, foliáceo, crustáceo ou gelatinoso) de forma e de estrutura interna constantes e definidas, que permitem o reconhecimento de gêneros e de espécies de líquens. Na maioria dos casos, cada líquem apresenta uma espécie de fungo interagindo com uma espécie de alga, embora, em alguns líquens, um segundo fotobionte pode estar presente em pequenas excres -



cências superficiais denominadas de cefalódios. Esta interação específica entre a alga e o fungo sugere que a alga, sendo fotossintetizante e fixadora de nitrogênio, fornece compostos orgânicos ao fungo e este, por sua vez, abastece a alga com água e com sais minerais, oferecendo também proteção contra a desidratação e as intensidades luminosas excessivas.

Os líquens vivem em quase todos os tipos de ambientes, inclusive naqueles onde quaisquer outros vegetais não se desenvolvem, uma vez que podem ser encontrados em cascas de árvores, em solos e mesmo em regiões extremamente frias, tais como, a tundra ártica e os "fellfields" antárticos.<sup>131</sup> Além disso, aos líquens é atribuída uma considerável importância ecológica como pioneiros da colonização de ambientes rochosos, já que o crescimento de um líquem sobre uma rocha é acompanhado pela de composição da porção rochosa imediatamente subjacente, e quando os líquens morrem, os seus restos juntamente com as partículas de rocha, formam o solo em que outros vegetais poderão crescer.

Uma característica sumamente importante dos líquens diz respeito a sua perenidade, que é consequência da extrema lentidão no crescimento dos talos liquênicos e da extraordinária resistência deles às condições ambientais. Embora os líquens sejam muito sensíveis a poluentes atmosféricos, particularmente dióxido de enxofre que ocasiona danos na clorofila, os mesmos são excepcionalmente resistentes às variações de temperatura, em estado de desidratação. Por exemplo, o resfriamento a  $-70^{\circ}\text{C}$  não enfraquece as atividades subsequentes do micobionte ou do fotobionte nos líquens, já que os mesmos recuperam rapidamente, em seu estado de reidratação, a capacidade total de respirar,

de fotossintetizar e de fixar nitrogênio.<sup>59</sup> E, até mesmo os líquens de regiões temperadas apresentam um alto grau de resistência ao frio, de modo que esta característica poderia ser considerada inerente da associação líquênica. Por outro lado, os líquens são também resistentes ao calor, suportando temperaturas de até 70°C, sendo tal propriedade facilmente observada na natureza, quando por exemplo os mesmos são encontrados sobre rochas, cuja temperatura em suas superfícies expostas ao sol pode exceder a 50°C.

### APLICAÇÕES DOS LÍQUENS

Apesar dos líquens apresentarem pouco valor econômico direto, em épocas passadas e mesmo atualmente, estas entidades simbióticas têm sido utilizadas principalmente em medicina, como medicamento para tuberculose pulmonar (líquém Lobaria pulmonaria), como expectorante (líquém Cetraria islandica), no tratamento de feridas e de doenças da pele, para o crescimento de cabelos (líquém Usnea barbata) e na cura de estomatites cremosas ou "sapinhos" (líquém Cladonia miniata var. sanguinea).<sup>118</sup> Outro emprego de considerável valor dos líquens é como alimento, tanto para seres humanos, como por exemplo os líquens comestíveis Gyrophora esculenta ("Iwatake"<sup>115</sup>) utilizado pelos japoneses e Actinogyra muehlenbergii ("Asīnīwakonak"<sup>69</sup>) utilizado pelos índios canadenses, quanto para insetos, como o líquém Cladonia symphycarpa consumido pelas traças "oribatid" dos vales alpinos suíços.<sup>109</sup> Além disso, os líquens servem igualmente como pastagens para renas e caribus nas florestas da Escandinávia e no Ca

nadã subártico, especialmente o líquem Cladonia alpestris comumente conhecido por "musgo da renas".<sup>4</sup> E ainda, os líquens podem ser usados na perfumaria, tais como, Evernia prunastri e Pseudevernia furfuracea, empregados extensivamente na manufatura de perfumes que apresentam odor característico de musgo.

## 2. PRINCIPAIS COMPONENTES QUÍMICOS EM LÍQUENS

Os componentes químicos isolados de líquens, mais intensivamente investigados até o presente estudo, foram os ácidos liquênicos, os carotenóides, bem como, os carboidratos de baixo peso molecular e os polissacarídeos. Uma descrição das estruturas químicas, de algumas propriedades físico-químicas e das aplicações destes componentes foi realizada a seguir.

### 2.1. ÁCIDOS LIQUÊNICOS E CAROTENÓIDES

Os ácidos liquênicos são compostos orgânicos largamente distribuídos em líquens e encontrados quase exclusivamente nestas entidades simbióticas, sendo produzidos pelos seus micobiontes que formam depósitos extracelulares destes ácidos sobre a superfície das hifas.<sup>110</sup> Estes ácidos são insolúveis em água e consistem de uma grande variedade de compostos alifáticos e aromáticos, mas sobretudo de ácidos fenólicos fracos, cujas estruturas químicas foram pioneiramente investigadas a partir de 1926, quando foi estudado um depsídeo, a atranorina, seguido pelos estudos de um derivado dibenzofurano, o ácido úsnico, e de uma dep

sidona, o ácido protocetrárico (Tabela I).<sup>34</sup> Tais compostos podem ser facilmente identificados por cromatografia em camada delgada, segundo método elaborado, padronizado e aperfeiçoado principalmente por Chicita F. CULBERSON,<sup>23</sup> em 1972.

Já com respeito aos carotenóides, os mesmos têm sido amplamente estudados através das investigações recentes de CZECZUGA e seus colaboradores,<sup>24,25,26,27</sup> que indicaram essencialmente a influência significativa de fatores ambientais, tais como, clima, diferentes altitudes e latitudes, sobre a ocorrência de determinados carotenóides em talos de líquens coletados de diversas partes do mundo,<sup>24,25,26</sup> inclusive do Brasil<sup>27</sup> (Tabela II).

Apesar da dificuldade em assinalar conclusivamente o papel metabólico destes componentes, parece que os ácidos liquênicos e os pigmentos carotenóides apresentam certa importância na fisiologia dos talos liquênicos, visto que estes componentes podem reduzir a quantidade de luz que atinge a alga e presumivelmente filtrar certos comprimentos de onda.<sup>110</sup> Além disso, os depósitos cristalinos de ácidos liquênicos na superfície dos micobiontes podem tornar os talos quase impermeáveis, impedindo o consumo excessivo de água e auxiliando na regulação dos níveis internos de água.

### APLICAÇÕES DOS ÁCIDOS LIQUÊNICOS

Em relação às aplicações destes componentes, particularmente as dos ácidos liquênicos, foi demonstrado que os mesmos são fundamentalmente utilizados em estudos fitoquímicos e taxo

TABELA I - PRINCIPAIS ÁCIDOS LIQUÊNICOS ISOLADOS DE LIQUENS 67

Depsídeos	Depsidonas	Derivados Dibenzofurano
<p>Ácido anziânico</p> <p>A. barbatânico</p> <p>A. barbatólico</p> <p>A. beomicêsico</p> <p>A. bonânico</p> <p>A. confluentânico</p> <p>A. criptoclorofêico</p> <p>A. difractaico</p> <p>A. diplosquistêsico</p> <p>A. divaricático</p> <p>A. esquamático</p> <p>A. evêrnico</p> <p>A. girofórico</p> <p>A. glomeriférico</p> <p>A. hiâscico</p> <p>A. hipotamnólico</p> <p>A. homoseguicâico</p> <p>A. imbricário</p> <p>A. lecanórico</p> <p>A. meroclorofêico</p> <p>A. microfilínico</p> <p>A. obtusático</p> <p>A. olivetórico</p> <p>A. perlatólico</p> <p>A. planáico</p> <p>A. ramalinólico</p> <p>A. sequicâico</p> <p>A. tamnólico</p> <p>A. umbilicário</p> <p><b>Atranorina</b></p> <p>Cloroatranorina</p> <p>(+)-Eritrina</p> <p>Esferoforina</p> <p>Peltigerina (Tenuiorina)</p> <p>Tumidulina</p>	<p>A. alectorônico</p> <p>A. α-colatólico</p> <p>A. estictânico</p> <p>A. fisodálico</p> <p>A. fisódico</p> <p>A. fumarprotocetrário</p> <p>A. graiânico</p> <p>A. hipoprotocetrário</p> <p>A. lobário</p> <p>A. 4-O-metil fisódico</p> <p>A. norestictânico</p> <p><b>A. protocetrário</b></p> <p>A. psorômico</p> <p>A. salazânico</p> <p>A. variolário</p> <p>A. virênsico</p> <p>Diploicina</p> <p>Gangaleoidina</p> <p>Norlobaridona</p> <p>Panarina</p> <p>Vicanicina</p>	<p>A. didímico</p> <p>A. esquizopêltico</p> <p>A. panário</p> <p>A. profirílico</p> <p><b>A. úsnico</b></p> <p>Estrepsilina</p>

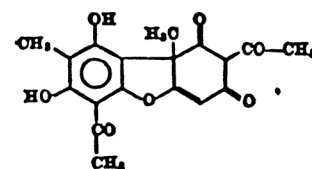
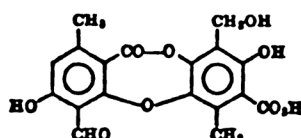
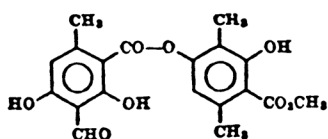
Estrutura química do  
ÁCIDO ÚSNICOEstrutura química do  
ÁCIDO PROTOCETRÁRIOEstrutura química da  
ATRANORINA

TABELA II - DISTRIBUIÇÃO DE CAROTENÓIDES EM ALGUNS LÍQUENS DO BRASIL<sup>a</sup>

Carotenóides	Líquens						
	<u>Cladonia</u> <u>miniata</u> <sup>b</sup>	<u>Cladonia</u> <u>verticillaris</u> <sup>c</sup>	<u>Parmelia</u> <u>rutidota</u> <sup>d</sup>	<u>Parmelia</u> <u>tinctorum</u> <sup>d</sup>	<u>Pseudo-</u> <u>cyphe'llaria</u> <u>aurata</u> <sup>e</sup>	<u>Pseudo-</u> <u>cyphe'llaria</u> <u>clothara</u> <sup>f</sup>	<u>Telos-</u> <u>chistes</u> <u>flavicans</u> <sup>d</sup>
β-Caroteno	-	+	+	+	-	+	+
α-Criptoxantina	-	+	-	-	-	+	+
β-Criptoxantina	-	+	+	-	+	+	+
Cantaxantina	-	+	-	-	-	-	-
Luteína	-	-	+	+	-	-	+
Epóxido de luteína	+	+	-	+	+	-	+
Zeaxantina	-	-	+	+	-	-	-
Anteraxantina	+	-	-	-	-	-	-
Astaxantina	+	-	+	+	+	-	-
Neoxantina	-	-	-	+	-	+	-
Violaxantina	-	-	-	-	-	-	+
Aurocromo	-	-	-	-	+	-	-
Auroxantina	-	-	-	-	+	+	-
Criptoflavina	-	-	-	-	+	-	-
Mutatocromo	+	-	-	+	-	-	-
Mutatoxantina	+	+	-	-	+	+	+

<sup>a</sup> Dados obtidos da referência 27.

<sup>b</sup> Da Serra da Mantiqueira.

<sup>c</sup> Do Estado do Rio de Janeiro.

<sup>d</sup> Do Estado de Pernambuco.

<sup>e</sup> Do Estado de São Paulo.

<sup>f</sup> Do Estado do Amazonas.

nômicos visando a identificação e a classificação de espécies de líquens,<sup>23,53</sup> bem como podem ser empregados em medicina.<sup>118</sup> A aplicação na área médica é devida essencialmente a atividade antimicrobiana comprovada destes componentes, como por exemplo, a do ácido úsnico<sup>123</sup> e a da atranorina,<sup>17</sup> frente a certos microorganismos representados por bactérias gram-positivas, por micobactérias e por fungos leveduriformes. Além disso, uma outra aplicação seria como agentes preservativos, uma vez que foi demonstrado que os produtos de hidrólise da atranorina e da tenuiorina, ou seja, metil e etil orselinatos, foram especialmente ativos contra a bactéria Pseudomonas aeruginosa, um microorganismo frequentemente encontrado em produtos farmacêuticos e bastante resistente a muitos agentes preservativos corriqueiramente em uso.<sup>72</sup>

## 2.2. CARBOIDRATOS<sup>42</sup>

A despeito dos inúmeros trabalhos realizados para a identificação de ácidos liquênicos e de carotenóides em líquens, não há dúvida que a pesquisa de carboidratos, especialmente a de polissacarídeos, também despertou acentuada ou talvez maior atenção por parte dos estudiosos, uma vez que o estudo pioneiro de polissacarídeos nestas entidades simbióticas remonta desde 1815, quando BERZELIUS<sup>10</sup> empregou o líquem Cetraria islandica ("Isländischen Mooses") como alvo de pesquisa.

A partir daquele ano, várias investigações foram efetuadas e continuam sendo realizadas para a caracterização estrutural de polissacarídeos, como  $\alpha$ -D-glucanas,  $\beta$ -D-glucanas

e galactomananas isoladas de líquens, bem como, de carboidratos de baixo peso molecular, principalmente polióis, dissacarídeos, açúcares livres e glicosídeos de polióis.

As características gerais destes componentes, particularmente de suas estruturas químicas, foram descritas no presente trabalho, como segue.

### 2.2.1. Carboidratos de baixo peso molecular

Relativamente poucos estudos têm sido realizados a cerca da distribuição global de carboidratos de baixo peso molecular em diferentes espécies de líquens.<sup>94</sup> A investigação mais abrangente sobre estes componentes foi efetuada somente em 1953, quando LINDBERG et al.<sup>83</sup> pesquisaram a presença dos polióis arabinitol, manitol e volemitol, dos dissacarídeos trealose e sacarose e do glicosídeo de poliol umbilicina (2-O-β-D-galactofuranosil-D-arabinitol<sup>86</sup>) em sessenta espécies de líquens, sendo cinco da ordem Pyrenocarpeae, atualmente denominada de Verrucariales, gêneros Dermatocarpon e Endocarpon, e as demais da ordem Gymnocarpeae, atualmente Lecanorales, gêneros Lobaria, Peltigera, Cladonia, Stereocaulon, Umbilicaria, Lecanora, Parmelia, Cetraria, Letharia, Alectoria, Ramalina, Xanthoria, etc. Como resultado desta pesquisa foi demonstrado basicamente que o manitol era um componente de ocorrência geral em líquens, enquanto que o arabinitol e o volemitol eram característicos de grupos taxonômicos específicos, ou seja, o arabinitol nos líquens da ordem Lecanorales e o volemitol naqueles da ordem Verrucariales. Quanto aos demais componentes, trealose, sacarose



e umbilicina, não foi indicado um parecer conclusivo sobre a distribuição dos mesmos em líquens.

Dezesseis anos mais tarde, Chicita F. CULBERSON<sup>22</sup> elaborou um guia químico de produtos liquênicos, incluindo vários trabalhos efetuados sobre o isolamento e a identificação de carboidratos de baixo peso molecular encontrados em líquens. Este guia foi devidamente complementado em 1980-1981, quando PUEYO<sup>104,105,106</sup> escreveu uma revisão bibliográfica sobre polióis, açúcares livres, dissacarídeos e glicosídeos de polióis amplamente distribuídos nestas entidades simbióticas (Tabela III). A revisão mostrou que os líquens poderiam apresentar: a) polióis com três a sete átomos de carbono, como por exemplo, glicerol, eritritol, arabinitol, manitol, volemitol; b) açúcares livres principalmente com cinco como ribose e com seis átomos de carbono como glucose; c) dissacarídeos representados essencialmente por sacarose e por trealose, apesar de no líquem Sticta damaecornis<sup>117</sup> ter sido encontrado lactose; e d) glicosídeos de polióis particularmente umbilicina, 3-O-β-D-glucopiranosil-D-manitol<sup>84</sup> e peltigerosídeo (3-O-β-D-galactofuranosil-D-manitol<sup>84</sup>). No entanto, deveria ser ressaltado que embora os polióis, os açúcares livres e os dissacarídeos possam ser distribuídos em outras fontes naturais, como em fungos, em algas, em bactérias e em vegetais superiores,<sup>22</sup> parece que tal distribuição não ocorre com os glicosídeos de polióis. Neste caso, especialmente a umbilicina e o peltigerosídeo, originalmente isolados respectivamente dos líquens Umbilicaria pustulata<sup>85</sup> e Peltigera horizontalis,<sup>84</sup> apresentam estruturas não frequentemente encontradas na natureza, ou seja, galactofuranosídeos de baixo peso molecular, parecendo portanto serem componentes característicos unicamente de lí-

TABELA III - CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR ISOLADOS  
DE LÍQUENS<sup>a</sup>

Polióis	Açúcares Livres	Dissacarídeos	Glicosídeos de Polióis
Arabinitol	Arabinose	Lactose	Glucose-manitol <sup>b</sup>
Eritritol	Frutose	Sacarose	Peltigerosídeo <sup>c</sup>
Glicerol	Galactose	Trealose	Umbilicina <sup>d</sup>
Inositol	Glucose		
Manitol	Lixose		
Ribitol	Manose		
Sifulitol	Ramnose		
Sorbitol	Ribose		
Volemitol	Tagatose		
	Xilose		

<sup>a</sup> Dados obtidos das referências 104, 105, 106 e 117.

<sup>b</sup> Glucose-manitol = 3-0-β-D-glucopiranosil-D-manitol.

<sup>c</sup> Peltigerosídeo = 3-0-β-D-galactofuranosil-D-manitol.

<sup>d</sup> Umbilicina = 2-0-β-D-galactofuranosil-D-arabinitol.

quens.

## APLICAÇÕES DOS CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR

Levando em consideração o enfoque investigativo dos trabalhos mencionados acima, parece que os mesmos foram basicamente dirigidos para o isolamento e a identificação de carboidratos de baixo peso molecular em líquens, sem contudo sobrevir a preocupação em relacionar tais componentes com alguma aplicação futura. Inclusive para estudos quimiotaxonômicos parece não haver uma aplicação total destes componentes, devido provavelmente a distribuição dos mesmos, sobretudo dos glicosídeos de polióis, ser específica a certas espécies de líquens e não característica de determinados grupos taxonômicos. Talvez, a única exceção, citada anteriormente, seja relacionada à distribuição dos polióis arabinitol e volemitol em líquens, já que até o presente estudo, os referidos polióis foram encontrados quase exclusivamente nas ordens Lecanorales e Verrucariales, respectivamente, embora no líquem Sticta damaecornis,<sup>117</sup> pertencente à ordem Lecanorales, tenham sido detectados concomitantemente arabinitol e pequena quantidade de volemitol (0,02%).

### 2.2.2. Polissacarídeos

Em oposição ao número relativamente limitado de estudos efetuados sobre carboidratos de baixo peso molecular em líquens, foi observada uma grande quantidade de trabalhos sobre polissa-

carídeos, que registraram as investigações químicas realizadas para a caracterização estrutural das referidas moléculas isoladas de diferentes espécies destas entidades simbióticas.

A primeira espécie de líquem estudada foi a Cetraria islandica, da qual BERZELIUS,<sup>10</sup> em 1815, isolou por extração aquosa quente\*, um polissacarídeo que, após resfriamento, era insolúvel em água fria\*. Inúmeros trabalhos foram então realizados,<sup>18,35,90,101,103</sup> para a determinação de estrutura química deste polissacarídeo, originalmente denominado de "lichenin" e atualmente de "lichenan", cujos resultados mostraram que o mesmo era uma  $\beta$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{20} + 8^{\circ} \rightarrow 10^{18}$ ) linear contendo ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) numa relação molar de 3:7.<sup>18,90,101</sup> Estas ligações estavam distribuídas de modo a constituir principalmente uma sequência repetitiva tetrassacarídica [uma ligação (1  $\rightarrow$  3) seguida por duas ligações (1  $\rightarrow$  4) adjacentes], e ocasionalmente, uma sequência pentassacarídica [uma ligação (1  $\rightarrow$  3) seguida por três ligações (1  $\rightarrow$  4) consecutivas].<sup>101,103</sup> A ausência de ligações (1  $\rightarrow$  3) adjacentes na estrutura da liquenana foi posteriormente comprovada por estudos de degradação de Smith branda<sup>35</sup> e de espectroscopia de r.m.n.-<sup>13</sup>C.<sup>40</sup>

Durante os trabalhos realizados para o isolamento, a purificação e a caracterização estrutural da liquenana, foi revelada inicialmente por MEYER & GÜRTLER,<sup>91</sup> em 1947, e confirmada mais tarde por CHANDA et al.<sup>18</sup>, em 1957, a presença de um outro polissacarídeo no líquem C. islandica, também extraído por água quente, mas ao contrário da liquenana, solúvel tanto em água

\* Observar que no texto, o termo "quente" é indicativo de temperatura a 100°C, enquanto que o termo "fria" (ou "frio"), de temperatura ambiente (~ 20°C), tanto para processos de extração quanto para solubilidade de polissacarídeos.

fria quanto em água quente. Este polissacarídeo, originalmente denominado de "isolichenin" e atualmente de "isolichenan", foi demonstrado ser uma  $\alpha$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{15} + 255^{018}$ ) linear, com ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação molar bastante controversa, pois foram encontrados os valores de 1,5:1,<sup>18</sup> de 1,2:1,<sup>102</sup> de 1,3:1<sup>36</sup> e finalmente de 1,9:1,<sup>45</sup> provavelmente devido às dificuldades na preparação de amostras puras. A distribuição destas ligações ao longo da cadeia da glucana foi evidenciada por degradação de Smith branda,<sup>36</sup> que indicou uma estrutura repetitiva preponderante com duas ligações (1 → 3) consecutivas interceptadas por uma ligação (1 → 4) isolada (43%), embora uma sequência de ligações (1 → 3) e (1 → 4) alternadas também estivesse amplamente distribuída (38%), além de uma menor proporção de ligações (1 → 4) adjacentes (6%).

Obviamente, a investigação química de polissacarídeos em líquens não foi restrita aos intensos estudos efetuados com a C. islandica, já que DRAKE,<sup>30</sup> quatro anos antes de MEYER & GÜRTLER,<sup>91</sup> tinha isolado por extração aquosa do líquem Umbilicaria pustulata, um polissacarídeo insolúvel em água fria mas solúvel em água quente, originalmente denominado de "pustulin". Mais tarde, LINDBERG & McPHERSON<sup>82</sup> trabalhando com o referido líquem, obtiveram este polissacarídeo, atualmente chamado de "pustulan", e indicaram que o mesmo era uma  $\beta$ -D-glucana ( $[\alpha]_D - 46^0$ ) linear com apenas ligações (1 → 6) entre as unidades de glucose, sendo tal estrutura confirmada posteriormente por HELLERQVIST et al.<sup>58</sup>.

A partir destes estudos com a C. islandica e a U. pustulata, em que foram isolados os polissacarídeos liquenana e isoliquenana do primeiro líquem e a pustulana do segundo, muitos

trabalhos sucederam, em média um trabalho ao ano após a década de 50, visando a obtenção de polissacarídeos, relacionados aos citados acima, de diferentes espécies de líquens.

Realmente, polissacarídeos estruturalmente semelhantes à liquenana (Tabela IV) e à isoliquenana (Tabela V) ou então a apresentando algumas variações estruturais com respeito principalmente as relações molares de ligações (1 → 3) e (1 → 4), foram encontrados em outros líquens, sendo observado que as proporções das referidas ligações foram bastante diversificadas especialmente nas  $\alpha$ -D-glucanas. Evidentemente, novas caracterizações estruturais foram reveladas, sobretudo para as  $\beta$ -D-glucanas, como aquela linear do tipo laminarana isolada por extração alcalina do líquem Stereocaulon ramulosum,<sup>7</sup> que mostrou apenas ligações (1 → 3) entre as unidades de glucose. Uma  $\beta$ -D-glucana ramificada foi também obtida, por extração alcalina, do líquem C. islandica,<sup>65</sup> que apresentou uma cadeia principal com unidades de glucose e de ácido glucurônico ligadas (1 → 3) e cadeias laterais constituídas por unidades de glucose ligadas (1 → 4) e/ou (1 → 6) à cadeia principal. Além disso, nos polissacarídeos do tipo pustulana (Tabela VI) isolados de diversos líquens, em particular dos gêneros Gyrophora, Umbilicaria e Lasallia, foi igualmente constatada uma novidade estrutural, uma vez que os mesmos mostraram grupos O-acetil em suas estruturas químicas. Esta constatação foi bastante significativa, já que os três gêneros mencionados acima eram pertencentes à mesma família Gyrophoraceae, sugerindo uma possível correlação entre a posição taxonômica destes líquens e seus carboidratos, especialmente as pustulanas parcialmente acetiladas.<sup>97</sup>

Juntamente com o interesse intenso em pesquisar glucu

TABELA IV -  $\beta$ -D-GLUCANAS COM LIGAÇÕES (1 → 3) E (1 → 4) ISOLADAS DE LÍQUENS

Líquens	$[\alpha]_D$	Relação molar de ligações (1 → 3) e (1 → 4)	Solubilidade	Rendimento (g% do peso de líquido quem original)
<u>C. islandica</u> <sup>18,90,101</sup> (a)	+ 8° → 10° (+ 18,4°)	3:7	Insolúvel em água fria mas solúvel em água quente	0,60 (22,00)
<u>C. richardsonii</u> <sup>129,141</sup>	-	3:7	Idem	-
<u>A. sarmentosa</u> <sup>128</sup>	+ 19°	~ Liqueenana	Idem	15,00
<u>A. sulcata</u> <sup>128</sup>	+ 17,5°	~ Liqueenana	Idem	15,00
<u>U. rubescens</u> <sup>95</sup>	+ 21,3°	3:7	Idem	11,36
<u>E. prunatri</u> <sup>128</sup>	+ 12°	3:1	Solúvel em água fria	0,63
<u>L. vulpina</u> <sup>69</sup>	- 8°	1:3	Idem	9,00
<u>Usnea sp.</u> <sup>69</sup>	- 8°	1:3	Idem	5,50

(a) A  $\beta$ -D-glucana com ligações (1 → 3) e (1 → 4) isolada do líquem C. islandica é conhecida comumente por liqueenana.

Líquens	$[\alpha]_D$	Relação molar de ligações (1 → 3) e (1 → 4)	Presença de outros tipos de ligações	Solubilidade	Rendimento (g <sup>o</sup> do peso de líquem original)
<i>C. islandica</i> <sup>18,36,45,102</sup> (a)	+ 255 <sup>0</sup> (+ 272 <sup>0</sup> )	1,5:1 (1,2:1; 1,3:1; 1,9:1)	-	Solúvel em água fria	0,05 (1,14)
<i>C. richardsonii</i> <sup>141</sup>	-	1,5:1	-	Idem	-
<i>A. sulcata</i> <sup>128</sup>	+ 265 <sup>0</sup>	- Isoliquenana	-	Idem	9,20
<i>A. sarmentosa</i> <sup>128</sup>	+ 275 <sup>0</sup>	- Isoliquenana	-	Idem	1,70
<i>St. ramulosum</i> <sup>7</sup>	+ 171 <sup>0</sup>	1,6:1	-	Idem	4,48
<i>P. caperata</i> <sup>73,129,141</sup> (b)	+ 201 <sup>0</sup>	1:1	-	Insolúvel em água fria	3,00
<i>C. crispata</i> <sup>95</sup> (b)	+ 232 <sup>0</sup>	1:1	-	Idem	0,57
<i>C. mitis</i> <sup>95</sup> (b)	+ 242 <sup>0</sup>	1:1	-	Idem	-
<i>C. rangiferina</i> <sup>95</sup> (b)	+ 215 <sup>0</sup>	1:1	-	Idem	0,46
<i>C. squamosa</i> <sup>95</sup> (b)	+ 245 <sup>0</sup>	1:1	-	Idem	0,28
<i>C. alpestris</i> <sup>70</sup> (b)	-	1:1	-	Idem	0,12
<i>C. confusa</i> <sup>70</sup> (b)	+ 189 <sup>0</sup>	- 1:1	-	Idem	0,30
<i>L. vulpina</i> <sup>69</sup>	-	1,2:1	-	Idem	4,00
<i>E. prunastri</i> <sup>66,128</sup>	+ 200 <sup>0</sup> + 164 <sup>0</sup> + 217 <sup>0</sup> + 152 <sup>0</sup>	4:1 1,5:1 1:1 6:1	- - (1 → 2) (1 → 6)	Insolúvel Solúvel Solúvel Insolúvel	0,75 0,43 3,20 3,50-4,00
<i>St. japonicum</i> <sup>73,125,140,141</sup>	+ 201 <sup>0</sup>	2,7:1 (2:1; 3:1)	(1 → 2)	Solúvel	5,50
<i>P. acicularis</i> <sup>141</sup>	-	2:1	-	Idem	5,00
<i>St. sorediiferum</i> <sup>125</sup>	+ 230 <sup>0</sup>	3:1	-	Idem	1,80
<i>St. exutum</i> <sup>125</sup>	+ 160 <sup>0</sup>	3:1	-	Idem	5,40
<i>St. paschale</i> <sup>55</sup>	+ 233 <sup>0</sup>	1:2,5	-	Idem	0,10
<i>A. sphaerophoroides</i> <sup>128,141</sup>	+ 176 <sup>0</sup>	2:3	(1 → 6) (6 <sup>o</sup> )	Insolúvel	0,16
<i>S. globosus</i> <sup>141</sup>	-	2:3	(1 → 6) (6 <sup>o</sup> )	Idem	1,90
<i>R. usnea</i> <sup>45</sup>	+ 243 <sup>0</sup>	3:1	(1 → 2)	Solúvel	2,00

(a) A  $\alpha$ -D-glucana com ligações (1 → 3) e (1 → 4) isolada do líquem *C. islandica* é conhecida comumente por isoliquenana.

(b) As  $\alpha$ -D-glucanas com ligações (1 → 3) e (1 → 4) isoladas dos líquens *Parmelia caperata* e do gênero *Cladonia* são conhecidas como do tipo nigerana.



TABELA VI -  $\beta$ -D-GLUCANAS COM APENAS LIGAÇÕES (1 → 6), PREFERENCIALMENTE O-ACETILADAS, ISOLADAS DE LÍQUENS

Líquens	$[\alpha]_D$	Grupos O-acetil	Solubilidade	Rendimento (g% do peso de líquem original)
<u>U. pustulata</u> <sup>30,58,82</sup> (a)	- 46°	Ausente	Insolúvel em água fria mas solúvel em água quente	7,00
<u>U. hirsuta</u> <sup>30,97</sup>	- 36°	Ausente	Idem	0,62
<u>G. esculenta</u> <sup>96,115,116</sup>	- 37,5°	Presente (2%)	Idem	5,20
<u>L. papulosa</u> <sup>96,115,116</sup>	- 38,8°	Presente	Idem	39,00
<u>U. angulata</u> <sup>97</sup>	- 30°	Presente (~ 2%)	Idem	7,20
<u>U. caroliniana</u> <sup>97</sup>	- 36°	Presente (~ 2%)	Idem	16,00
<u>U. polyphylla</u> <sup>97</sup>	- 32°	Presente (~ 2%)	Idem	28,10
<u>L. pensylvanica</u> <sup>95</sup>	- 42,2°	Presente (2,7%)	Idem	19,50
<u>C. amaurocraea</u> <sup>70</sup>	- 35°	Ausente	Idem	4,00

(a) A  $\beta$ -D-glucana com ligações (1 → 6) isolada do líquem U. pustulata é conhecida comumente por pustulana.

nas em líquens, houve também a curiosidade em investigar heteropolissacarídeos nestas entidades simbióticas, desde 1906, quando ULANDER & TOLLENS<sup>136</sup> detectaram manose e galactose com grande quantidade de glucose no líquem C. islandica. Deste estudo, seguido por outros, incluindo o de GRANICHSTADTEN & PERCIVAL,<sup>51</sup> em 1943, foi deduzido que o referido líquem apresentava além das glucanas, reconhecidas posteriormente como liquenana e iso liquenana, menores quantidades de um heteropolissacarídeo provavelmente constituído por manose e por galactose. No entanto, devido a utilização de procedimentos de purificação inadequados, bem como, de métodos analíticos estruturais rudimentares, não foi possível determinar a estrutura química do referido polissacarídeo, permanecendo então desconhecida.

Somente em 1969, MIČOVIČ et al.<sup>92</sup> realizaram um estudo estrutural mais aprimorado de heteropolissacarídeo, utilizando porém outro líquem, Evernia prunastri, do qual obtiveram uma galactomanana acídica com unidades terminais não redutoras de  $\beta$ -D-galactopiranosose, de  $\alpha$ -D-manopiranosose e de ácido galactopiranosilurônico, além de outras unidades de manopiranosose 2-O-, 2,6-di-O-, 3,6-di-O- e 2,3,6-tri-O-substituídas.

Todavia, foi apenas em 1984, com os trabalhos de GORIN, IACOMINI e seus colaboradores,<sup>45,46,70</sup> que as estruturas químicas de galactomananas isoladas de líquens foram devidamente elucidadas, devido ao emprego de procedimentos de purificação mais adequados e principalmente de técnicas analíticas mais modernas, como por exemplo, a espectroscopia de r.m.n.-<sup>13</sup>C e a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa. O primeiro trabalho destes autores foi justamente com o heteropolissacarídeo de C. islandica,<sup>45</sup> que mostrou ser uma ga -

lactomanana, solúvel em água fria, com cadeia principal composta de unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosose unidas por ligações (1 → 6) e com cadeias laterais de  $\alpha$ -D-galactopiranosose e de  $\beta$ -D-galactopiranosose ligadas (1 → 2) e (1 → 4), respectivamente, à mesma unidade da cadeia principal (Tabela VII). Neste trabalho e nos outros que sucederam, galactomananas de várias espécies de líquens, particularmente com micobiontes ascomicetos, foram do mesmo modo estudadas, e os autores concluíram que estes polissacarídeos apresentavam basicamente cadeias principais constituídas por  $\alpha$ -D-manopiranosas (1 → 6) (ver Tabela VII). A diversidade estrutural em tais polissacarídeos dependia apenas da maneira como as cadeias principais eram substituídas por determinadas cadeias laterais, sendo estas últimas geralmente representadas por unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose ligada (1 → 4), de  $\alpha$ -D-galactopiranosose e de  $\alpha$ -D-manopiranosose ligadas (1 → 2) e de  $\beta$ -D-galactofuranose ligada (1 → 4) às unidades da  $\alpha$ -D-manopiranosana (1 → 6).

Salientando então, que os estudos realizados acima foram com ascolíquens, foi observado que as galactomananas dos mesmos poderiam ser relacionadas com aquelas comumente presentes em fungos ascomicetos.<sup>43</sup> Mas ao contrário, quando IACOMINI et al.<sup>71</sup>, em 1987, estudaram pioneiramente o basidiolíquem Cora pavonia, constataram que o líquem continha polissacarídeos típicos de fungos basidiomicetos e diferentes daqueles encontrados em ascomicetos e ascolíquens. Um dos componentes obtidos foi um heteropolissacarídeo bastante complexo, constituído por L-ramnose, L-fucose, D-xilose, D-manose, D-glucose e D-galactose. Este polissacarídeo apresentou principalmente manose e xilose, com um núcleo contendo manose e uma cadeia princi

TABELA VII - GALACTOMANANAS COM CADEIAS PRINCIPAIS DE  $\alpha$ -D-MANOPIRANANAS (1 - 6) ISOLADAS DE LIQUENS

Líquens	$[\alpha]_D^{25}$	Composição em monossacarídeos			Tipos de substituição	Solubilidade	Rendimento (g' do peso de líquem original)
		Man	Gal	Glc			
<i>C. islandica</i> <sup>45</sup>	+ 88 <sup>0</sup>	43	40	17	$\alpha$ -D-Galp-(1 → 2) <sup>a</sup> $\beta$ -D-Galp-(1 → 4)	Solúvel em água fria	0,65
<i>R. usnea</i> <sup>45</sup>	+ 63 <sup>0</sup>	53	43	3	$\beta$ -D-Galp-(1 → 4) <sup>b</sup>	Idem	2,11
<i>P. sulcata</i> <sup>46</sup>	+ 95 <sup>0</sup>	49	40	10	$\alpha$ -D-Galp-(1 → 2) <sup>a</sup> $\beta$ -D-Galp-(1 → 4)	Idem	2,50
<i>St. paschale</i> <sup>46</sup>	+ 63 <sup>0</sup>	63	31	5	$\beta$ -D-Galp-(1 → 4) <sup>b</sup> e $\alpha$ -D-Manp-(1 → 2) <sup>a</sup> $\beta$ -D-Galp-(1 → 4)	Idem	4,30
<i>P. aphthosa</i> <sup>46</sup>	+ 60 <sup>0</sup>	58	39	2	$\beta$ -D-Galp-(1 → 4) <sup>b</sup> e $\alpha$ -D-Manp-(1 → 2) <sup>a</sup> $\beta$ -D-Galp-(1 → 4)	Idem	5,20
<i>L. vulpina</i> <sup>46</sup>	-	66	24	9	-	Idem	0,10
<i>A. muehlenbergii</i> <sup>46</sup>	+ 30 <sup>0</sup>	62	30	8	$\alpha$ -D-Manp-(1 → 2) <sup>b</sup> e $\beta$ -D-Galp-(1 → 4) <sup>a</sup> $\alpha$ -D-Manp-(1 → 2)	Idem	0,60
<i>Usnea</i> sp. <sup>46</sup>	+ 112 <sup>0</sup>	43	42	14	-	Idem	2,00
<i>C. alpestris</i> <sup>70</sup>	+ 52 <sup>0</sup>	66	24	9	$\alpha$ -D-Manp-(1 → 2) <sup>b</sup> e $\alpha$ -D-Manp-(1 → 2) <sup>a</sup> $\beta$ -D-Galp-(1 → 4)	Idem	-
<i>C. confusa</i> <sup>70</sup>	+ 54 <sup>0</sup>	63	33	4	$\alpha$ -D-Manp-(1 → 2) <sup>b</sup> e $\alpha$ -D-Manp-(1 → 2) <sup>a</sup> $\beta$ -D-Galp-(1 → 4)	Idem	1,60
<i>C. amaurocraea</i> <sup>70</sup>	+ 46 <sup>0</sup>	50	29	20	-	Idem	5,60

<sup>a</sup> Como dissubstituintes na mesma unidade de  $\alpha$ -D-manopiranosose da cadeia principal.

<sup>b</sup> Como monossubstituinte numa unidade de  $\alpha$ -D-manopiranosose da cadeia principal

pal mostrando preponderância de unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosose unidas por ligações (1 → 3). Estas últimas eram não substituídas (10%) ou 4-O- (10%) e 2,4-di-O-substituídas (10%) por unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosose, demonstrando assim, uma diversidade estrutural deste heteropolissacarídeo, tanto em relação à estrutura da cadeia principal quanto à natureza das cadeias laterais, quando comparadas com as dos componentes heteropoliméricos isolados de líquens com micobiontes ascomicetos. Além disso, um outro polissacarídeo foi obtido do líquem C. pavo-nia, ou seja, uma  $\beta$ -D-glucana altamente ramificada, com 21% de unidades terminais não redutoras e com unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosose 3-O-, 6-O- e 3,6-di-O-substituídas, cuja cadeia principal era composta por ligações (1 → 3) e (1 → 6). Desta forma, foi também verificado que a  $\beta$ -D-glucana ramificada do basidiolíquem era bastante diferente daquelas essencialmente lineares e frequentemente presentes em ascolíquens.

### APLICAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS

Portanto, considerando todos estes estudos estruturais realizados sobre polissacarídeos isolados de líquens, tanto os de ascolíquens quanto os de basidiolíquem, poderia ser deduzido que alguma finalidade de extrema importância deveria existir, para justificar o imenso interesse despertado nos pesquisadores em estudar tais componentes.

Realmente, foi observado que, ao contrário do estabelecido para os carboidratos de baixo peso molecular, os polissacarídeos, em grande parte, poderiam ser utilizados como compostos

de referência para a classificação quimiotaxonômica de líquens, sendo o exemplo mais notável, a ocorrência característica de pustulanas parcialmente acetiladas em gêneros de líquens, Umbilicaria, Lasallia, Gyrophora, pertencentes à mesma família Gyrophoraceae.<sup>97</sup>

Todavia, a principal finalidade da caracterização estrutural de polissacarídeos foi certamente a evidência da atividade antineoplásica destes componentes, demonstrada inicialmente por FUKUOKA et al.<sup>37</sup>, em 1968. Neste trabalho, as frações polissacarídicas brutas foram preparadas pela adição de etanol aos extratos aquosos obtidos de líquens e seus efeitos antineoplásicos foram testados contra tumores do tipo sarcoma-180 implantados subcutaneamente em ratos. Todas as frações testadas foram altamente efetivas, com relações de inibição do crescimento de tumor geralmente superiores a 90%, merecendo destaque a fração com o polissacarídeo tipo pustulana parcialmente acetilada do líquem Gyrophora esculenta, que mostrou relação de inibição igual a 99,1%, e as frações com a isoliquenana e a liquenana, ambas do líquem C. islandica, com relações de inibição de 99,6% e 100%, respectivamente.

