

SANDRA MARA WORANOVICZ BARREIRA



**ESTUDO COMPARATIVO DE POLISSACARÍDEOS
E OLIGOSSACARÍDEOS DE LIQUENS
DO GÊNERO *Cladonia***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

CURITIBA
1999

SANDRA MARA WORANOVICZ BARREIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DE POLISSACARÍDEOS
E OLIGOSSACARÍDEOS DE LIQUENS
DO GÊNERO *Cladonia***

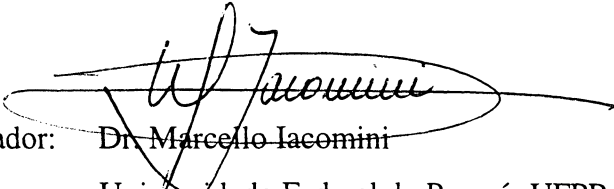
Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.


CURITIBA
1999

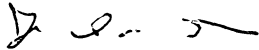
SANDRA MARA WORANOVICZ BARREIRA


ESTUDO COMPARATIVO DE POLISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS DE
LIQUENS DO GÊNERO *Cladonia*

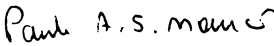
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências no
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão
formada pelos professores:


Orientador: Dr. Marcelo Iacomini
Universidade Federal do Paraná- UFPR


Membros: Dr.ª Fany Reicher
Universidade Federal do Paraná- UFPR


Dr. José Osvaldo Previato
Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ


Dr. Luiz Rodolpho Travassos
Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP


Dr. Paulo Antonio de Souza Mourão
Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

Curitiba, 23 de setembro de 1999.

ORIENTADOR: DR. MARCELLO IACOMINI

COORIENTADOR: DR. PHILIP ALBERT JAMES GORIN

PARTE DESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DA “SIMON FRASER UNIVERSITY, BURNABY, BRITISH COLUMBIA, CANADA”, SOB A ORIENTAÇÃO DO DR. BRIAN MARIO PINTO.

Como o destino impõe ao peixe o nadar e o imergir de contínuo, assim o pesquisador e mestre de toda e qualquer onda evolutiva condenam-se ao estudo e à inovação da sua desapoderada oficina modernizante. VJB

Ut piscis ad nandum et immergendum perpetuo damnatur, sic in sua officina primae, secundae vel tertiae undae magister et inquisitor ad discendum et innovandum in servitutem abducti. (Virgilius Joshua Ballesterius)

*Ao meu marido Silvino
e aos meus pais Magdalena e
Salvador, com amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Marcello Iacomini o conhecimento, a confiança e as lições no decorrer deste trabalho;

ao meu coorientador professor Dr. Philip Albert James Gorin, o seu apoio e sugestões para o desenvolvimento desta tese;

ao professor Dr. Brian Mario Pinto, a grata oportunidade de desenvolver parte deste trabalho no Departamento de Química da Simon Fraser University (SFU), Burnaby, BC, Canada;

às professoras Dr^a Fany Reicher e Dr^a Maria Eugênia Rabello Duarte, a participação como membros da banca examinadora interna, bem como as sugestões enriquecedoras;

à professora Dr^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira, coordenadora do Curso de Pós-Graduação, a amizade, a atenção e o carinho em todas as etapas desta caminhada;

aos coordenadores que estiveram à frente do Departamento de Bioquímica, na pessoa da Dr^a Glaci T. Zancan, pelo exemplo de sua dedicação à pesquisa;

a todos os professores e funcionários dos Departamentos de Bioquímica e Farmácia, a generosa colaboração prestada;

ao Dr. Marcelo Pinto Marcelli (Instituto de Botânica, São Paulo, SP), a coleta e classificação dos líquens estudados;

ao Dr. Giangiacomo Torri (Istituto Ronzoni, Milano, Italia), Marcelline Tracey (Simon Fraser University, Burnaby, BC, Canada) e César Augusto Tischer (Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná), as análises espectroscópicas;

ao Dr. Blair D. Johnston (Simon Fraser University, Canada), Dr. Herman van Halbeek (University of California San Diego, USA) e Dr. Teuvo Ahti (University of Helsinki, Finland), as valiosas discussões no decorrer deste trabalho;

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Pronex-

Carboidratos, o apoio financeiro;

às bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas e da subsede do Setor de Ciências da Saúde, a colaboração, a atenção e a disposição;

ao professor Virgílio Josué Balestro, a adequação sintática de regência, concordância e colocação do português;

aos professores Dr. José Roberto Cavazzani, Dr^a Miriam Blumel Chociai e Dr^a Tânia Maria Bordin Bonfim, o incentivo e a amizade;

às minhas amigas Cíntia, Patrícia, Selene e Sílvia, os anos inesquecíveis de convivência, carinho e ajuda inestimáveis;

aos colegas de laboratório César, Cirene, Guilherme, Juliana e Marcos, os momentos de convivência e colaboração; aos alunos de Iniciação Científica Andréia, Leticia, Washington, Elaine e Patrícia, o carinho e ajuda dispensados;

aos amigos Anat e Gerardo, a colaboração, cumplicidade e nossos alegres *coffee breaks* na *cafeteria*; meus dias longe de meu país não teriam sido os mesmos sem vocês;

aos amigos Alessandra, Armindo, Maria Aparecida, Vandeir, Ana Cristina e “vó” Fúlvia, a amizade, paciência e inesgotável colaboração durante o tempo em que morei em British Columbia, Canada, minha eterna gratidão;

a Denise, Marco Antônio e Allan que, mesmo de longe, sempre demonstraram carinho, estímulo e apoio;

à minha mãe, a preocupação para que meus objetivos fossem alcançados; ao meu pai, *in memoriam*, as lições de vida deixadas;

ao meu marido Silvino, a dedicação e incentivo, a compreensão e amizade durante a realização deste trabalho, o meu eterno amor;

last not least, a Deus em quem vivemos, nos movemos e somos e a quem tudo devemos, como à causa das causas incausada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 LIQUENS E SUAS APLICAÇÕES	2
1.2 QUÍMICA DOS LIQUENS	3
1.2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	4
1.2.2 METABÓLITOS PRIMÁRIOS	4
1.2.2.1 Carotenóides	4
1.2.2.2 Aminoácidos e proteínas	5
1.2.2.3 Glicolípideos	6
1.2.2.4 Carboidratos	6
1.2.2.4.1 Carboidratos de baixa massa molecular	6
1.2.2.4.2 Polissacarídeos	8
1.3 TAXONOMIA E QUIMIOTAXONOMIA	20
1.4 OS GÊNEROS <i>Cladonia</i> E <i>Cladia</i>	21
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 LIQUENS EM ESTUDO.....	27
3.1.1 COLETA E CLASSIFICAÇÃO	27
3.1.2 ISOLAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DOS LIQUENS EM ESTUDO	28
3.1.2.1 Extração clorofórmio-metanol	28
3.1.2.2 Extração metanol-água	29
3.1.2.3 Extração alcalina	29
3.1.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	30
3.1.3.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo	30
3.1.3.2 Separação dos polissacarídeos solúveis em água por precipitação com solução de Fehling	31

3.1.3.3	Separação dos polissacarídeos do sobrenadante de Fehling por precipitação com Cetavlon	32
3.1.3.4	Purificação da fração Sobrenadante de Fehling precipitada em pH 8,5	33
3.2	ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DOS LIQUENS EM ESTUDO	34
3.2.1	COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS	34
3.2.1.1	Hidrólise ácida total	34
3.2.1.2	Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida	34
3.2.2	TESTE DE HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR ..	35
3.2.2.1	Cromatografia de gel permeação (GPC)	35
3.2.3	METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	36
3.2.3.1	Metilação dos polissacarídeos das frações Precipitado de Fehling e Sobrenadante de Fehling: polissacarídeos solúveis em água	36
3.2.3.2	Metilação da glucana de <i>Cladonia penicillata</i> : polissacarídeo insolúvel em água	37
3.2.3.3	Análise dos polissacarídeos metilados na forma de acetatos de alditóis	38
3.2.4	DEGRADAÇÃO TIPO SMITH DE POLISSACARÍDEOS	38
3.2.4.1	Degradação de polissacarídeos seguida de hidrólise ácida total.....	38
3.2.4.2	Degradação da glucana de <i>Cladonia penicillata</i> seguida de hidrólise ácida parcial.....	39
3.2.5	DETERMINAÇÃO DA CADEIA PRINCIPAL DA GALACTOMANOGLUCANA DE <i>Cladonia miniata</i>	39
3.2.6	ACETÓLISE PARCIAL DOS POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO PRECIPITADO DE FEHLING	40
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	41
3.3.1	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	41
3.3.1.1	Cromatografia em papel (CP) e em camada delgada (TLC)	41
3.3.1.2	Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)	42
3.3.1.3	Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)	42
3.3.1.4	Cromatografia em coluna de sílica gel	43
3.3.2	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	44
3.3.2.1	Ressonância magnética nuclear de próton (RMN ¹ H)	44
3.3.2.2	Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN ¹³ C)	45
3.3.3	MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	45
3.3.4	POLARIMETRIA	45