A partir de 1968, muitos estudos foram então efetuados com polissacarídeos isolados de líquens, que eram caracterizados estruturalmente e em seguida testados contra sarcomas-180 implantados em ratos, confirmando quase totalmente os resultados obtidos por FUKUOKA et al.<sup>37</sup>. Dentre os polissacarídeos estudados foi revelado que as  $\beta$ -D-glucanas do tipo pustulana parcialmente acetilada e do tipo liquenana eram, sem dúvida alguma, essencialmente efetivas, com relações de inibição do crescimento de tumor idênticas às mencionadas anteriormente. A o -

corrência de regressão completa do tumor era notada em quase todos os ratos tratados com ambos os tipos de tais polissacarídeos, sem acompanhamento de significativa toxicidade.<sup>95</sup> Por outro lado, após revisão e avaliação dos resultados obtidos com as  $\alpha$ -D-glucanas do tipo isoliquenana e do tipo nigerana,<sup>43</sup> foi demonstrado que as mesmas eram apenas moderadamente efetivas, sendo tal evidência facilmente constatada para a nigerana de Parmelia caperata, que apresentou relação de inibição do crescimento de tumor igual a somente 67%. Além disso, com o intuito de testar a atividade antineoplásica de polissacarídeos diferentes de glucanas, foi obtida do líquem Cladonia squamosa, uma fração heteropolissacarídica bruta, constituída por glicose, galactose e principalmente manose, que após ser injetada em ratos com sarcomas-180 implantados, mostrou efeito antineoplásico apenas moderado, com relação de inibição variando entre 60 a 70%.

Assim, pela análise destes estudos foi observado que polissacarídeos, especialmente  $\beta$ -D-glucanas, isolados de líquens e com estruturas químicas distintas mostraram significativas atividades antineoplásicas sobre tumores transplantados, apesar de que uma correlação perfeita entre as estruturas químicas destes polissacarídeos e seus efeitos antineoplásicos ainda não está bem compreendida. No entanto, como polissacarídeos antineoplásicos também podem ser obtidos de outras fontes naturais, como de fungos, de leveduras, de algas, de bactérias e de vegetais superiores, poderiam ser sugeridas algumas características distintamente percebidas em glucanas estruturalmente conhecidas e sobretudo isoladas de fungos, que auxiliariam nesta possível correlação.<sup>8,138</sup> Tais características seriam basi-

camente representadas por: a) tipo de ligação, de preferência  $\beta$ -D-glucanas, uma vez que as  $\alpha$ -D-glucanas poderiam ser susceptíveis à ação de D-glucanases humorais; b) grau de ramificação, preferencialmente glucanas lineares ou com poucas ramificações; c) peso molecular, em que foi revelado que glucanas com graus de polimerização (GP) superiores a 50 mostraram atividades antineoplásicas notáveis em contraste com aquelas tendo GP inferiores a 39; e d) conformação. Quanto à esta última característica parece bem estabelecido que a ação antineoplásica de  $\beta$ -D-glucanas está intimamente relacionada às suas conformações em hélices triplas, como aquelas presentes em glucanas lineares com apenas ligações  $\beta$ -(1 → 3) ou ramificadas com cadeias principais também com as referidas ligações.

Comparando então estas características das glucanas de fungos com aquelas das glucanas do tipo pustulana e do tipo liquenana isoladas de líquens, poderia ser assumido que as últimas estão em conformidade com as primeiras, no que diz respeito ao tipo de ligação, ao grau de ramificação e ao peso molecular (GP da liquenana de *C. islandica*<sup>43</sup> entre 100 a 200 e GP da pustulana, parcialmente acetilada, de *G. esculenta*<sup>96</sup> aproximadamente 120). Já em relação às conformações, ambas as glucanas, de alguma forma, apresentam estruturas em hélice, pois que para a liquenana foi demonstrada a conformação em hélice dupla trisseriada, em que cada série corresponderia a uma sequência repetitiva de  $\beta$ -celotriose ligada (1 → 3),<sup>134</sup> enquanto que para a pustulana, formadora de gel com relativa facilidade, foi evidenciada a conformação em hélices no seu estado sólido.<sup>124</sup> E, ainda na pustulana, seria digno de nota salientar a importância da presença de grupos acetil em sua estrutu



ra química, uma vez que estes grupos, além de possivelmente revelar especificidade imunológica, poderiam alterar a conformação molecular da glucana, levando a mudanças em sua atividade antineoplásica.<sup>138</sup> Um exemplo bastante claro, foi demonstrado por NISHIKAWA et al.<sup>96</sup>, quando testaram pustulanas desacetilada e totalmente acetilada em ratos com tumores transplantados. Estes autores encontraram para a pustulana desacetilada, uma relação de inibição do crescimento de tumor (85,5%) inferior à mostrada pela pustulana parcialmente acetilada isolada de G. esculenta. Já uma perda quase completa do efeito antineoplásico foi observada para a pustulana totalmente acetilada, cuja relação de inibição foi igual a 9,3%.

Constatando assim, a importância biológica dos polissacarídeos de líquens como agentes antineoplásicos, se bem que não possa ser descartada a provável significância antigênica e possivelmente imunogênica, sobretudo das glucanas parcialmente acetiladas e mesmo das galactomananas, provou ser plenamente justificado o crescente interesse em estudar tais componentes, visando essencialmente a determinação de suas estruturas refinadas e subsequente elucidação das relações estrutura química-atividade biológica.

### 3. LÍQUENS Stereocaulon ramulosum (SW.) RAUSCH, Newropogon aurantiaco-ater E Actinogyra muehlenbergii

Com a intenção de investigar profundamente os líquens para revelar os seus componentes químicos, que certamente conduziram às esperadas aplicações biológicas, foi observado que

nos trabalhos mencionados anteriormente os pesquisadores estudaram líquens coletados de várias partes do mundo, principalmente em razão de que os mesmos vivem em quase todos os tipos de ambientes, desde regiões extremamente frias, até aquelas exuberantemente quentes. Neste requisito de diversidade ambiental poderiam ser incluídos os líquens St. ramulosum, N. aurantiaco-ater e A. muehlenbergii, uma vez que foram coletados de locais geograficamente distintos, ou seja, do Brasil, da Antártida e do Canadá, respectivamente. Considerando ainda, as condições climáticas bastante diversas destes três ambientes, em que o Brasil (Estado do Paraná) apresenta clima regularmente temperado, a Antártida (Ilha de King George), clima constantemente frio e seco, e o Canadá (Província de Saskatchewan), clima sucessivamente muito frio e muito quente, deveria merecer cuidadosa atenção a investigação química destes líquens, com o objetivo de alcançar caracterizações estruturais de seus componentes químicos específicas a cada líquem e conseqüentemente correspondentes a cada condição ambiental.

Dos estudos até então realizados com estes líquens, apenas o N. aurantiaco-ater não foi investigado quanto aos seus componentes químicos, quer seja, ácidos liquênicos e carotenóides, quer seja, carboidratos. Já o líquem St. ramulosum foi previamente estudado por RAMAUT et al.<sup>107</sup>, que isolaram e identificaram os ácidos liquênicos atranorina e ácido perlatólico, e por BARON et al.<sup>6,7</sup>, que caracterizaram estruturalmente os seus carboidratos de baixo peso molecular, arabinitol, manitol, inositol, umbilicina e trealose, e alguns polissacarídeos, tais como, uma  $\alpha$ -D-glucana do tipo isoliquenana obtida por extração aquosa e uma  $\beta$ -D-glucana linear do tipo laminarana ob-

tida por extração alcalina. Por sua vez, o líquem A. muehlenbergii mostrou os carboidratos de baixo peso molecular, arabinitol, manitol, umbilicina e sacarose, bem como, um dos polissacarídeos representado por uma galactomanana, devidamente estudados por GORIN & IACOMINI.<sup>46</sup>

Assim, para dar continuidade aos estudos efetuados com os líquens St. ramulosum e A. muehlenbergii no tocante a determinação estrutural de outros polissacarídeos ainda não investigados, foi realizado o presente trabalho, sendo incrementado pelo estudo pioneiro do líquem N. aurantiaco-ater. Em relação a este último, deveria ser salientada a importância científica em estudar um líquem originalmente da Antártida, já que até o presente, poucos registros sobre investigações minuciosas com líquens antárticos têm sido disponíveis, a despeito da colonização preferencial do referido ambiente por estas entidades simbióticas, quando comparada com a de outros vegetais, tais como, musgos e algas.<sup>119,131</sup>

## OBJETIVOS

A finalidade básica do presente trabalho foi realizar um estudo comparativo entre os carboidratos mais representativos ou de maior rendimento presentes nos líquens St. ramulosum, N. aurantiaco-ater e A. muehlenbergii, e em seguida, comparar os mesmos com os obtidos de outras espécies de líquens. Para esta finalidade, obviamente, foram considerados os trabalhos anteriores efetuados por BARON et al.<sup>6,7</sup> e por GORIN & IACOMI - NI,<sup>46</sup> com o intuito de serem utilizados como guias para os processos de extração, de purificação e de análise estrutural dos componentes ainda não investigados.

Levando então em consideração estes procedimentos técnicos, os objetivos pretendidos neste trabalho poderiam ser resumidamente esclarecidos como especificados abaixo:

1. Caracterizar estruturalmente uma  $\alpha$ -D-glucana obtida por extração alcalina e as galactomananas obtidas por extrações aquosa e alcalina do líquem St. ramulosum, dando continuidade aos estudos realizados inicialmente por BARON et al.<sup>6,7</sup> com este líquem.

2. Isolar, purificar e determinar as estruturas químicas dos carboidratos de baixo peso molecular e dos polissacarídeos obtidos por extração aquosa de N. aurantiaco-ater, um lí-

antártico ainda não investigado quimicamente.

3. Determinar a quantidade e o posicionamento de grupos O-acetil na  $\beta$ -D-glucana, tipo pustulana, isolada por extração com dimetil-sulfóxido do líquem A. muehlenbergii. Estas investigações ampliariam aquelas iniciadas por GORIN & IACOMINI<sup>46</sup> sobre polissacarídeos encontrados neste líquem.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## 1. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

### 1.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

#### 1.1.1. Cromatografia em papel (c.p.)

As análises cromatográficas qualitativas em papel foram desenvolvidas pelas técnicas ascendente e descendente, em papel Whatman nº 1, e com os seguintes sistemas de solventes:

A) Benzeno-1-butanol-piridina-água 1:5:3:3 (v/v, fase superior);<sup>62</sup>

B) 1-Butanol-etanol-água 2:1:1 (v/v);<sup>45,62</sup>

C) 1-Butanol-etanol-água 40:11:19 (v/v).<sup>45,62</sup>

A detecção de carboidratos foi efetuada com os reagentes de nitrato de prata sódico,<sup>133</sup> de nitrato de prata amoniacal,<sup>100</sup> de cloridrato de p-anisidina - para carboidratos redutores,<sup>63</sup> e de ninidrina - para hexosaminas.<sup>132</sup>

A migração cromatográfica dos carboidratos de baixo peso molecular obtidos por extração metanol-água do líqüem N. aurantiaco-ater foi relacionada à migração da D-galactose ( $R_{Gal}$ ) - técnica ascendente, solvente B.

As migrações cromatográficas dos produtos de degradação

de Smith branda de homopolissacarídeos ( $\alpha$ -D-glucanas) e do heteropolissacarídeo (galactomanana) isolado por extração alcalina de St. ramulosum foram relacionadas respectivamente às migrações do 2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-eritritol ( $R_{GE}$ ) - técnica ascendente, solvente A, e da D-manose ( $R_{Man}$ ) - técnica ascendente, solvente C.

A migração cromatográfica dos produtos de acetólise parcial do heteropolissacarídeo (galactomanana) isolado por extração alcalina de St. ramulosum foi relacionada à migração da D-manose ( $R_{Man}$ ) - técnica descendente, solvente B, 72 horas.

#### 1.1.2. Cromatografia em camada delgada (c.c.d.)

As análises cromatográficas em camada delgada foram desenvolvidas em placas de alumínio com sílica-gel G (Merck), utilizando como sistema de solventes, acetato de etila-metanol-água 7:3:2 (v/v).<sup>73</sup>

A detecção de carboidratos foi efetuada com o reagente de  $H_2SO_4$  a 5% em metanol.<sup>80</sup>

#### 1.1.3. Cromatografia em fase gasosa (c.f.g.)

As análises cromatográficas em fase gasosa foram realizadas em dois aparelhos, cujas características estão abaixo relacionadas:

A) Cromatógrafo Varian, modelo 2440, com detector de ionização de chama e utilizando nitrogênio como gás de arraste. As

colunas de aço inoxidável empregadas (200 x 0,15 cm d.i.) foram preenchidas com as seguintes fases estacionárias:

1- ECNSS-M a 3% (p/p) sobre Gas Chrom Q de 100-120 mesh.<sup>112</sup> O fluxo de nitrogênio foi de 37,5 ml/min e as temperaturas da câmara de injeção e do detector foram de 200 e 250°C, respectivamente. A determinação quantitativa dos acetatos de alditóis foi feita à temperatura de 180°C ou com programação de temperatura de 130 a 180°C, pelo acréscimo de 4°C/min, enquanto que a dos acetatos de alditóis parcialmente metilados foi a 160°C.

2- OV-225 a 3% (p/p) sobre Gas Chrom Q de 100-200 mesh.<sup>87</sup> O fluxo de nitrogênio foi de 40 ml/min e as temperaturas do injetor e do detector foram de 190 e 240°C, respectivamente. Esta coluna foi utilizada na quantificação de acetatos de alditóis, à temperatura de 190°C ou com programação de temperatura de 150 ou 170 a 190°C, de acetatos de alditóis parcialmente metilados, à temperatura de 170°C, e de acetatos de metil glicosídeos, à temperatura de 170°C.

Os picos foram identificados pela co-injeção de padrões, sendo os tempos de retenção (T) dos acetatos de alditóis relacionados ao do xilitol penta-0-acetato, os dos acetatos de alditóis parcialmente metilados ao do 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol e os dos acetatos de metil glicosídeos ao do metil 2,3,4,6-tetra-0-metil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo.

A composição molar foi calculada em função da área do pico registrada para cada componente, através dos métodos de triangulação e de corte e pesagem.<sup>120</sup>

B) Cromatógrafo CG, modelo 37, com detector de ionização de chama e utilizando nitrogênio como gás de arraste (50 ml/min).



As temperaturas do vaporizador e do ionizador foram controladas para registrarem, respectivamente, 197 e 239<sup>o</sup>C. A coluna de aço inoxidável (180 x 0,48 cm d.i.), empacotada com Porapak Q, foi empregada na determinação qualitativa de ácido acético, à temperatura de 201<sup>o</sup>C.<sup>96,97</sup>

#### 1.1.4. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (c.f.g.-e.m.)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em aparelho Finnigan, modelo 4000, dotado de sistema de dados Incos 2300 e equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) revestida com OV-225 e OV-17 na proporção de 3:1<sup>9,44</sup> ou com DB-210.<sup>71</sup> Os espectros foram obtidos por impacto de elétrons repetitivamente a cada 2 s, desde m/z 40 até 420. As injeções foram feitas diretamente na coluna a 50<sup>o</sup>C, utilizando a técnica "split" e então, a temperatura foi rapidamente programada, 40<sup>o</sup>C/min, até 220<sup>o</sup>C e mantida constante. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com velocidade linear de 22 cm/s.

Estas colunas foram empregadas para a quantificação de acetatos de alditóis parcialmente metilados, identificados pelos seus perfis de fragmentação característicos,<sup>74</sup> e pelos seus tempos de retenção, que foram comparados com aqueles de padrões co-injetados.

As áreas dos picos foram obtidas por integração automática.

## 1.2. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

### 1.2.1. Ressonância magnética nuclear de carbono treze (r.m.n.- $^{13}\text{C}$ )

Os espectros de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  foram obtidos pelo uso dos seguintes espectrômetros acoplados ao transformador de Fourier:

A) Espectrômetro Bruker AM-360WB.- Os polissacarídeos e carboidratos de baixo peso molecular (~ 10 a 100 mg) foram examinados como soluções em  $\text{D}_2\text{O}$  ou em  $\text{D}_2\text{O}$  contendo NaOD a 1% ou KOD a 2% ou ainda em  $\text{DMSO}-^2\text{H}_6$ , enquanto que as soluções de acetato de sódio foram simplesmente em  $\text{D}_2\text{O}$ . Estas soluções (3 ml) contidas em cilindros coaxiais foram introduzidas em tubos de 20 cm de comprimento e 10 mm de diâmetro e examinadas a  $33^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos a  $33^\circ\text{C}$  foram então corrigidos para a temperatura de  $70^\circ\text{C}$  pelo acréscimo de ~ 1 p.p.m.<sup>40</sup>. Os espectros foram obtidos em 360 MHz em relação ao núcleo de  $^1\text{H}$  (90,56 MHz em relação ao núcleo de  $^{13}\text{C}$ ).

B) Espectrômetro Varian XL-100-15.- Uma solução do homopolissacarídeo ( $\beta$ -D-glucana) de A. muehlenbergii (80 mg em 2 ml de  $\text{D}_2\text{O}$ ), contida em cilindro coaxial, foi colocada em tubo de 20,3 cm de comprimento e 12 mm de diâmetro e examinada à temperatura de  $70^\circ\text{C}$ . Os espectros foram obtidos em 100 MHz com respeito ao núcleo de  $^1\text{H}$  (25,16 MHz em relação ao núcleo de  $^{13}\text{C}$ ).

Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  (p.p.m.) relativos à ressonância do TMS ( $\delta = 0$ ) determinada em experimento separado.

### 1.2.2. Ressonância magnética nuclear de próton (r.m.n.-<sup>1</sup>H)

Os espectros de r.m.n.-<sup>1</sup>H foram obtidos pelo uso de espectrômetro Bruker AM-360WB incorporado ao transformador de Fourier, em 360 MHz em relação ao núcleo de <sup>1</sup>H. As soluções dos carboidratos de baixo peso molecular (10 a 30 mg em 3 ml de D<sub>2</sub>O) e de acetato de sódio (em D<sub>2</sub>O), contidas em cilindros coaxiais, foram colocadas em tubos de 200 x 10 mm d.i. e mantidas a 33°C para serem analisadas no espectrômetro.

Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (p.p.m.) relativos à ressonância do TMS (δ = 0) determinada em experimento separado.

### 1.3. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

a) A determinação quantitativa de carboidratos totais foi realizada pelo método do fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,<sup>32</sup> utilizando como padrão solução de D-galactose.

b) A determinação quantitativa de proteínas foi feita com o reagente de Folin-Ciocalteu segundo processo descrito por LOWRY et al.<sup>39,88</sup>, utilizando como padrão solução de soroalbumina cristalina. Para a obtenção do conteúdo de nitrogênio (g%) foi dividido o conteúdo protéico (g%) pelo fator 6,25.

c) A determinação do conteúdo de grupos O-acetil foi realizada de acordo com o método de HESTRIN,<sup>29,60</sup> utilizando como padrão solução de galactose penta-O-acetato.

#### 1.4. POLARIMETRIA

As rotações específicas foram obtidas em polarímetro Perkin Elmer, modelo 141, à temperatura de 25°C. Os solventes utilizados nestas determinações foram água para polissacarídeos solúveis em água fria e solução aquosa de NaOH a 1% para aqueles insolúveis.

#### 1.5. TITULOMETRIA

a) O conteúdo de grupos O-acetil foi confirmado por saponificação segundo método descrito por TANGHE et al.<sup>130</sup>.

b) As determinações do consumo de meta-periodato de sôdio e da produção de ácido fôrmico foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por NEUMÜLLER & VASSEUR<sup>93</sup> e HAY et al.<sup>57</sup>.

#### 1.6. MÉTODOS COMPLEMENTARES

a) Os líquens em estudo foram pulverizados em moinho Fort Wayne, modelo 5KH35KG114E (malha nº 20).

b) As pesagens em geral foram feitas em balanças analíticas Mettler, modelo H6; e Sauter, modelo KG.D-7470.

c) As concentrações de soluções foram realizadas em rotaevaporador Fisatom, modelo 802, sob pressão reduzida, e em temperaturas geralmente inferiores a 50°C.

d) As centrifugações para o fracionamento de polissacarídeos foram realizadas em centrífugas Janetzki, modelo K70 (2500 rpm, 10°C); Celm, modelo LS-III1053 (3000 rpm, temperatura ambiente); e Sorvall Superspeed, modelo SS-1 (10000 rpm, temperatura ambiente).

e) As liofilizações de soluções foram feitas em aparelho Virtis, modelo 10-145MR-BA.

f) As medidas e aferições de concentrações hidrogeniônicas (pH) foram procedidas em potenciômetros Ionalyzer, modelo 399; e Micronal, modelo B374.

g) As determinações espectrofotométricas, na região visível, foram realizadas em aparelho Coleman Junior, modelo 6A.

h) A precipitação de polissacarídeos em excesso de etanol correspondeu aproximadamente a uma parte da solução de polissacarídeo para três a cinco partes de etanol.

i) A remoção de material inorgânico de soluções pelo uso de resinas trocadoras de íons foi feita pela agitação das soluções com resina catiônica (Dowex 50W x 8 ou Dowex 50W x 12 - forma H<sup>+</sup>) e/ou com resina aniônica (Dowex 2 x 8 - forma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e posterior filtração por papel ou por algodão.

## 2. LÍQUENS EM ESTUDO E SEUS CARBOIDRATOS

Os líquens estudados no presente trabalho foram Stereocaulon ramulosum (Sw.) Räsusch, Newropogon aurantiaco-ater e Actinogyra muehlenbergii.

## 2.1. LOCAIS DE COLETA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS LÍQUENS EM ESTUDO

2.1.1. Líquem St. ramulosum. - A coleta durante o verão foi realizada na Serra do Mar, Estado do Paraná, Brasil. O líquem foi encontrado em desenvolvimento sobre rochas situadas à margem da Estrada da Graciosa, a 1 Km do Posto de Polícia Florestal, em direção a Morretes - altitude de ~ 900 m. Esta região apresenta comumente temperaturas médias anuais inferiores a 14°C. Contudo, no mês mais frio, a temperatura pode variar entre + 18°C e - 3°C, e no mês mais quente, pode atingir temperaturas acima de 22°C.<sup>89</sup>

O referido líquem foi caracterizado pelo seu talo arbuscivo denominado de pseudopodécio, sobre o qual foi observado o desenvolvimento de aparelhos produtores de esporos ou apotécios.<sup>34</sup> Ao longo do talo também foram notadas formações cilíndricas chamadas de ramificações ou râmulos filocladióides, que conferiram um aspecto coralóide ao líquem. Além disso, excrescências muito comuns, de coloração diversa da do talo e de formação geralmente arredondada, foram observadas, sendo denominadas de cefalódios.

2.1.2. Líquem N. aurantiaco-ater. - A coleta durante o verão foi realizada em áreas planas, livres de gelo, e situadas próximo às praias da baía Admiralty e da península Keller, localizadas na ilha de King George, Antártida. O local é normalmente caracterizado por temperaturas negativas, sendo que no inverno, em junho, as temperaturas médias máxima e mínima são de - 6,8 e - 19,5°C, respectivamente,<sup>131</sup> enquanto que no verão, a tempe

ratura atmosférica não ultrapassa a + 5°C.

Neste líquem também foi observado o talo do tipo arbus-tivo, que estava em desenvolvimento diretamente sobre rochas, ou então, juntamente com outros vegetais tais como gramas, sobre solo rudimentar assentado entre pequenas rochas.

2.1.3. Líquem A. muehlenbergii.- A coleta durante o verão foi realizada em formações rochosas proeminentes, situadas na costa leste do lago Mountain, próximo à cidade de Stanley Mis-sion, Província de Saskatchewan, Canadá. Esta região mostra va-riações climáticas drásticas, já que o inverno, longo e rigo-roso, pode atingir temperaturas de - 55°C, ao passo que o ve-rão pode apresentar temperaturas de até + 30°C.

O líquem, que apresentou um talo do tipo foliáceo, foi facilmente destacado da rochas, uma vez que estava preso frou-xamente ao substrato por meio de rizinas ou de "tomentosum".<sup>53</sup>

## 2.2. ISOLAMENTO DE CARBOIDRATOS DOS LÍQUENS EM ESTUDO

Antes dos processos de extrações, os líquens foram se-cos à temperatura ambiente e limpos, para a remoção de vegetais contaminantes.

### 2.2.1. Isolamento de polissacarídeos do líquem St. ramulosum

O líquem foi submetido à duas séries diferentes de eta-pas de extração, para a obtenção dos polissacarídeos presentes nesta entidade simbiótica.<sup>6,7,69</sup>

### 2.2.1.1. Primeira série de etapas de extração

#### 2.2.1.1.1. EXTRAÇÃO BENZENO-ETANOL

O líqüem devidamente seco e limpo (50 g) foi deslipidificado com mistura de benzeno-etanol (9:1, v/v, ~ 500 ml), sob refluxo, durante aproximadamente 3 horas. Após filtração por algodão, a quente, o extrato benzeno-etanólico foi reservado para estudos posteriores, enquanto que o líqüem residual foi seco em estufa a 50°C, durante a noite, para ser submetido ao próximo processo extrativo.

#### 2.2.1.1.2. EXTRAÇÃO METANOL-ÁGUA

O material remanescente da extração benzeno-etanol (47,55 g) foi tratado com metanol-água (4:1, v/v, ~ 500 ml), sob refluxo, por um período de 4 horas, e posteriormente, filtrado por algodão, a quente. O extrato metanol-aquoso resultante foi reservado, enquanto que o líqüem residual foi seco em estufa a 50°C, durante a noite, para ser submetido aos processos subsequentes de extração. Este resíduo liquênico (40,10 g) foi dividido em duas partes iguais (20,05 g), sendo uma parte extraída com água quente, e a outra parte submetida à extração com solução de álcali quente.

#### 2.2.1.1.3. EXTRAÇÃO AQUOSA

Uma parte do líqüem residual das extrações benzeno-etanol e metanol-água (20,05 g) foi tratada com água (~ 500 ml), a 100°C, durante 8 horas. Após filtração enquanto quente, o processo extrativo foi repetido mais uma vez (~ 500 ml, a 100°C, durante 4 horas) e os filtrados foram combinados e concentrados a pequeno volume (75 ml), para precipitação dos polissacarídeos em excesso de etanol. Pela centrifugação (2500 rpm, 20



min, 10<sup>0</sup>C), foi então obtido um precipitado etanólico (5,18 g), que forneceu rendimento de 20,70 g% em relação ao peso de lí - quem original.

Com a finalidade de fracionar os polissacarídeos da extração aquosa, foram empregados os procedimentos de purificação descritos a seguir:

A) Processos alternados de congelamento e de degelo.-

O precipitado etanólico (5,18 g) foi solubilizado em água (~ 100 ml), com auxílio de aquecimento, e submetido ao congelamento, seguido por degelo a 4<sup>0</sup>C e posterior centrifugação (10000 rpm, 15 min, temperatura ambiente). Este processo de purificação foi repêtido diversas vezes, até que o sobrenadante não formasse resíduo por congelamento e degelo e o resíduo, após tentativa de solubilização em água usando aquecimento, não apresentasse mais polissacarídeos solúveis em água fria, que fossem detectados pelo teste do fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>32</sup> e estivessem contaminando este material.

O resíduo resultante da purificação por congelamento e por degelo do extrato aquoso não foi investigado no presente trabalho. Já o sobrenadante foi submetido a outro processo de fracionamento pelo emprego de solução de Fehling.<sup>75</sup>

B) Precipitação com solução de Fehling.-

Ao sobrenadante da etapa anterior, concentrado a pequeno volume (50 ml), foi adicionado igual quantidade de solução de Fehling,<sup>5</sup> havendo a formação de precipitado. Após centrifugação (10000 rpm, 15 min, temperatura ambiente), o sobrenadante de Fehling foi neutralizado com AcOH glacial, à temperatura de 0-2<sup>0</sup>C, dialisado contra água corrente, e então deionizado com resinas catiônica e aniônica. Já o precipitado de Fehling

foi lavado sucessivamente com solução aquosa de KOH a 2% (3 vezes) e com metanol (3 vezes), seguido pela decomposição do complexo cúprico insolúvel, por agitação, numa suspensão aquosa de resina catiônica, durante no mínimo 20 min, para então ser filtrado. Este fracionamento foi repetido diversas vezes, até que o sobrenadante não mostrasse mais precipitação pela adição de solução de Fehling e o precipitado não revelasse mais a presença de polissacarídeos solúveis em solução de Fehling, que fossem detectados pelo teste do fenol- $H_2SO_4$ .<sup>32</sup>

O sobrenadante de Fehling foi liofilizado, fornecendo um produto de 0,98 g, correspondente a 3,91 g% do peso de líqüem original. Já o precipitado de Fehling foi submetido a outro procedimento de purificação pelo uso de um sal de amônio quaternário, ou seja, brometo de hexadeciltrimetilamônio (Cetavlon).

#### C) Precipitação com Cetavlon.-

Uma solução aquosa do precipitado de Fehling (15 ml) foi submetida ao processo de fracionamento com sal de amônio quaternário, em diferentes concentrações hidrogeniônicas (pH), como descrito por SCOTT<sup>113</sup> e por DUARTE & JONES, na presença de tampão borato.<sup>31</sup>

Em pH 7, houve a formação de precipitado, que foi decomposto com solução aquosa de NaCl 4 M e o polissacarídeo da solução resultante foi precipitado em excesso de etanol. Este processo de dissolução em solução de eletrólito e precipitação em etanol foi repetido mais duas vezes e o resíduo obtido (0,01 g) forneceu rendimento de 0,05 g% em relação ao peso de líqüem original.

O sobrenadante de pH 7 foi tratado com tampão borato a 3%, pH 8,5, e o precipitado obtido na forma de complexo polis-

sacarídico boratado com base quaternária foi descomplexado com solução aquosa de AcOH 2 M. A solução resultante foi adicionada em excesso de etanol e o precipitado, após mais dois procedimentos de dissolução em AcOH e precipitação em etanol, forneceu um produto de 0,12 g (0,49 g%).

O sobrenadante de pH 8,5 foi tratado com solução aquosa de NaOH a 40% para ajustar o pH até 12, e como não houve formação de precipitado, foi neutralizado com solução aquosa de AcOH 2 M, à temperatura de 0-2°C, concentrado a pequeno volume e adicionado em excesso de etanol. O precipitado obtido após centrifugação (10000 rpm, 15 min, temperatura ambiente) foi submetido ainda a dois tratamentos de dissolução em AcOH e precipitação em etanol, como realizado para o polissacarídeo de pH 8,5, fornecendo um produto de 0,004 g (0,017 g%).

#### 2.2.1.1.4. EXTRAÇÃO ALCALINA

A outra parte do líqüem residual das extrações benzeno-etanol e metanol-água (20,05 g) foi tratada com solução aquosa de KOH a 2% (~ 500 ml), a 100°C, durante aproximadamente 2 horas. Em seguida, o extrato alcalino resultante da filtração, a quente, foi neutralizado com AcOH glacial, à temperatura de 0-2°C, concentrado a pequeno volume (140 ml), e os polissacarídeos foram precipitados em excesso de etanol. O precipitado etanólico obtido, após centrifugação (2500 rpm, 20 min, 10°C), forneceu um produto de 8,23 g, o qual correspondeu a 32,91 g% do peso de líqüem original.

Com o objetivo de fracionar os polissacarídeos da extração alcalina, foram utilizados os seguintes procedimentos de purificação:

A) Processos alternados de congelamento e de degelo.-

O precipitado etanólico (8,23 g) foi solubilizado em água (~ 150 ml), com auxílio de aquecimento, e submetido a processos de purificação por congelamento, seguido por degelo a 4<sup>o</sup>C, com posterior centrifugação (10000 rpm, 15 min, temperatura ambiente), de maneira análoga ã purificação realizada para o precipitado etanólico da extração aquosa.

O resíduo resultante da purificação por congelamento e por degelo do extrato alcalino não foi investigado no presente trabalho. Já o sobrenadante foi submetido a outro processo de fracionamento pelo emprego de solução de Fehling.<sup>75</sup>

#### B) Precipitação com solução de Fehling.-

Ao sobrenadante da etapa anterior (100 ml) foi adicionado igual quantidade de solução de Fehling,<sup>5</sup> havendo a formação de precipitado. Após centrifugação (10000 rpm, 15 min, temperatura ambiente), o sobrenadante e o precipitado de Fehling foram tratados de forma idêntica ã realizada para a purificação daqueles da extração aquosa.

O sobrenadante de Fehling foi liofilizado, fornecendo um produto de 0,76 g, correspondente a 3,06 g% do peso de lí-quem original, enquanto que o precipitado de Fehling foi submetido a outro procedimento de purificação pelo uso de Cetavlon.<sup>31,113</sup>

#### C) Precipitação com Cetavlon.-

Uma solução aquosa do precipitado de Fehling (30 ml) foi submetida ao processo de fracionamento usando sal de amônio quaternário, em diferentes concentrações hidrogeniônicas (pH), como aquele realizado para o precipitado de Fehling da extração aquosa.

Em pH 7 foi obtida uma fração de 0,03 g (0,12 g% do

peso de líquido original), em pH 8,5, de 0,87 g (3,48 g%) e em pH 12, o produto resultante foi de 0,02 g (0,09 g%).

#### 2.2.1.2. Segunda série de etapas de extração

##### 2.2.1.2.1. EXTRAÇÃO BENZENO-ETANOL

O líquido devidamente seco, limpo e pulverizado (5 g) foi deslipidificado com solução de benzeno-etanol (9:1, v/v, ~ 100 ml), sob agitação, em Erlenmeyer fechado, à temperatura ambiente, durante 18 horas. Após centrifugação (3000 rpm, 15 min, temperatura ambiente), o sobrenadante benzeno-etanólico foi reservado, enquanto que o líquido residual foi seco à temperatura ambiente, durante aproximadamente 7 horas, para ser submetido ao próximo processo extrativo.

##### 2.2.1.2.2. EXTRAÇÃO COM DIMETIL-SULFÓXIDO

O material remanescente da extração benzeno-etanol (4,59 g) foi tratado com DMSO<sup>52</sup> (100 ml), sob agitação, em Erlenmeyer fechado, à temperatura ambiente, durante 89 horas. Após filtração por algodão, o filtrado foi centrifugado (3000 rpm, 10 min, temperatura ambiente) para remover partículas finas e os polissacarídeos foram precipitados em excesso de etanol. O precipitado etanólico obtido por filtração em sistema de Büchner e Kitazato forneceu um produto de 0,26 g, o qual correspondeu a 5,20 g% do peso de líquido original.

#### 2.2.2. Isolamento de carboidratos de baixo peso molecular e de polissacarídeos do líquido N. aurantiaco-ater

O líquido foi submetido à duas séries diferentes de eta

pas de extração, para a obtenção dos carboidratos de baixo peso molecular e dos polissacarídeos presentes nesta entidade simbiótica.<sup>6,7,69</sup>

#### 2.2.2.1. Primeira série de etapas de extração

##### 2.2.2.1.1. EXTRAÇÃO BENZENO-ETANOL

O líqüem devidamente seco, limpo e pulverizado (50 g) foi deslipidificado com mistura de benzeno-etanol (9:1, v/v, 350 ml), sob refluxo, durante aproximadamente 4 horas. Após filtração por algodão, a quente, o extrato benzeno-etanólico foi reservado, enquanto que o líqüem residual foi seco em estufa a 50°C, durante a noite, para ser submetido ao próximo processo extrativo.

##### 2.2.2.1.2. EXTRAÇÃO METANOL-ÁGUA

O material remanescente da extração benzeno-etanol (49,46 g) foi tratado com metanol-água (4:1, v/v, 350 ml), sob refluxo, durante 6 horas, com posterior filtração por algodão, a quente. O extrato metanol-aquoso resultante foi concentrado à secura e o resíduo no balão de evaporação foi parcialmente solubilizado em água. Após centrifugação (3000 rpm, 15 min, temperatura ambiente), o resíduo não foi investigado adicionalmente, enquanto que o sobrenadante foi deionizado com resinas catiônica e aniônica. O filtrado obtido após dessalificação foi liofilizado, fornecendo um produto de 1,47 g, que correspondeu a 2,94 g% do peso de líqüem original.

Com o objetivo de fracionar os carboidratos de baixo peso molecular presentes no extrato metanol-aquoso dessalificado foi realizada cromatografia de partição em coluna de celulo

se, como descrito a seguir.

## FRACIONAMENTO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE CELULOSE

A montagem da coluna de celulose, bem como a preparação e a aplicação da amostra, foram feitas de acordo com WHISTLER & BeMILLER,<sup>137</sup> e GARDELL.<sup>38</sup> O pó de celulose (Grau Padrão Whatman CF-11), após ter sido lavado com água e seco em estufa a 50°C, foi suspenso em acetona e compactado em coluna cromatográfica (60 x 3,2 cm d.i.). O leito de celulose (altura do leito = 49 cm; volume do leito = 394,08 cm<sup>3</sup>) foi então lavado com 500 ml de acetona e a seguir uma amostra do extrato metanol-aquoso dessalificado foi aplicada (1,18 g), de forma que a altura de celulose atingiu ~ 55 cm, correspondendo a um volume de leito igual a 442,34 cm<sup>3</sup>. A eluição foi inicialmente realizada com acetona (500 ml), seguida por soluções de acetona-água (v/v) nas proporções de 7:1 (3000 ml), 4:1 (1500 ml), 3:1 (1500 ml) e finalmente água (1000 ml), sendo o volume das frações coletadas igual a 200 ml. Com o decorrer das eluições, as frações foram concentradas a pequeno volume para serem cromatografadas em papel - técnica descendente, solvente B, 48 horas, visualizador: nitrato de prata sódico.<sup>133</sup>

O fracionamento de extrato metanol-aquoso por cromatografia em coluna de celulose forneceu quatro componentes, sendo três eluídos por acetona-água 7:1 com  $R_{Ga1}^1$  1,44 (1065,71 mg - 2,66 g% do peso de líquido original),  $R_{Ga1}^2$  1,11 (61,60 mg - 0,15 g%) e  $R_{Ga1}^3$  0,95 (25,60 mg - 0,06 g%) e um eluído por acetona-água 4:1 com  $R_{Ga1}^4$  0,38 (24,20 mg - 0,06 g%).

### 2.2.2.1.3. EXTRAÇÃO AQUOSA

O líqüem residual das extrações benzeno-etanol e metanol-água (44,92 g) foi tratado com água (1800 ml), a 100°C, durante aproximadamente 6 horas. Após este período de extração, o resíduo liquênico resultante da filtração por algodão, a quente, foi submetido a mais três processos extrativos nas mesmas condições. Os filtrados foram combinados e concentrados (~ 1000 ml), para precipitação dos polissacarídeos em excesso de etanol. Pela filtração em sistema de Büchner e Kitazato foi obtido um precipitado etanólico (25,60 g), que forneceu rendimento de 51,20 g% do peso de líqüem original, enquanto que o sobrenadante etanólico foi reservado.

Com a finalidade de fracionar os polissacarídeos presentes no extrato aquoso foram utilizados os seguintes procedimentos de purificação:

A) Processos alternados de congelamento e de degelo.-

A maior parte do precipitado etanólico (20,90 g) foi parcialmente solubilizado em água (~ 400 ml), com auxílio de aquecimento, e submetido ao congelamento, seguido por degelo à temperatura ambiente e posterior centrifugação (3000 rpm, 25 min, temperatura ambiente). Este processo de purificação foi repetido mais oito vezes, fornecendo um resíduo de 11,03 g, o qual correspondeu a 27,02 g% do peso de líqüem original, e um sobrenadante, que foi submetido à precipitação com solução de Fehling.<sup>75</sup>

B) Precipitação com solução de Fehling.-

Ao sobrenadante da etapa anterior (100 ml) foi adicionado igual quantidade de solução de Fehling,<sup>5</sup> havendo a formação de precipitado. Após centrifugação (3000 rpm, 20 min, tempera-



tura ambiente), o sobrenadante de Fehling foi neutralizado com AcOH glacial, à temperatura de 0-2°C, dialisado contra água corrente e então deionizado com resinas catiônica e aniônica. Já o precipitado de Fehling foi lavado sucessivamente com solução aquosa de KOH a 2% (3 vezes) e com metanol (3 vezes), e em seguida foi decomposto, por agitação, numa suspensão aquosa de resina catiônica. Esta purificação foi repetida mais duas vezes, fornecendo um sobrenadante e um precipitado de Fehling de 1,52 g (3,73 g% do peso de líqüem original) e de 0,49 g (1,20 g%), respectivamente.

#### 2.2.2.1.4. EXTRAÇÃO ALCALINA

O líqüem remanescente da extração aquosa (9,40 g) foi tratado com solução aquosa de KOH a 2% (100 ml), a 100°C, durante aproximadamente 2 horas. Em seguida, o extrato alcalino obtido por filtração, a quente, foi neutralizado com AcOH glacial, à temperatura de 0-2°C, e concentrado a pequeno volume (50 ml), para precipitação dos polissacarídeos em excesso de etanol. Após centrifugação (3000 rpm, 15 min, temperatura ambiente), o precipitado etanólico forneceu um produto de 2,66 g, o qual correspondeu a 5,32 g% do peso de líqüem original.

#### 2.2.2.2. Segunda série de etapas de extração

##### 2.2.2.2.1. EXTRAÇÃO BENZENO-ETANOL

O líqüem devidamente seco, limpo e pulverizado (7,95 g) foi deslipidificado com mistura de benzeno-etanol (9:1, v/v, ~ 150 ml), sob agitação, em Erlenmeyer fechado, à temperatura ambiente, durante 16 horas. Após filtração por algodão, o sobrenadante benzeno-etanólico foi reservado, enquanto que o líqüem residual foi seco à temperatura ambiente, durante a noite,

para ser submetido ao próximo processo extrativo.

#### 2.2.2.2.2. EXTRAÇÃO COM DIMETIL-SULFÓXIDO

O material remanescente da extração benzeno-etanol (7,72 g) foi tratado com DMSO<sup>52</sup> (150 ml), sob agitação, em Erlenmeyer fechado, à temperatura ambiente, durante 87 horas. Após filtração por algodão, o filtrado foi centrifugado (3000 rpm, 15 min, temperatura ambiente) e os polissacarídeos foram precipitados em excesso de etanol. O precipitado etanólico obtido por filtração em sistema de Büchner e Kitazato forneceu um produto de 2,42 g, o qual correspondeu a 30,40 g% do peso de líquido original.

#### 2.2.3. Isolamento de polissacarídeo do líquido A. muehlenbergii

##### 2.2.3.1. EXTRAÇÃO BENZENO-ETANOL SEGUIDA POR EXTRAÇÃO COM DIMETIL-SULFÓXIDO

O líquido (3 g), previamente extraído com benzeno-etanol, foi agitado com DMSO<sup>52</sup> (60 ml), em Erlenmeyer fechado, à temperatura ambiente, por 72 horas. Após filtração por algodão, o polissacarídeo foi precipitado em excesso de etanol. O precipitado etanólico obtido por filtração em sistema de Büchner e Kitazato forneceu rendimento correspondente a 38,00 g% do peso de líquido original.

### 3. ANÁLISE ESTRUTURAL DOS CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR E DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DOS LIQUENS EM ESTUDO

#### 3.1. COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS DOS CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR E DOS POLISSACARÍDEOS

##### 3.1.1. Hidrólise ácida total

Amostras de carboidratos (1 a 5 mg) foram tratadas com solução aquosa de TFA<sup>19,64</sup> 2 M (~ 2 ml), durante 8 horas, a 100°C, especialmente para a hidrólise de heteropolissacarídeos (galactomananas), ou com solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>45</sup> 0,5 M (~ 2 ml), durante 18 horas, também a 100°C. Após as hidrólises, o agente catalisador TFA foi removido por concentração à secura e o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por neutralização com carbonato de bário seguida pela remoção dos íons bário com resina catiônica. Os carboidratos hidrolisados foram então dissolvidos em água e cromatografados em papel - técnica ascendente, solvente A, visualizador: nitrato de prata sódico.<sup>133</sup>

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

As misturas de monossacarídeos obtidas dos carboidratos hidrolisados foram reduzidas com NaBH<sub>4</sub>,<sup>114</sup> pH 9 a 10, durante em média 15 horas, à temperatura ambiente. Decorrido este período, as soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica para remoção dos íons sódio. Após filtração por papel, as

soluções foram concentradas à secura e o ácido bórico resultante deste tratamento foi eliminado, na forma de éster volátil borato de metila, por co-destilação com metanol.

Os alditóis obtidos foram então submetidos à acetilação com mistura de anidrido acético e piridina na proporção de 1:1 (v/v, ~ 2 ml), durante 15 horas, à temperatura ambiente.<sup>114,139</sup> Após este intervalo de tempo, o processo de acetilação foi interrompido pela adição de água gelada e os alditóis acetilados foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual foi eliminada da preparação por tratamentos sucessivos com solução aquosa de  $H_2SO_4$  5 mM. Em seguida, a fração clorofórmica foi lavada várias vezes com água destilada, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão. Os acetatos de alditóis resultantes foram analisados por c.f.g. em colunas convencionais preenchidas com ECNSS-M, a  $180^\circ C$ , ou com OV-225, a  $190^\circ C$ .

### 3.2. TESTES DE HOMOGENEIDADE APLICADOS AOS POLISSACARÍDEOS

#### 3.2.1. Eletroforese em acetato de celulose

A eletroforese de polissacarídeos solúveis em água fria [homopolissacarídeos ( $\alpha$ -D-glucanas) e heteropolissacarídeos (galactomananas)] (aproximadamente 10 mg), previamente corados com azul de Procion M-3G (Imperial Chemistry Industry) segundo método descrito por DUDMAN & BISHOP,<sup>33</sup> foi realizada em fitas de acetato de celulose (2 x 12,5 cm), utilizando tampão borato-NaCl 0,05 M, pH 9, nas seguintes condições: 200 V, 30 a 40 mA, 10 min (Fonte: LKB Bromma, modelo 3371E).

### 3.2.2. Filtração em géis de Sepharose 4B-200 e de Sepharose 6B

Amostras de polissacarídeos solúveis em água fria [homopolissacarídeos ( $\alpha$ -D-glucanas) e heteropolissacarídeos (galactomananas)] (aproximadamente 3 mg) foram dissolvidas em 0,5 ml de solução aquosa de NaCl 0,2% e aplicadas em colunas de Sepharose 4B-200 (37,5 x 2 cm) e de Sepharose 6B (25,5 x 1,8 cm). O eluente empregado foi solução aquosa de NaCl 0,2% e o volume das frações coletadas igual a 5 ml.

Para o polissacarídeo insolúvel em água fria [homopolissacarídeo ( $\beta$ -D-glucana) de N. aurantiaco-ater], em que aproximadamente 3 mg de polissacarídeo foram dissolvidas em 0,5 ml de solução aquosa de NaOH 0,3 M, foi utilizado como eluente a referida solução de NaOH e o volume das frações coletadas foi também de 5 ml.

As frações coletadas manualmente foram analisadas para carboidratos totais.<sup>32</sup>

### 3.3. METILAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E DE CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR

#### 3.3.1. Metilação de polissacarídeos originais

Uma amostra de cada polissacarídeo (aproximadamente 20 mg) foi tratada com  $\text{NaBH}_4$ , à temperatura ambiente, durante 15 horas. Após redução, o meio alcalino foi neutralizado com solução aquosa de  $\text{AcOH}$  2 M, à temperatura de 0-2°C e dialisado contra água corrente, durante a noite. A fração não dialisada -

vel foi concentrada à secura e submetida à metilação com sulfato de dimetila em solução alcalina, segundo processo descrito por HAWORTH.<sup>56,61</sup>

Primeiramente, o resíduo no balão de metilação foi dissolvido em 15 ml de solução aquosa de NaOH a 33%. Em seguida, foram feitas dez adições de 0,5 ml de DMS, em intervalos de 15 min, sob agitação constante e à temperatura ambiente. Nas adições de solução aquosa de NaOH a 33% (15 ml) e de DMS (10 vezes 0,5 ml) foram feitas em mais dois dias consecutivos, sendo que no quarto dia, o processo de metilação foi interrompido pelo aquecimento do balão a 100°C, durante 30 min, para decomposição de excesso de DMS. Após resfriamento a 0-2°C, o meio foi neutralizado com AcOH glacial e dialisado contra água corrente durante 72 horas e contra água destilada durante 24 horas. Decorrido este período de diálise, os polissacarídeos parcialmente metilados foram liofilizados e submetidos ao tratamento com óxido de prata e iodeto de metila, de acordo com o método descrito por PURDIE e modificado por KUHN et al.<sup>61,77</sup>.

O material liofilizado foi dissolvido em 2 ml de dimetil-formamida. No primeiro dia de metilação, foram adicionados 2 ml de iodeto de metila e 1 g de óxido de prata, porém nos dois dias seguintes, foi apenas feita adição de 1 g de óxido de prata. Durante estes três dias, o sistema de reação foi mantido sob agitação constante, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após este período, o processo foi interrompido pela extração exaustiva do material metilado com diclorometano. Os polissacarídeos permetilados foram convertidos em seus respectivos acetatos de alditóis e o heteropolis-

sacarídeo (galactomanana) isolado por extração alcalina de St. ramulosum foi também derivatizado para acetatos de metil glicósídeos, como descrito no item 3.3.3..

### 3.3.2. Metilação de polissacarídeos e de oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida parcial e por acetólise parcial de heteropolissacarídeos (galactomananas) originais

Uma amostra de cada componente (3 a 8 mg) foi apenas metilada pelo processo de PURDIE modificado por KUHN et al.<sup>61,77</sup>, como descrito anteriormente. Os produtos metilados foram então extraídos com diclorometano e derivatizados para seus respectivos acetatos de alditóis, como descrito a seguir.

### 3.3.3. Análise dos produtos de hidrólise ácida de polissacarídeos e de oligossacarídeos metilados

#### 3.3.3.1. Na forma de acetatos de alditóis

Uma amostra de polissacarídeo ou de oligossacarídeo metilado (2 a 10 mg) foi dissolvida em solução aquosa de  $H_2SO_4$  a 72% (0,5 ml) e após 1 hora, à temperatura de 0-2°C, foram adicionados 4 ml de água, sendo a solução resultante mantida a 100°C, por 18 horas.<sup>15</sup> O agente catalisador foi eliminado com carbonato de bário e o filtrado límpido deionizado com resina catiônica. Após filtração, a solução foi concentrada a pequeno volume e tratada com  $NaBH_4$ , durante 15 horas, à temperatura ambiente. Decorrido o período de redução, os íons sódio foram e-

eliminados da preparação pelo tratamento com resina catiônica e o ácido bórico formado foi removido por co-destilação com metanol. A acetilação dos alditóis parcialmente metilados foi realizada pelo método convencional com anidrido acético e piridina na proporção de 1:1, e os acetatos de alditóis resultantes foram analisados por c.f.g. em colunas convencionais de ECNSS-M, a 160°C, ou de OV-225, a 170°C, e por c.f.g.-e.m. em colunas capilares preenchidas com OV-225 e OV-17 3:1 ou com DB-210, ambas à temperatura de 50 a 220°C.

### 3.3.3.2. Na forma de acetatos de metil glicosídeos

Aproximadamente 7 mg do heteropolissacarídeo (galactomanana) isolado por extração alcalina de St. ramulosum e metilado foram dissolvidas em solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% (0,5 ml) e após 1 hora, à temperatura de 0-2°C, foram adicionados 4 ml de água, sendo a solução resultante mantida a 100°C, por 18 horas.<sup>15</sup> Decorrido este período, a solução foi neutralizada com carbonato de bário, filtrada e concentrada à secura, e os monossacarídeos parcialmente metilados foram extraídos com metanol. A solução metanólica foi então concentrada à secura e o resíduo, tratado com solução de HCl em metanol a 5% (3 ml), sob refluxo, por 2 horas.<sup>45,81</sup> Após adição de carbonato de prata para eliminação do ácido na forma de cloreto de prata, os metil glicosídeos parcialmente metilados foram extraídos com acetona e submetidos à acetilação convencional com anidrido acético e piridina. Os acetatos de metil glicosídeos foram então analisados por c.f.g. em coluna convencional preenchida com OV-225, a



170°C.

3.4. CONSUMO DE PERIODATO DE SÓDIO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO PELO HETEROPOLISSACARÍDEO (GALACTOMANANA) ISOLADO POR EXTRAÇÃO ALCALINA DE St. ramulosum

Uma amostra de polissacarídeo (50 mg) foi oxidada com solução aquosa de  $\text{NaIO}_4$  0,05 M (50 ml), durante 96 horas, à temperatura ambiente, e na ausência de luz.<sup>6,57, 93</sup>

3.4.1. Consumo de meta-periodato de sódio

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

3.4.2. Produção de ácido fórmico

Já a produção de ácido fórmico foi determinada por titulação de alíquotas de 5 ml, retiradas no final da oxidação, com solução aquosa de NaOH 0,01 N, devidamente padronizada, e utilizando solução alcoólica de fenolftaleína a 1 g% como indicador.

### 3.5. DEGRADAÇÃO TIPO SMITH DE POLISSACARÍDEOS

#### 3.5.1. Polissacarídeos solúveis em água fria [ homopolissacarídeos ( $\alpha$ -D-glucanas) e heteropolissacarídeo (galactomanana) isolado por extração alcalina de St. ramulosum ]<sup>1,68</sup>

Uma amostra de cada polissacarídeo (20-50 mg\*) foi oxidada com solução aquosa de  $\text{NaIO}_4$  0,05 M (25-50 ml\*), durante 96 horas, à temperatura ambiente, e na ausência de luz. O excesso de agente oxidante foi decomposto pela adição de etileno glicol (1-2 ml\*) e a solução oxidada foi dialisada contra água corrente por 2 dias. Após diálise, a solução contendo o polialdeído foi tratada com  $\text{NaBH}_4$ , durante 15 horas, à temperatura ambiente. O excesso de agente redutor foi decomposto pela adição cuidadosa de solução aquosa de  $\text{AcOH}$  2 M até pH 6, à temperatura de 0-2°C, e a solução reduzida foi dialisada contra água corrente, durante 3 dias. A fração não dialisável foi concentrada à secura e submetida à hidrólise com solução aquosa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M (~ 8 ml), durante 7 horas, a 100°C. Decorrido este período de hidrólise, o meio ácido foi neutralizado com carbonato de bário e, após filtração por papel, deionizado com

\* Como vários polissacarídeos, tanto homo quanto heteropolissacarídeos, foram submetidos à degradação tipo Smith e as quantidades de amostras empregadas foram diferentes, foi adotada a seguinte apresentação gráfica: (20-50 mg), (25-50 ml) e (1-2 ml), significando que para 20 mg de polissacarídeo foram utilizados 25 ml de  $\text{NaIO}_4$  e posteriormente, 1 ml de etileno-glicol, enquanto que para 50 mg de polissacarídeo foram correspondentes 50 ml de  $\text{NaIO}_4$  e 2 ml de etileno-glicol. Observar que esta apresentação gráfica foi também adotada nas metodologias descritas adiante.

resina catiônica. O material hidrolisado foi então reduzido com  $\text{NaBH}_4$ , à temperatura ambiente, durante 15 horas, tratado com resina catiônica e o ácido bórico resultante, removido por co-distilação com metanol. Os alditóis obtidos foram acetilados com anidrido acético e piridina e posteriormente, os acetatos de alditóis foram analisados por c.f.g. em colunas convencionais de ECNSS-M, à temperatura de 130 a 180°C (4°C/min), ou de OV-225, à temperatura de 150 ou 170 a 190°C.

### 3.5.2. Polissacarídeo insolúvel em água fria [homopolissacarídeo ( $\beta$ -D-glucana) de N. aurantiaco-ater]<sup>135</sup>

Uma amostra do polímero (50 mg) foi dissolvida em solução aquosa de  $\text{NaOH}$  1 M (7 ml) e, em seguida, o pH do meio foi ajustado para 6,0 com solução aquosa de  $\text{HCl}$  0,5 M (12 ml). O volume foi então completado para 25 ml com água (6 ml) e a solução resultante foi tratada com solução aquosa de  $\text{NaIO}_4$  0,1 M (25 ml), durante 96 horas, à temperatura ambiente, sob agitação constante e na ausência de luz. A oxidação foi interrompida pela adição de etileno-glicol (2 ml) e a solução, dialisada e então reduzida com  $\text{NaBH}_4$ , durante 15 horas, à temperatura ambiente. Após redução, o meio foi neutralizado com solução aquosa de  $\text{AcOH}$  2 M, à temperatura de 0-2°C, e a solução reduzida foi dialisada e liofilizada. O produto de liofilização foi submetido à hidrólise com ácido fórmico a 90% (5 ml), durante 6 horas, a 100°C. O agente catalisador foi removido por evaporação sob pressão reduzida e o resíduo, lavado duas vezes com água, foi tratado com solução aquosa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,25 M (5 ml),

durante 17 horas, a 100°C. O material hidrolisado resultante foi convertido aos correspondentes acetatos de alditóis, como descrito anteriormente, e analisado por c.f.g. em coluna convencional de OV-225, à temperatura de 170 a 190°C.

### 3.6. DEGRADAÇÃO DE SMITH BRANDA DE POLISSACARÍDEOS

#### 3.6.1. Polissacarídeos solúveis em água fria [homopolissacarídeos (α-D-glucanas) e heteropolissacarídeo (galactomanana) isolado por extração alcalina St. ramulosum ]<sup>6,7,45</sup>

Uma amostra de cada polissacarídeo (50-100 mg) foi oxidada com solução aquosa de NaIO<sub>4</sub> 0,05 M (50-100 ml), durante 96 horas, à temperatura ambiente, e na ausência de luz. O excesso de agente oxidante foi decomposto pela adição de etileno-glicol (2-3 ml) e a solução oxidada foi reduzida e dialisada como descrito no item 3.5.1.. A fração não dialisável foi concentrada a pequeno volume (20 a 40 ml) e o poliol foi parcialmente hidrolisado em pH 2,0 (pH ajustado com solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M), durante 40 min, a 100°C. Após hidrólise ácida parcial, o meio foi neutralizado com carbonato de bário e deionizado com resina catiônica, sendo a solução resultante concentrada a pequeno volume e cromatografada em papel - técnica ascendente, visualizadores: nitrato de prata sódico<sup>133</sup> e cloridrato de p-anisidina.<sup>63</sup> Para os homopolissacarídeos (α-D-glucanas) foi empregado solvente A, enquanto que para o heteropolissacarídeo (galactomanana), solvente C.

## ANÁLISE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE SMITH BRANDA

Com o objetivo de elucidar e comparar os produtos de de gradação obtidos dos homopolissacarídeos ( $\alpha$ -D-glucanas) em es tudo, foram também submetidas à degradação de Smith branda, nas condições descritas anteriormente, a isoliquenana do líquem C. islandica<sup>7,45</sup> e a  $\alpha$ -D-glucana obtida por extração aquosa do líquem St. ramulosum.<sup>6,7</sup>

Já para o fracionamento dos produtos de degradação de Smith branda do heteropolissacarídeo (galactomanana) isolado por extração alcalina de St. ramulosum foi realizada cromato - grafia em camada delgada, como descrito em métodos cromatogrâ - ficos item 1.1.2.. Após desenvolvimento do cromatograma, as â - reas contendo os produtos de degradação, localizados pela vi - sualização dos mesmos em tira paralela, foram cortadas e os carboidratos eluídos com água. Os eluatos foram então concen - trados a pequeno volume e cromatografados em papel - técnica ascendente, solvente C, visualizadores: nitrato de prata sôdi - co<sup>133</sup> e cloridrato de p-anisidina.<sup>63</sup> O fracionamento por c.c.d. dos produtos de degradação deste heteropolissacarídeo forneceu três componentes com  $R_{Man}^1$  1,41,  $R_{Man}^2$  1,20 e  $R_{Man}^3$  0,95.

### 3.6.2. Polissacarídeo insolúvel em água fria [homopolissa - carídeo ( $\beta$ -D-glucana) de N. aurantiaco-ater ]<sup>135</sup>

Uma amostra do polímero (100 mg) foi dissolvida em so - lução aquosa de NaOH 1 M (13 ml) e, em seguida, o pH do meio foi ajustado para ~ 6,0 com solução aquosa de HCl 0,5 M (24

ml). O volume foi então completado para 50 ml com água (13 ml) e a solução resultante foi tratada com solução aquosa de  $\text{NaIO}_4$  0,1 M (50 ml), durante 96 horas, à temperatura ambiente, sob agitação constante e na ausência de luz. A oxidação foi interrompida pela adição de etileno-glicol (3 ml) e a solução, reduzida, dialisada e liofilizada, como descrito no item 3.5.2.. O produto de liofilização foi tratado com solução aquosa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05 M (20 ml), durante 24 horas, sob agitação constante e à temperatura ambiente. Decorrido este período de hidrólise, o meio foi neutralizado com carbonato de bário e após filtração, a solução foi deionizada com resina catiônica e cromatografada em papel - técnica ascendente, solvente A, visualizadores: nitrato de prata sódico e cloridrato de p-anisidina.

### 3.7. PESQUISA DE AMIDO (AMILOSE) EM HOMOPOLISSACARÍDEOS ( $\alpha$ -D-GLUCANAS)

Uma amostra de cada polissacarídeo (1 mg) foi dissolvida em água (0,5 ml) e a solução resultante foi adicionada, gota a gota, solução aquosa de iodo 0,5 mM, com a finalidade de observar se haveria ou não o desenvolvimento de coloração azul esverdeada.<sup>18</sup>

Paralelamente, duas amostras de amido (Reagen PA-ACS), ambas de 1 mg, foram dissolvidas em 0,5 e 2 ml de água e, em seguida, testadas frente à solução de iodo, mostrando o aparecimento de coloração azul.

### 3.8. TRATAMENTO DE HETEROPOLISSACARÍDEOS (GALACTOMANANAS) COM ENZIMA GALACTOSE OXIDASE

Uma amostra de cada polissacarídeo (~ 2 mg) foi hidrolisada com solução aquosa de TFA<sup>19,64</sup> 2 M (~ 2 ml), durante 8 horas, a 100°C. O agente catalisador foi removido por concentração à secura e o resíduo, lavado três vezes com água, foi rediluído em água e utilizado para a determinação quantitativa de carboidratos totais,<sup>32</sup> para a análise por c.f.g., na forma de acetatos de alditóis, em coluna convencional de OV-225, a 190°C, e como substrato para a enzima galactose oxidase.

O tratamento dos heteropolissacarídeos (galactomananas) com enzima galactose oxidase foi realizado de acordo com o método descrito por AMARAL et al.<sup>3</sup>. O sistema de incubação (volume total de 2,6 ml) continha 1,0-1,5 ml do reagente cromógeno (mistura de o-dianisidina e peroxidase), 1,5-1,0 ml da solução de material hidrolisado (40 a 55 µg de carboidrato total/ml de solução) e 0,1 ml da solução de enzima, preparada e purificada em conformidade com os procedimentos descritos no referido trabalho de AMARAL et al.. A incubação foi mantida por 60 min, a 30°C, e após este período, a absorbância foi lida a 420 nm, sendo utilizado como padrão solução aquosa de D-galactose.

### 3.9. PESQUISA DE AÇÚCARES AMINADOS EM HETEROPOLISSACARÍDEOS (GALACTOMANANAS)

Uma amostra de cada polissacarídeo (10 mg) foi submeti-

da à hidrólise com solução aquosa de HCl 6 M, a 100°C, durante dois intervalos de tempo, ou seja, 5 e 10 horas.<sup>2,121</sup> Após hidrólise, o agente catalisador foi removido por concentração à secura, e sucessivas lavagens do resíduo com água foram feitas para eliminação total do ácido residual. Cada amostra, rediluída em água a um volume adequado, foi analisada por c.p. - técnica descendente, ~ 85 horas, solvente A, visualizado - res: nitrato de prata sódico<sup>133</sup> e ninidrina.<sup>132</sup>

### 3.10. HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE HETEROPOLISSACARÍDEOS (GALACTOMANANAS)

Uma amostra de cada polissacarídeo (100-200 mg) foi tratada com solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,16 M (10-20 ml), por 18 horas, a 100°C.<sup>45,50</sup> O material hidrolisado foi neutralizado com carbonato de bário e deionizado com resina catiônica. Após concentração a pequeno volume, a solução foi adicionada em excesso de etanol e então centrifugada (3000 rpm, ~ 10 min, temperatura ambiente). O sobrenadante etanólico, concentrado à secura, e o precipitado etanólico foram liofilizados.

O sobrenadante e o precipitado etanólicos obtidos pela hidrólise ácida parcial da galactomanana isolada por extração aquosa do líqüem St. ramulosum forneceram, respectivamente, produtos de 78,8 mg e 10,7 mg (10,7%), enquanto que os da galactomanana isolada por extração alcalina do mesmo líqüem resultaram em 69,7 mg e 30,5 mg (15,3%), respectivamente. Já os produtos relacionados à galactomanana do líqüem N. aurantiacater foram de 81,2 mg para o sobrenadante etanólico e de 3,9



mg (3,9%) para o precipitado etanólico.

3.11. ACETÓLISE PARCIAL DO HETEROPOLISSACARÍDEO (GALACTOMANA) ISOLADO POR EXTRAÇÃO ALCALINA DE *St. ramulosum*<sup>45,78</sup>

3.11.1. Acetólise

Uma amostra do polissacarídeo (243,5 mg) foi adicionada em mistura de AcOH glacial (7,5 ml), anidrido acético (7,5 ml) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (0,75 ml). Durante o processo, a mistura de reação foi mantida à temperatura ambiente, e após 5 dias, foi decantada. A fração solúvel foi adicionada em água gelada (100 ml) e mantida a 4°C, por aproximadamente 3 horas. Os carboidratos acetilados foram extraídos com clorofórmio (200 ml) e a fração clorofórmica foi lavada com mais água destilada (200 ml), em seguida, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão. Após evaporação do solvente, a mistura de carboidratos acetilados foi liofilizada (394,6 mg).

3.11.2. Desacetilação

Os carboidratos acetilados (394,6 mg) foram dissolvidos em mistura de clorofórmio (20 ml) e metanol (10 ml) e desacetilados pela adição de solução metanólica de metóxido de sódio 0,124 M (10 ml). Após repouso por 1 hora, à temperatura ambiente, foi adicionado AcOH glacial para neutralização do meio alcalino e a solução neutralizada foi concentrada à secura. O resíduo no balão de evaporação foi então dissolvido em água, deionizado com mistura de resinas catiônica e aniônica na propor-

ção de ~ 3:1 e liofilizado (200,3 mg).

### 3.11.3. Análise dos produtos de acetólise parcial

O fracionamento dos produtos de acetólise parcial da galactomanana isolada por extração alcalina do líqüem St. ramulosum foi realizado por cromatografia de partição em coluna de celulose.

A montagem da coluna de celulose, bem como a preparação e a aplicação da amostra, foram feitas de acordo com WHISTLER & BeMILLER<sup>137</sup> e GARDELL.<sup>38</sup> O pó de celulose (Grau Padrão Whatman CF-11), após ter sido lavado com água e seco em estufa a 50°C, foi suspenso em acetona e compactado em coluna cromatográfica (60 x 3,2 cm d.i.). O leito de celulose (altura do leito = 44,5 cm; volume de leito = 357,89 cm<sup>3</sup>) foi então lavado com 500 ml de acetona e a seguir, a amostra de carboidratos desacetilados (200,3 mg) foi aplicada, de modo que a altura de celulose alcançou 49,7 cm, correspondendo a um volume de leito igual a 399,71 cm<sup>3</sup>. A eluição foi realizada com soluções de acetona-água (v/v) nas proporções de 9:1 (2000 ml), 4:1 (1000 ml), 3:1 (1000 ml), 2:1 (1000 ml) e finalmente água (1000 ml), sendo o volume das frações coletadas igual a 250 ml. Com o decorrer da eluições, as frações foram concentradas a pequeno volume e cromatografadas em papel - técnica descendente, 72 horas, solvente B, visualizador: nitrato de prata amoniacal.<sup>100</sup>

O fracionamento por cromatografia em coluna de celulose dos produtos de acetólise parcial deste heteropolissacarídeo forneceu basicamente quatro frações, sendo duas eluídas por acetona-água 9:1 com  $R_{Man}^1$  1,00 e  $R_{Man}^2$  0,70 e as outras duas eluídas por acetona-água 4:1 com  $R_{Man}^3$  0,44 (16,1 mg) e  $R_{Man}^4$

0,43 (24,4 mg).

3.12. HIDRÓLISE ÁCIDA, COM LIBERAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO, DO HOMOPOLISSACARÍDEO (  $\beta$ -D-GLUCANA) DE A. muehlenbergii

Uma amostra do polissacarídeo (100 mg) foi hidrolisada com solução aquosa de  $H_2SO_4$  0,5 M (13 ml), a  $100^\circ C$ , por 18 horas.<sup>45</sup> O material hidrolisado foi então submetido à destilação fracionada, sendo a primeira fração do destilado utilizada para a análise por c.f.g. em coluna convencional preenchida com Porapak Q, a  $201^\circ C$ .<sup>96,97</sup>

Paralelamente, uma solução aquosa de AcOH 0,3 M foi também submetida à co-destilação fracionada e o destilado foi analisado por c.f.g., nas condições descritas acima.

Posteriormente, ambos os destilados foram neutralizados com solução aquosa de NaOH 0,1 M e submetidos às análises por r.m.n.- $^{13}C$  e por r.m.n.- $^1H$ , como mencionadas em métodos espectroscópicos item 1.2..

3.13. LOCALIZAÇÃO DE GRUPOS O-ACETÍLICOS NO HOMOPOLISSACARÍDEO (  $\beta$ -D-GLUCANA) DE A. muehlenbergii<sup>13,14,21</sup>

3.13.1. Tratamento do polissacarídeo com fenilisocianato

Uma amostra do polissacarídeo (69,2 mg), seco a vácuo sob atmosfera de pentóxido de fósforo, foi dissolvida em DMSO anidro (10 ml) e tratada com FIS (1,5 ml), inicialmente à temperatura ambiente, durante ~ 15 horas e posteriormente a  $50^\circ C$ ,

durante 4 horas. A solução foi então resfriada e centrifugada (10000 rpm, 15 min, temperatura ambiente) para remoção de partículas finas. O sobrenadante foi adicionado em excesso de metanol e após centrifugação (10000 rpm, 15 min, temperatura ambiente), o precipitado foi lavado uma vez com metanol e duas vezes com éter etílico. Em seguida, o precipitado foi seco a vácuo sob atmosfera de pentóxido de fósforo e submetido novamente ao tratamento com FIS, nas condições descritas acima.

### 3.13.2. Desacetilação e metilação simultâneas do polissacarídeo fenilcarbamato

A amostra do polissacarídeo resultante do tratamento anterior (164,8 mg) foi dissolvida em tetraidrofurano anidro (~10 ml), contendo NaOH pulverizado e seco (1 g). O sistema foi mantido sob agitação constante e três adições de DMS (0,5 ml) foram feitas em intervalos de 30 min. Após ~ 15 horas, à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pelo resfriamento do sistema a 0-2°C, neutralização do meio com solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M e concentração à secura do THF. O polissacarídeo fenilcarbamato metilado foi extraído com clorofórmio, seguido pela desidratação da solução clorofórmica com sulfato de sódio anidro, evaporação do clorofórmio e liofilização do material resultante. Toda a operação foi repetida mais uma vez.

### 3.13.3. Remoção de grupos fenilcarbamoilas do polissacarídeo fenilcarbamato metilado

O polissacarídeo fenilcarbamato metilado obtido anteriormente (243,9 mg) foi dissolvido em DMSO anidro (9 ml) e tra-

tado com hidreto de sódio, sob agitação constante, durante 15 horas, à temperatura ambiente. O íon metil sulfinil carbânion formado em excesso foi decomposto pela adição de água (~ 4 ml) e a solução foi então dialisada contra água destilada, durante 24 horas. A fração não dialisável foi concentrada a pequeno volume e liofilizada (35,8 mg).

#### 3.13.4. Análise dos produtos de hidrólise ácida do polissacarídeo parcialmente metilado

Uma amostra do polissacarídeo parcialmente metilado (~ 10 mg) foi submetida à hidrólise ácida, redução e acetilação, como descrito em análise dos produtos de hidrólise ácida de polissacarídeos metilados, na forma de acetatos de alditóis, item 3.3.3.1.. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por c.f.g.-e.m. em coluna capilar preenchida com DB-210, à temperatura de 50 a 220°C.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três espécies de líquens com micobiontes ascomicetos, coletados de locais com características geográficas e climáticas distintas, ou seja, Brasil (Estado do Paraná), Antártida (Ilha de King George) e Canadá (Província de Saskatchewan), foram submetidas à análises químicas e físico-químicas para investigação de seus carboidratos e comparação dos mesmos entre si e com os obtidos de outros líquens.

Os líquens secos à temperatura ambiente foram cuidadosamente limpos, manualmente, para a remoção de folhas, ramos, pedaços de pedregulhos e solo. Amostras de líquens foram então enviadas aos liquenólogos prof. Dr. Hector S. OSÓRIO e prof. Dr. Mason E. HALE para identificação botânica competente. Com auxílio destes especialistas foram identificadas as espécies Stereocaulom ramulosum (Sw.) Räsusch (Brasil), Newropogon aurantiaco-ater (Antártida) e Actinogyra muehlenbergii (Canadá), cujos carboidratos foram isolados e estudados estruturalmente.

Para facilitar a compreensão e a interpretação dos resultados obtidos através das investigações químicas realizadas com os líquens mencionados acima, os carboidratos foram divididos em dois grupos, de acordo com o peso molecular, ou seja, em carboidratos de baixo peso molecular e em polissacarí-

deos. Estes últimos foram então subdivididos, de acordo com a natureza dos monossacarídeos constituintes e a estrutura química de cada tipo de molécula, em três grupos correspondentes a  $\alpha$ -D-glucanas, galactomananas e  $\beta$ -D-glucanas. As  $\beta$ -D-glucanas, por sua vez, foram ainda divididas em  $\beta$ -D-glucanas sem grupamentos O-acetil e  $\beta$ -D-glucanas com grupamentos O-acetil. Cada grupo de carboidratos foi analisado para os três líquens, iniciando sempre por St. ramulosum, seguido por N. aurantiaco-ater e finalmente por A. muehlenbergii, devendo, no entanto, ser lembrado que até o presente ano, apenas o líquem N. aurantiaco-ater não foi investigado quanto aos seus carboidratos, enquanto que St. ramulosum e A. muehlenbergii já foram previamente estudados por BARON et al.<sup>6,7</sup> e por GORIN & IACOMINI,<sup>46</sup> respectivamente. Além disso, observar que tanto os carboidratos de baixo peso molecular, quanto os polissacarídeos, foram analisados e discutidos sob dois aspectos referentes, em primeiro lugar, ao isolamento e a determinação estrutural dos referidos componentes, e em segundo lugar, a produção e a função dos mesmos, visando basicamente um melhor entendimento da distribuição global destes componentes em líquens e uma concomitante percepção do papel fisiológico dos mesmos nestas entidades simbióticas.

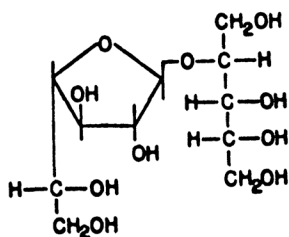
# 1. CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR

## 1.1. ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR DE LÍQUENS

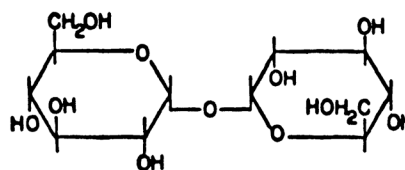
Os líquens St. ramulosum, N. aurantiaco-ater e A. muehlenbergii previamente extraídos com benzeno-etanol, um processo que removeu 1-5 g% de materiais solúveis, foram tratados com metanol contendo 20% de água (v/v) para extração de seus carboidratos de baixo peso molecular.

### 1.1.1. Líquem St. ramulosum

Os componentes de St. ramulosum foram estudados por BARON et al.<sup>6,7</sup>, que detectaram a presença de arabinitol (1,87 g% do peso de líquem original), manitol (0,34 g%) e inositol (0,04 g%), identificados por análises de c.p. e de c.f.g., e 2-O- $\beta$ -D-galactofuranosil-D-arabinitol, comumente conhecido por umbilicina (0,86 g% - Estrutura 1), e  $\alpha$ - $\alpha$ -D-trealo se (0,08 g% - Estrutura 2), purificados por cromatografia de partição em coluna de celulose e identificados principalmente por análise de r.m.n.-<sup>13</sup>C.



1



2



### 1.1.2. Líquor N. aurantiaco-ater

Em relação ao líquido N. aurantiaco-ater foram empregadas análises químicas e físico-químicas para purificação e caracterização estrutural de seus carboidratos de baixo peso molecular idênticas às utilizadas por BARON et al.<sup>6,7</sup> e devidamente descritas em Materiais e Métodos item 2.2.2.1.2..

Pelo tratamento de líquido com metanol-água foi obtido um extrato metanol-aquoso que, após deionização, forneceu um produto de 1,47 g, correspondente a 2,94 g% do peso de líquido original. A análise por c.f.g. dos acetatos de alditóis resultantes da acetilação do extrato metanol-aquoso (Tabela I') mostrou arabinitol (98,94%), manitol (1,06%) e um componente não identificado, e a dos acetatos de alditóis obtidos pela redução e acetilação do mesmo extrato (Tabela I') confirmou a presença de arabinitol (99,19%), de manitol (0,81%) e do desconhecido. Como as proporções de arabinitol e manitol foram praticamente semelhantes no extrato metanol-aquoso simplesmente acetilado e naquele reduzido e acetilado, ficou assim demonstrado que este extrato não era constituído de monossacarídeos livres. No entanto, quando foi realizada hidrólise ácida do extrato metanol-aquoso e posterior análise dos respectivos acetatos de alditóis por c.f.g. (Tabela I') foi encontrado, além dos alditóis (arabinitol - 92,63% e manitol - 5,23%) e do desconhecido mencionados acima, um monossacarídeo identificado como galactose (2,15%), evidenciando a presença de glicosídeo e/ou oligossacarídeo em tal extrato.

Com a finalidade de fracionar os carboidratos de baixo peso molecular existentes no extrato metanol-aquoso foi reali

TABELA I' - ANÁLISE POR c.f.g.<sup>a</sup> DOS ACETATOS DE ALDITÓIS OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO METANOL-AQUOSO DE N. aurantiaco-ater

Componentes	T <sup>b</sup>	Extrato Metanol-Aquoso Composição Relativa (%)		
		A	B	C
Arabinitol	0,70	98,94	99,19	92,63
Desconhecido	1,54	-	-	-
Manitol	1,98	1,06	0,81	5,23*
Galactose	2,31	-	-	2,15

<sup>a</sup> Coluna convencional de ECNSS-M, a 180°C.

<sup>b</sup> Tempos de retenção relativos ao do xilitol penta-0-acetato.

A = Extrato metanol-aquoso simplesmente acetilado.

B = Extrato metanol-aquoso reduzido e acetilado.

C = Extrato metanol-aquoso hidrolisado, reduzido e acetilado.

\* O aumento da % relativa de manitol em relação a % de arabinitol foi presumivelmente originado pela ocorrência de um glicosídeo, que por hidrólise ácida forneceu manitol e que não foi investigado no presente trabalho. No líqüem Peltigera horizontalis foi encontrado 3-0-β-D-galactofuranosil-D-manitol, sugerindo que tal glicosídeo também poderia ocorrer em N. aurantiaco-ater.

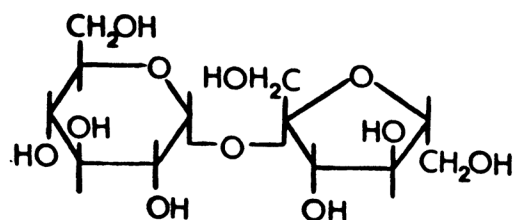
zada cromatografia de partição em coluna de celulose, que forneceu quatro componentes, sendo três eluídos por acetona-água 7:1 com  $R_{Gal}^1$  1,44 (1065,71 mg),  $R_{Gal}^2$  1,11 (61,60 mg) e  $R_{Gal}^3$  0,95 (25,60 mg) e um eluído por acetona-água 4:1 com  $R_{Gal}^4$  0,38 (24,20 mg).

Os componentes com  $R_{Gal}^1$  1,44,  $R_{Gal}^2$  1,11 e  $R_{Gal}^4$  0,38 foram identificados por análises de c.p. e de c.f.g., com sendo arabinitol (2,66 g% do peso de líqüem original), manitol (0,15 g%) e inositol (0,06 g%), respectivamente. Já o componente com  $R_{Gal}^3$  0,95, após análise de c.p., mostrou contaminação com manitol, a qual foi confirmada pela análise por c.f.g. dos acetatos de alditóis obtidos pela hidrólise ácida do referido componente, que revelou, além de manitol, os carboidratos arabinitol e galactose. Como este componente mostrou os mesmos poliol e monossacarídeo constituintes do glicosídeo umbilicina, bem como, mobilidade cromatográfica praticamente igual a deste glicosídeo ( $R_{Gal}$  umbilicina = 0,94<sup>6,7</sup>), poderia ser sugerido que o componente com  $R_{Gal}^3$  0,95 fosse a umbilicina (0,06 g%). No entanto, devido ao baixo rendimento obtido para este componente e a contaminação com manitol, o mesmo não teve a sua estrutura mais detalhadamente estudada no presente trabalho.

### 1.1.3. Líqüem A. muehlenbergii

Os componentes de A. muehlenbergii foram investigados por GORIN & IACOMINI,<sup>46</sup> que encontraram também arabinitol (1,20%), manitol (0,60%) e umbilicina (0,68%), além de sacaro

se (0,19% - Estrutura 3). Os poliôis foram caracterizados pelas análises de c.p. e de c.f.g.-e.m. e a umbilicina e a sacarose foram purificadas por cromatografia em coluna de celulose e identificadas basicamente por análise de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ .



3

#### 1.1.4. Estudo comparativo entre carboidratos de baixo peso molecular isolados de líquens

Pelo exame da Tabela II' foi observado que o componente comum e mais abundante nos três líquens revelou ser o arabinitol, além de que o manitol, em concentrações inferiores às do arabinitol e distinguivelmente baixa no líquem N. aurantiaco-ater, também estava presente nas três espécies estudadas. Já o inositol, a umbilicina\*, a trealose, e a sacarose, que foram do mesmo modo detectados em quantidades relativamente baixas, não mostraram ser componentes de ocorrência geral nestas enti-

\* Considerar o fato de que a presença de umbilicina no líquem N. aurantiaco-ater não foi comprovada por análises químicas e físico-químicas mais precisas.

TABELA II' - COMPOSIÇÕES EM CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR DOS LÍQUENS St. ramulosum, N. aurantiaco-ater E A. muehlenbergii

Componentes <sup>a</sup>	Líquens		
	<u>St.</u> <u>ramulosum</u>	<u>N.</u> <u>aurantiaco-ater</u>	<u>A.</u> <u>muehlenbergii</u>
Arabinitol	1,87	2,66	1,20
Manitol	0,34	0,15	0,60
Inositol	0,04	0,06	-
Umbilicina	0,86	0,06 <sup>b</sup>	0,68
Trealose	0,08	-	-
Sacarose	-	-	0,19

<sup>a</sup> Os números foram expressos em g% relativos ao peso de líquem original. Os políeis foram identificados por análises de c.p. e de c.f.g.(e.m.), enquanto que o glicosídeo umbilicina e os dissacarídeos trealose e sacarose, principalmente por análise de r.m.n.-<sup>13</sup>C.

<sup>b</sup> Este componente não foi identificado por análise de r.m.n.-<sup>13</sup>C, mas apenas por composição em monossacarídeos e mobilidade cromatográfica.

dades simbióticas.

Concordando com estes resultados, foi reconhecido que vários polióis<sup>22,104</sup> (ver Tabela III anexa na Introdução - p. 11) constituíam os carboidratos de baixo peso molecular predominantes em líquens,<sup>94</sup> sendo inclusive evidenciado que os conteúdos de arabinitol eram frequentemente superiores aos de manitol em líquens apresentando ambos os polióis.<sup>46,70,94</sup> Além disso, foi demonstrado que o manitol era geralmente encontrado em todas espécies de líquens investigadas, apesar de excepcionalmente no líquem Ramalina usnea<sup>45</sup> não ter sido detectado o referido poliol, mas, ao contrário, o arabinitol era largamente espalhado em líquens da ordem Gymnocarpeae, atualmente denominada de Lecanorales, mas não naqueles da ordem Pyrenocarpeae, atualmente Verrucariales, que, por sua vez, continham volemitol.<sup>83</sup> E ainda, em outros estudos foi revelado que as quantidades de polióis em líquens antárticos eram aproximadamente três vezes superiores às aquelas em líquens de regiões temperadas,<sup>131</sup> devendo, no entanto, ser considerado que, no presente trabalho, o conteúdo de polióis em N. aurantiaco-ater (2,87 g%), um líquem antártico, foi praticamente igual ao conteúdo apresentado no líquem de região temperada St. ramulosum (2,25 g%).

Por outro lado, foi constatado que açúcares livres<sup>22,105</sup> (ver Tabela III anexa na Introdução - p. 11) e dissacarídeos<sup>22,106</sup> (ver a referida Tabela III - p. 11) não eram normalmente encontrados como componentes abundantes em líquens,<sup>94</sup> embora ocorrendo uma exceção, quando IACOMINI et al.<sup>71</sup> evidenciaram a presença de uma quantidade surpreendentemente alta de trealose (4,40 g%) no líquem Cora pavonia. E, adicionalmente, alguns líquens foram reconhecidos conter glicosídeos de polióis<sup>22,106</sup> (ver Ta

bela III - p. 11), que eram característicos de certas entidades simbióticas,<sup>94</sup> como por exemplo, a umbilicina, originalmente isolada do líquem Umbilicaria pustulata,<sup>85</sup> e o 3-O-β-D-glucopiranosil-D-manitol, bem como, o 3-O-β-D-galactofuranosil-D-manitol, também conhecido por peltigerosídeo, ambos obtidos de espécies do gênero Peltigera.<sup>84</sup>

Portanto, se fosse restritamente levado em consideração todos os estudos sobre as distribuições qualitativa e quantitativa de carboidratos de baixo peso molecular em líquens, a tendência seria assumir a predominância de polióis, a menor abundância de açúcares livres e de dissacarídeos e a ocorrência casual de glicosídeos de polióis em determinadas espécies destas entidades simbióticas. Não obstante, deveria ser notado que vários fatores poderiam contribuir, levando a diferenças nas composições destes componentes em líquens.<sup>94</sup> A variação poderia ser devido aos diferentes procedimentos empregados para o isolamento e principalmente para a análise dos mesmos, já que nos primeiros estudos eram basicamente utilizadas cromatografia e eletroforese em papéis, ambos os métodos não totalmente adequados para detectar os referidos componentes, especialmente quando presentes em baixas concentrações. Somente mais tarde, técnicas mais sensíveis foram utilizadas, como por exemplo, a cromatografia em fase gasosa, excelente para a identificação e quantificação sobretudo de polióis, e a cromatografia de partição em coluna de celulose, ideal para o fracionamento destes componentes, visando basicamente a obtenção de dissacarídeos e de glicosídeos de polióis puros. Outros fatores que poderiam concorrer para estas variações nas distribuições qualitativa e quantitativa destes componentes seriam os diferentes habitats das amostras de líquens testadas, bem

como, as diferentes estações climáticas, uma vez que alguns autores indicaram que os conteúdos de polióis variavam notavelmente com o último fator. Um exemplo, foi o encontrado para os líquens antárticos Usnea antarctica e Himantormia lugugris, cujos conteúdos principalmente de polióis foram alterados significativamente com as estações, diminuindo a partir dos valores mais altos de 236 e 231 mg/g de peso seco do líquem, na primavera, para os mais baixos de 62 e 68 mg/g de peso seco do líquem, respectivamente, no inverno.<sup>131</sup>

## 1.2. PRODUÇÃO E FUNÇÃO DE CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR DE LÍQUENS

Destas investigações com os carboidratos de baixo peso molecular, além da preocupação em identificar e quantificar tais componentes, também surgiu uma questão interessante quanto a produção dos mesmos, se seria pelo fotobionte (simbionte algal) ou pelo micobionte (simbionte fungal) dos líquens, ou por ambos.<sup>83</sup> A solução deste problema começou a ser vislumbrada a partir dos estudos de D.C. SMITH et al., como registrados por KOMIYA & SHIBATA<sup>76</sup> e por RODERIC,<sup>110</sup> sobre o metabolismo de carboidratos nos simbioses isolados de líquens. Pelo uso de técnicas com traçadores do isótopo de carbono-14, foi observado que D-glucose, inicialmente formada na alga azul-esverdeada Nostoc, era convertida em D-manitol no fungo, enquanto que ribitol formado na alga verde Trebouxia, era transformado em D-manitol e D-arabinitol no fungo. Com estudos mais recentes e abrangentes de D.C. SMITH et al., citados por RODERIC<sup>110</sup> e por NISHIKAWA et al.<sup>94</sup>, foi revelado que a



identidade do carboidrato transportado entre os simbioses de um líquem dependia do gênero de alga presente. Por exemplo, em líquens contendo cinco gêneros de Chlorophyceae, os carboidratos eram transportados aos fungos como polióis (ribitol em Trebouxia, Myrmecia e Coccomyxa; eritritol em Trentepohlia; e sorbitol em Hyalococcus) e em líquens possuidores de três gêneros de Cyanophyceae (Nostoc, Calothrix e Scytonema), glucose era o carboidrato transportado. E ainda, independente da natureza do carboidrato transportado, o mesmo era convertido dentro do micobionte a manitol ou a manitol e arabinitol (Tabela III').<sup>110</sup>

Desta forma, não foi surpreendente notar que os líquens estudados no presente trabalho, bem como nos trabalhos citados anteriormente,<sup>46,70,94</sup> provavelmente pertencentes à ordem Lecanorales, tenham apresentado ambos os polióis arabinitol e manitol, em quantidades razoáveis, mas geralmente sobressaindo o conteúdo de arabinitol.

Considerando então, que os carboidratos de baixo peso molecular mais comuns e abundantes em líquens, ou seja, os polióis arabinitol e manitol, foram produzidos pelos seus micobiontes, restaria uma questão relacionada com a função dos referidos componentes em tais simbioses liquênicos. Para esclarecer esta dúvida, poderia ser levado em conta os estudos realizados a cerca da distribuição e do metabolismo destes carboidratos em fungos filamentosos, como descritos por BLUMENTHAL.<sup>11</sup> A partir destes estudos foi constatado que os carboidratos de baixo peso molecular mais comuns e abundantes nestes microorganismos eram representados pelo dissacarídeo trealose e coincidentemente pelos polióis manitol e arabinitol, sendo que os mesmos possivelmente desempenhariam papéis importantes como re

TABELA III' - MOVIMENTO DE CARBOIDRATOS DA ALGA (FOTOBIONTE) PARA O FUNGO (MICOBIONTE)  
EM ALGUMAS ESPÉCIES DE LIQUENS<sup>a</sup>

Espécie de Líquem	Alga	Carboidrato	
		Móvel	Fungo
<u>Umbilicaria pustulata</u>	<u>Trebouxia</u>	Ribitol	
<u>Lobaria pulmonaria</u>	<u>Myrmecia</u>	Ribitol	
<u>Peltigera aphthosa</u>	<u>Coccomyxa</u>	Ribitol	Manitol simplesmente
<u>Roceella fuciformis</u>	<u>Trentepohlia</u>	Eritritol	ou
<u>Dermatocarpon fluviatile</u>	<u>Hyalococcus</u>	Sorbitol	Manitol e Arabinitol
<u>Sticta fuliginosa</u>	<u>Nostoc</u>	Glucose	
<u>Lichina pygmaea</u>	<u>Calothrix</u>	Glucose	
<u>Coccocarpia sp.</u>	<u>Scytonema</u>	Glucose	

<sup>a</sup> Dados obtidos da referência 110.

servas de carbono e de energia. Por conseguinte, em comparação com as funções dos carboidratos de baixo peso molecular desempenhadas em fungos filamentosos, poderia ser sugerido que estes componentes serviriam aos líquens, em particular aos seus micobiontes, como uma reserva de nutrientes de carbono, que seriam eventualmente transformados em polissacarídeos liquênicos,<sup>42</sup> ou como uma forma de energia armazenada, para ser mobilizada especialmente em períodos de carência nutricional, quando os conteúdos de carboidratos deveriam declinar significativamente.<sup>94</sup>

Adicionalmente, investigações realizadas com líquens antárticos mostraram que em virtude das altas concentrações de políeis presentes nestes líquens, tais componentes poderiam também providenciar uma considerável tolerância destas entidades simbióticas ao congelamento, sendo assim considerados como substâncias crioprotetoras.<sup>131</sup>

## 2. POLISSACARÍDEOS

### 2.1. ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS LIQUÊNICOS

Os líquens residuais das extrações benzeno-etanol e metanol-água foram tratados com água quente e/ou com solução de álcali quente, para extração de polissacarídeos como  $\alpha$ -D-glucanas, galactomananas e  $\beta$ -D-glucanas sem grupos O-acetil. Já os líquens residuais da extração benzeno-etanol, a frio, foram extraídos com dimetil-sulfóxido, também a frio, para obtenção

de polissacarídeos do tipo  $\beta$ -D-glucana com grupos O-acetil.

### 2.1.1. $\alpha$ -D-GLUCANAS

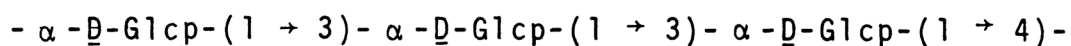
Glucanas com configuração  $\alpha$ -D foram isoladas dos líquens St. ramulosum e N. aurantiaco-ater, como descrito a seguir.

#### 2.1.1.1. Líquem St. ramulosum

- Extração Aquosa: Uma  $\alpha$ -D-glucana de St. ramulosum foi isolada e caracterizada estruturalmente por BARON et al.<sup>6,7</sup>, em 1985. Os autores submeteram o líquem residual das extrações benzeno-etanol e metanol-água ao tratamento com água quente e obtiveram um extrato aquoso com mistura de polissacarídeos contendo glucose, manose e galactose numa relação molar de 90:5:5. Os polissacarídeos do extrato aquoso foram então fracionados por processos alternados de congelamento e de degelo, resultando um resíduo, que não foi investigado quimicamente devido ao baixo rendimento em carboidratos obtido, e um sobrenadante, que foi tratado com solução de Fehling. O complexo cúprico insolúvel formado (precipitado de Fehling\*) não foi detalhadamente estudado, em 1985, por BARON et al.<sup>6</sup>. Já o sobrenadante de Fehling forneceu uma  $\alpha$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{25} + 171^0$ ), quimicamen

\* Este precipitado de Fehling foi investigado no presente trabalho, como descrito em Resultados e Discussão item 2.1.2.1..

te homogênea quando cromatografada em colunas de DEAE-celulose e de Sepharose 6B, cujo rendimento foi de 4,48 g%\* em relação ao peso de líqüem original. Após análises de r.m.n.-<sup>13</sup>C, de metilação, de oxidação com NaIO<sub>4</sub>, de degradação tipo Smith e de degradação de Smith branda, a estrutura desta glucana foi determinada, mostrando a presença de ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação molar de 1,6:1. Estas ligações estavam distribuídas irregularmente ao longo da cadeia linear da glucana, já que a estrutura repetitiva preponderante foi representada por duas ligações (1 → 3) consecutivas interceptadas por uma ligação (1 → 4) isolada (Estrutura 4), embora uma menor proporção de ligações (1 → 3) e (1 → 4) alternadas e poucas ligações (1 → 4) adjacentes também estivessem presentes.



4

- Extração Alcalina: No presente trabalho, o líqüem St. ramulosum, também previamente extraído com benzeno-etanol e metanol-água, foi tratado com solução álcali quente, e o extrato alcalino obtido, após neutralização (AcOH), forneceu uma mistura de polissacarídeos contendo glucose, manose, galactose, xilose e ramnose numa relação molar de 47:24:27,5:0,5:1. Este extrato foi então submetido a processos alternados de congelamento e de degelo, de forma que foram obtidos um resíduo,

\* Observar que o rendimento desta  $\alpha$ -D-glucana obtida, no presente trabalho, por extração aquosa do líqüem St. ramulosum foi de 3,91 g% (ver Materiais e Métodos item 2.2.1.1.3.).

não investigado quimicamente, e um sobrenadante, cujos polissacarídeos foram fracionados por precipitação com solução de Fehling. O complexo cúprico insolúvel resultante (precipitado de Fehling) foi estudado neste trabalho como descrito mais adiante (ver Resultados e Discussão item 2.1.2.1.). O sobrenadante de Fehling, por sua vez, mostrou um polissacarídeo solúvel em água fria, cujo rendimento foi de 3,06 g% do peso de líquem original (Tabela IV'). Este polissacarídeo, quando submetido à hidrólise ácida e analisado por c.f.g., na forma de acetatos de alditóis, forneceu glucose, galactose e manose numa relação molar de 82:9:9. No entanto, a análise do seu espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  (Fig. 1-A) foi idêntica a dos espectros da  $\alpha$ -D-glucana obtida por extração aquosa de St. ramulosum<sup>6,7</sup> (Fig. 1-B) e da isoliquenana de C. islandica<sup>45</sup> (Fig. 1-C). O espectro mostrou principalmente três sinais em  $\delta$  101,8, 101,1 e 100,8 para C-1 de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranoose; dois sinais em  $\delta$  81,9 e 81,6 para C-3 substituído e um sinal em  $\delta$  79,0 para C-4 substituído de unidades de glucopiranoose; e um sinal em  $\delta$  62,2 correspondente aos átomos de carbono ligados a grupos hidroxil primários não substituídos (C-6).

A metilação do polissacarídeo seguida pela análise dos seus respectivos acetatos de alditóis parcialmente metilados por c.f.g. resultou basicamente em dois componentes, identificados como sendo 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol (unidade 3-mono-O-substituída) e 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol (unidade 4-mono-O-substituída). E, a degradação tipo Smith do mesmo polissacarídeo forneceu como principais produtos, glucose e eritritol, em que a glucose foi proveniente de unidades 3-mono-O-substituídas, as quais foram

TABELA IV' - PROPRIEDADES GERAIS DAS  $\alpha$ -D-GLUCANAS ISOLADAS DE LÍQUENS E ESTUDADAS ESTRUTURALMENTE NO PRESENTE TRABALHO

$\alpha$ -D-Glucana	Espécie de Líquem		
	<u>St.</u> <u>ramulosum</u>	<u>N.</u> <u>aurantiaco-ater</u>	
Líquido Extrator	Solução de álcali quente	Água quente	
Composição em monossacarídeos (%)	Glucose Galactose Manose	82 - 9 9	100 - -
$[\alpha]_D^{25}$	+ 151°	+ 174°	
Nitrogênio (%)	0,43	0,13	
Solubilidade	Solúvel em água fria	Solúvel em água fria	
Grupos O-acetil (%)	-	-	
Rendimento em relação ao peso de líquem original (g%)	3,06	3,73	

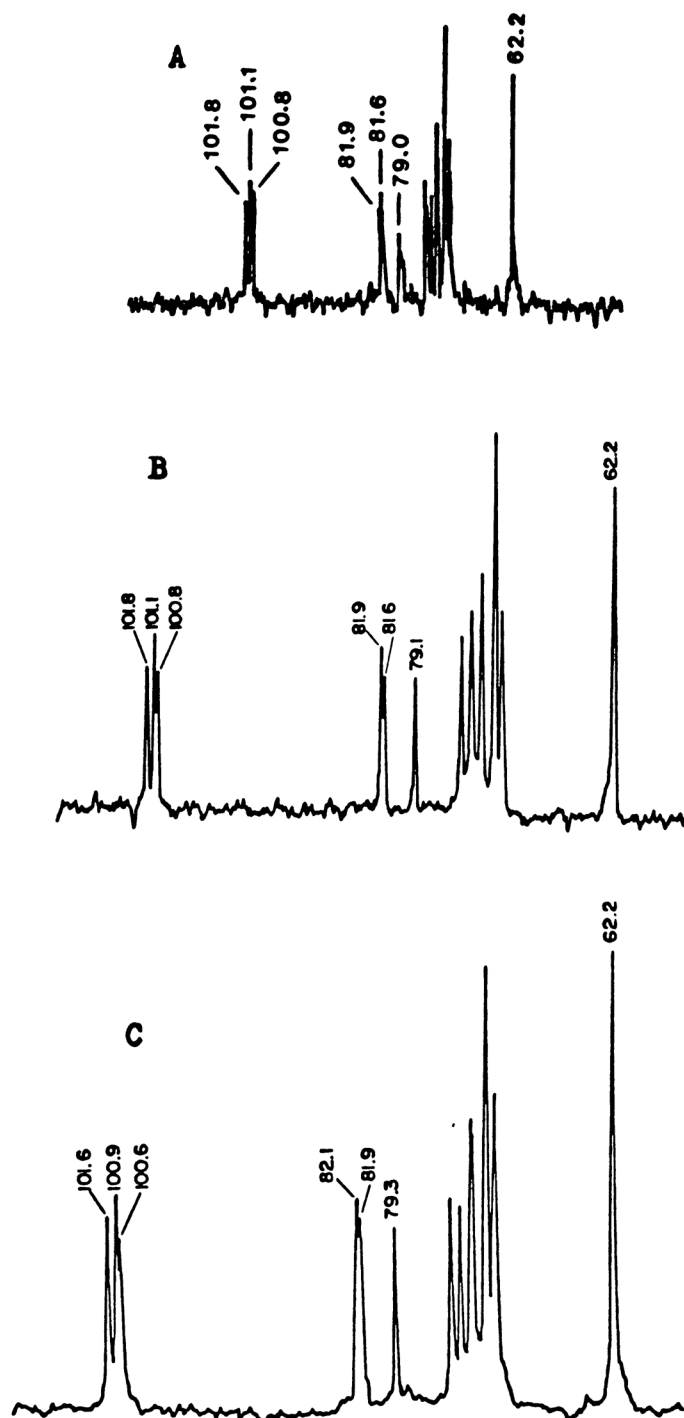


Figura 1 - Espectros de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  de polissacarídeos, em óxi-  
do de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos quí-  
micos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

- A)  $\alpha$ -D-Glucana obtida por extração alcalina de St. ramulosum.
- B)  $\alpha$ -D-Glucana obtida por extração aquosa de St. ramulosum.<sup>6,7</sup>
- C) Isoliquenana de C. islandica.<sup>45</sup>



resistentes à oxidação pelo periodato, enquanto o eritritol foi produzido por unidades 4-mono-O-substituídas, justamente pela oxidação entre as hidroxilas de C-2 e de C-3 destas unidades de glucose.

Portanto, de acordo com as análises de r.m.n.-<sup>13</sup>C, de metilação e de degradação tipo Smith, este polissacarídeo mostrou fundamentalmente unidades de glucose unidas por ligações (1 → 3) e (1 → 4), e a sequência destas ligações ao longo da cadeia do polímero foi demonstrada pela degradação de Smith branda. Os produtos de degradação, quando cromatografados em papel (técnica ascendente, solvente A, visualizadores: nitrato de prata sódico e cloridrato de p-anisidina), foram idênticos aos produtos de degradação de Smith branda da α-D-glucana obtida por extração aquosa de St. ramulosum<sup>6,7</sup> e da isoliquenana de C. islandica.<sup>7,36</sup> Estes produtos corresponderam a eritritol ( $R_{GE} = 1,70$ ), a O-α-D-glucopiranosil-(1 → 2)-D-eritritol ( $R_{GE} = 1,18$ ) e a O-α-D-glucopiranosil-(1 → 3)-O-α-D-glucopiranosil-(1 → 2)-D-eritritol ( $R_{GE} = 0,80$ ), indicando uma sequência irregular de ligações (1 → 3) e (1 → 4) ao longo da cadeia linear do polissacarídeo, como aquela evidenciada na α-D-glucana de St. ramulosum e na isoliquenana de C. islandica.

Pelos resultados acima registrados, foi então demonstrado que o sobrenadante de Fehling, resultante do fracionamento de extrato alcalino obtido de St. ramulosum, apresentou basicamente uma glucana contaminada por outro polissacarídeo constituído por manose e galactose. Observar que componentes contendo amido (amilose) estavam ausentes, já que o teste com iodo resultou negativo. Além disso, a rotação específica des-

ta glucana foi de  $+ 151^{\circ}$  (c. 0,4 em  $H_2O$ ), sendo que a presença de impurezas, presumivelmente, diminuiu tal valor daquele encontrado para a  $\alpha$ -D-glucana pura, isolada por extração aquosa de St. ramulosum ( $[\alpha]_D^{25} + 171^{\circ}$ ).<sup>6,7</sup>

Desta forma, poderia ser assumido que as  $\alpha$ -D-glucanas obtidas por extrações aquosa e alcalina de St. ramulosum foram semelhantes e do tipo isoliquenana.

#### 2.1.1.2. Líquem N. aurantiaco-ater

- Extração Aquosa: O líquido residual após extrações com benzeno-etanol e metanol-água foi, no presente trabalho, tratado com água quente e o extrato aquoso resultante apresentou uma mistura de polissacarídeos em quantidade excepcionalmente alta (51,20 g% do peso de líquido original) e contendo manose, galactose e glucose numa relação molar de 9:9:82. Este extrato foi então submetido a processos alternados de congelamento e de degelo, fornecendo um resíduo, investigado neste trabalho como citado mais adiante (ver Resultados e Discussão item 2.1.3.1.2.), e um sobrenadante, o qual foi tratado com solução de Fehling. O complexo cúprico insolúvel formado (precipitado de Fehling) foi estudado e descrito em Resultados e Discussão item 2.1.2.2.. Já o sobrenadante de Fehling forneceu um polissacarídeo solúvel em água fria, com rendimento de 3,73 g% do peso de líquido original (ver Tabela IV'). Este polissacarídeo mostrou simplesmente glucose quando analisado por c.f.g., na forma de acetatos de alditóis, indicando ser uma glucana. A homogeneidade química desta glucana foi testada por eletrofo-

rese em acetato de celulose, que revelou o aparecimento de uma única banda, e por filtração em géis de Sepharose 6B (Fig. 2-A) e de Sepharose 4B-200 (Fig. 2-B), que exibiram apenas um pico em ambos cromatogramas. Além disso, o teste negativo com iodo mostrou a ausência de amido. Por estes testes, a glucana foi considerada quimicamente homogênea e adequada para estudos estruturais.

O conteúdo protéico da glucana foi igual a 0,80 g%, correspondendo a um baixo conteúdo de nitrogênio de 0,13 g%. O alto valor de sua rotação específica ( $[\alpha]_D^{25} + 174^{\circ}$ ; c. 0,6 em  $H_2O$ ) indicou uma configuração  $\alpha$ -D para as unidades de glicose, sendo esta configuração também comprovada pela análise de r.m.n.- $^{13}C$ . O espectro desta glucana (Fig. 3) apresentou similitudes aos da  $\alpha$ -D-glucana obtida por extração aquosa de St. ramulosum<sup>6,7</sup> (ver Fig. 1-B) e da isoliquenana de C. islandica<sup>45</sup> (ver Fig. 1-C), mostrando principalmente três sinais

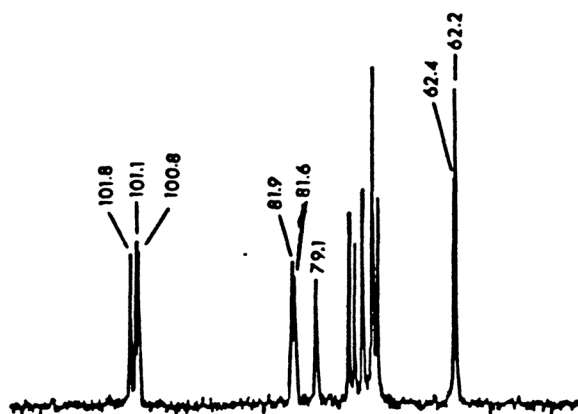


Figura 3 - Espectro de r.m.n.- $^{13}C$  da  $\alpha$ -D-glucana de N. aurantiaco-ater, em óxido de deutério ( $D_2O$ ), a  $70^{\circ}C$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

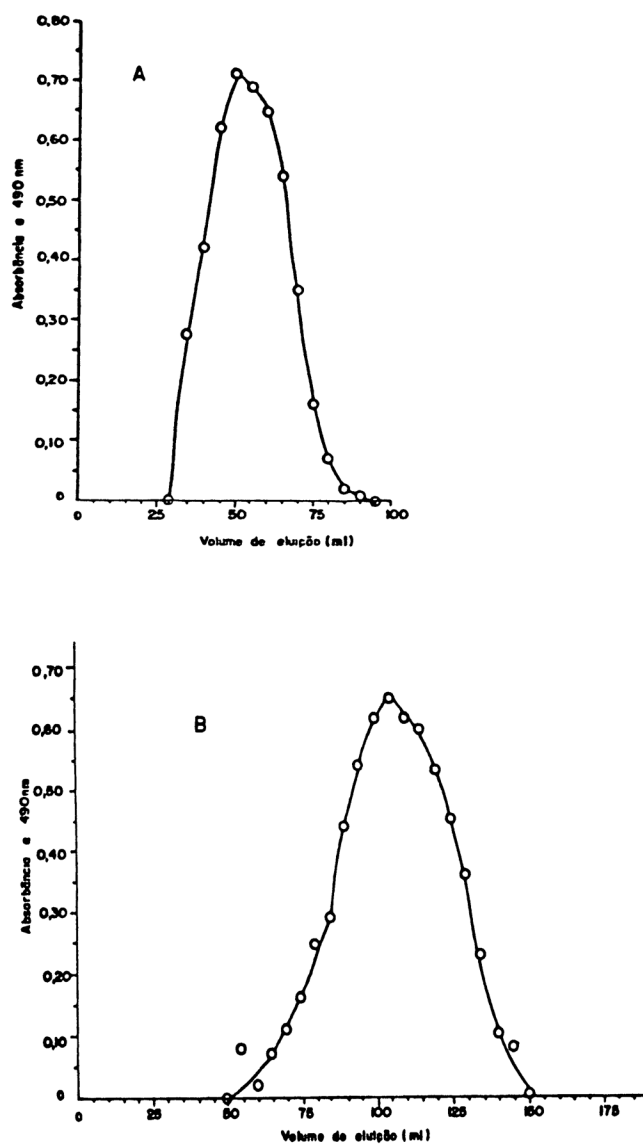


Figura 2 - Cromatogramas da  $\alpha$ -D-glucana de N. aurantiaco-a - ter em colunas de géis:

- A) Sepharose 6B (25,5 x 1,8 cm).  
 Eluente: Solução aquosa de NaCl 0,2%.  
 Frações de 5 ml.  
 Volume de eluição do azul de dextrana: 30 ml.
- B) Sepharose 4B-200 (37,5 x 2 cm).  
 Eluente: Solução aquosa de NaCl 0,2%.  
 Frações de 5 ml.  
 Volume de eluição do azul de dextrana: 48 ml.

em  $\delta$  101,8, 101,1 e 100,8 para C-1 de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranose; dois sinais em  $\delta$  81,9 e 81,6 para C-3 substituído e um sinal em  $\delta$  79,1 para C-4 substituído de unidades de glucopiranose; e dois sinais em  $\delta$  62,4 e 62,2 relacionados aos átomos de carbono ligados a grupos hidroxil primários não substituídos (C-6).

A análise por c.f.g. dos produtos de hidrólise ácida da glucana metilada, na forma de acetatos de alditóis, detectou apenas dois componentes correspondentes a 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol (unidade 3-mono-O-substituída) e 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol (unidade 4-mono-O-substituída) em quantidades de 60 e 40%, respectivamente. Esta análise mostrou que um número maior de unidades de glucose era resistente à oxidação pelo periodato de sódio, como confirmado pela degradação tipo Smith deste polissacarídeo, que forneceu glucose (~ 60%), proveniente de unidades 3-mono-O-substituídas, e eritritol (~ 40%), proveniente de unidades 4-mono-O-substituídas.

Assim, pode ser observado que as análises de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ , de metilação e de degradação tipo Smith indicaram a presença de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) entre as unidades de glucose do polímero e estas ligações estavam numa relação molar de 1,5:1.

A seguir, quando foi realizada a degradação de Smith branda da glucana, os produtos resultantes foram cromatografados em papel (técnica ascendente, solvente A, visualizadores: nitrato de prata sódico e cloridrato de p-anisidina) e mostraram ser idênticos aos produtos de degradação de Smith branda da  $\alpha$ -D-glucana obtida por extração aquosa de St. ramulosum<sup>6,7</sup> e da isoliquenana de C. islandica,<sup>7,36</sup> sendo correspondentes a eritritol ( $R_{GE} = 1,70$ ), a O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)-D-eritritol ( $R_{GE} = 1,18$ ) e a O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  3)-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil

-(1 → 2)-D-eritritol ( $R_{GE} = 0,80$ ). A partir destes resultados, poderia ser sugerido que a sequência de ligações (1 → 3) e (1 → 4) ao longo da cadeia linear da glucana seria representada por duas ligações (1 → 3) consecutivas interceptadas por uma ligação (1 → 4) isolada (ver Estrutura 4), além de ligações (1 → 3) e (1 → 4) alternadas e ligações (1 → 4) adjacentes.

Portanto, com todos os dados obtidos acima, foi então demonstrado que o sobrenadante de Fehling resultante do fracionamento do extrato aquoso de N. aurantiaco-ater apresentou uma  $\alpha$ -D-glucana com estrutura química semelhante às estruturas da isoliquenana de C. islandica e da  $\alpha$ -D-glucana de St. ramulosum.

- Extração Alcalina: Ainda no presente trabalho, o líqüem residual da extrações benzeno-etanol, metanol-água e água quente foi tratado com solução de álcali quente, e o extrato alcalino obtido, após neutralização (AcOH), mostrou uma mistura de polissacarídeos contendo glucose, manose e galactose numa relação molar de 75:8:17. Como este extrato apresentou uma quantidade de glucose superior as dos monossacarídeos manose e galactose, talvez pelo seu fracionamento com processos alternados de congelamento e de degelo e com o emprego de solução de Fehling pudesse ser evidenciada uma  $\alpha$ -D-glucana. No entanto, o referido extrato não foi investigado adicionalmente, devido ao baixo rendimento em carboidratos obtido.

#### 2.1.1.3. Líqüem A. muehlenbergii

- Extrações Aquosa e Alcalina: Quando o líqüem A. muehlen -

bergii, previamente tratado com benzeno-etanol e metanol-água, foi submetido à extrações com água quente ou com solução de álcali quente não forneceu quaisquer glucanas com configuração  $\alpha$ -D.

#### 2.1.1.4. Estudo comparativo entre $\alpha$ -D-glucanas isoladas de líquens

$\alpha$ -D-Glucanas do tipo isoliquenana foram obtidas por extrações aquosa e alcalina do líquem St. ramulosum e por extração aquosa do líquem N. aurantiaco-ater. No entanto, este tipo de glucana não foi detectado no líquem A. muehlenbergii, embora tenha sido observado em diversos trabalhos, que os líquens geralmente foram produtores de uma série de  $\alpha$ -D-glucopiranas estruturalmente diferentes, contendo ligações (1 → 3) e (1 → 4) em várias proporções, como pode ser visualizado na Tabela V anexa na Introdução (p. 17).

As primeiras investigações realizadas para a determinação das estruturas químicas destas glucanas foram com a isoliquenana de C. islandica,<sup>91</sup> um polissacarídeo solúvel em água fria, cujas ligações (1 → 3) e (1 → 4) foram encontradas inicialmente numa relação molar de 1,5:1,<sup>18</sup> sendo mais tarde sugeridas as relações de 1,2:1,<sup>102</sup> 1,3:1<sup>36</sup> e 1,9:1.<sup>45</sup> Esta variação na relação de ligações (1 → 3) e (1 → 4) provavelmente foi devida a presença de componentes contaminantes na isoliquenana, como por exemplo, o amido (amilose), já que nos estudos mais antigos realizados por CHANDA et al.<sup>18</sup>, a isoliquenana corava com solução muito diluída de iodo, resultando uma coloração azul-esverdeada. Posteriormente, PEAT et al.<sup>102</sup> e HUAN & KJØLBERG<sup>55</sup>

analisando os estudos de CHANDA et al. sugeriram que a isoliquenana poderia realmente apresentar componentes contendo amido (amilose), responsáveis pela coloração com iodo, e que novos procedimentos de purificação desta molécula deveriam ser testados para a remoção dos contaminantes.

Glucanas similares à isoliquenana foram presenciadas em Cetraria richardsonii,<sup>141</sup> Alectoria sulcata,<sup>128</sup> Alectoria sarmentosa<sup>128</sup> e St. ramulosum.<sup>7</sup>

Glucanas do tipo nigerana,<sup>43</sup> insolúveis em água fria e com estruturas predominantes contendo ligações (1 → 3) e (1 → 4) alternadas, foram do mesmo modo encontradas em líquens como Parmelia caperata<sup>129</sup> e espécies do gênero Cladonia, C. crispata,<sup>95</sup> C. mitis,<sup>95</sup> C. rangiferina,<sup>95</sup> C. squamosa,<sup>95</sup> C. alpestris<sup>70</sup> e C. confusa.<sup>70</sup> Já no líquem Letharia vulpina,<sup>69</sup> a α-D-glucana isolada apresentou ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação de 1,2:1 e embora, sua estrutura tenha sido relacionada à da isoliquenana, esta glucana também poderia ser assemelhada à nigerana, devido a sua insolubilidade em água fria.

O líquem Evernia prunastri, por sua vez, produziu glucanas com características estruturais bastante diversas. Em 1972, TAKEDA et al.<sup>128</sup> isolaram deste líquem duas α-D-glucanas, uma insolúvel em água fria e outra solúvel, com ligações (1 → 3) e (1 → 4) em relações molares de 4:1 e de 1,5:1, porém mais tarde, HRANISAVLJEVIČ-JAKOVLJEVIČ et al.<sup>66</sup> estudaram o mesmo líquem e isolaram mais duas glucanas, também uma insolúvel e outra solúvel, mas com relações das ligações (1 → 3) e (1 → 4) de 6:1 e de 1:1, respectivamente.

Em líquens da família Stereocaulaceae foram igualmente isoladas α-D-glucanas com diferentes estruturas químicas, a co-



meçar pelo líquem Stereocaulon japonicum, que apresentou glucana com relação molar de ligações (1 → 3) e (1 → 4) de certa forma controvertida, uma vez que estudos de r.m.n.-<sup>13</sup>C evidenciaram uma relação estimada igual a 2:1 e idêntica à encontrada para a glucana do líquem Pilophoron acicularis, integrante junto com St. japonicum da referida família.<sup>141</sup> Contudo, resultados de degradação de Smith branda<sup>73</sup> da glucana de St. japonicum mostraram a relação de 2,7:1, confirmando os primeiros estudos estruturais realizados com este polissacarídeo, que através da análise de seus derivados metilados<sup>140</sup> já tinha demonstrado esta mesma relação molar. Em novos estudos com líquens exclusivamente do gênero Stereocaulon,<sup>125</sup> a glucana de St. japonicum foi então incluída num grupo com glucanas contendo ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação de 3:1, juntamente com as glucanas isoladas de St. soreddiferum e St. exutum, sugerindo assim a importância destas α-D-glucanas numa possível classificação quimio-taxonômica dos líquens "stereocaulaceus". Não obstante, deveria ser lembrado que a glucana de St. ramulosum<sup>7</sup> apresentou ligações (1 → 3) e (1 → 4) em relação molar de 1,6:1 e foi assemelhada à isoliquenana, e também deveria ser considerado que o líquem Stereocaulon paschale<sup>55</sup> produziu glucana com ligações (1 → 4) em maior número do que ligações (1 → 3), ou seja, numa relação de 2,5:1.

Além da presença destas ligações glicosídicas (1 → 3) e (1 → 4) em α-D-glucanas de líquens, foi encontrado outro tipo de ligação nas glucanas dos líquens Acroscyphus sphaerophoroides<sup>128,141</sup> e Sphaerophorus globosus.<sup>141</sup> Estes polissacarídeos apresentaram ligações (1 → 3) e (1 → 4) numa relação molar de 2:3 e a análise de r.m.n.-<sup>13</sup>C ainda indicou 6% de ligações

(1 → 6). Estas ligações (1 → 6) também ocorreram numa das glucanas isoladas de Evernia prunastri,<sup>66</sup> constituindo ramificações sobre as unidades de glucose unidas por ligações (1 → 4) da cadeia principal, embora, numa outra glucana do referido líquem, ao invés de ligações (1 → 6) estavam presentes ligações (1 → 2) nas ramificações. Outrossim, as ligações (1 → 2) foram encontradas nas glucanas dos líquens St. japonicum<sup>140</sup> e Ramalina usnea,<sup>45</sup> formando porém ramificações sobre as unidades de glucose unidas por ligações (1 → 3) da cadeia principal.

## 2.1.2. GALACTOMANANAS

Galactomananas foram isoladas dos líquens St. ramulosum, N. aurantiaco-ater e A. muehlenbergii, como descrito a seguir.

### 2.1.2.1. Líquem St. ramulosum

- Extração Aquosa: Em 1985, BARON et al.<sup>6,7</sup> submeteram o líquem St. ramulosum, previamente extraído com benzeno-etanol e metanol-água, ao tratamento com água quente e obtiveram um extrato aquoso (glucose - 90%, manose - 5% e galactose - 5%), que através de processos alternados de congelamento e de degelo formou um resíduo, descartado, e um sobrenadante, o qual foi tratado com solução de Fehling. O sobrenadante de Fehling resultante forneceu uma  $\alpha$ -D-glucana, isolada e já caracterizada estruturalmente como descrito anteriormente (ver Resultados e Discussão item 2.1.1.1.). O precipitado de Fehling, ao contrário, foi apenas e

xaminado superficialmente pelos autores,<sup>6</sup> que inicialmente determinaram a sua composição em monossacarídeos como sendo galactose (69%), manose (21%), xilose (4%), fucose (3%), ramnose (3%) e glucose. Além destes monossacarídeos, foi observada pela análise por c.p. (técnica ascendente, solvente A, visualizadores: nitrato de prata sódico e cloridrato de p-anisidina) do material hidrolisado, a presença de um componente com características de ácido urônico ( $R_{Gal} = 0,13$ ), de modo que os referidos autores submeteram então o precipitado de Fehling ao procedimento de purificação com sal de amônio quaternário (Cetavlon). Em pH 7,0\* foi obtida uma fração com rendimento de 0,055 g% em relação ao peso de líqüem original, em pH 8,5\*, na presença de tampão borato a 3%, uma fração com 0,24 g%, e em pH 12\*, ajustado com solução aquosa de NaOH a 40%, uma fração com 0,007 g%. Visto que as frações de pH 7,0, constituída por ramnose (4%), fucose (11%), xilose (23%), manose (14%), galactose (45%) e glucose (4%), e de pH 12, contendo apenas glucose, apresentaram rendimentos muito baixos, as estruturas dos polissacarídeos existentes nestas frações não foram investigadas. Contudo, a fração de pH 8,5 obtida por extração aquosa de St. ramulosum (Fração de pH 8,5-H<sub>2</sub>O), que também apresentou rendimento relativamente baixo, foi, no presente trabalho, parcialmente estudada para uma caracterização geral da estrutura química do polissacarídeo contido nesta fração.

A Fração de pH 8,5-H<sub>2</sub>O (Tabela V') apresentou polissacarídeo com rotação específica de + 52° (c. 0,8 em H<sub>2</sub>O) e contendo

\* Observar que os rendimentos das frações de pH 7,0, de pH 8,5 e de pH 12 obtidas, no presente trabalho, com a extração aquosa do líqüem St. ramulosum foram de 0,05, 0,49 e 0,017 g%, respectivamente (ver Materiais e Métodos item 2.2.1.1.3.).

TABELA V' - PROPRIEDADES GERAIS DAS GALACTOMANANAS ISOLADAS DE LÍQUENS E ESTUDADAS ESTRUTURALMENTE NO PRESENTE TRABALHO

Galactomanana	Espécie de Líquens	
	<u>St. ramulosum</u>	<u>N. aurantiaco-ater</u>
Líquido Extrator	Água quente	Água quente
Composição em monossacarídeos (%)	Glucose Galactose Manose	Traços <sup>a</sup> 45 55
$[\alpha]_{D}^{25}$	- 40 60 + 52 <sup>o</sup>	- 46 54 + 49 <sup>o</sup>
Nitrogênio (%)	0,94	0,50
Solubilidade	Solúvel em água fria	Solúvel em água fria Parcialmente solúvel em água fria
Grupos O-acetil (%)	-	-
Rendimento em relação ao peso de líquens original (g%)	0,24	3,48 1,20

<sup>a</sup> Traços = ~ 3%.

manose e galactose numa relação molar de 60:40, sendo o mesmo considerado quimicamente homogêneo quando eletroforetizado em acetato de celulose, que revelou o aparecimento de uma única banda. A homogeneidade química do polissacarídeo foi confirmada por filtração em géis de Sepharose 6B (Fig. 4-A) e de Sepharose 4B-200 (Fig. 4-B), que exibiram apenas um pico em ambos cromatogramas.

O conteúdo protéico deste polímero foi igual a 5,88 g% (0,94 g% de nitrogênio), indicando que o mesmo estava ligado à proteína. Com a finalidade de descobrir se a ponte polissacarídeo-proteína comprometia açúcares aminados, foi realizada uma hidrólise ácida forte (HCl 6 M, 5 e 10 horas, 100°C), em condições capazes de destruir os açúcares neutros, deixando intactos os açúcares aminados. A análise por c.p. (técnica descendente, ~ 85 horas, solvente A, visualizadores: nitrato de prata sódico e ninidrina) dos materiais hidrolisados por 5 e 10 horas não detectou a presença de glucosamina, ou de outros açúcares aminados, tais como, galactosamina ou manosamina. De acordo com estudos realizados sobre glicoproteínas,<sup>121,122</sup> foi observado que geralmente as pontes polissacarídeo-proteína poderiam envolver unidades de açúcares aminados, principalmente unidades de glucosamina ou de galactosamina, ambas na forma N-acetilada. Estas pontes poderiam ser do tipo éster-glicosídica, entre a hexosamina e os aminoácidos aspartato ou glutamato, ou do tipo amina-glicosídica, entre a hexosamina e o aminoácido asparagina. No presente trabalho, a possibilidade da existência de tais pontes polissacarídeo-proteína envolvendo unidades de hexosamina na Fração de pH 8,5-H<sub>2</sub>O foi simplesmente descartada, face aos resultados obtidos pela hidrólise ácida forte e

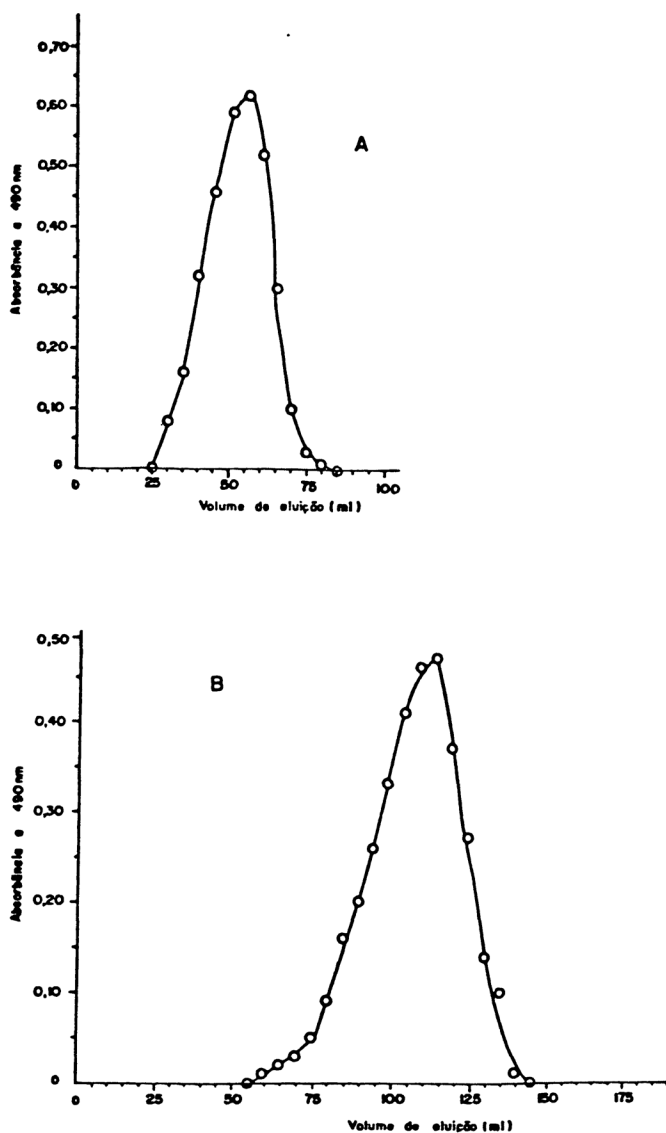


Figura 4 - Cromatogramas da galactomanana obtida por extração aquosa de St. ramulosum em colunas de géis:

- A) Sepharose 6B (25,5 x 1,8 cm).  
 Eluente: Solução aquosa de NaCl 0,2%.  
 Frações de 5 ml.  
 Volume de eluição do azul de dextrana: 30 ml.
- B) Sepharose 4B-200 (37,5 x 2 cm).  
 Eluente: Solução aquosa de NaCl 0,2%.  
 Frações de 5 ml.  
 Volume de eluição do azul de dextrana: 48 ml.

análise por c.p. do material hidrolisado. Não obstante, nesta fração talvez pudesse ser evidenciado o mesmo tipo de ponte polissacarídeo-proteína, que foi revelado numa proteoglicana contendo 1,01 g% de nitrogênio e isolada do líqüem Lobaria orientalis,<sup>127</sup> cuja porção carboidrato, constituída principalmente de glucose e de galactose, estava ligada com serina e treonina da porção peptídica através de ligações O-glicosídicas. A única ressalva seria em relação ao fato de que na composição em monossacarídeos, tal proteoglicana apresentou, além de açúcares neutros, 1,30 g% de glucosamina.

A metilação do polissacarídeo seguida pela análise dos seus respectivos acetatos de alditóis parcialmente metilados por c.f.g.-e.m. apresentou uma série de componentes (Tabela VI'), sendo que os principais foram unidades terminais não redutoras de manopirranose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man; 12%) e de galactopirranose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal; 41%), unidades de manopirranose 6-O- (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man; 9%), 4,6-di-O- (2,3-Me<sub>2</sub>-Man; 11%) e 2,4,6-tri-O- (3-Me-Man\*; 8%) substituídas. A percentagem baixa dos acetatos de di-O-metil manitol e de mono-O-metil manitol provavelmente foi devida a degradação preferencial destes componentes durante a etapa de hidrólise ácida.<sup>15</sup> Além destes derivados metilados, foi observada a presença de pequena quantidade de unidades terminais não redutoras de galactofuranose (2,3,5,6-Me<sub>4</sub>-Gal; 2%), consistente com a análise do espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C do polissacarídeo

\* Embora 3-Me-Man seja idêntico ao 4-Me-Man,<sup>45</sup> foi assumido que as unidades de manopirranose estavam 2,4,6-tri-O-substituídas na galactomanana obtida por extração aquosa de St. ramulosum. Verificar mais adiante, na análise de metilação da galactomanana obtida por extração alcalina do mesmo líqüem, a confirmação desta hipótese.

TABELA VI' - ANÁLISE POR c.f.g.-e.m.<sup>a</sup> DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA METILAÇÃO DA GALACTOMANANA OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA DE St. ramulosum

Componentes	T <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0,985	12
2,3,5,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1,012	2
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1,036	41
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Hex	1,246	6
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Hex	1,265	2
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1,293	9
3,6-Me <sub>2</sub> -Hex	1,601	3
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	1,658	11
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1,738	2
3-Me-Man	2,301	8
Hex	2,779	3

<sup>a</sup> C.f.g.-e.m. em coluna capilar revestida com OV-225 e OV-17 na proporção de 3:1.

<sup>b</sup> Tempo de retenção de cada componente relativo ao do 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol (T = 1,000).

<sup>c</sup> Percentagem (%) da área do pico de cada componente em relação ao total das áreas dos picos.



(Fig. 5), que mostrou pequenos sinais de unidades de  $\beta$ -galactofuranose,<sup>40,48</sup> incluindo aquele para C-1 em  $\delta$  109,4.<sup>47,98</sup> Neste espectro também foi evidenciado um grande sinal em  $\delta$  104,7<sup>47,54</sup> característico de unidades de  $\beta$ -galactopiranosose,<sup>48</sup> juntamente com um sinal para C-5 em  $\delta$  77,0<sup>47</sup> igualmente típico para estas unidades.

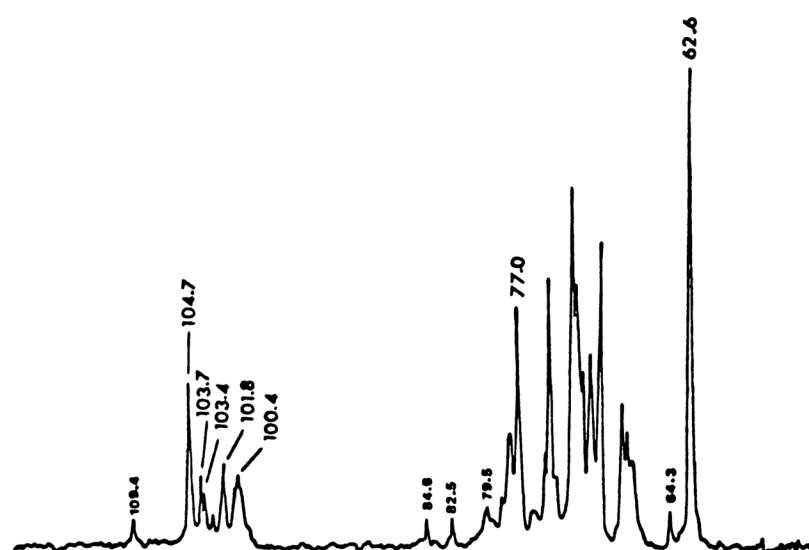


Figura 5 - Espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C da galactomanana obtida por extração aquosa de St. ramulosum, em óxido de deutério (D<sub>2</sub>O), a 70°C. Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

Para determinar a estrutura da cadeia principal do polissacarídeo, o mesmo foi submetido à hidrólise ácida parcial (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,16 M, 18 horas, 100°C), que preferencialmente removeu as unidades de galactopiranosose. O material hidrolisado, após neutrali

zação, foi então adicionado em excesso de etanol, sendo que o sobrenadante etanólico apresentou manose e galactose numa relação molar de 19:81, enquanto que o precipitado etanólico (10,7%) mostrou ambos monossacarídeos, mas na relação inversa de 87:13. O espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  (Fig. 6-A) do polissacarídeo residual (precipitado etanólico) foi semelhante ao daquele obtido, por hidrólise ácida parcial seguida de enzimólise com  $\alpha$ -D-manosidase, da galactomanana do líqüem Peltigera aphthosa<sup>46</sup> (Fig. 6-B), bem como ao de uma  $\alpha$ -D-manopiranana unida por ligações (1  $\rightarrow$  6)<sup>40,45</sup> (Tabela VII'). Os sinais principais foram em  $\delta$  101,0 (C-1), 72,5 (dois sinais para C-3 e C-4), 71,6 (C-5), 68,3 (C-4) e 67,3 (C-6 substituído) para a estrutura da  $\alpha$ -D-manopiranana 6-O-substituída, e o sinal em  $\delta$  62,7 para C-6 de unidades terminais não redutoras de galactopiranose e de manopiranose. Em vista da rotação específica positiva ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 34^{\circ}$ ; c. 0,1 em  $\text{H}_2\text{O}$ ) do polissacarídeo degradado por ácido, que continha principalmente ligações  $\alpha$ -D de acordo com o espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ , foi atribuída a configuração D para as unidades de manopiranose. Por sua vez, as unidades de galactopiranose na molécula do heteropolissacarídeo também apresentaram esta configuração, já que foram oxidadas pela enzima D-galactose oxidase.

Assim, pelos resultados obtidos acima, foi demonstrado que a galactomanana presente na Fração de pH 8,5- $\text{H}_2\text{O}$  continha uma alta proporção de unidades de  $\alpha$ -D-manopiranose unidas por ligações (1  $\rightarrow$  6) na cadeia principal. Estas unidades, de acordo com os dados de metilação, eram não substituídas ou 4-mono-O- e 2,4-di-O-substituídas, principalmente por unidades terminais não redutoras de manopiranose e de  $\beta$ -D-galactopiranose. Obser

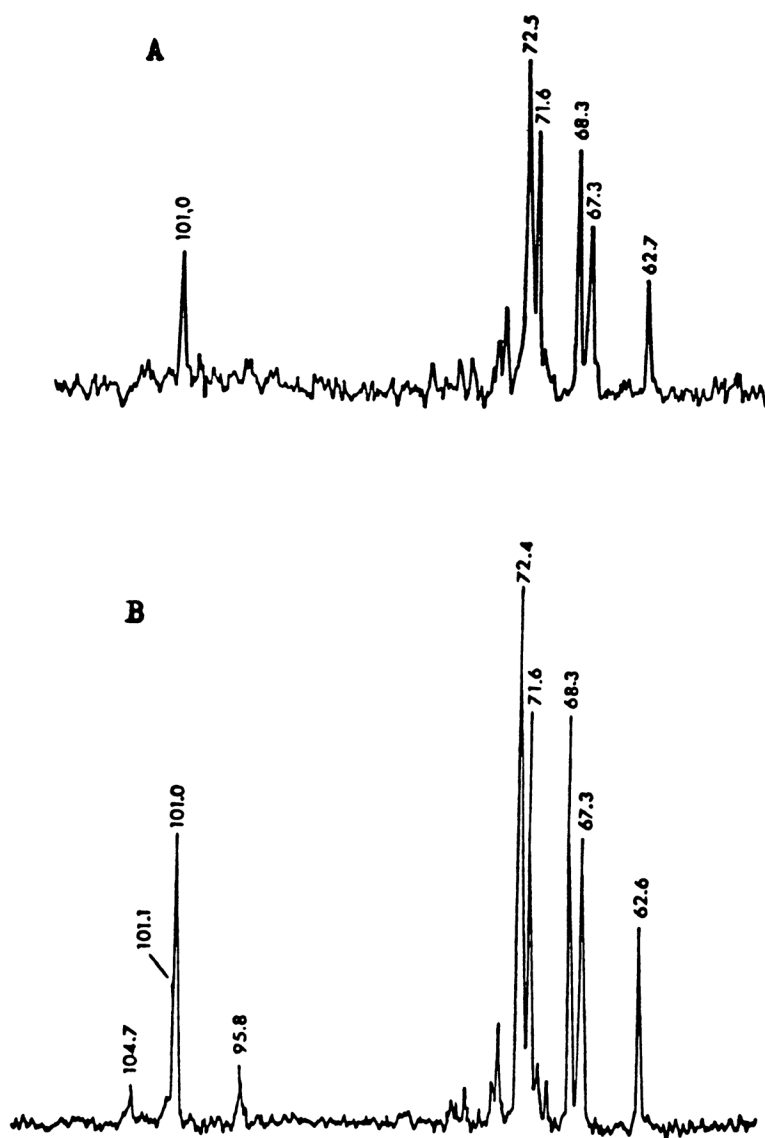


Figura 6 - Espectros de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  de polissacarídeos residuais, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

- A) Polissacarídeo residual resultante de hidrólise ácida parcial da galactomanana obtida por extração aquosa de St. ramulosum.
- B) Polissacarídeo residual obtido por hidrólise ácida parcial seguida de enzimólise com  $\alpha$ -D-manosidase da galactomanana do líquem Peltigera aphthosa.<sup>46</sup>

TABELA VII' - SINAIS<sup>a</sup> E SUAS ATRIBUIÇÕES OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE r.m.n.-<sup>13</sup>C DE POLISSACARÍDEO RESIDUAL RESULTANTE DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA GALACTOMANANA OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA DE St. ramulosum E DE UMA  $\alpha$ -D-MANOPIRANANA (1 → 6)

Atribuição de sinais	Polissacarídeo Residual ( <u>St. ramulosum</u> )	$\alpha$ -D-Manopirana (1 → 6) <sup>b</sup>
C-1	101,0	101,0 (101,0)
C-2	72,5	72,6 (72,5)
C-3	72,5	72,6 (72,5)
C-4	68,3	68,6 (68,5)
C-5	71,6	71,7 (71,6)
C-6 substituído	67,3	67,6 (67,5)
C-6 não substituído	62,7	- (62,8)

<sup>a</sup> Sinais com deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (p.p.m.) relativos à ressonância do tetrametilsilano (TMS).

<sup>b</sup> Dados obtidos da referência 40 (45).

var que a configuração  $\beta$ -D nas unidades de galactopiranosose foi consistente com a análise do espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo original.

- Extração Alcalina: Como o rendimento da galactomanana extraída por água do líquem St. ramulosum foi relativamente baixo, faltando inclusive material para a metodologia experimental, investigações químicas mais refinadas e abrangentes para a determinação da estrutura global do polímero não puderam ser realizadas. Com o objetivo então de obter um maior rendimento de galactomanana para a continuação de sua caracterização estrutural, no presente trabalho, ao invés de submeter o referido líquem, previamente extraído com benzeno-etanol e metanol-água, ao tratamento com água quente, o mesmo foi diretamente tratado com solução de álcali quente. A escolha desta solução como líquido extrator do líquem foi devido ao fato de que estudos anteriores<sup>46,70</sup> demonstraram ser a extração alcalina mais efetiva na obtenção de maiores concentrações de heteropolissacarídeos.

O extrato alcalino resultante, após neutralização (AcOH), mostrou glucose, manose, galactose, xilose e ramnose numa relação molar de 47:24:27,5:0,5:1. Os polissacarídeos deste extrato foram então fracionados por processos alternados de congelamento e de degelo, resultando um resíduo, descartado, e um sobrenadante, tratado com solução de Fehling. O sobrenadante de Fehling, que apresentou uma  $\alpha$ -D-glucana, já foi discutido no presente trabalho, como descrito em Resultados e Discussão item 2.1.1.1.. O precipitado de Fehling também foi estudado neste trabalho, iniciando por seu fracionamento com sal de amônio quaternário (Cetavlon). Em pH 7,0, a fração obtida mostrou rendimento

de 0,12 g% do peso de líqüem original, em pH 8,5 (com tampão borato a 3%), a fração foi de 3,48 g%, e em pH 12 (ajustado com solução aquosa de NaOH a 40%), a fração foi de 0,09 g%.

A fração de pH 8,5 obtida por extração alcalina de St. ramulosum (Fração de pH 8,5-KOH) foi detalhadamente investigada, principalmente em razão de que o rendimento desta fração foi muito superior ao da Fração de pH 8,5-H<sub>2</sub>O, e a mesma seria então representativa do conteúdo total em heteropolissacarídeo presente no líqüem em estudo.

A Fração de pH 8,5-KOH (ver Tabela V') apresentou polissacarídeo com rotação específica de + 49° (c. 0,5 em H<sub>2</sub>O) e contendo manose e galactose numa relação molar de 54:46. Quando este heteropolissacarídeo foi eluído em colunas de géis de Sepharose 6B (Fig. 7-A) e de Sepharose 4B-200 (Fig. 7-B) mostrou apenas um pico em ambos cromatogramas, e a eletroforese do mesmo em acetato de celulose revelou somente uma banda, de modo que o polímero foi submetido a estudos químicos e físico-químicos adequados para sua caracterização estrutural.

O seu conteúdo protéico de 3,13 g% (0,50 g% de nitrogênio) indicou que o polímero estava ligado à proteína. Uma hidrólise ácida forte para a possível liberação de açúcares aminados da ponte polissacarídeo-proteína foi então realizada, em condições hidrolíticas idênticas às utilizadas na Fração de pH 8,5-H<sub>2</sub>O, como descrito anteriormente. O exame por c.p. (técnica decendente, ~ 85 horas, solvente A, visualizadores: nitrato de prata sódico e ninidrina) dos materiais hidrolisados por 5 e 10 horas não demonstrou a presença de glucosamina ou galactosamina ou mesmo de manosamina, descartando assim a possibilidade da ocorrência de hexosaminas na ponte polissacarídeo-proteína nesta

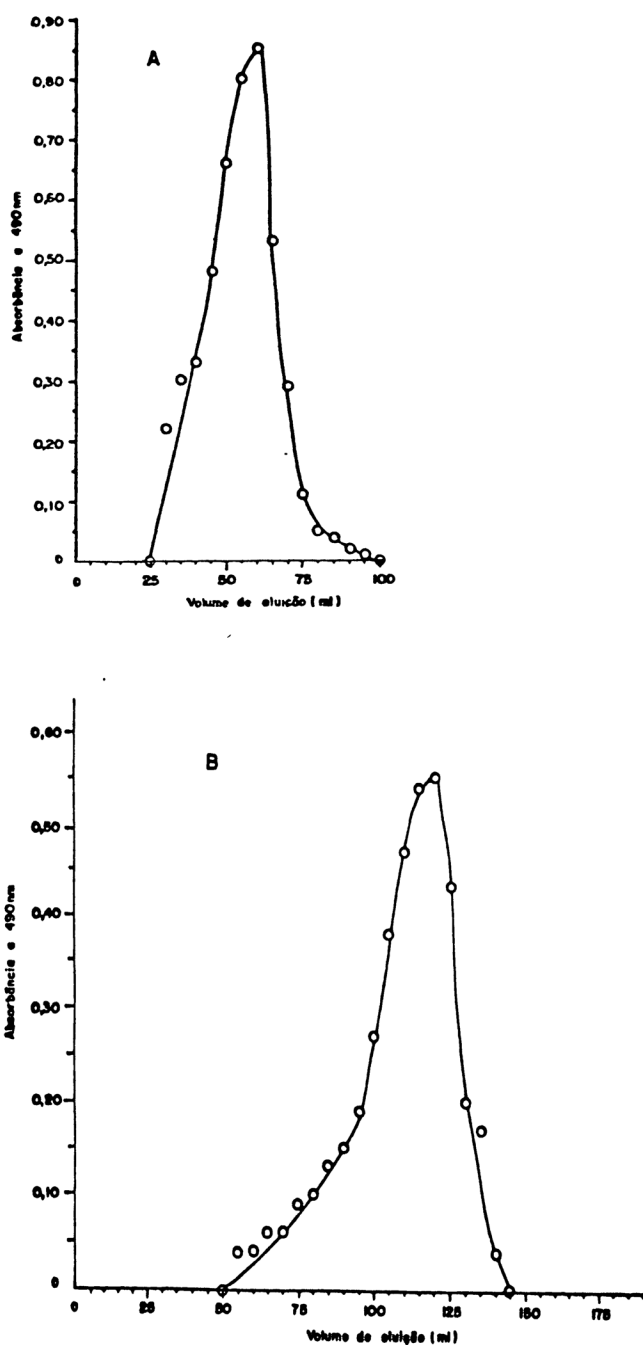


Figura 7 - Cromatogramas da galactomanana obtida por extração alcalina de St. ramulosum em colunas de géis:

- A) Sepharose 6B (25,5 x 1,8 cm).  
 Eluente: Solução aquosa de NaCl 0,2%.  
 Frações de 5 ml.  
 Volume de eluição do azul de dextrana: 30 ml.
- B) Sepharose 4B-200 (37,5 x 2 cm).  
 Eluente: Solução aquosa de NaCl 0,2%.  
 Frações de 5 ml.  
 Volume de eluição do azul de dextrana: 48 ml.

Fração de pH 8,5-KOH.

A análise de metilação do heteropolissacarídeo resultou em vários componentes (Tabela VIII'), cujas estruturas principais corresponderam a unidades terminais não redutoras de manopiranosose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man; 14%) e de galactopiranosose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal; 41%), unidades de manopiranosose 6-0- (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man; 8%), 4,6-di-0- (2,3-Me<sub>2</sub>-Man; 17%) e 2,4,6-tri-0- (3-Me-Man; 11%) substituídas. Já que a formação do acetato de 3-0-metil manitol (~ acetato de 4-0-metil manitol) foi equívoca, o polissacarídeo metilado foi convertido em acetatos de metil glicosídeos. Pela análise destes últimos por c.f.g. em coluna preenchida com OV-225 a 3% foi obtido apenas metil 2,4,6-tri-0-acetil-3-0-metil-manopiranosídeo (T = 3,64), indicando somente unidades de manopiranosose 2,4,6-tri-0-substituídas na estrutura do polissacarídeo, uma vez que um pico do isômero 4-0-metil (T = 5,14) não foi detectado.

Como uma concordância perfeita entre as unidades terminais não redutoras (55%) e os pontos de ramificação (46%) não foi obtida (ver Tabela VIII'), os dados de metilação não puderam ser absolutamente quantitativos para a determinação dos componentes estruturais preponderantes presentes no heteropolissacarídeo. Avaliações do consumo de meta-periodato de sódio e da produção de ácido fórmico pelo polímero, bem como degradação tipo Smith, foram então realizadas para contornar esta dificuldade. O polissacarídeo consumiu 1,62 moles de periodato de sódio/ com concomitante formação de 0,64 moles de ácido fórmico/mol de hexose anidra. Este consumo ocorreu de preferência pelas unidades terminais não redutoras de manopiranosose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man) e de galactopiranosose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal) e pelas



TABELA VIII' - ANÁLISE POR c.f.g.-e.m.<sup>a</sup> DOS ACETATOS DE ALDI  
TÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA ME-  
TILAÇÃO DA GALACTOMANANA OBTIDA POR EXTRAÇÃO  
ALCALINA DE St. ramulosum

Componentes	T <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0,985	14
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1,045	41
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1,189	1
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Hex	1,237	2
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1,289	8
3,6-Me <sub>2</sub> -Hex	1,582	1
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	1,672	17
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1,727	2
2-Me-Man	2,023	2
3-Me-Man	2,316	11
Hex	2,450	1

<sup>a</sup> C.f.g.-e.m. em coluna capilar revestida com OV-225 e OV-17 na proporção de 3:1.

<sup>b</sup> Tempo de retenção de cada componente relativo ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (T = 1,000).

<sup>c</sup> Percentagem (%) da área do pico de cada componente em relação ao total das áreas dos picos.

unidades de manopiranosose 6-0- (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man) e 4,6-di-0- (2,3-Me<sub>2</sub>-Man) substituídas, devendo ser observado que as três primeiras unidades foram formadoras de ácido fórmico. A seguir, quando os produtos da degradação tipo Smith foram analisados por c.f.g., na forma de acetatos de alditóis, foi detectada a presença de manitol, eritritol e glicerol numa relação molar de 20:11:69. Assim, estes resultados indicaram que 20% das unidades de manopiranosose, presumivelmente presentes na cadeia principal da molécula do heteropolissacarídeo eram substituídas em 0-2,4,6 (produtoras de manitol) e 11% das mesmas unidades em 0-4,6 (produtoras de eritritol). Além disso, os 69% remanescentes surgiram do restante da molécula, principalmente das unidades que produziram ácido fórmico.

Informação sobre a estrutura da cadeia principal foi obtida por hidrólise ácida parcial do polissacarídeo (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,16 M, 18 horas, 100°C), que removeu algumas cadeias laterais, fornecendo, após neutralização do material hidrolisado e adição em excesso de etanol, um sobrenadante etanólico com manose e galactose numa relação molar de 32:68 e um precipitado etanólico com estes monossacarídeos na relação de 84:16. A análise de metilação (Tabela IX') do polissacarídeo residual (precipitado etanólico) mostrou essencialmente unidades terminais não redutoras de manopiranosose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man; 15%) e de galactopiranosose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal; 12%), unidades de manopiranosose 4,6-di-0- (2,3-Me<sub>2</sub>-Man; 6%) e 2,6-di-0- (3,4-Me<sub>2</sub>-Man; 11%) substituídas, mas principalmente unidades de manopiranosose 6-0- (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man; 54%) substituídas. Estas últimas unidades provavelmente foram componentes de uma cadeia principal, que apresentou inteiramente esta estrutura, ou seja, unidades de manopiranosose uni-

TABELA IX' - ANÁLISE POR c.f.g.<sup>a</sup> DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO RESIDUAL PROVENIENTE DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA GALACTOMANANA OBTIDA POR EXTRAÇÃO ALCALINA DE St. ramulosum

Componentes	T <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0,96	15
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1,17	12
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	2,23	54
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	4,11	6
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	4,60	11
2-Me-Man	5,72	1
3-Me-Man	6,99	2

<sup>a</sup> C.f.g. em coluna convencional empacotada com OV-225 a 3%, a 170°C.

<sup>b</sup> Tempo de retenção de cada componente relativo ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (T = 1,00).

<sup>c</sup> Percentagem (%) da área do pico de cada componente em relação ao total das áreas dos picos.

das por ligações (1 → 6). E, considerando ainda, a rotação específica positiva de + 60° (c. 0,3 em H<sub>2</sub>O) do polissacarídeo degradado por ácido, foi oportuno assumir que as unidades de manopiranosose apresentaram configuração α-D na estrutura desta molécula.<sup>50</sup>

Por sua vez, no intuito de ser determinada a configuração absoluta das unidades de galactopiranosose, o hidrolisado ácido do heteropolissacarídeo original foi tratado com a enzima D-galactose oxidase. Como resultado, foi observado que a galactose apresentou configuração D, devido a sua completa oxidação pela referida enzima. Desde que a rotação específica do heteropolissacarídeo original (+ 49°) foi relativamente próxima a do polissacarídeo degradado por ácido (+ 60°), do qual muitas unidades de galactopiranosose foram removidas, foi presumido que estas unidades apresentaram uma contribuição rotacional fraca e deveriam ter principalmente configuração β-D. Tal configuração foi confirmada pela análise do espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C deste heteropolissacarídeo (Fig. 8), que mostrou um sinal grande para C-1 em δ 104,7<sup>47,54</sup> característico de unidades de β-D-galactopiranosose,<sup>48</sup> juntamente com um sinal para C-5 em δ 77,0<sup>47</sup> também típico para estas unidades.

Deste modo, com os dados relacionados anteriormente, ficou demonstrado que a galactomanana existente na Fração de pH 8,5-KOH apresentou na cadeia principal, unidades de α-D-manopiranosose unidas por ligações (1 → 6). Estas unidades, de acordo com os resultados de metilação e de degradação tipo Smith, eram não substituídas (~ 8%, segundo metilação), 4-mono-O- (11%, segundo degradação tipo Smith) e 2,4-di-O- (20%, segundo degradação tipo Smith) substituídas por unidades terminais não reduto-

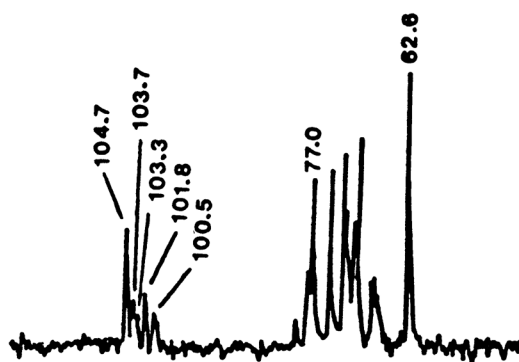


Figura 8 - Espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  da galactomanana obtida por extração alcalina de St. ramulosum, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

ras de manopirranose e de  $\beta$ -D-galactopirranose (configuração  $\beta$ -D consistente com a análise do espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  do heteropolissacarídeo original).

No entanto, para uma caracterização mais completa da estrutura desta galactomanana, ainda restava a dúvida sobre a forma como as unidades terminais não redutoras de manopirranose e de  $\beta$ -D-galactopirranose estavam preferencialmente ligadas à cadeia principal do polímero, ou seja, como monossubstituintes em 0-4 ou como dissubstituintes em 0-2,4. Para esclarecer esta questão, o heteropolissacarídeo foi submetido à acetólise parcial, que seletivamente clivou ligações (1  $\rightarrow$  6), com o objetivo de obter oligossacarídeos que mostrassem os tipos de ligações entre as unidades que compunham as cadeias laterais e as unidades que pertenciam à estrutura da cadeia principal, rompida durante a reação de acetólise. Realmente, a análise por c.p. (técnica descendente, 72 horas, solvente B, visualizador: nitrato

de prata amoniaca) dos produtos de acetólise seguida de desacetilação providenciou uma mistura de manose, galactose, dissacarídeo com mobilidade cromatográfica semelhante a do padrão 2-O- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose ( $R_{\text{Man}} = 0,42$ ), e trissacarídeo com mobilidade cromatográfica semelhante a do padrão  $\alpha$ -D-manotriose unido por ligações (1  $\rightarrow$  2) ( $R_{\text{Man}} = 0,18$ ). Com o propósito então de fracionar estes produtos foi realizada cromatografia de partição em coluna de celulose que forneceu quatro frações, sendo duas eluídas por acetona-água 9:1 com  $R_{\text{Man}}^1$  1,00 e  $R_{\text{Man}}^2$  0,70 e as outras duas por acetona-água 4:1 com  $R_{\text{Man}}^3$  0,44 e  $R_{\text{Man}}^4$  0,43.

As frações com  $R_{\text{Man}}^1$  1,00 e  $R_{\text{Man}}^2$  0,70 foram identificadas por análise de c.p., através da co-aplicação de padrões, como sendo manose e galactose, respectivamente. Já as frações com  $R_{\text{Man}}^3$  0,44 ( $F_3$ ) e  $R_{\text{Man}}^4$  0,43 ( $F_4$ ) mostraram mobilidades cromatográficas basicamente relacionadas a do padrão 2-O- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose, apesar de que a  $F_4$  também apresentou uma outra mancha pequena com mobilidade cromatográfica correspondente a do padrão  $\alpha$ -D-manotriose unido por ligações (1  $\rightarrow$  2). Embora, aparentemente a  $F_3$  induzisse apenas a presença do dissacarídeo 2-O- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose, foi demonstrado que esta fração era mais complexa, já que sua hidrólise ácida seguida pela análise por c.f.g. dos respectivos acetatos de alditóis mostrou manose e galactose numa relação molar de 72:28. Quando a referida fração foi primeiramente reduzida com boroidreto de sódio e depois hidrolisada com ácido para ser analisada por c.p. (técnica ascendente, solvente A, visualizadores: nitrato de prata sódico e cloridrato de p-anisidina) exibiu galactose, manose e hexitol, sendo este último identificado como manitol pela co-apli

cação de padrões. Este resultado revelou que a extremidade redutora do (s) oligossacarídeo (s) presente (s) na fração não apresentava galactose, mas simplesmente unidades de manose. A análise de metilação de  $F_3$  (Tabela X') evidenciou unidades terminais não redutoras de manopiranosose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man; 21%) e de galactopiranosose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal; 23%) e unidades terminais redutoras de manopiranosose 2-O- (3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man; 22%), 4-O- (2,3,6-Me<sub>3</sub>-Man; 20%) e 6-O- (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man; 14%) substituídas. Os dados de metilação foram então racionalizados na luz da análise do espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C de  $F_3$  (Fig. 9), que foi consistente com uma mistura principalmente de dois dissacarídeos, a saber, 2-O- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose e 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-manose. Os sinais característicos para a identificação de 2-O- $\alpha$ -D-manopira

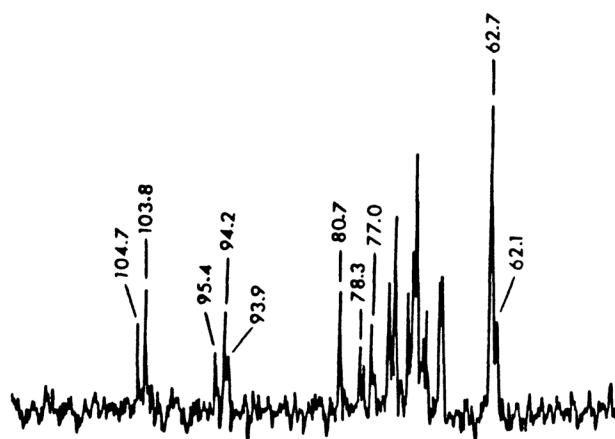


Figura 9 - Espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C de oligossacarídeos presentes na Fração com  $R_{Man}^3$  0,44 -  $F_3$ , provenientes de acetólise parcial da galactomanana obtida por extração alcalina de *St. ramulosum*, em óxido de deutério ( $D_2O$ ), a 70<sup>o</sup>C. Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

TABELA X' - ANÁLISE POR c.f.g.<sup>a</sup> DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA METILAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS PROVENIENTES DA ACETÓLISE PARCIAL DA GALACTOMANANA OBTIDA POR EXTRAÇÃO ALCALINA DE St. ramulosum

Componentes	T <sup>b</sup>	F <sub>3</sub> (%) <sup>c</sup>	F <sub>4</sub> (%) <sup>c</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0,96	21	18
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1,17	23	46
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1,86	22	7
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Man	2,11	20	18
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	2,23	14	11

<sup>a</sup> C.f.g. em coluna convencional empacotada com OV-225 a 3%, a 170°C.

<sup>b</sup> Tempo de retenção de cada componente relativo ao do 1,5-di-0-acetil-2,3,4,6-tetra-0-metil-D-glucitol (T = 1,00).

<sup>c</sup> Percentagem (%) da área do pico de cada componente em relação ao total das áreas dos picos.

F<sub>3</sub> = Fração com R<sub>Man</sub><sup>3</sup> 0,44.

F<sub>4</sub> = Fração com R<sub>Man</sub><sup>4</sup> 0,43.



nosil-D-manose<sup>12,41</sup> foram em  $\delta$  103,8 e 94,2 para C-1 de unidades terminais não redutora e redutora, respectivamente, de manopiranosose e em  $\delta$  80,7 para C-2 substituído de unidade terminal redutora de manopiranosose, enquanto que aqueles para a caracterização de 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-manose foram em  $\delta$  104,7<sup>47,54</sup> e 77,0<sup>47</sup> para C-1 e C-5, respectivamente, de unidade terminal não redutora de  $\beta$ -D-galactopiranosose e em  $\delta$  87,3<sup>12</sup> para C-4 substituído de unidade terminal redutora de manopiranosose. E, ainda, para corroborar a presença dos dois dissacarídeos em  $F_3$  foi feita espectroscopia de r.m.n.-<sup>1</sup>H (Fig. 10-A) desta fração, que mostrou sinais de tamanhos aproximadamente iguais em  $\delta$  5,30 e 4,96 correspondentes aos hidrogênios-1 das unidades terminais redutora e não redutora, respectivamente, de manopiranosose do dissacarídeo 2-0- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose,<sup>49</sup> juntamente com um sinal menor em  $\delta$  5,10, cuja larga constante de acoplamento (J) de 7,7 Hz foi típica de configuração beta nas unidades de galactopiranosose.<sup>79</sup> Um sinal em  $\delta$  4,36 de tamanho similar ao do sinal em  $\delta$  5,10 sugeriu que fosse da extremidade redutora do dissacarídeo 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-manose. Observar que este espectro de r.m.n.-<sup>1</sup>H também exibiu um sinal em  $\delta$  4,83 para H-1 de unidade terminal não redutora de 6-0- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose,<sup>49</sup> cuja presença do referido dissacarídeo já havia sido presumida pela análise de metilação de  $F_3$ , que evidenciou unidades de manopiranosose 6-0- (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man) substituídas.

Com respeito a  $F_4$ , que apresentou manose e galactose numa relação de 59:41, após hidrólise ácida, e ambos monossacarídeos juntamente com manitol, após sua redução com boroidreto de sódio seguida de hidrólise ácida, foi demonstrado que esta fra-

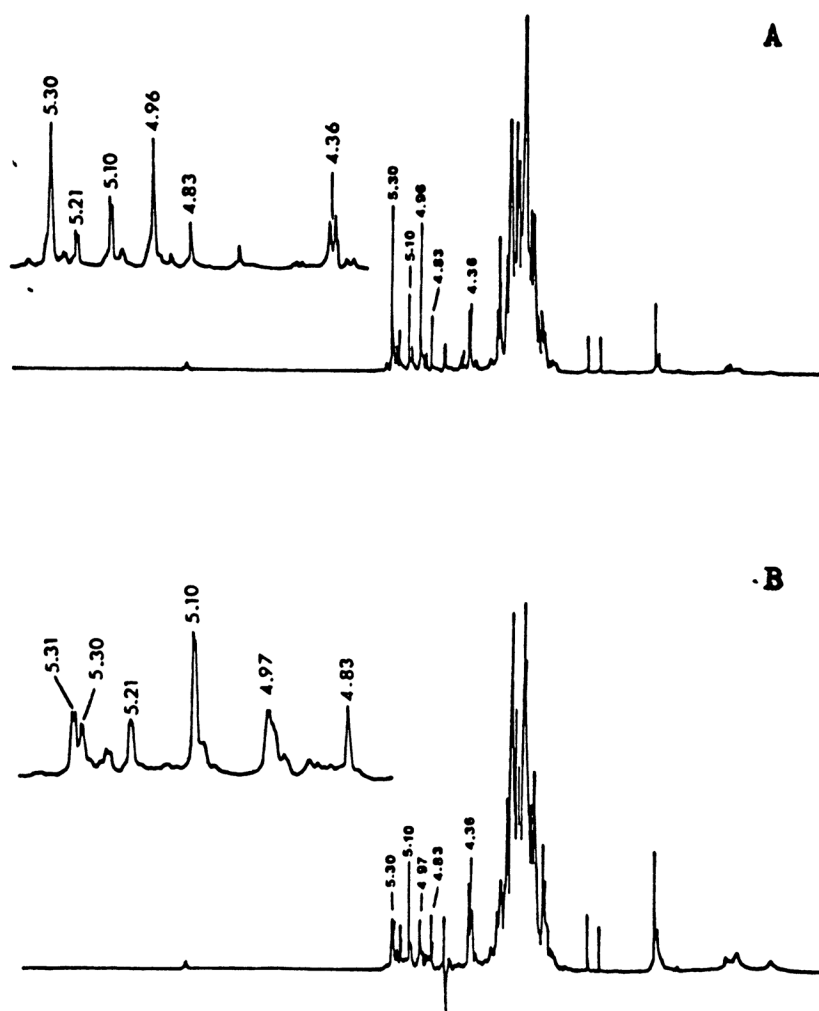


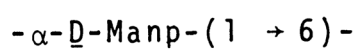
Figura 10 - Espectros de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  de oligossacarídeos provenientes de acetólise parcial da galactomanana obtida por extração alcalina de St. ramulosum, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $33^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

- A) Fração com  $R_{\text{Man}}^3$  0,44 -  $\text{F}_3$ .
- B) Fração com  $R_{\text{Man}}^4$  0,43 -  $\text{F}_4$ .

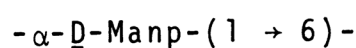
ção também era complexa, com os mesmos oligossacarídeos presentes em  $F_3$ , porém em proporções diferentes. Embora os dados de metilação tenham sido quantitativamente inexatos, devido a comitante oxidação com óxido de prata das extremidades reductoras dos dissacarídeos, resultando em quantidades de acetatos de tri-0-metil manitol inferiores às esperadas, foi ainda possível identificar os componentes qualitativamente. Estes componentes (ver Tabela X') foram representados por unidades terminais não reductoras de manopirano-se (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man) e de galactopirano-se (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal) e unidades terminais reductoras de manopirano-se 2-0- (3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man), 4-0- (2,3,6-Me<sub>3</sub>-Man) e 6-0- (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man) substituídas, que foram idênticos aos componentes presentes em  $F_3$  metilada. Além disso, com a análise do espectro de r.m.n.-<sup>1</sup>H de  $F_4$  (Fig. 10-B) ficou evidente a ocorrência dos dissacarídeos 6-0- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose, 2-0- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose e 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-manose, sendo este último em quantidade superior as dos dois primeiros. Os sinais correspondentes para cada dissacarídeo foram em  $\delta$  4,83 para H-1 de unidade terminal não redutora de 6-0- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose, em  $\delta$  5,30 e 4,97 para hidrogênios-1 das unidades terminais redutora e não redutora, respectivamente, de 2-0- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose e grandes sinais em  $\delta$  5,10 ( $J = 1,6$  Hz) e 4,36 ( $J = 7,7$  Hz) para hidrogênios-1 das unidades terminais não redutora e redutora, respectivamente, de 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-manose. O fato mais interessante e digno de nota a ser mencionado foi que pela primeira vez o dissacarídeo 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-manose ocorreu num acetolizado parcial de galactomanana isolada de líqüem, uma vez que os dissacarídeos mais comuns sempre foram 2-0- $\alpha$ -D-manopiranosil-D-manose<sup>46,70</sup> e 2-0- $\alpha$ -D-galactopiranosil-D-mano

se.<sup>45,46,70</sup> Portanto, com os resultados de acetólise parcial ficou claro que as posições 4 de muitas unidades de manopirano- se pertencentes à cadeia principal da galactomanana eram ocupa- das por unidades terminais não redutoras de  $\beta$ -D-galactopirano- se, enquanto que as posições 2 de algumas das referidas unida - des eram preenchidas por unidades terminais não redutoras de  $\alpha$ - D-manopirano- se.

Assim, pareceu evidente que a estrutura global desta ga- lactomanana existente na Fração de pH 8,5-KOH continha uma ca- deia principal constituída por unidades de  $\alpha$ -D-manopirano- se u- nidas por ligações (1 → 6), sendo estas não substituídas (~ 8%, segundo metilação; Estrutura 5) ou substituídas na posição 4 por unidades de  $\beta$ -D-galactopirano- se (11%, segundo degradação tipo Smith; Estrutura 6) e ainda dissubstituídas nas posições 2 e 4 por unidades de  $\alpha$ -D-manopirano- se e de  $\beta$ -D-galactopirano- se, respectivamente (20%, segundo degradação tipo Smith; Estrutura 7). Observar que os componentes estruturais 5, 6 e 7 compreen- deram ~ 90% da estrutura global da galactomanana.



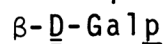
5



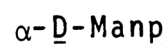
4

↑

1



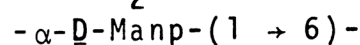
6



1

↓

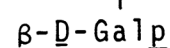
2



4

↑

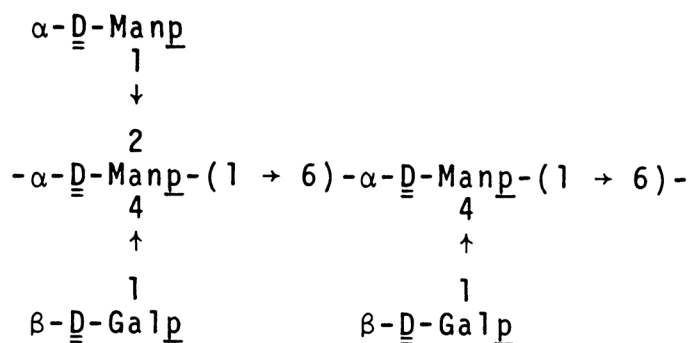
1



7

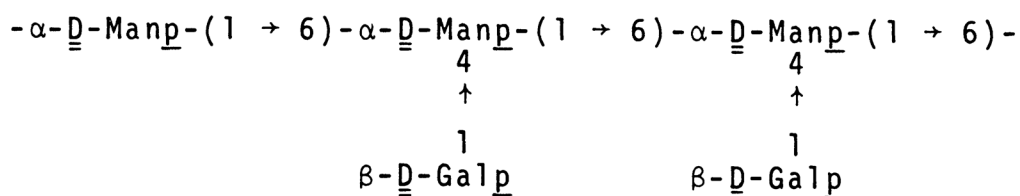
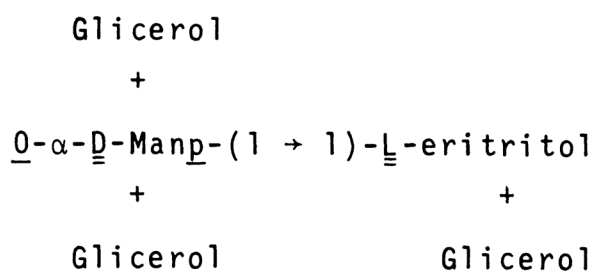
Finalmente, a prova comprobatória para a sequência das três estruturas (5, 6 e 7) nesta galactomanana foi obtida pela degradação de Smith branda do polissacarídeo. Os produtos de degradação, quando examinados por c.p. (técnica ascendente, solvente A, visualizadores: nitrato de prata sódico e cloridrato de p-anisidina), mostraram três componentes com  $R_{\text{Man}}^1$  1,41,  $R_{\text{Man}}^2$  1,20 (mancha bastante pequena em comparação com as dos dois outros componentes) e  $R_{\text{Man}}^3$  0,95. Os componentes com  $R_{\text{Man}}^1$  1,41 e  $R_{\text{Man}}^2$  1,20 foram identificados por análise de c.p., através da aplicação de padrões, como sendo glicerol e eritritol, respectivamente. Já o componente com  $R_{\text{Man}}^3$  0,95, isolado por c.c.d. em sílica-gel G, resultou em manose e eritritol, após hidrólise ácida, e presumivelmente surgiu do glicosídeo 1-O- $\alpha$ -D-manopiranosil-L-eritritol (Esquema I'). Estes resultados foram então consistentes com uma sequência predominante das Estruturas 7  $\rightarrow$  6 no polissacarídeo, que providenciou o glicosídeo manosil-eritritol, deixando as sequências das Estruturas 5  $\rightarrow$  6 e/ou 6  $\rightarrow$  6, responsáveis pela produção da pequena quantidade de eritritol.

Deste modo, a estrutura química da galactomanana na Fração de pH 8,5-KOH foi esclarecida, através da metodologia experimental empregada e citada anteriormente, e poderia agora ser comparada com aquela parcialmente determinada da galactomanana na Fração de pH 8,5-H<sub>2</sub>O do mesmo líquido. Pelas análises de rotação específica, de metilação, de espectroscopia de r.m.n.-<sup>13</sup>C e de hidrólise ácida parcial poderia ser assumido que ambos polissacarídeos foram intimamente relacionados, a não ser pela presença de pequena quantidade de unidades de galactofuranose detectada por metilação e por r.m.n.-<sup>13</sup>C na galactomanana da extração aquosa. Como estas unidades não foram encontradas na ga-



Sequência das Estruturas

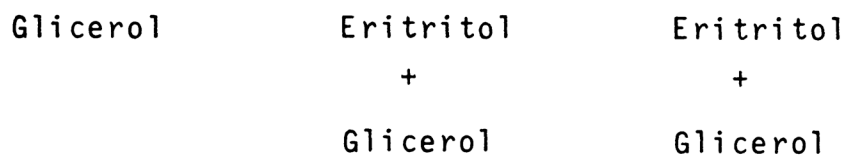
7 → 6



Sequências das Estruturas

5 → 6

6 → 6



Esquema I' - Degradação de Smith branda da galactomanana obtida por extração alcalina de St. ramulosum e os seus produtos de degradação.

lactomanana da extração alcalina poderia ser sugerido que as mesmas provavelmente estavam presentes num glicocomplexo, que foi decomposto pela ação de álcali, de modo que não ficaram no precipitado etanólico após adição do extrato alcalino neutralizado em excesso de etanol.

#### 2.1.2.2. Líquem N. aurantiaco-ater

- Extração Aquosa: No presente trabalho, o líquido remanescente das extrações benzeno-etanol e metanol-água foi tratado com água quente e o extrato aquoso resultante com mistura de polissacarídeos correspondendo a 51,20 g% do peso de líquido original e contendo manose, galactose e glucose na relação molar de 9:9:82 foi submetido a processos alternados de congelamento e de degelo, resultando um resíduo, investigado como descrito mais adiante em Resultados e Discussão item 2.1.3.1.2., e um sobrenadante, tratado com solução de Fehling. O sobrenadante de Fehling apresentou uma  $\alpha$ -D-glucana já estruturalmente estudada e discutida em Resultados e Discussão item 2.1.1.2., enquanto que o precipitado de Fehling, com rendimento de 1,20 g% em relação ao peso de líquido original, foi também investigado para uma caracterização estrutural geral do polissacarídeo (s) presente (s) neste material.

Este precipitado de Fehling mostrou polissacarídeo (s) com rotação específica de  $+76^{\circ}$  (c. 0,4 em NaOH a 1%) e contendo manose e galactose numa relação molar de 55:45, embora tenha sido evidenciado traços de glucose (ver Tabela V'). Já que em vários trabalhos realizados com líquidos,<sup>45,46,70</sup> foi observado que o isolamento de galactomananas via seus complexos cúpricos

insolúveis formados com solução de Fehling ainda providenciava contaminação com glucanas, seria aconselhável proceder um outro processo de purificação para separação destes polissacarídeos. Um procedimento indicado seria através do emprego de um sal de amônio quaternário (Cetavlon), como aquele realizado para a obtenção das galactomananas, quimicamente homogêneas, extraídas com água ou com solução de álcali do líquem St. ramulosum (ver Resultados e Discussão item 2.1.2.1.). No entanto, tal procedimento de purificação não foi empregado no precipitado de Fehling de N. aurantiaco-ater, devido a pequena quantidade obtida deste material, o que levaria a uma falta do mesmo para a metodologia analítica estrutural comumente empregada. Como esperado, quando o (s) polissacarídeo (s) presente (s) no referido precipitado de Fehling foi eletroforetizado em acetato de celulose, revelou o aparecimento de duas bandas, de tamanhos bastante desiguais, correspondendo presumivelmente a maior banda para o heteropolissacarídeo constituído de manose e galactose e a menor banda para a glucana contaminante. Entretanto, a filtração em géis de Sepharose 6B (Fig. 11-A) e de Sepharose 4B-200 (Fig. 11-B) exibiu aparentemente um pico em ambos cromatogramas. Pelos resultados obtidos a partir dos métodos utilizados para testar a homogeneidade química do polissacarídeo, juntamente com aquele obtido pela sua hidrólise ácida total que mostrou a presença de traços de glucose, obviamente não pode ser considerado quimicamente homogêneo o heteropolissacarídeo presente no precipitado de Fehling de N. aurantiaco-ater. Apesar disso, o referido polímero foi submetido a estudos químicos e físico-químicos adequados visando a sua determinação estrutural parcial.



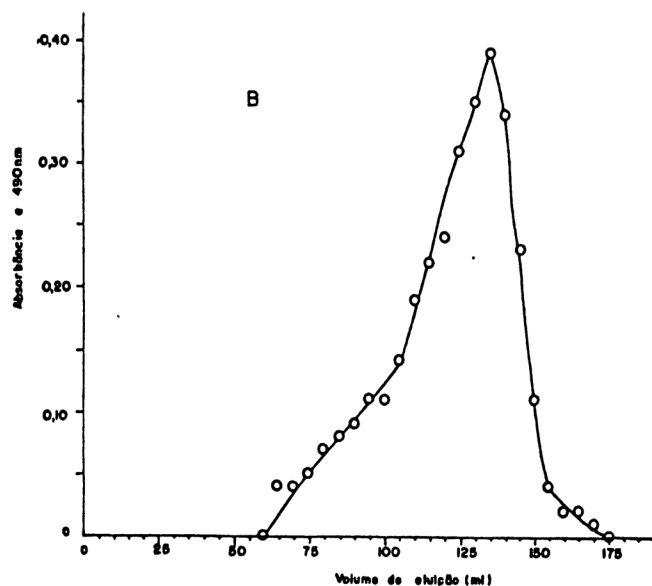
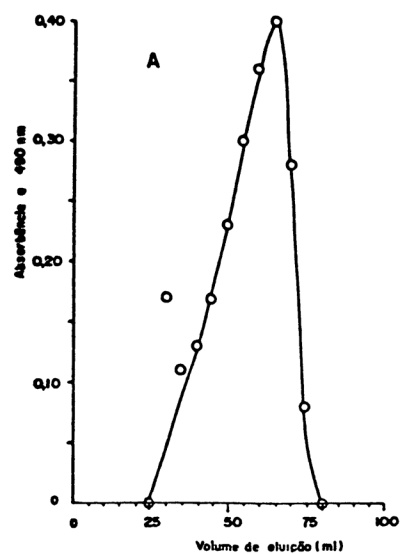


Figura 11 - Cromatogramas da galactomanana de N. aurantiacater em colunas de géis:

- A) Sepharose 6B (25,5 x 1,8 cm).  
 Eluente: Solução aquosa de NaCl 0,2%.  
 Frações de 5 ml.  
 Volume de eluição do azul de dextrana: 30 ml.
- B) Sepharose 4B-200 (37,5 x 2 cm).  
 Eluente: Solução aquosa de NaCl 0,2%.  
 Frações de 5 ml.  
 Volume de eluição do azul de dextrana: 48 ml.

Desde que o seu conteúdo protéico foi igual a 4,35 g% (0,70 g% de nitrogênio), uma hidrólise ácida forte (HCl 6 M, 5 e 10 horas, 100°C) seguida pela análise por c.p. dos materiais hidrolisados (técnica descendente, ~ 85 horas, solvente A, visualizadores: nitrato de prata sódico e ninidrina) foi efetuada para a determinação de possíveis açúcares aminados, que pudessem estar presentes na ponte polissacarídeo-proteína. Pelos resultados obtidos foi descartada a possibilidade da existência de hexosaminas nesta ponte, uma vez que manchas no papel cromatográfico com carboidratos apresentando mobilidades correspondentes as dos açúcares aminados glucosamina, galactosamina ou manosamina não foram visualizadas.

A análise de metilação (Tabela XI') do heteropolissacarídeo mostrou como principais componentes, unidades terminais não redutoras de galactopiranoose (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal; 37%), unidades de manopiranoose 6-0- (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man; 39%), 4,6-di-0- (2,3-Me<sub>2</sub>-Man; 7%) e 2,6-di-0- (3,4-Me<sub>2</sub>-Man; 6%) substituídas, cuja percentagem bastante baixa dos acetatos de di-0-metil manitol e de mono-0-metil manitol provavelmente resultou da degradação preferencial destes componentes durante a reação de hidrólise ácida.<sup>15</sup> De acordo com o exame do espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C deste polímero (Fig. 12) foi constatada a ausência virtual, na região de C-1, de sinais distintamente correspondentes a unidades de β-galactopiranoose<sup>47,48</sup> e em campo mais baixo do que o sinal em δ 102,8, mostrando que as unidades de galactopiranoose presumivelmente teriam configuração alfa. Tal observação concordaria com a rotação específica relativamente alta do polímero original (+ 76°) e, por conseguinte, com a configuração D, sendo a última experimentalmente confirmada, quando as unida -

TABELA XI' - ANÁLISE POR c.f.g.-e.m.<sup>a</sup> DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA METILAÇÃO DA GALACTOMANANA OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA DE N. aurantiaco-ater

Componentes	T <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0,985	4
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1,046	37
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Hex	1,246	1
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1,317	39
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Hex	1,439	3
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	1,678	7
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1,757	6
3(4)-Me-Man	2,319	2
Hex	2,493	1

<sup>a</sup> C.f.g.-e.m. em coluna capilar revestida com OV-225 e OV-17 na proporção de 3:1.

<sup>b</sup> Tempo de retenção de cada componente relativo ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (T = 1,000).

<sup>c</sup> Percentagem (%) da área do pico de cada componente em relação ao total das áreas dos picos.

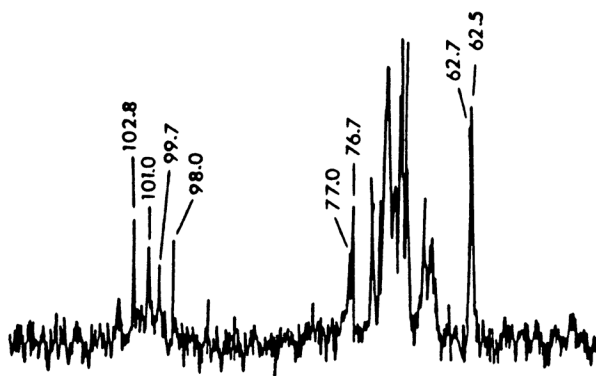


Figura 12 - Espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  da galactomanana de N. aurantiaco-ater, em  $\text{D}_2\text{O}$ , a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

des de galactose no heteropolissacarídeo foram totalmente oxidadas pela enzima D-galactose oxidase.

Com a finalidade de descobrir a estrutura da cadeia principal foi realizada uma hidrólise ácida parcial do polissacarídeo ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,16 M, 18 horas,  $100^\circ\text{C}$ ), para remoção de suas cadeias laterais, que foram detectadas no sobrenadante etanólico, cuja relação molar de manose e galactose foi de 58:42. O precipitado etanólico (polissacarídeo residual; 3,9%), por sua vez, continha manose e galactose em relação de 80:20 e sua análise de metilação (Tabela XII') revelou os principais componentes representados por unidades terminais não redutoras de manopiranosose (2,3,4,6- $\text{Me}_4$ -Man; 11%) e de galactopiranosose (2,3,4,6- $\text{Me}_4$ -Gal; 25%), unidades de manopiranosose 6-0- (2,3,4- $\text{Me}_3$ -Man; 55%), 4,6-di-0- (2,3- $\text{Me}_2$ -Man; 4%) e 2,6-di-0- (3,4- $\text{Me}_2$ -Man; 4%) substituídas. Constatando que as unidades de manopiranosose 6-0-substituídas foram encontradas em maior quantidade neste hidrolisado áci

TABELA XII' - ANÁLISE POR c.f.g.<sup>a</sup> DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO RESIDUAL PROVENIENTE DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA GALACTOMANANA OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA DE N. aurantiaco-ater

Componentes	T <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0,96	11
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1,17	25
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	2,23	55
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	4,11	4
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	4,60	4
3(4)-Me-Man	6,99	1

<sup>a</sup> C.f.g. em coluna convencional empacotada com OV-225 a 3%, a 170°C.

<sup>b</sup> Tempo de retenção de cada componente relativo ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (T = 1,00).

<sup>c</sup> Percentagem (%) da área do pico de cada componente em relação ao total das áreas dos picos.

do parcial e considerando que geralmente as cadeias principais das galactomananas obtidas de líquens<sup>45,46,70</sup> foram representadas por  $\alpha$ -D-manopiranas unidas por ligações (1 → 6) poderia ser sugerido que a cadeia principal da galactomanana de N. aurantiaco-ater também era constituída por uma estrutura de manopiranana com apenas ligações (1 → 6). Possivelmente, as unidades de manopiranose desta estrutura apresentaram configuração  $\alpha$ -D, embora a rotação específica do polissacarídeo degradado por ácido não tenha sido determinada, em virtude deste polissacarídeo ter sido obtido em quantidade bastante baixa. Além disso, pela comparação entre os dados de metilação da galactomanana original e aqueles do polissacarídeo parcialmente degradado por ácido, foi observada que a quantidade de unidades terminais não redutoras de manopiranose aumentou de 4 a 11 %, respectivamente, sugerindo que tais unidades foram expostas pela hidrólise ácida parcial e surgiram de cadeias laterais formadas por unidade sub-terminal de manose e por unidade terminal não redutora de galactose. Surpreendentemente, cadeias laterais com mais de uma unidade não tem sido previamente relatadas em galactomananas isoladas de líquens.<sup>45,46,70</sup>

Portanto, analisando os resultados obtidos anteriormente, poderia ser considerado que a galactomanana do líquem estudado neste tópico mostrou uma cadeia principal com unidades de manopiranose unidas por ligações (1 → 6), possivelmente em configuração  $\alpha$ -D, e que as mesmas unidades eram principalmente não substituídas e 4-mono-O- ou 2-mono-O-substituídas por cadeias laterais, com mais de uma unidade, predominantemente constituídas por unidades terminais não redutoras de  $\alpha$ -D-galactopiranose. Observar que a configuração  $\alpha$ -D nas unidades de ga-

lactose foi sugerida a partir da análise do espectro de r.m.n.  $-^{13}\text{C}$  do polissacarídeo.

- Extração Alcalina: Em vista da galactomanana, recém-mencionada, ter sido obtida em quantidade relativamente baixa por extração aquosa, além de estar impura, se fosse seguida a linha de raciocínio utilizada em relação ao líquem St. ramulosum (ver Resultados e Discussão item 2.1.2.1.) seria presumível que através da extração alcalina do líquem N. aurantiaco-ater, a quantidade de heteropolissacarídeo isolado seria superior, permitindo assim a continuação da caracterização estrutural deste polissacarídeo. Entretanto, como não houve abundante disponibilidade de líquem, pois que o mesmo foi proveniente da Antártida, um procedimento de extração diretamente com solução de álcali, do líquem previamente extraído com benzeno-etanol e metanol-água, não pode ser realizado. Ao invés disso, no presente trabalho, o líquem residual das extrações benzeno-etanol, metanol-água e água quente foi tratado com solução de álcali quente, resultando um extrato alcalino (glucose, manose e galactose 75:8:17), que não foi investigado adicionalmente, devido ao baixo rendimento em carboidratos obtido.

#### 2.1.2.3. Líquem A. muehlenbergii

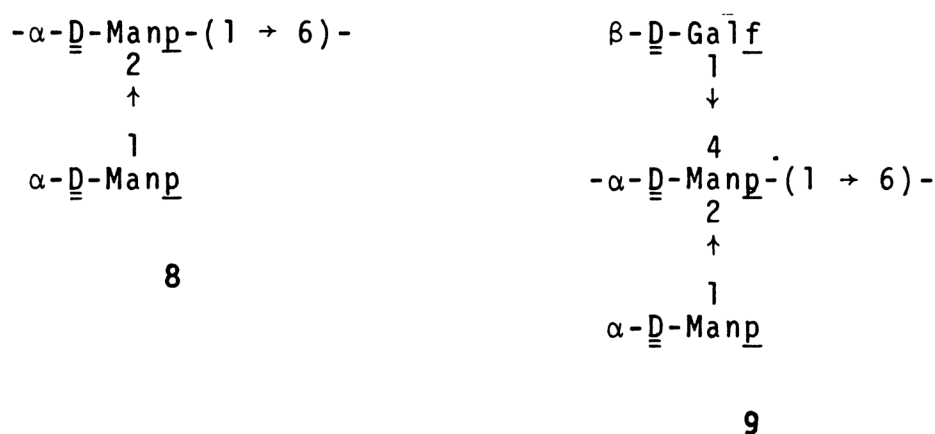
- Extrações Aquosa e Alcalina: Uma galactomanana de A. muehlenbergii foi isolada e caracterizada estruturalmente por GORIN & IACOMINI,<sup>46</sup> em 1985. Com a finalidade de obter um maior rendimento de heteropolissacarídeo, os autores submeteram o líquem

residual das extrações benzeno-etanol e metanol-água diretamente ao tratamento com solução de álcali quente, ou seja, não realizaram previamente uma extração aquosa do líqüem. O extrato alcalino resultante, após neutralização, foi submetido a processos alternados de congelamento e de degelo antes e depois da precipitação com solução de Fehling, fornecendo uma  $\beta$ -D-glicana, insolúvel em água fria, e uma galactomanana, solúvel. O componente glucana\* não foi detalhadamente estudado, em 1985, por GORIN & IACOMINI, enquanto que a galactomanana foi devidamente investigada, sendo obtida em 0,60 g% do peso de líqüem original. Este heteropolissacarídeo continha manose, galactose e glucose numa relação de 31:15:4 e seu espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ , relativamente complexo, mostrou um sinal em campo baixo para C-1 em  $\delta$  109,4 típico de unidades de  $\beta$ -D-galactofuranose. Estas unidades, que estavam presentes em quantidade extraordinariamente alta, foram responsáveis pela rotação específica relativamente baixa do polímero ( $[\alpha]_D^{25} + 30^\circ$ ). Por sua hidrólise ácida parcial foi obtido um núcleo de manana e quando este núcleo foi submetido à enzimólise com  $\alpha$ -D-manosidase, foi demonstrado que a cadeia principal do heteropolissacarídeo era constituída por uma  $\alpha$ -D-manopirranana unida por ligações (1  $\rightarrow$  6). Como a etapa de hidrólise ácida parcial foi realizada em condições ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 mM, 100 $^\circ\text{C}$ , 3 horas) que apenas removeram as unidades de galactofuranose, o núcleo de manana foi deixado praticamente intacto e serviu de grande auxílio na elucidação da estrutura deste polímero. O espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  e a análise de metilação deste núcleo evidenciaram principalmen-

\* Este componente glucana foi investigado no presente trabalho, como descrito em Resultados e Discussão item 2.1.3.2.3..



te unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosose simplesmente substituídas na posição 6 ou substituídas nas posições 2 e 6 e unidades terminais não redutoras de  $\alpha$ -D-manopiranosose, correspondendo assim às Estruturas 5 (ver p. 125) e 8. Além disso, já que o polímero original continha razoável quantidade de unidades de manopiranosose substituídas nas posições 2, 4 e 6, de acordo com a análise de metilação, bem como, unidades terminais não redutoras de  $\beta$ -D-galactofuranose e de  $\alpha$ -D-manopiranosose, confirmadas por espectroscopia de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ , foi sugerido que a Estrutura 9 também estava presente na galactomanana de A. muelenbergii.



#### 2.1.2.4. Estudo comparativo entre galactomananas isoladas de líquens

Pelas investigações registradas anteriormente, foi observado que as galactomananas extraídas com água e/ou com solução de álcali dos líquens St. ramulosum, N. aurantiaco-ater e A. muelenbergii apresentaram cadeias principais com estruturas idênticas e representadas por  $\alpha$ -D-manopiranas unidas por ligações (1  $\rightarrow$  6). As cadeias laterais, que corresponderam em regra

geral a unidades terminais não redutoras de  $\alpha$ -D-manopirranose, de  $\alpha$ -D-galactopirranose, de  $\beta$ -D-galactopirranose ou ainda de  $\beta$ -D-galactofuranose, ocorreram como monossubstituintes ou como dissubstituintes nas posições 2 e/ou 4 (Estruturas 5 a 9).

Desde 1906, quando ULANDER & TOLLENS<sup>136</sup> detectaram manose e galactose, juntamente com glucose, no líquem C. islandica, foi deduzido que além de glucanas dos tipos isoliquenana e liquenana, os líquens apresentavam outros componentes contendo monossacarídeos diferentes de glucose. Alguns estudos estruturais preliminares foram então realizados com polissacarídeos contendo manose, galactose e glucose isolados dos líquens C. islandica<sup>51</sup> e Cladonia alpestris,<sup>4</sup> porém a maior dificuldade nestas investigações foi devido ao fato de que o monossacarídeo glucose presumivelmente surgiu de glucanas contaminantes presentes geralmente em quantidades superiores às dos heteropolissacarídeos, impossibilitando assim a obtenção destes últimos em estado puro.

Informações estruturais mais detalhadas e precisas sobre galactomananas de líquens somente foram então obtidas, recentemente, com os estudos efetuados por GORIN, IACOMINI e seus colaboradores.<sup>45,46,70</sup> Estes autores trabalharam com vários líquens, apresentando principalmente micobiontes ascomicetos (ver Tabela VII anexa na Introdução - p. 21), e obtiveram dos mesmos, galactomananas quase puras, isoladas por extrações com água quente ou com solução de álcali quente, sendo que a extração alcalina foi preferida para a obtenção destes polímeros em maiores rendimentos, e purificadas por processos alternados de congelamento e de degelo e por precipitação com solução de Fehling. Observar que não foi utilizado procedimento de purifica-

ção com sal de amônio quaternário (Cetavlon), que provavelmente resultaria em galactomananas mais puras. De acordo com os resultados obtidos em tais estudos foi concluído que a diversidade estrutural da maioria das galactomananas dependia da maneira como as cadeias principais constituídas por unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosose unidas por ligações (1 → 6) eram substituídas por determinadas cadeias laterais. Embora frequentemente as unidades da cadeia principal fossem não substituídas, pode ser reconhecido diferentes tipos de substituição, em que  $\beta$ -D-galactopiranosose era ligada (1 → 4),  $\alpha$ -D-galactopiranosose e  $\alpha$ -D-manopiranosose (1 → 2) e  $\beta$ -D-galactofuranose (1 → 4) às unidades da cadeia principal.

Desta forma, como pode ser visto, as galactomananas descritas por GORIN & IACOMINI,<sup>45,46,70</sup> bem como as investigadas no presente trabalho, mostraram não ser idênticas mas estruturalmente relacionadas, com respeito às suas cadeias principais comuns e às suas cadeias laterais variáveis.

### 2.1.3. $\beta$ -D-GLUCANAS

As  $\beta$ -D-glucanas sem grupos O-acetil foram extraídas dos líquens com água quente ou com solução de álcali quente, enquanto que uma  $\beta$ -D-glucana com grupos O-acetil foi preferencialmente obtida por extração com dimetil-sulfóxido, à temperatura ambiente.

### 2.1.3.1. $\beta$ -D-GLUCANAS SEM GRUPOS O-ACETIL

Glucanas com configuração  $\beta$ -D e sem grupos O-acetil foram isoladas dos líquens St. ramulosum e N. aurantiaco-ater, como descrito a seguir.

#### 2.1.3.1.1. Líquem St. ramulosum

- Extrações Aquosa e Alcalina: Pela extração do líquem St. ramulosum, previamente tratado por benzeno-etanol e metanol-água, com água quente não foi obtida glucana com configuração  $\beta$ -D. No entanto, este tipo de glucana foi isolado por extração alcalina do referido líquem e caracterizado estruturalmente por BARON et al.<sup>6,7</sup>, em 1985. Os autores submeteram o líquem residual das extrações benzeno-etanol, metanol-água e água quente, ao tratamento com solução de álcali quente, e o extrato alcalino resultante, após neutralização, foi submetido a processos alternados de congelamento e de degelo, resultando um sobrenadante, que não foi estudado adicionalmente, e um resíduo, constituído principalmente por uma glucana (65%) contaminada com galactose (21%) e manose (13%). Com o objetivo de purificar a glucana, o resíduo foi submetido diversas vezes aos tratamentos sucessivos de dissolução em solução de álcali, de neutralização, de diálise e de isolamento do material insolúvel, até que apresentasse apenas glucose. Este resíduo foi então constituído por uma  $\beta$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{25} + 3^0$ ), quimicamente homogênea quando cromatografada em colunas de Sepharose 4B-200 e de Sepharose 6B, sendo o seu rendimento igual a 0,19 g% em relação ao peso de líquem original. O seu espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C

continha seis sinais com deslocamentos químicos típicos de laminarana e as análises de metilação, de oxidação com  $\text{NaIO}_4$  e de degradação tipo Smith indicaram que a glucana era composta exclusivamente por ligações (1 → 3) em sua cadeia linear.

#### 2.1.3.1.2. Líquem N. aurantiaco-ater

- Extração Aquosa: O líquido residual, após extrações com benzeno-etanol e metanol-água, foi, no presente trabalho, tratado com água quente e o extrato aquoso resultante com mistura de polissacarídeos correspondendo a 51,20 g% do peso de líquido original foi submetido a processos alternados de congelamento e de degelo, fornecendo um sobrenadante, constituído por uma  $\alpha$ -D-glucana e uma galactomanana investigadas como já descrito em Resultados e Discussão respectivamente itens 2.1.1.2. e 2.1.2.2., e um resíduo, contendo um polissacarídeo insolúvel em água fria mas solúvel em água quente, com rendimento de 27,02 g% do peso de líquido original (Tabela XIII'). Este polissacarídeo mostrou simplesmente glucose quando analisado por c.f.g., na forma de acetatos de alditóis, indicando ser uma glucana. A homogeneidade química desta glucana foi testada por filtração em géis de Sepharose 6B (Fig. 13-A) e de Sepharose 4B-200 (Fig. 13-B), que exibiram apenas um pico em ambos cromatogramas, de modo que o polímero foi assim considerado homogêneo e adequado para estudos estruturais.

O conteúdo protéico da glucana foi igual a 0,91 g%, correspondendo a um conteúdo de nitrogênio de 0,15 g%. O valor relativamente baixo de sua rotação específica ( $[\alpha]_D^{25} + 14^0$ ; c.

TABELA XIII' - PROPRIEDADES GERAIS DA  $\beta$ -D-GLUCANA SEM GRUPOS O-ACETIL ISOLADA DE LÍQUEM E ESTUDADA ESTRUTURALMENTE NO PRESENTE TRABALHO

$\beta$ -D-Glucana	Espécie de Líquem N. <u>aurantiaco-ater</u>
Líquido Extrator	Água quente
Composição em monossacarídeos (%)	Glucose 100 Galactose - Manose -
$[\alpha]_D^{25}$	+ 14°
Nitrogênio (%)	0,15
Solubilidade	Insolúvel em água fria mas solúvel em água quente
Grupos O-acetil (%)	-
Rendimento em relação ao peso de líquem original (g%)	27,02

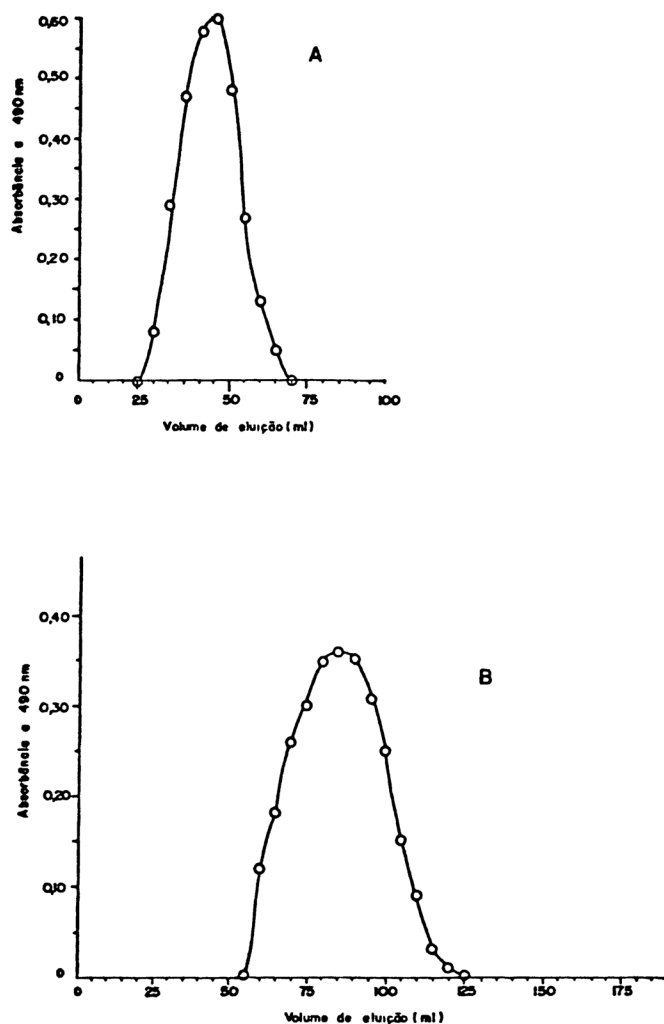


Figura 13 - Cromatogramas da  $\beta$ -D-glucana de N. aurantiaco-ater em colunas de géis:

- A) Sepharose 6B (25,5 x 1,8 cm).  
 Eluente: Solução aquosa de NaOH 0,3 M.  
 Frações de 5 ml.
- B) Sepharose 4B-200 (37,5 x 2 cm).  
 Eluente: Solução aquosa de NaOH 0,3 M.  
 Frações de 5 ml.

0,4 em NaOH a 1%) e bastante próximo ao encontrado para a liquenana de C. islandica ( $[\alpha]_D^{20} + 8^\circ \rightarrow 10^{018}$ ) indicou uma configuração  $\beta$ -D para as unidades de glucose, sendo esta configuração também comprovada pela análise de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ . O espectro desta glucana (Fig. 14) mostrou sinais com deslocamentos químicos

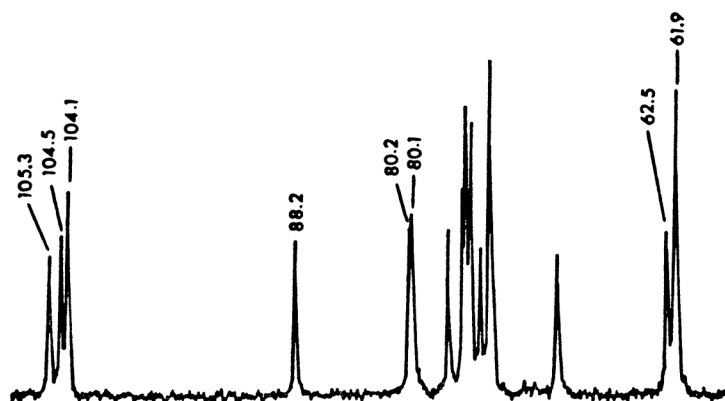


Figura 14 - Espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  da  $\beta$ -D-glucana de N. aurantiaco-ater, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo KOD a 2%, a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

relacionados aos da liquenana de C. islandica<sup>141</sup> (Tabela XIV'), embora deva ser ressaltado que estes sinais foram sensíveis às mudanças de pD, ou seja, às concentrações diferentes de álcali utilizadas para a solubilização dos polissacarídeos, principalmente o sinal relacionado à ressonância de C-3.<sup>20</sup> Notar ainda, que o espectro da  $\beta$ -D-glucana de N. aurantiaco-ater foi obtido em 360 MHz em relação ao núcleo de  $^1\text{H}$ , enquanto que o da liquenana de C. islandica<sup>141</sup> em 100 MHz, justificando assim a melhor resolução de sinais observada no espectro da glucana em es



TABELA XIV' - SINAIS<sup>a</sup> E SUAS ATRIBUIÇÕES OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE r.m.n.-<sup>13</sup>C DAS  $\beta$ -D-GLUCANAS DOS LIQUENS N. aurantiaco-ater E C. islandica<sup>b</sup>

Atribuição de Sinais	$\beta$ -D-Glucana obtida por extração aquosa de <u>N. aurantiaco-ater</u>	Liquenana de <u>C. islandica</u>
C-1	105,3	105,6
	104,5	104,5
	104,1	
C-3	88,2	89,2
C-4	80,2	79,9
	80,1	
C-6	62,5	62,0
	61,9	61,5

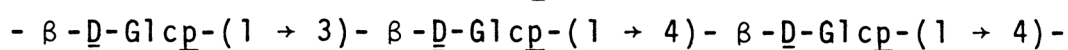
<sup>a</sup> Sinais com deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (p.p.m.) relativos à ressonância do tetrametilsilano (TMS).

<sup>b</sup> Dados obtidos da referência 141, cujo espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C foi obtido em 100 MHz com respeito ao núcleo de <sup>1</sup>H (25,03 MHz em relação ao núcleo de <sup>13</sup>C).

tudo. Na análise da Tabela XIV' puderam ser basicamente observados três sinais em  $\delta$  105,3, 104,5 e 104,1 para C-1 de unidades de  $\beta$ -D-glucopiranoose; um sinal em  $\delta$  88,2 para C-3 substituído e dois sinais em  $\delta$  80,2 e 80,1 para C-4 substituído de unidades de glucopiranoose; e dois sinais em  $\delta$  62,5 e 61,9 relacionados aos átomos de carbono ligados a grupos hidroxil primários não substituídos (C-6). Observar que não houve dois sinais agrupados e associados com ligações (1  $\rightarrow$  3), ao contrário daqueles obtidos para ligações (1  $\rightarrow$  4), sugerindo a ausência de duas ligações (1  $\rightarrow$  3) consecutivas na estrutura da molécula.<sup>40</sup>

A metilação da glucana, seguida pela análise por c.f.g. dos respectivos acetatos de alditóis parcialmente metilados, mostrou apenas dois componentes correspondentes a 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol (unidade 3-mono-O-substituída) e a 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol (unidade 4-mono-O-substituída) em quantidades de 32 e 68%, respectivamente. Este resultado foi de pleno acordo com os dados de r.m.n.-<sup>13</sup>C, indicando que a  $\beta$ -D-glucana apresentava em sua estrutura ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) e estas ligações estavam numa relação molar de  $\sim$  1:2. A confirmação desta estrutura foi alcançada pela degradação tipo Smith do polissacarídeo que forneceu glucose (32%), proveniente de unidades 3-mono-O-substituídas resistentes à oxidação pelo periodato, e eritritol (68%), proveniente de unidades 4-mono-O-substituídas oxidadas entre as hidroxilas de C-2 e de C-3. E ainda, para comprovar que realmente duas ligações (1  $\rightarrow$  3) consecutivas não estavam presentes, como sugerido pela análise de r.m.n.-<sup>13</sup>C, foi realizada degradação de Smith branda do polissacarídeo, cujos produtos foram idênticos aqueles obtidos pela degradação de Smith, incorporando condições hidrolíticas suaves, da liquenana de C. islandica.<sup>35</sup>

Estes produtos, quando cromatografados em papel (técnica ascendente, solvente A, visualizadores: nitrato de prata sódico e cloridrato de p-anisidina), corresponderam a eritritol ( $R_{GE}$  1,70) e a 2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-eritritol ( $R_{GE}$  1,00). Como não houve a formação de oligossacarídeos ligados a eritritol ficou demonstrada a ausência de ligações (1  $\rightarrow$  3) adjacentes, e concordando com todos os resultados obtidos anteriormente, poderia ser sugerida a estrutura repetitiva preponderante nesta  $\beta$ -D-glucana, como sendo representada por duas ligações (1  $\rightarrow$  4) consecutivas alternadas por uma ligação (1  $\rightarrow$  3) isolada (Estrutura 10).



## 10

Desta forma, foi evidenciado que o resíduo resultante do fracionamento do extrato aquoso de N. aurantiaco-ater apresentou uma  $\beta$ -D-glucana com estrutura química semelhante à estrutura da liquenana de C. islandica.

- Extração Alcalina: Ainda, no presente trabalho, o líquem residual das extrações benzeno-etanol, metanol-água e água quente foi tratado com solução de álcali quente e o extrato alcalino resultante, após neutralização (AcOH), mostrou uma quantidade de glucose (75%) superior as dos monossacarídeos manose (8%) e galactose (17%). Em vista disso, se fosse fracionado o extrato alcalino por processos alternados de congelamento e de degelo, poderia ser obtido um resíduo contendo uma  $\beta$ -D-glucana. Entretanto, este procedimento não foi realizado em virtude do baixo rendimento em carboidratos evidenciado neste extrato.

### 2.1.3.1.3. Líquem A. muehlenbergii

- Extrações Aquosa e Alcalina: Pela extração do líquem A. muehlenbergii, previamente tratado por benzeno-etanol e metanol-água, com água quente<sup>69</sup> ou com solução de álcali quente<sup>46</sup> não foi obtida uma  $\beta$ -D-glucana com apenas ligações (1 → 3) como do tipo laminarana ou com ligações (1 → 3) e (1 → 4) como do tipo liquenana. Contudo, tanto o extrato aquoso quanto o extrato alcalino neutralizado, após processos alternados de congelamento e de degelo, resultaram um resíduo contendo uma  $\beta$ -D-glucana ( $[\alpha]_D^{25} - 42^\circ$ ), cujo espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C daquela obtida por extração aquosa mostrou sinais com deslocamentos químicos típicos para grupos O-acetil<sup>16</sup> em  $\delta$  22,1 para grupo metil (CH<sub>3</sub>) e em  $\delta$  175,3 para grupo carbonila (C=O). Como os grupos O-acetil poderiam migrar com a extração aquosa quente<sup>108</sup> ou serem removidos pela extração com solução de álcali<sup>28</sup> foi realizada uma extração com dimetil-sulfóxido, à temperatura ambiente,<sup>52</sup> do líquem previamente tratado com benzeno-etanol, também à temperatura ambiente, o que presumivelmente evitaria uma alteração estrutural desta glucana. A estrutura do referido polímero foi investigada como descrito mais adiante em Resultados e Discussão item 2.1.3.2.3..

### 2.1.3.1.4. Estudo comparativo entre $\beta$ -D-glucanas sem grupos O-acetil isoladas de líquens

$\beta$ -D-Glucanas do tipo liquenana e do tipo laminarana foram obtidas por extrações aquosa de N. aurantiaco-ater e alca-

lina de St. ramulosum, respectivamente, enquanto que estes tipos de glucanas não foram detectados no líquem A. muehlenbergii.

Liquenana, um polissacarídeo linear insolúvel em água fria mas solúvel em água quente e isolado do líquem C. islandica, foi originalmente descrita, em 1815, por BERZELIUS.<sup>10</sup> Vários estudos estruturais foram então realizados com este polissacarídeo e mostraram a presença de unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosose unidas por ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) numa relação molar de 3:7.<sup>18,90,101</sup> Glucanas similares à liquenana foram encontradas em Cetraria richardsonii,<sup>129,141</sup> Alectoria sarmentosa,<sup>128</sup> Alectoria sulcata<sup>128</sup> e Usnea rubescens<sup>95</sup> (ver Tabela IV anexa Introdução - p. 16). No entanto, o líquem Evernia prunastri produziu uma  $\beta$ -D-glucana estruturalmente diferente, já que revelou ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) numa relação de 3:1.<sup>128</sup> Esta relação molar invertida foi presenciada nas  $\beta$ -D-glucanas de Letharia vulpina e de uma Usnea sp., uma vez que apresentaram ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) na relação de 1:3.<sup>69</sup>

Glucana do tipo laminarana, insolúvel em água fria e em água quente mas solúvel em solução de álcali e com estrutura constituída apenas por ligações (1  $\rightarrow$  3), foi pela primeira vez isolada do líquem St. ramulosum,<sup>7</sup> em 1985, representando assim uma nova e até o momento excepcional caracterização estrutural entre os polissacarídeos líquênicos.

Todavia, a presença de apenas ligações (1  $\rightarrow$  3) ou principalmente de ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) nas estruturas das  $\beta$ -D-glucanas sem grupos O-acetil de líquens apresentando micobiontes ascomicetos não constituiu uma regra geral, pois foram evidenciadas algumas variações estruturais basicamente relacionadas a diferentes ligações glicosídicas e a ocorrência de ramifi

cações nestas moléculas. Um exemplo foi o encontrado no líquem C. islandica,<sup>65</sup> que além da presença dos polissacarídeos liquenana, isoliquenana e galactomanana extraídos com água e já intensivamente estudados, mostrou um polissacarídeo adicional extraído com solução de álcali a partir do líquem residual da extração aquosa. Este polímero apresentou uma estrutura ramificada composta de cadeia principal com unidades de glucopirranose e de ácido glucurônico ligadas (1 → 3) e de cadeias laterais constituídas por unidades de glucopirranose ligadas (1 → 4) e/ou (1 → 6) às unidades da cadeia principal. A preponderância de ligações beta entre as unidades de glucose foi indicada pelo baixo valor da rotação específica e pelo espectro de infra-vermelho, sendo corroborada pela formação de laminaribiose, celobiose e gentiobiose por hidrólise ácida parcial do polímero.

#### 2.1.3.2. $\beta$ -D-GLUCANAS COM GRUPOS O-ACETIL

Uma glucana apresentando configuração  $\beta$ -D e grupos O-acetil foi isolada do líquem A. muehlenbergii, não sendo porém a referida glucana encontrada em St. ramulosum e N. aurantiaco-ater, como pode ser visto a seguir.

##### 2.1.3.2.1. Líquem St. ramulosum

Pelas investigações químicas realizadas com o líquem St. ramulosum foram encontrados basicamente três tipos de polissacarídeos, ou seja, uma  $\alpha$ -D-glucana e uma galactomanana, ambas extraídas com água e com solução de álcali, e uma  $\beta$ -D-glucana,

obtida apenas por extração alcalina. Nestes três polímeros não foi revelada a presença de grupos O-acetil, que poderiam preliminarmente ser detectados pela análise dos seus respectivos espectros de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ . Mas considerando, que os processos de extração com água quente<sup>108</sup> ou com solução de álcali<sup>28</sup> poderiam originar migração ou remoção de grupos O-acetil, foi tentado um outro de procedimento de extração mais brando porém eficaz na obtenção de polissacarídeos O-acilados, utilizando como líquido extrator dimetil-sulfóxido, à temperatura ambiente.<sup>52</sup>

No presente trabalho, tal procedimento de extração foi executado no líqüem St. ramulosum previamente extraído com benzeno-etanol, à temperatura ambiente, resultando uma mistura de polissacarídeos (5,20 g% em relação ao peso de líqüem original) constituída por fucose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose numa relação molar de 3:3:1:12:26:55. Pela análise do espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  desta mistura (Fig. 15), poderia ser ra

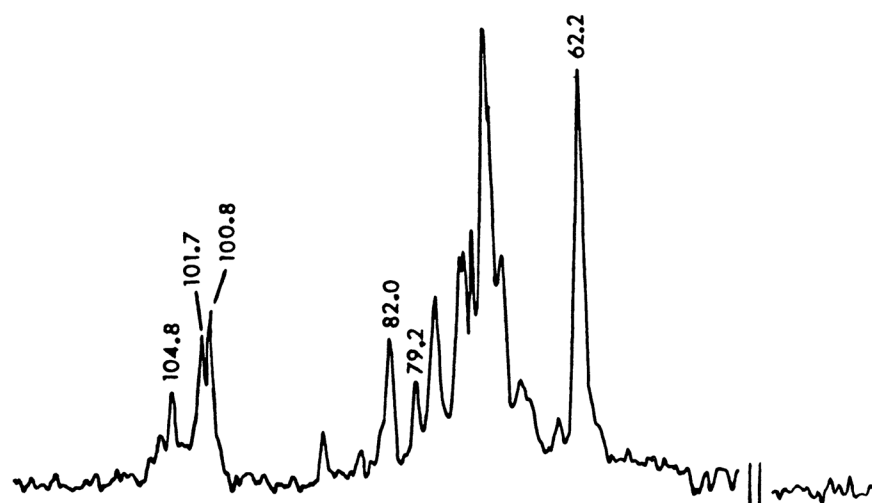


Figura 15 - Espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  da mistura de polissacarídeos obtida por extração com dimetil-sulfóxido do líqüem St. ramulosum, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 1%, a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

cionalizado que a mesma provavelmente apresentou a  $\alpha$ -D-glucana em maior quantidade, com sinais típicos na região de C-1 em  $\delta$  101,7 e 100,8 para C-1 de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosose, contaminada pela galactomanana. Observar que sinais com deslocamentos químicos característicos para grupos O-acetil não foram detectados.

Assim, poderia ser assumido que os polissacarídeos preponderantes no líqüem St. ramulosum não foram estruturalmente O-acetilados.

#### 2.1.3.2.2. Líqüem N. aurantiaco-ater

Este líqüem também apresentou três tipos de polissacarídeos, a saber, uma  $\alpha$ -D-glucana, uma galactomanana e uma  $\beta$ -D-glucana, sendo os três extraídos com água.

Seguindo então a linha de raciocínio anteriormente utilizada em relação ao líqüem St. ramulosum, no presente trabalho, foi do mesmo modo procedida uma extração com dimetil-sulfóxido, à temperatura ambiente,<sup>52</sup> do líqüem N. aurantiaco-ater previamente deslipidificado, obtendo uma mistura de polissacarídeos (30,40 g% do peso de líqüem original) contendo fuco<sub>se</sub>, arabinose, xilose e glucose numa relação molar de 1:6:2:91. Na luz da análise do seu espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C (Fig. 16), que não revelou grupos O-acetil, foi demonstrado que esta mistura presumivelmente apresentou uma abundância do polissacarídeo  $\beta$ -D-glucana, com largos sinais na região de C-1 em  $\delta$  104,5 e 103,6 para C-1 de unidades de glucopiranosose, juntamente com uma pequena quantidade de  $\alpha$ -D-glucana.



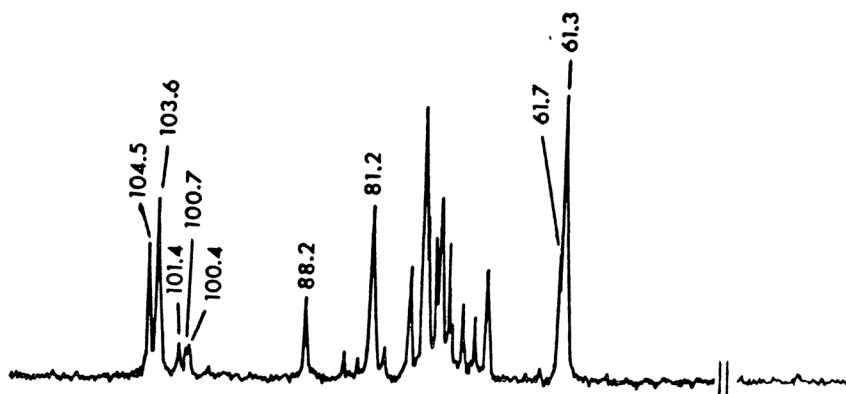


Figura 16 - Espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  da mistura de polissacarídeos obtida por extração com dimetil-sulfóxido do líquem N. aurantiaco-ater, em dimetil-sulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-}^2\text{H}_6$ ), a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

Desta forma, pareceu evidente que os polissacarídeos isolados do líquem N. aurantiaco-ater não apresentaram O-acetilação em suas estruturas químicas.

#### 2.1.3.2.3. Líquem A. muehlenbergii

Ao contrário dos polissacarídeos estruturalmente des-O-acilados presentes nos líquens St. ramulosum e N. aurantiaco-ater, foi constatada a presença de grupos O-acetil numa  $\beta$ -D-glucana contaminada com 3% de galactose e 4% de manose, insolúvel em água fria mas solúvel em água quente, isolada por extração aquosa do líquem A. muehlenbergii,<sup>69</sup> uma vez que seu espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  mostrou sinais típicos em  $\delta$  22,1<sup>16</sup> para grupo me -

til ( $\text{CH}_3$ ) e em  $\delta$  175,3<sup>16</sup> para grupo carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ). Todavia, como os grupos O-acetil poderiam migrar com a extração aquosa quente,<sup>108</sup> no presente trabalho, foi então realizada uma extração com dimetil-sulfóxido, à temperatura ambiente,<sup>52</sup> do referido líquido previamente deslipidificado, a frio, com a finalidade de obter este polissacarídeo estruturalmente intacto. O extrato dimetil-sulfóxido resultante foi adicionado em excesso de etanol, fornecendo um precipitado etanólico com rendimento de 38,00 g% do peso de líquido original. Este precipitado etanólico, após ser analisado por c.f.g. na forma de seus respectivos acetatos de alditóis, mostrou ser constituído por uma glucana, apresentando somente 2% de manose como impureza. (Tabela XV').

A análise de metilação desta glucana revelou que todas as unidades de glucopirranose eram 6-O-substituídas, em virtude do reconhecimento de apenas um componente nos produtos de metilação, identificado como 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-D-glucitol. O valor bastante baixo de sua rotação específica ( $[\alpha]_D^{25} - 42^0$ ) indicou uma configuração  $\beta$ -D para as unidades de glucose, sendo esta configuração confirmada pela análise do seu espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C (Fig. 17). Este espectro mostrou seis sinais com deslocamentos químicos correspondentes aqueles de uma  $\beta$ -D-glucopirranana unida por ligações (1  $\rightarrow$  6),<sup>111</sup> também denominada de pustulana\*, e representados por  $\delta$  104,6, 74,8, 77,4, 71,7, 76,6 e 70,6 para C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 não substituídos e C-6 substituído, respectivamente, de unidades de

\* Uma  $\beta$ -D-glucana unida por ligações (1  $\rightarrow$  3<sub>6</sub>) foi originalmente isolada do líquido Umbilicaria pustulata, sendo atualmente conhecida pela denominação de pustulana.

TABELA XV' - PROPRIEDADES GERAIS DA  $\beta$ -D-GLUCANA COM GRUPOS O-ACETIL ISOLADA DE LÍQUEM E ESTUDADA ESTRUTURALMENTE NO PRESENTE TRABALHO

$\beta$ -D-Glucana O-acetilada	Espécie de Líquem <u>A. muehlenbergii</u>
Líquido Extrator	Dimetil-sulfóxido a frio
Composição em monossacarídeos (%)	Glucose 98 Galactose - Manose 2
$[\alpha]_D^{25}$	- 42°
Nitrogênio (%)	0,31
Solubilidade	Insolúvel em água fria mas solúvel em água quente
Grupos O-acetil (%)	~ 3
Rendimento em relação ao peso de líquem original (g%)	38,00

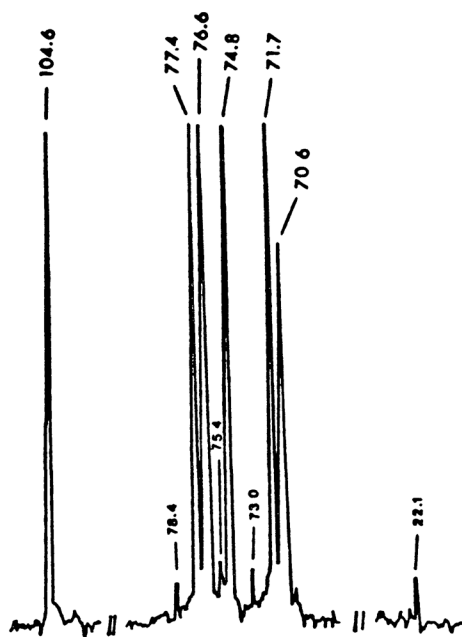


Figura 17 - Espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  da  $\beta$ -D-glucana parcialmente O-acetilada de A. muehlenbergii, em  $\bar{\text{o}}$ xido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  p.p.m..

glucopiranosose (Tabela XVI'). Além disso, o espectro exibiu sinais em  $\delta$  22,1 ( $\text{CH}_3$ ) e 175,3 ( $\text{C}=\text{O}$ ) relacionados a grupos O-acetil,<sup>16</sup> juntamente com outros pequenos sinais de tamanhos aproximadamente iguais em  $\delta$  78,4, 75,4 e 73,0, presumivelmente atribuíveis aos carbonos' O-acetilados na estrutura da glucana.

Assim, pode ser observado que as análises de metilação e de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  foram coincidentes em evidenciar a presença de somente ligações ( $1 \rightarrow 6$ ) entre as unidades de glucose do polissacarídeo. E, ainda, a espectroscopia de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  mostrou ser uma importante ferramenta investigativa, já que preliminarmente identificou grupos O-acetil nesta glucana.

No entanto, para uma caracterização estrutural mais com-

TABELA XVI' - SINAIS<sup>a</sup> E SUAS ATRIBUIÇÕES OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE r.m.n.-<sup>13</sup>C DA  $\beta$ -D-GLUCANA PARCIALMENTE O-ACETILADA DE A. muehlenbergii E DE UMA  $\beta$ -D-GLUCOPIRANANA (1  $\rightarrow$  6) OU PUSTULANA

Atribuição de Sinais	$\beta$ -D-Glucana parcialmente O-acetilada obtida por extração com dimetil-sulfóxido de <u>A. muehlenbergii</u>	$\beta$ -D-Glucopirana (1 $\rightarrow$ 6) ou pustulana <sup>b</sup>
C-1	104,6	104,2
C-2	74,8	74,2
C-3	77,4	76,8
C-4	71,7	70,7
C-5	76,6	76,1
C-6	70,6	70,0

<sup>a</sup> Sinais com deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (p.p.m.) relativos à ressonância do tetrametilsilano (TMS).

<sup>b</sup> Dados obtidos da referência 111.

pleta e precisa, restaria justamente confirmar a presença destes grupos O-acetil, quantificar os mesmos e determinar a distribuição deles na estrutura química do referido polissacarídeo. Tais procedimentos para confirmação, quantificação e localização de grupos O-acetil foram realizados, no presente trabalho, como descritos a seguir.

Inicialmente, a presença de grupos O-acetil foi comprovada pela hidrólise ácida da glucana, que resultou na liberação de ácido acético. Este último foi identificado, diretamente, por c.f.g. utilizando coluna convencional empacotada com Porapak Q<sup>96,97</sup> e, na forma de seu sal sódico (acetato de sódio), através das análises espectroscópicas de r.m.n.-<sup>13</sup>C e de <sup>1</sup>H (Tabela XVII'). Observar que os sinais no espectro de r.m.n.-<sup>13</sup>C provavelmente foram sensíveis às concentrações diferentes de solução de álcali utilizadas para a formação do acetato de sódio, principalmente o sinal relacionado à ressonância do carbono da carbonila. Com estes procedimentos foi conclusivamente reconhecido que o grupo O-acil na estrutura da glucana era representado pelo O-acetil, eliminando desta forma a possibilidade da presença de outros grupos O-acilados.

Em seguida, foi determinado o conteúdo de grupos O-acetil na glucana, por intermédio do método de HESTRIN,<sup>60</sup> em que foram obtidos os valores idênticos a 2,93% para duas amostras iguais. Estes resultados foram validados por saponificação segundo método de TANGHE et al.<sup>130</sup>, cujos valores alcançados foram de 2,97 e 2,77% para duas amostras diferentes. Ambos os métodos concordaram com um valor aproximado de 3%, correspondendo a 1 grupo acetil para cada 8 a 10 unidades de glicose.

TABELA XVII' - SINAIS<sup>a</sup> E SUAS ATRIBUIÇÕES OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE r.m.n. DE <sup>13</sup>C E DE <sup>1</sup>H DO ÁCIDO ACÉTICO LIBERADO POR HIDRÓLISE ÁCIDA DA β-D-GLUCANA PARCIALMENTE O-ACETILADA DE A. muehlenbergii E DO ÁCIDO ACÉTICO AUTÊNTICO

Atribuição de Sinais	Ácido acético liberado por hidrólise ácida da β-D-glu cana parcialmente O-acetilada de <u>A. muehlenbergii</u> , na forma de seu sal sódico		Ácido acético autêntico <sup>b</sup> , na forma de seu sal sódico	
	R.m.n.- <sup>13</sup> C	R.m.n.- <sup>1</sup> H	R.m.n.- <sup>13</sup> C	R.m.n.- <sup>1</sup> H
CH <sub>3</sub>	24,28	1,86	24,08	1,80
C=O	169,41	-	181,99	-

<sup>a</sup> Sinais com deslocamentos químicos expressos em δ (p.p.m.) relativos à ressonância do tetrametilsilano (TMS).

<sup>b</sup> Uma amostra de ácido acético autêntico foi submetida às análises espectroscópicas de r.m.n. em condições idênticas às utilizadas para examinar a amostra de ácido acético liberado por hidrólise ácida da glucana em estudo.

Considerando então, que cerca de 3% de grupos comprovadamente O-acetil estavam presentes na glucana, faltaria apenas determinar a distribuição dos mesmos em sua estrutura química. Assim, a primeira tentativa para localizar grupos O-acetil no polissacarídeo foi realizada de acordo com o método de BELDER & NORRMAN,<sup>28</sup> utilizando o reagente protetor éter metil vinílico na etapa de O-substituição dos grupos hidroxil livres. Contudo, este experimento não foi bem sucedido, de modo que foi procedido, com algumas modificações, o método de BOUVENG,<sup>13,14</sup> que demonstrou ser superior para o polissacarídeo investigado. Seguindo este método, no tratamento inicial do polissacarídeo com o reagente protetor fenilisocianato, visando a O-substituição dos grupos hidroxil livres para a formação do derivado fenilcarbamato, foi empregado dimetil-sulfóxido como solvente, já que a dissolução do polímero na dimetilformamida recomendada não foi completa. Nas etapas subsequentes foram incorporadas as modificações propostas por CORRÊA et al.<sup>21</sup>, sendo representadas pela desacetilação e metilação simultâneas do polissacarídeo fenilcarbamato e pela remoção de grupos fenilcarbamoilas com o íon metil sulfinil carbânion (Fig. 18). O polissacarídeo parcialmente metilado obtido foi então submetido à hidrólise ácida, redução e acetilação, e a mistura resultante de acetatos de alditóis parcialmente metilados foi examinada por c.f.g.-e.m., utilizando coluna capilar empacotada com DB-210. Os componentes principais detectados (Tabela XVIII') foram acetatos de 2-O- (20%), 3-O- (3%) e 4-O-metil (5%) glucitol e o glucitol hexa-O-acetato (71%), em que as posições de O-metilação corresponderam às daquelas dos grupos O-acetil na estrutura da glucana original. Com estes resultados pareceu claro, que determinadas unidades de



TABELA XVIII' - ANÁLISE POR c.f.g.-e.m.<sup>a</sup> DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DAS METODOLOGIAS DE BOUVENG<sup>13,14</sup> E DE CORRÊA et al.<sup>21</sup> PARA A LOCALIZAÇÃO DE GRUPOS O-ACETIL NA  $\beta$ -D-GLUCANA PARCIALMENTE O-ACETILADA OBTIDA POR EXTRAÇÃO COM DIMETIL-SULFÓXIDO DE A. muehlenbergii

Componentes	$\tau^b$	% <sup>c</sup>
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	0,503 (391)	1
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	0,613 (477)	1
2-Me-Glc	0,775 (603)	20
3-Me-Glc	0,814 (633)	3
4-Me-Glc	0,904 (703)	5
Glc	1,000 (778)	71

<sup>a</sup> C.f.g.-e.m. em coluna capilar revestida com DB-210.

<sup>b</sup> Tempo de retenção de cada componente relativo ao do glucitol hexa-O-acetato (tempos de retenção absolutos).

<sup>c</sup> Percentagem (%) da área do pico de cada componente em relação ao total das áreas dos picos.

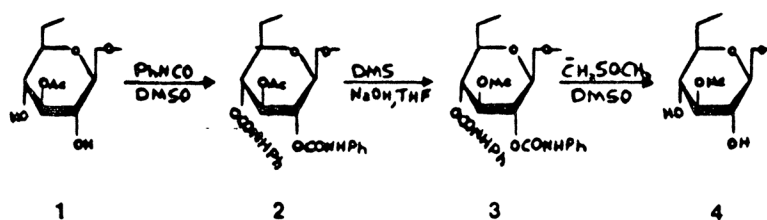


Figura 18 - A  $\beta$ -D-glucana parcialmente O-acetilada (1) foi tratada com uma solução de fenilisocianato ( $\text{PhNCO}$ ) em dimetil-sulfóxido anidro (DMSO) para obter o polissacarídeo fenilcarbamato (2). Este produto foi desacetilado com metilação simultânea, usando sulfato de dimetila (DMS) e NaOH pulverizado em tetraidrofurano anidro (THF), para resultar o polissacarídeo fenilcarbamato metilado (3). A remoção de grupos fenilcarbamoilas de (3) com o íon metil sulfinil carbânion ( $\bar{\text{C}}\text{H}_2\text{SOCH}_3$ ) em DMSO forneceu o polissacarídeo parcialmente metilado (4).

glucopiranosose 6-O-substituídas no polissacarídeo apresentaram grupos O-acetil quase exclusivamente como monossubstituintes nas posições 0-2, 0-3 e 0-4. Entretanto, uma distribuição quantitativa dos mesmos a partir destes resultados não pode ser considerada, uma vez que também pareceu evidente, em comparação com as análises do espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  da glucana (Fig. 17) e do seu conteúdo de grupos O-acetil (1 grupo acetil para cada 8 a 10 unidades de glucose), que os dados precedentes não foram quantitativamente dignos de confiança.

Neste caso, foi então constatado que uma melhor avaliação da distribuição quantitativa dos grupos O-acetil na estrutura da glucana poderia ser obtida, razoavelmente, com o exame do seu espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  (Fig. 17), que mostrou, como já dis-

cutido anteriormente, seis sinais com deslocamentos químicos típicos para pustulana e três sinais menores de tamanhos aproximadamente iguais em  $\delta$  78,4, 75,4 e 73,0 para carbonos' 0-acetilados. Estes últimos puderam ser atribuídos com auxílio da análise qualitativa de BOUVENG modificada por CORRÊA et al., recém mencionada, e levando em consideração os deslocamentos para campo baixo (efeito alfa) e para campo alto (efeito beta) ocorridos devido a acetilação de determinados grupos hidroxil da molécula de metil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo<sup>16</sup> (Tabela XIX'). Observar que os derivados mono-0-acetilados em 0-2, 0-3, 0-4 e 0-6 do metil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo foram preparados pelos prof.<sup>s</sup> Dr.<sup>s</sup> P. A.J. GORIN e A.P. TULLOCH e as análises destes derivados por técnicas espectroscópicas de r.m.n. [ homonuclear (<sup>1</sup>H) convencional e heteronuclear (<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H) bidimensional (2D) ] foram desenvolvidas pelo Dr. M. MAZUREK.

Citando um exemplo, visualizado na Tabela XIX', para melhor compreensão dos efeitos alfa e beta causados pela acetilação, poderia ser considerado o caso do derivado 3-0-acetil, em que a ressonância de C'-3 0-acetilado sofreu um deslocamento para campo baixo de 1,6 p.p.m. (efeito alfa), enquanto que aquelas de C-2 e de C-4 adjacentes foram deslocadas, cada uma, para campo alto por 1,7 p.p.m. (efeito beta). Aplicando agora estas considerações para o espectro da glucana (Fig. 17), poderia ser sugerido que o sinal em  $\delta$  78,4 surgiu de C'-3 0-acetilado, que sofreu um deslocamento para campo baixo de 1,0 p.p.m. (efeito alfa), sendo acompanhado por um sinal de C-2 adjacente em  $\delta$  73,0, que foi deslocado para campo alto por 1,8 p.p.m. (efeito beta). Já o correspondente sinal de C-4 adjacente foi provavelmente deslocado para campo alto (efeito beta), ficando por

TABELA XIX' - DESLOCAMENTOS DAS RESSONÂNCIAS DE  $^{13}\text{C}$  OBSERVADOS PELA MONO-O-ACETILAÇÃO DO METIL  $\beta$ -D-GLUCOPIRANOSÍDEO

Derivado do metil $\beta$ -D-glucopiranosídeo	Sinais e deslocamentos <sup>a</sup> observados devido a mono-O-acétilação (p.p.m.)								
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OCH <sub>3</sub>	C=O	COCH <sub>3</sub>
Não substituído	103,6	73,45	76,2	70,0	76,2	61,1	57,5		
2-O-acetil	101,6 <sup>b</sup> (-2,0)	74,2 <sup>b</sup> (+0,8)	74,2 <sup>b</sup> (-2,0)	70,0	76,4 (+0,2)	61,0 <sup>b</sup> (-0,1)	57,4 <sup>b</sup> (-0,1)	173,7	20,8
3-O-acetil	103,4 <sup>b</sup> (-0,2)	71,8 <sup>b</sup> (-1,7)	77,8 <sup>b</sup> (+1,6)	68,3 (-1,7)	76,05 (-0,1)	60,9 <sup>b</sup> (-0,2)	57,65 <sup>b</sup> (+0,1)	174,2	20,9
4-O-acetil	103,8 <sup>b</sup> (+0,2)	73,6 <sup>b</sup> (+0,1)	74,3 (-1,9)	71,6 <sup>b</sup> (+1,6)	74,3 (-1,9)	60,9 <sup>b</sup> (-0,2)	57,8 <sup>b</sup> (+0,3)	173,8	20,9
6-O-acetil	103,7 <sup>b</sup> (+0,1)	73,4 <sup>b</sup> (-0,1)	75,9 (-0,3)	69,8 (-0,2)	73,7 <sup>b</sup> (-2,5)	63,6 <sup>b</sup> (+2,5)	57,6 <sup>b</sup> (+0,1)	174,4	20,5

<sup>a</sup> Em parênteses.

<sup>b</sup> As atribuições dos sinais de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  foram confirmadas através de experimentos de desacoplamento de prótons via técnica homonuclear ( $^1\text{H}$ ) convencional e através de mapas mostrando a correlação entre deslocamentos químicos de prótons e de carbonos via técnica heteronuclear ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ) bidimensional (2D).

impedido pela larga ressonância de C-6 da  $\beta$ -D-glucana (1  $\rightarrow$  6) em  $\delta$  70,6. Continuando ainda com as proposições, poderia ser atribuído o pequeno sinal em  $\delta$  75,4 para C'-2 O-acetilado, que sofreu um deslocamento alfa para campo baixo de 0,6 p.p.m. com parável a + 0,8 p.p.m. ocorrido pela mono-O-acetilação em O-2 do metil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo (ver Tabela XIX'). Infelizmente, qualquer sinal no espectro para C'-4 O-acetilado deveria também contribuir para aquele em  $\delta$  73,0 e os sinais de C-3 e de C-5 adjacentes seriam então impedidos pelos sinais grandes em  $\delta$  76,6 [ressonância de C-5 da  $\beta$ -D-glucana (1  $\rightarrow$  6)] e em  $\delta$  74,8 [ressonância de C-2 da  $\beta$ -D-glucana (1  $\rightarrow$  6)], respectivamente. Além disso, qualquer contribuição de C'-4 O-acetilado ao sinal em  $\delta$  73,0 deveria ser pequena, já que o tamanho deste sinal foi da mesma grandeza que o tamanho do sinal de C'-3 O-acetilado em  $\delta$  78,4. Assim, poderia ser ponderado, em concordância com as proposições discutidas acima, que os grupos O-acetil foram principalmente distribuídos entre as posições O-2 e O-3 na glucana, com uma menor proporção na posição O-4.

Como conclusão, ficou então demonstrado que o extrato de metil-sulfóxido obtido de A. muelenbergii basicamente apresentou uma  $\beta$ -D-glucana com estrutura química semelhante à da pustulana. A única diferença registrada foi pela ocorrência, na glucana em estudo, de grupos O-acetil como monossubstituintes nas posições O-2, O-3 e O-4, sendo a última posição ocupada em menor quantidade.

#### 2.1.3.2.4. Estudo comparativo entre $\beta$ -D-glucanas com grupos O-acetil isoladas de líquens

$\beta$ -D-Glucana do tipo pustulana e apresentando grupos O-acetil foi preferencialmente obtida por extração com dimetil-sulfóxido do líquem A. muehlenbergii, enquanto que este tipo de glucana não foi encontrado nos líquens St. ramulosum e N. aurantiaco-ater.

Pustulana, uma  $\beta$ -D-glucana insolúvel em água fria mas solúvel em água quente, foi isolada por DRAKE,<sup>30</sup> em 1943, a partir dos líquens U. pustulata e Umbilicaria hirsuta, e mais tarde por LINDBERG & McPHERSON,<sup>82</sup> sendo caracterizada pela presença de apenas ligações (1 → 6) entre as unidades de glucose.<sup>58,82</sup> Este tipo de glucana foi também evidenciado em outros líquens, tais como, Gyrophora esculenta,<sup>96,115,116</sup> Lasallia papulosa,<sup>96,115,116</sup> Umbilicaria angulata,<sup>97</sup> Umbilicaria caroliniana,<sup>97</sup> Umbilicaria polyphylla,<sup>97</sup> Lasallia pennsylvanica<sup>95</sup> e Cladonia amaurocraea<sup>70</sup> (ver Tabela VI anexa na Introdução - p. 18). Observar que estas espécies de líquens, com exceção de C. amaurocraea, foram pertencentes à família Gyrophoraceae, sugerindo uma possível correlação entre a posição taxonômica destas entidades simbióticas e os seus constituintes polissacarídicos. Assim, estes últimos poderiam ser utilizados como compostos de referência para uma provável classificação quimiotaxonômica destes líquens.

Ainda foi observado, que as pustulanas presentes nos líquens U. pustulata, U. hirsuta e C. amaurocraea não apresentam O-acilação (ver a referida Tabela VI - p. 18), e, ao contrário, as dos demais líquens mostraram a presença de grupos O-ace

til, em quantidades variáveis de 2 a 3% e na posição 0-3 das unidades de glucose, sendo esta posição determinada para o caso específico da pustulana 0-acetilada de G. esculenta.<sup>96</sup> Não obstante, seria digno de nota mencionar que a pustulana de U. pustulata foi isolada por extração aquosa quente do líqüem previamente tratado com solução de carbonato de sódio a 2%,<sup>82</sup> enquanto que a de C. amaurocraea foi obtida pela extração alcalina quente do líqüem.<sup>70</sup> Ambos procedimentos poderiam, de alguma forma, ocasionar a separação dos grupos 0-acetil da glucana original, levando à obtenção de pustulanas estruturalmente alteradas, ou seja, sem 0-acetilação. Já as pustulanas dos demais líqüens, que apresentaram grupos 0-acetil,<sup>95,96,97,115,116</sup> foram isoladas dos mesmos por extração aquosa quente, um processo que teoricamente não causaria remoção destes grupos, porém poderia provocar a migração deles de um grupo hidroxil a outro na estrutura da glucana.

Portanto, como pode ser visto, as pustulanas até então isoladas de líqüens provavelmente foram todas parcialmente 0-acetiladas. A única ressalva que deveria ser levada em consideração para a obtenção destas moléculas estruturalmente intactas seria relacionada com o processo de extração, visando basicamente evitar a remoção ou a migração de grupos 0-acetil. Com esta intenção, poderia ser sugerido o processo de extração com dimetil-sulfóxido, à temperatura ambiente, como procedido no líqüem A. muelenbergii, que conduziu ao isolamento de uma pustulana praticamente pura e com grupos 0-acetil, presumivelmente, distribuídos nas posições originais da molécula.

## 2.2. PRODUÇÃO E FUNÇÃO DE POLISSACARÍDEOS LIQUÊNICOS

Do mesmo modo que para os carboidratos de baixo peso molecular estudados anteriormente (poliôis, dissacarídeos, açúcares livres e glicosídeos de poliôis), seria interessante verificar se os polissacarídeos liquênicos recém-estudados, ou seja,  $\alpha$ -D-glucanas, galactomananas e  $\beta$ -D-glucanas, eram produzidos pelo micobionte (simbionte fúngal) ou pelo fotobionte (simbionte algal) dos líquens, ou por ambos. Esta questão foi posta em prática, quando TAKAHASHI et al.<sup>126</sup> realizaram um estudo muito importante, em que compararam os polissacarídeos de micobiontes e ficobiontes isolados e cultivados separadamente de líquens dos gêneros Cladonia, Parmelia e Ramalina, com os polissacarídeos solúveis em água quente característicos destes líquens intactos. Após exame do rendimento, dos componentes monossacarídicos, da solubilidade em água fria, do espectro de infra-vermelho e do valor de rotação específica de cada polissacarídeo, os autores observaram que os polissacarídeos de micobiontes eram muito similares ou idênticos aqueles dos líquens intactos, enquanto que os dos ficobiontes apresentavam características diferentes. Por exemplo, o líquem Ramalina crassa intacto (Tabela XX') produziu dois polissacarídeos solúveis em água quente, em que um deles era solúvel em água fria ( $[\alpha]_D + 31^0$ ), após resfriamento, e o outro insolúvel ( $[\alpha]_D + 140^0$ ). Observar que ambos polissacarídeos eram constituídos pelo monossacarídeo glucose. Já o micobionte deste líquem produziu da mesma forma dois polissacarídeos, um solúvel e o outro insolúvel em água fria, sendo ambos formados por glucose e com rotações específicas semelhantes às obtidas para os polissacarídeos do líquem intacto.



TABELA XX' - PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS DO LÍQUEM Ramalina crassa INTACTO E DE SEUS SIMBIONTES

Polissacarídeos de	Solubilidade em água fria	Composição em monossacarídeos	$[\alpha]_D$	Rendimento em relação ao peso de líquem original (g%)
Líquem intacto	Solúvel	Glucose	+ 31 <sup>0</sup>	2,10
	Insolúvel	Glucose	+ 140 <sup>0</sup>	0,30
Micobionte (Componente fungal)	Solúvel	Glucose	+ 36 <sup>0</sup>	1,30
	Insolúvel	Glucose	+ 136 <sup>0</sup>	1,80
Ficobionte (Componente algal)	Solúvel	Galactose	- 85 <sup>0</sup>	-

<sup>a</sup> Dados obtidos da referência 126.

Por outro lado, o ficobionte do referido líquem produziu um polímero solúvel em água fria, apresentando basicamente galactose e com rotação específica de  $-85^{\circ}$  comparável com aquela encontrada para uma  $\beta$ -D-galactofuranana pura ( $[\alpha]_D -84^{\circ}$ ).<sup>42,70</sup> Portanto, com os resultados obtidos para o líquem R. crassa, bem como para os dos gêneros Cladonia e Parmelia, os autores sugeriram que os polissacarídeos solúveis em água quente isolados de líquens eram principalmente produzidos pelos seus micobiontes.

No entanto, se fosse levado em consideração apenas os resultados de TAKAHASHI et al.<sup>126</sup>, ainda permaneceria uma dúvida a cerca da razão pela qual determinados polissacarídeos líquênicos são produzidos em quantidades extremamente baixas, enquanto que outros são sintetizados em concentrações bastante altas. Esta dúvida poderia ser ilustrada com os estudos realizados por BARON et al.<sup>7</sup>, em 1985, quando os autores obtiveram por extração aquosa do líquem St. ramulosum, uma  $\alpha$ -D-glucana do tipo isoliquenana, e por extração alcalina do mesmo líquem, uma  $\beta$ -D-glucana do tipo laminarana. Como o fotobionte usualmente constitui somente uma pequena proporção da massa líquênica total, sendo em geral circundado totalmente pelo micobionte,<sup>110</sup> poderia ocorrer a possibilidade do fotobionte ser a fonte produtora da  $\beta$ -D-glucana, já que a mesma, além de ser insolúvel em água quente, foi isolada do líquem com rendimento de apenas 0,19 g%. Além disso, este tipo de glucana normalmente é encontrado em algas.<sup>99</sup> Ao contrário, o isolamento da  $\alpha$ -D-glucana, solúvel em água quente, e com rendimento de 4,48 g%, mostrou que provavelmente a mesma tenha surgido do micobionte.

Assim, parece óbvio que muitos estudos deveriam ainda ser realizados para descobrir as fontes produtoras (micobionte ou

fotobionte ?) de polissacarídeos liquênicos, uma vez que os mesmos não são representados apenas por glucanas estruturalmente simples, mas também por polissacarídeos com estruturas químicas mais complexas, ou seja, galactomananas, e inclusive polissacarídeos com grupos O-acilados, como por exemplo, a  $\beta$ -D-glucana parcialmente O-acetilada de A. muehlenbergii. Quanto à esta última, além do empenho em saber qual o simbionte que realmente sintetiza o polissacarídeo, haveria também o interesse em descobrir se os grupos O-acetil foram originalmente biossintetizados em diferentes posições ou ocorreram primeiramente numa única posição e posteriormente sofreram migração na estrutura da glucana. Observar que esta migração poderia ser ocasionada pelas elevadas temperaturas alcançadas, durante o verão, na superfície das rochas em que ocorre o desenvolvimento do líquem.<sup>69</sup>

Como as investigações procedidas sobre a produção de polissacarídeos liquênicos não definiram completamente a origem simbiótica dos mesmos, não seria surpreendente a dificuldade em definir a função dos referidos polissacarídeos nos líquens. Entretanto, se fosse considerado que realmente os polissacarídeos liquênicos em maiores concentrações foram produzidos pelos micobiontes destas entidades simbióticas, alguma luz poderia surgir a cerca das funções destas moléculas, quando se fizesse uma comparação entre fungos e líquens. Por exemplo, em fungos foi demonstrado que a composição polissacarídica de suas paredes celulares é geralmente constituída por uma manana ou por um polissacarídeo contendo manose ligada(o) à proteína, juntamente com uma glucana insolúvel.<sup>43</sup> Por analogia, esta composição poderia ser relacionada com aquela das paredes celulares dos micobiontes liquênicos. Assim, galactomananas com cadeias principais de  $\alpha$ -D-manopirrananas (1 → 6) e ocorrendo naturalmente como proteoglica

nas, ao lado de glucanas insolúveis, principalmente aquelas com configuração beta do tipo liquenana<sup>134</sup> ou do tipo pustulana,<sup>43</sup> presumivelmente constituiriam as paredes celulares dos simbiontes fungais de líquens. Além disso, esta suposição seria de certa forma confirmada pelo procedimento extrativo utilizado para a obtenção, sobretudo, de galactomananas de líquens, já que as mesmas foram geralmente isoladas em maior rendimento através de extrações alcalinas, como foi visto anteriormente, sugerindo a presença destas moléculas em paredes celulares e consequentemente, a necessidade de condições extrativas mais enérgicas para a separação delas da referida estrutura celular.

No entanto, com respeito às glucanas com configuração alfa, embora seja frequentemente aceito que polissacarídeos contendo apenas glucose e  $\alpha$ -ligações, como por exemplo, glicogênio e amido, representam normalmente carboidratos de reserva, foi também reconhecido que nem todos os compostos deste tipo servem como substâncias de armazenamento.<sup>11</sup> Um exemplo, seria o polissacarídeo nigerana, uma  $\alpha$ -D-glucana com ligações (1  $\rightarrow$  3) e (1  $\rightarrow$  4) alternadas e isolada de fungos dos gêneros Aspergillus e Penicillium,<sup>43</sup> que foi demonstrado não ser utilizado pelos microorganismos, mesmo em períodos com limitação de nutrientes. Todavia, muitas investigações evidentemente deveriam ser realizadas para esclarecer esta questão, já que nos primeiros estudos com a isoliquenana, uma  $\alpha$ -D-glucana do líquem C. islandica, a mesma foi denominada de amido liquênico e era considerada como material de reserva alimentar.<sup>102</sup> E outro fato interessante, foi que ao contrário do processo extrativo drástico empregado para o isolamento de heteropolissacarídeos, as  $\alpha$ -D-glucanas de líquens em concentrações relativamente altas

foram comumente extraídas com água, um processo extrativo mais brando, sugerindo que tais moléculas possivelmente estavam presentes no citoplasma dos simbiontes fungais de líquens.

Por outro lado, se fosse considerado que os polissacarídeos líquênicos em concentrações baixas foram sintetizados pelos fotobiontes destas entidades simbióticas, a comparação entre algas e líquens mostraria que a glucana com configuração beta e do tipo laminarana, provavelmente serviria como reserva alimentar para os simbiontes algais de líquens.<sup>99</sup>

## C O N C L U S Õ E S

Com o objetivo de recapitular os resultados alcançados no presente trabalho e paralelamente destacar as conclusões apropriadas, os carboidratos obtidos dos líquens St. ramulosum\*, N. aurantiaco-ater e A. muehlenbergii\*, coletados respectivamente do Brasil, da Antártida e do Canadá, foram relacionados na Tabela XXI', como visualizada na página seguinte. Pela análise desta tabela foram enumeradas as seguintes conclusões:

1. Carboidratos de baixo peso molecular, em particular os polióis manitol e arabinitol, foram comuns aos três líquens investigados, que mostraram conteúdos de manitol inferiores aos de arabinitol como frequentemente evidenciado em outras espécies de líquens. No entanto, uma observação distintamente assinalada foi com respeito a presença de uma proporção entre manitol e arabinitol excepcionalmente baixa no líquem N. aurantiaco-ater e raramente encontrada em outros líquens, que normalmente apresentaram o manitol em quantidades mais destacáveis.<sup>46,70,94</sup>

2.  $\alpha$ -D-Glucanas com ligações (1 → 3) e (1 → 4) e do tipo isoliquenana foram isoladas apenas dos líquens St. ramulosum

\* Observar que também foram citados os carboidratos obtidos por BARON et al.<sup>6,7</sup> e por GORIN & IACOMINI.<sup>46</sup>

TABELA XXI' - CARBOIDRATOS ISOLADOS DOS LÍQUENS St. ramulosum, N. aurantiaco-ater E A. muehlenbergii

Componentes	Líquens		
	<u>St. ramulosum</u>	<u>N. aurantiaco-ater</u>	<u>A. muehlenbergii</u>
Carboidratos de baixo peso molecular	Arabinitol (1,87 g%) <sup>6,7</sup> Manitol (0,34 g%) <sup>6,7</sup> Outros <sup>a</sup> (0,98 g%) <sup>6,7</sup>	Arabinitol (2,66 g%) Manitol (0,15 g%) Outros <sup>a</sup> (0,12 g%)	Arabinitol (1,20 g%) <sup>46</sup> Manitol (0,60 g%) <sup>46</sup> Outros <sup>a</sup> (0,87 g%) <sup>46</sup>
$\alpha$ -D-Glucanas	Com ligações (1 → 3) e (1 → 4) <sup>b</sup> na relação de 1,6:1 [isolada por extração aquosa: 4,48 g%; <sup>6,7</sup> por extração alcalina: 3,06 g% ]	Com ligações (1 → 3) e (1 → 4) <sup>b</sup> na relação de 1,5:1 [3,73 g%]	-
Galactomananas com cadeias principais de $\alpha$ -D-manopiranas (1 → 6)	Cadeias laterais constituídas por $\alpha$ -D-Manp (1 → 2) e $\beta$ -D-Galp (1 → 4) [isolada por extração aquosa: 0,24 g%; por extração alcalina: 3,48 g% ]	Cadeias laterais com mais de uma unidade constituídas predominantemente por unidades terminais não redutoras de $\alpha$ -D-Galp [1,20 g%]	Cadeias laterais constituídas por $\alpha$ -D-Manp (1 → 2) e $\beta$ -D-Galp (1 → 4) [0,60 g%] <sup>46</sup>
$\beta$ -D-Glucanas	Com apenas ligações (1 → 3) <sup>c</sup> [0,19 g%] <sup>6,7</sup>	Com ligações (1 → 3) e (1 → 4) <sup>d</sup> na relação de 1:2 [27,02 g%]	Com apenas ligações (1 → 6) <sup>e</sup> e grupos D-acetil (~ 3%) monos substituindo as posições 0-2, 0-3 e 0-4 [38,00 g%]

<sup>a</sup> O termo "outros" correspondeu aos carboidratos de baixo peso molecular representados por inositol, umbilicina, trealose e sacarose.

<sup>b</sup> Tipo isoliquenana.

<sup>c</sup> Tipo laminarana.

<sup>d</sup> Tipo liquenana.

<sup>e</sup> Tipo pustulana parcialmente D-acetilada.

Nota: Os números entre parênteses representaram os rendimentos dos carboidratos expressos em g% em relação ao peso de líquem original.

e N. aurantiaco-ater. Glucana com configuração  $\alpha$ -D não foi porém encontrada em A. muehlenbergii, a despeito de ser geralmente constatada em líquens, a presença de  $\alpha$ -D-glucanas estruturalmente diferentes e contendo ligações (1 → 3) e (1 → 4) em proporções variáveis (ver Tabela V anexa na Introdução - p. 17).

3. Galactomananas foram obtidas dos três líquens estudados e mostraram cadeias principais idênticas e representadas por  $\alpha$ -D-manopiranas (1 → 6), como aquelas comumente encontradas em galactomananas de diversas espécies de líquens investigadas por GORIN & IACOMINI.<sup>45,46,70</sup> As cadeias laterais, por sua vez, foram constituídas por unidades de  $\alpha$ -D-Manp,  $\alpha$ -D-Galp,  $\beta$ -D-Galp e  $\beta$ -D-Galf invariavelmente distribuídas nas posições 2 e/ou 4 das  $\alpha$ -D-manopiranas (1 → 6). Destas cadeias laterais mereceu duplo destaque aquelas presentes na galactomanana de N. aurantiaco-ater, já que as mesmas aparentemente não mostraram unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose mas apenas unidades terminais não redutoras de  $\alpha$ -D-galactopiranosose ligadas a uma ou mais unidades de manose interna. Surpreendentemente, tais cadeias laterais com mais de uma unidade e especialmente sem galactose em configuração  $\beta$ -D, até o momento, não foram registradas em quaisquer galactomananas isoladas de líquens. Além disso, digno de nota a ser mencionado foi o isolamento, pela primeira vez, do dissacarídeo 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-manose num acetolisado parcial de galactomanana de líquem, especificamente naquele de St. ramulosum, que auxiliou na confirmação da substituição da cadeia lateral de  $\beta$ -D-Galp na posição 4 da cadeia principal da referida galactomanana.



4. Destacadamente,  $\beta$ -D-glucanas com estruturas químicas distintamente diferentes foram características para cada líquem, ou seja, aquela com apenas ligações (1 → 3) e do tipo laminarana em St. ramulosum, a com ligações (1 → 3) e (1 → 4) e do tipo liquenana em N. aurantiaco-ater e a com somente ligações (1 → 6) e do tipo pustulana em A. muehlenbergii. Excepcionalmente, a  $\beta$ -D-glucana de A. muehlenbergii apresentou grupos O-acetil (~ 3%), que foram distribuídos como monossubstituídos nas posições O-2, O-3 e O-4, ao invés da distribuição em uma única posição.

5. Finalmente, considerando que os três líquens, St. ramulosum, N. aurantiaco-ater e A. muehlenbergii, foram proveitosamente estudados no presente trabalho em decorrência da presença de seus carboidratos, em especial dos polissacarídeos, em quantidades significativas, seria de considerável valor destacar ainda o conteúdo total de polissacarídeos obtido pelas extrações aquosa e alcalina de N. aurantiaco-ater (56,52 g% do peso de líquem original) e surpreendentemente alto para um líquem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J.K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F.. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. J. Am. Chem. Soc., 74: 4970-1, 1952.
2. ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. Methods Carbohydr. Chem., 5: 269-76, 1965.
3. AMARAL, D.; KELLY-FALCOZ, F.; HORECKER, B.L. Galactose oxidase of Polyporus circinatus. Methods Enzymol., 9: 87-92, 1966.
4. ASPINALL, G.O.; HIRST, E.L.; WARBURTON, M. The alkali-soluble polysaccharides of the lichen Cladonia alpestris (Reindeer Moss), J. Chem. Soc., 651-5, 1955.
5. ASSUMPÇÃO, R.M.V. & MORITA, T. Manual de Soluções, Reagentes e Solventes; padronização, preparação e purificação. São Paulo, Editora Edgard Blücher, 1968. p. 300.
6. BARON, M. Isolamento e caracterização de  $\alpha$ -D-glucana, laminarana, umbilicina e trealose do líquem Stereocaulon ramulosum. Curitiba, 1985. 110 p. Tese, Mestre, Universidade Federal do Paraná.

7. 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: 235-9, 1988.
8. BARRETO-BERGTER, E. Chemical structure, immunology and application of polysaccharides of fungi and lichens. In: RAHMAN, A. Studies in Natural Products Chemistry. Amsterdam, Elsevier Publishers, 1989. Aceito à publicação.
9. BARRETO-BERGTER, E.; HOGGE, L.; GORIN, P.A.J. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditol acetates on capillary columns of OV-17 and OV-225. Carbohydr. Res., 97: 147-50, 1981.
10. BERZELIUS, J. Versuche über die Mischung des Isländischen Moores und seine Anwendung als Nahrungsmittel. J. Chem. Phys., 7: 317-53, 1815.
11. BLUMENTHAL, H.J. Reserve carbohydrates in fungi. Filamentous Fungi, 2: 292-307, 1976.
12. BOCK, K.; PEDERSEN, C.; PEDERSEN, H. Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 42: 193-225, 1984.
13. BOUVENG, H.O. Phenylisocyanate derivatives of carbohydrates. Acta Chem. Scand., 15 (1): 87-95, 1961.
14. BOUVENG, H.O. Phenylisocyanate derivatives of carbohydrates. II. Location of the O-acetyl groups in birch xylan. Acta Chem. Scand., 15 (1): 96-100, 1961.

15. BOUVENG, H.O. & LINBERG, B. Hydrolysis of methylated poly saccharides. Methods Carbohydr. Chem., 5: 296-8, 1965.
16. BUNDLE, D.R.; JENNINGS, H.J.; SMITH, I.C.P. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of 2-acetamido-2-deoxy-D-hexoses and some specifically deuteriated, O-acetylated, and phosphorylated derivatives. Can. J. Chem., 51: 3812-9, 1973.
17. CAVALCANTI, L.H.S.M.; MAIA, R.F.; LIMA, E.O.; FILHO, L.X. Atividade anti-microbiana "in vitro" da atranorina. Rev. Microbiol., 14(3): 168-71, 1983.
18. CHANDA, N.B.; HIRST, E.L.; MANNERS, D.J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland Moss (Cetraria islandica). J. Chem. Soc., 1951-8, 1957.
19. CHURMS, S.C. Sample preparation and derivation. In: ZWEIG, G. & SHERMA, J. CRC Handbook of Chromatography; carbohydrates. Florida, CRC Press, 1982. v. 1, p. 211-30.
20. COLSON, P.; JENNINGS, H.J.; SMITH, I.C.P. Composition, sequence, and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by carbon-13 nuclear magnetic resonance. J. Am. Chem. Soc., 96: 8081-7, 1974.
21. CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F.; ODEBRECHT, S.; OLIVEIRA, M.L. The distribution of O-acetyl groups in partially acetylated xylan. An. Acad. Brasil. Ciênc., 51 (3): 429-33, 1979.
22. CULBERSON, C.F. Chemical guide to lichen products. In: \_\_\_\_\_. Chemical and Botanical Guide to Lichen Products.

North Carolina, The University of North Carolina Press,  
1969. p. 73-88.

23. CULBERSON, C.F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. J. Chromatogr., 72: 113-25, 1972.
24. CZECZUGA, B. & BUBRICK, P. Investigations of carotenoids in lichens. IX. Carotenoids in lichens from Israel. Isr. J. Bot., 35: 41-6, 1986.
25. CZECZUGA, B. & FERRARO DE CORONA, L. Carotenoids in lichens from Argentina. Biochem. Syst. Ecol., 15 (5): 519-22, 1987.
26. CZECZUGA, B. & SKULT, H. Carotenoids in lichens of Southern Finland. Ann. Bot. Fennici, 25: 229-32, 1988.
27. CZECZUGA, B. & XAVIER-FILHO, L. Investigations on carotenoids in lichens. VII. Some lichens from Brazil. Rev. Brasil. Biol., 47 (1/2): 243-6, 1987.
28. de BELDER, A.N. & NORRMAN, B. The distribution of substituents in partially acetylated dextran. Carbohydr. Res., 8: 1-6, 1968.
29. DOWNS, F. & PIGMAN, W. Determination of O-acetyl groups by the Hestrin method. Methods Carbohydr. Chem., 7: 241-3, 1976.
30. DRAKE, B. Untersuchungen über einige polysaccharide der flechten, vornehmlich das lichenin und das neuentdeckte pustulin. Biochem. Z., 313: 388-99, 1943.

31. DUARTE, J.H. & JONES, J.K.N. Some structural studies on the galactan from the albumen glands of the snail, Strophocheilus oblongus. Carbohydr. Res., 16: 327-35, 1971.
32. 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 (3): 350-6, 1956.
33. DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T. Electrophoresis of dyed polysaccharides on cellulose acetate. Can. J. Chem., 46: 3079-84, 1968.
34. FILHO, L.X. & RIZZINI, C.T. Manual de Liquenologia Brasileiro. 1. ed. Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, 1976. p. 1-205.
35. FLEMING, M. & MANNERS, D.J. A comparison of the fine-structure of lichenin and barley glucan. Biochem. J., 100: 4p, 1966.
36. FLEMING, M. & MANNERS, D.J. The fine structure of isolichenin. Biochem. J., 100: 24p, 1966.
37. FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M.; SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M. Polysaccharides in lichens and fungi. II. Antitumor activities on sarcoma-180 of the polysaccharide preparations from Gyrophora esculenta Miyoshi, Cetraria islandica (L.) Ach. var. orientalis Asahina, and some other lichens. Gann, 59: 421-32, 1968.
38. GARDELL, S. Fractionation on the cellulose columns. Methods

Carbohydr. Chem., 5: 9-14, 1965.

39. GOMES, V.M.V. Bioquímica Clínica; manual de práticas. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. 1975. p. 148-9.
40. GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 38: 13-104, 1981.
41. GORIN, P.A.J. Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. Can. J. Chem., 51: 2375-83, 1973.
42. GORIN, P.A.J.; BARON, M.; IACOMINI, M. Storage products of lichens. In: GALUN, M. CRC Handbook of Lichenology. Florida, CRC Press, 1988. v. 3, p. 9-23.
43. GORIN, P.A.J. & BARRETO-BERGTER, E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In: ASPINALL, G.O. The Polysaccharides. New York, Academic Press, 1983. v. 2, p. 365-409.
44. GORIN, P.A.J.; GIBLIN, E.M.; SLATER, G.P.; HOGGE, L. Improved resolution of O-methylalditol acetates by gas-liquid chromatography on capillary columns with blended coatings of OV-17 and OV-225. Carbohydr. Res., 106: 235-8, 1982.
45. GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens, Cetraria islandica and Ramalina usnea. Carbohydr. Res., 128: 119-32, 1984.
46. GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having

ascomycetous mycosymbionts. Carbohydr. Res., 142: 253-67, 1985.

47. 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: 283-7, 1982.
48. GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. Can. J. Chem., 53: 1212-23, 1975.
49. GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M.; SPENCER, J.F.T. Proton magnetic resonance spectra of Trichosporon aculeatum mannan and its borate complex and their relationship to chemical structure. Can. J. Chem., 46: 2305-10, 1968.
50. GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.F.T.; EVELEIGH, D.E. Enzymic degradation of yeast cell-wall mannans and galactomannans to polymeric fragments containing  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  6)-linked D-mannopyranose residues. Carbohydr. Res., 11: 387-98, 1969.
51. GRANICHSTADTEN, H. & PERCIVAL, E.G.V. The polysaccharides of Iceland Moss (Cetraria islandica). Part I. Preliminary study of the hemicelluloses. J. Chem. Soc., 54-8, 1943.
52. HAGGLUND, E.; LINDBERG, B.; McPHERSON, J. Dimethylsulphoxide, a solvent for hemicelluloses. Acta Chem. Scand., 10 (7): 1160-4, 1956.



53. HALE, M.E. How to Know the Lichens. 2. ed. Iowa, Brown Company Publishers, 1979. 246 p.
54. HALL, L.D. & JOHNSON, L.F. Chemical studies by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy: some chemical shift dependencies of oxygenated derivatives. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 509-10, 1969.
55. HAUAN, E. & KJØLBERG, O. Studies on the polysaccharides of lichens. 1. The structure of a water-soluble polysaccharide in Stereocaulon paschale (L.) Fr.. Acta Chem. Scand., 25 (7): 2622-8, 1971.
56. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J. Chem. Soc., 107: 8-16, 1915.
57. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. Methods Carbohydr. Chem., 5: 357-61, 1965.
58. HELLERQVIST, C.G.; LINDBERG, B.; SAMUELSSON, K. Methylation analysis of pustulan. Acta Chem. Scand., 22 (8): 2736, 1968.
59. HENRIKSSON, E. & SIMU, B. Nitrogen fixation by lichens. Oikos, 22: 119-21, 1971.
60. HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. J. Biol. Chem., 180: 249-61, 1949.
61. HIRST, E.L. & PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. Methods

Carbohydr. Chem., 5: 287-96, 1965.

62. HOUGH, L. & JONES, J.K.N. Chromatography on paper. Methods Carbohydr. Chem., 1: 21-31, 1962.
63. HOUGH, L.; JONES, J.K.N.; WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. J. Chem. Soc., 1702-6, 1950.
64. HOUGH, L.; JONES, J.V.S.; WUSTEMAN, P. On the automated analysis of neutral monosaccharides in glycoproteins and polysaccharides. Carbohydr. Res., 21: 9-17, 1972.
65. HRANISAVLJEVIČ-JAKOVLJEVIČ, M.; MILJKOVIČ--STOJANOVIČ, J.; DIMITRIJEVIČ, R.; MIČOVIČ, V.M. An alkali-soluble polysaccharide from the oak lichen Cetraria islandica (L.) Ach.. Carbohydr. Res., 80: 291-5, 1980.
66. HRANISAVLJEVIČ-JAKOVLJEVIČ, M.; MILJKOVIČ -STOJANOVIČ, J.; DIMITRIJEVIČ, R.; MIČOVIČ, V.M. Water- and alkali-soluble glucans from oak lichen. Carbohydr. Res., 39: 115-23, 1975.
67. HUNECK, S. Lichen substances. In: REINHOLD, L. & LIWSCHITZ, Y. Progress in Phytochemistry. New York, Interscience Publishers, 1968. v. 1, p. 223-346.
68. IACOMINI, M.; DUARTE, G.R.; DUARTE, E.R.; DUARTE, H.S.; FONTANA, J.D.; DUARTE, J.H. Structural study on snail galactans from the genus Biomphalaria. Agric. Biol.

Chem., 45 (6): 1373-80, 1981.

69. IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; BARON, M.; TULLOCH, A.P.; MAZUREK, M. Novel D-glucans obtained by dimethylsulfoxide extraction of the lichens Letharia vulpina, Actinogyra muehlenbergii, and an Usnea sp.. Carbohydr. Res., 176: 117-26, 1988.
70. 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: 237-51, 1985.
71. 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.
72. INGÓLFSDÓTTIR, K.; BLOOMFIELD, S.F.; HYLANDS, P.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. Antimicrob. Agents Chemother., 28 (2): 289-92, 1985.
73. IWATA, S.; NARUI, T.; TAKAHASHI, K.; SHIBATA, S. Separation of carbohydrates by l.c. in an aqueous, silica gel column. Carbohydr. Res., 133: 157-62, 1984.
74. JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. Chem. Commun., (8): 1-70, 1976.
75. JONES, J.K.N. & STOODLEY, R.J. Fractionation using cop-

- per complexes. Methods Carbohydr. Chem., 5: 36-8, 1965.
76. KOMIYA, T. & SHIBATA, S. Polyols produced by the cultured phyco- and mycobionts of some Ramalina species. Phytochemistry, 10: 695-9, 1971.
77. KUHN, R.; TRISCHMANN, H.; LÖW, I. Zur permethylierung von zuckern und glycosiden. Angew. Chem., 67 (1): 32, 1955.
78. LEE, Y. & BALLOU, C.E. Preparation of mannobiose, manno-triose, and a new mannotetraose from Saccharomyces cerevisiae mannan. Biochemistry, 4 (2): 257-64, 1965.
79. LEMIEUX, R.U.; KULLNIG, R.K.; BERNSTEIN, H.J.; SCHNEIDER, W.G. Configurational effects on the proton magnetic resonance spectra of six-membered ring compounds. J. Am. Chem. Soc., 80: 6098-105, 1958.
80. LEWIS, B.A. & SMITH, F. Sugar and derivatives. In: STAHL, E. Thin-Layer Chromatography; a laboratory handbook. 2. ed. New York, Egon Stahl, 1969. p. 807-37.
81. LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. Methods Enzymol., 28: 178-95, 1972.
82. LINDBERG, B. & McPHERSON, J. Studies on the chemistry of lichens. VI. The structure of pustulan. Acta Chem. Scand., 8 (6): 985-8, 1954.
83. 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): 591-5, 1953.
84. LINDBERG, B.; SILVANDER, B.; WACHTMEISTER, C.A. Studies on the chemistry of lichens. 19. Mannitol glycosides in Peltigera species. Acta Chem. Scand., 18 (1): 213-6, 1964.
85. LINDBERG, B.; WACHTMEISTER, C.A.; WICKBERG, B. Studies on the chemistry of lichens. II. Umbilicin, an arabinitol galactoside from Umbilicaria pustulata (L.) Hoffm. Acta Chem. Scand., 6: 1052-5, 1952.
86. LINDBERG, B. & WICKBERG, B. Studies on the chemistry of lichens. 17. The structure of umbilicin. Acta Chem. Scand., 16 (9): 2240-4, 1962.
87. LÖNNGREN, J. & PILOTTI, A. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates. II. Acta Chem. Scand., 25 (3): 1144-5, 1971.
88. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-75, 1951.
89. MAACK, R. Geografia Física do Estado do Paraná. 2. ed. Curitiba, Secretaria de Cultura e do Esporte do Governo do Estado do Paraná, 1981. 450 p.
90. MEYER, K.H. & GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXI. La constitution de la lichénine. Helv. Chim. Acta, 30 (3): 751-61, 1947.
91. MEYER, K.H. & GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXII. L'isolichénine. Helv. Chim. Acta, 30 (3): 761-5, 1947.

92. MIČOVIČ, V.M.; HRANISAVLJEVIČ-JALOVljeVIČ, M.; MILJKOVIČ STOJANOVIČ, J. Structural study of polysaccharides from the oak lichen Evernia prunastri (L.) Ach.. Carbohydr. Res., 10: 525-33, 1969.
93. NEUMÜLLER, G. & VASSEUR, E. The influence of pH on the periodate oxidation of carbohydrates. Ark. Kemi., 5 (21): 235-45, 1953.
94. 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): 1014-9, 1973.
95. NISHIKAWA, Y.; OHKI, K.; TAKAHASHI, K.; KURONO, G.; FUKUOKA, F.; EMORI, M. Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of Lasallia, Usnea, and Cladonia species. Chem. Pharm. Bull., 22 (11): 2692-702, 1974.
96. NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides in lichens and fungi. III. Further investigation on the structures and the antitumor activity of the polysaccharides from Gyrophora esculenta Miyoshi and Lasallia papulosa Llano. Chem. Pharm. Bull., 17 (9): 1910-16, 1969.
97. 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): 1431-34, 1970.

98. OGURA, M.; KOHAMA, T.; FUJIMOTO, M.; KUNINAKA, A.; YOSHINO, H.; SUGIYAMA, H. Structure of malonogalactan: carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of malonogalactan. Agric. Biol. Chem., 38 (12): 2563-4, 1974.
99. PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. Polysaccharides. New York, Academic Press, 1983. v. 2, p. 195-285.
100. PARTRIDGE, S.M. Filter-paper partition chromatography of sugars. 1. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. Biochem. J., 42: 238-50, 1948.
101. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; ROBERTS, J.G. The structure of lichenin. J. Chem. Soc., 3916-24, 1957.
102. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; TURVEY, J.R.; MORGAN, K. The structure of isolichenin. J. Chem. Soc., 623-9, 1961.
103. PERLIN, A.S. & SUZUKI, S. The structure of lichenin: selective enzymolysis studies. Can. J. Chem., 40: 50-6, 1962.
104. PUEYO, G. Constituants glucidiques dans les lichens. I. Polyalcools. Revue bibliographique. Ann. Fals. Exp. Chim., 73 (787): 331-7, 1980.
105. PUEYO, G. Constituants glucidiques dans les lichens. II. Oses. Revue bibliographique. Ann. Fals. Exp. Chim., 73 (789): 509-13, 1980.
106. PUEYO, G. Constituants glucidiques dans les lichens. III.

- Osides. Revue bibliographique. Ann. Fals. Exp. Chim., 74 (797): 343-7, 1981.
107. RAMAUT, J.L.; SERUSIAUX, E.; BROUERS, M.; CORVISIER, M. Lichen acids of the Stereocaulon ramulosum group in Central East Africa. The Bryologist, 81 (3): 415-21, 1978.
108. REICHER, F.; CORRÉA, J.B.C.; GORIN, P.A.J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of Mimosa scabrella (bracatinga). A study of O-acetyl group migration. Carbohydr. Res., 135: 129-40, 1984.
109. REUTIMANN, P. & SCHEIDEGGER, C. Importance of lichen secondary products in food choice of two oribatid mites (acari) in an alpine meadow ecosystem. J. Chem. Ecol., 13 (2): 363-9, 1987.
110. RODERIC, C. Lichens. In: \_\_\_\_\_. Symbiotic Fungi. London, John Wiley & Sons, 1977. p. 226-53.
111. SAITŌ, H.; OHKI, T.; TAKASUKA, N.; SASAKI, T. A  $^{13}\text{C}$ -n.m.r.-spectral study of a gel-forming, branched (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-glucan (lentinan) from Lentinus edodes, and its acid-degraded fractions. Structure, and dependence of conformation on the molecular weight. Carbohydr. Res., 58: 293-305, 1977.
112. SAWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal. Chem., 37 (12): 1602-4, 1965.



113. SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. Methods Carbohydr. Chem., 5: 38-44, 1965.
114. SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. Anal. Biochem., 96: 282-92, 1979.
115. 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): 2362-9, 1968.
116. SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M.; FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M. Studies on the chemical structures of the new glucans isolated from Gyrophora esculenta Miyoshi and Lasallia papulosa (Ach.) Llano and their inhibiting effect on implanted sarcoma-180 in mice. Chem. Pharm. Bull., 16 (8): 1639-41, 1968.
117. SILVA, M.L.C.C. Componentes carboidratados do líquem Sticta damaecornis (Sw.) Ach.. Curitiba, 1986. 90 p. Tese, Mestre, Universidade Federal do Paraná.
118. SILVA, J.O.; LEITE, J.E.M.; PAULO, M.Q.; FILHO, L.X. Atividade antimicrobiana de líquens brasileiros. Bol. Soc. Brot., Sér. 2, 59: 87-96, 1986.
119. SMITH, R.I.L. Plant ecological studies in the fellfield ecosystem near Casey Station, Australian Antarctic Territory, 1985-1986. Antarct. Surv. Bull., 0 (72): 81-91, 1986.

120. SNYDER, L.R. & KIRKLAND, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. New York, John Wiley & Sons, 1974. p. 431-44.
121. SPIRO, R.G. Analysis of sugars found in glycoproteins. Methods Enzymol., 8: 3-26, 1966.
122. SPIRO, R.G. Characterization of carbohydrate units of glycoproteins. Methods Enzymol., 8: 26-52, 1966.
123. STARK, J.B.; WALTER, E.D.; OWENS, H.S. Method of isolation of usnic acid from Ramalina reticulata. J. Am. Chem. Soc., 72: 1819, 1950.
124. STEVENS, E.S. & SATHYANARAYANA, B.K. Conformation of (1 → 6)-β-D-glucan by vacuum-ultraviolet circular dichroism. Carbohydr. Res., 160: 131-5, 1987.
125. TAKAHASHI, K.; KON, T.; YOKOTA, I.; SHIBATA, S. Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of stereocaulaceous lichens. Carbohydr. Res., 89: 166-73, 1981.
126. TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S. Polysaccharides of lichen symbionts. Chem. Pharm. Bull., 27 (1): 238-41, 1979.
127. TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S.; INOMATA, M.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. VI. Antitumour active polysaccharides of lichens of Stictaceae. Chem. Pharm. Bull., 22 (2): 404-8, 1974.
128. TAKEDA, T.; FUNATSU, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Poly -

- saccharides of lichens and fungi. V. Antitumour active polysaccharides of lichens of Evernia, Acroscyphus and Alectoria spp.. Chem. Pharm. Bull., 20 (11): 2445-9, 1972.
129. TAKEDA, T.; NISHIKAWA, Y.; SHIBATA, S. A new  $\alpha$ -glucan from the lichen Parmelia caperata (L.) Ach.. Chem. Pharm. Bull., 18 (5): 1074-5, 1970.
130. TANGHE, L.J.; GENUNG, L.B.; MENCH, J.W. Determination of acetyl content and degree of substitution of cellulose acetate. Methods Carbohydr. Chem., 3: 201-3, 1963.
131. TEARLE, P.V. Cryptogamic carbohydrate release and microbial response during spring freeze-thaw cycles in Antarctic fellfield fines. Soil Biol. Biochem., 19 (4): 381-90, 1987.
132. TOENNIES, G. & KOLB, J.J. Techniques and reagents for paper chromatography. Anal. Chem., 23 (6): 823-6, 1951.
133. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166 (4219): 444, 1950.
134. TVAROSKA, I.; OGAWA, K.; DESLANDES, Y.; MARCHESSAULT, R.H. Crystalline conformation and structure of lichenan and barley  $\beta$ -glucan. Can. J. Chem., 61: 1608-16, 1983.
135. UKAI, S.; YOKOYAMA, S.; HARA, C.; KIH0, T. Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the fruit body of Ganoderma japonicum Lloyd. Carbohydr. Res., 105: 237-45, 1982.

136. ULANDER, A. & TOLLENS, B. Untersuchungen über die kohlenhydrate der flechten. Chem. Ber., 39: 401-9, 1906.
137. WHISTLER, R.L. & BeMILLER, J.N. Cellulose column chromatography. Methods Carbohydr. Chem., 1: 47-50, 1962.
138. WHISTLER, R.L.; BUSHWAY, A.A.; SINGH, P.P. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32: 235-75, 1976.
139. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. Methods Carbohydr. Chem., 2: 211-5, 1963.
140. YOKOTA, I. & SHIBATA, S. A polysaccharide of the lichen, Stereocaulon japonicum. Chem. Pharm. Bull., 26 (9): 2668-70, 1978.
141. YOKOTA, I.; SHIBATA, S.; SAITŌ, H. A  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. Carbohydr. Res., 69: 252-8, 1979.

## P U B L I C A Ç Õ E S

As publicações dos autores Madalena BARON, Marcello IACOMINI e Philip A.J. GORIN, que registraram as investigações químicas efetuadas com os líquens St. ramulosum, N. aurantiaco-ater e A. muehlenbergii, foram as seguintes:

1. IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; BARON, M.; TULLOCH, A.P.; MAZUREK, M. Novel D-glucans obtained by dimethylsulfoxide extraction of the lichens Letharia vulpina, Actinogyra muehlenbergii, and an Usnea sp.. Carbohydr. Res., 176: 117-26, 1988.
2. BARON, M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Isolation and identification of a linear (1 → 3)-linked β-D-glucan and other carbohydrate components of the lichen Stereocaulon ramulosum (Sw.) Räsusch. Carbohydr. Res., 177: 235-9, 1988.\*
3. GORIN, P.A.J.; BARON, M.; IACOMINI, M. Storage products of lichens. In: GALUN, M. CRC Handbook of Lichenology. Flo-

\* Dados obtidos a partir da dissertação de Mestrado de Madalena BARON, intitulada "Isolamento e caracterização de α-D-glucana, laminarana, umbilicina e trealose do líquem Stereocaulon ramulosum" e defendida em 1985, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

rida, CRC Press, 1988. v. 3, p. 9-23.

4. BARON, M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structural studies on a galactomannan isolated from the lichen Stereocaulon ramulosum. Agric. Biol. Chem., 1989. Aceito à publicação.
5. BARON, M.; IACOMINI, M.; FANTA, E.S.E.; GORIN, P.A.J. Carbohydrate components of Newropogon aurantiaco-ater, an antarctic lichen. An. Acad. Brasil. Ciênc. A ser submetida à publicação.