3.3.5 MÉTODOS COMPLEMENTARES	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 COMPONENTES SOLÚVEIS NOS EXTRATOS CLOROFÓRMIO-METANÓLICO E METANOL-AQUOSO	55
4.2 POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO ALCALINA	55
4.2.1 POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO PRECIPITADO CONGELAMENTO-DEGELO	58
4.2.2 POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO SOBRENADANTE DE FEHLING	67
4.2.2.1 Galactomanoglucana de <i>Cladonia connexa</i>	77
4.2.2.2 Galactomanoglucana de <i>Cladonia signata</i>	81
4.2.2.3 Polissacarídeo de <i>Cladia aggregata</i>	83
4.2.3 POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO PRECIPITADO DE FEHLING	86
4.2.3.1 Galactoglucomanana de <i>Cladonia substellata</i>	87
4.2.3.2 Galactoglucomanana de <i>Cladonia ibitipocae</i>	95
4.2.3.3 Galactoglucomanana de <i>Cladonia penicillata</i>	96
4.2.3.4 Galactoglucomanana de <i>Cladonia crispatula</i>	100
4.2.3.5 Galactoglucomanana de <i>Cladonia miniata</i> e <i>C. salmonea</i>	102
4.2.3.6 Galactoglucomanana de <i>Cladonia connexa</i>	104
4.2.3.7 Galactoglucomanana de <i>Cladonia imperialis</i> e <i>C. clathrata</i>	107
4.2.3.8 Galactoglucomanana de <i>Cladonia furcata</i> 22975	108
4.2.3.9 Características comuns dos heteropolímeros isolados da fração Precipitado de Fehling.....	109
4.2.4 OLIGOSSACARÍDEOS	111
4.2.4.1 Oligossacarídeos isolados de <i>Cladonia substellata</i>	111
4.2.4.2 Oligossacarídeos isolados de <i>Cladonia ibitipocae</i>	131
4.2.4.3 Oligossacarídeos isolados de <i>Cladonia penicillata</i>	144
4.2.4.4 Oligossacarídeos isolados de <i>Cladonia crispatula</i> e <i>C. miniata</i>	148
4.2.4.5 Oligossacarídeos isolados de <i>Cladonia connexa</i>	151
4.2.4.6 Oligossacarídeo isolado de <i>Cladonia imperialis</i>	151
5 CONCLUSÕES	154
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158
ANEXO I	171

LISTA DE FIGURAS

1.1	Fragmentos dos líquens <i>Cladonia clathrata</i> , <i>C. imperialis</i> , <i>C. furcata</i> (23007), <i>C. furcata</i> (22975) e <i>C. signata</i>	50
1.2	Fragmentos dos líquens <i>Cladonia connexa</i> , <i>C. crispatula</i> , <i>C. ibitipocae</i> e <i>C. penicillata</i>	51
1.3	Fragmentos dos líquens <i>Cladonia miniata</i> , <i>C. substellata</i> , <i>C. salmonea</i> e <i>Cladia aggregata</i>	52
2	Espectro de RMN ¹³ C de α-glucanas obtidas das espécies de <i>Cladonia</i> em estudo	60
3	Integração da região de H-1 do espectro de RMN ¹ H da α-glucana isolada de <i>Cladonia penicillata</i>	61
4	Espectro de ¹ H, ¹ H COSY da α-glucana isolada de <i>Cladonia penicillata</i>	63
5	Espectro de ¹ H, ¹³ C HMQC da α-glucana isolada de <i>Cladonia penicillata</i>	64
6	Espectro de RMN ¹³ C da glucana obtida por extração alcalina de <i>Cladonia furcata</i>	69
7	Cromatograma da fração precipitada em pH 8,5 obtida a partir do sobrenadante de Fehling em coluna de gel Sepharose CL-4B	71
8.1	Espectro de RMN ¹³ C de heteropolímeros da fração Sobrenadante de Fehling obtidos de <i>Cladonia crispatula</i> , <i>C. crispatula</i> (fração C), <i>C. penicillata</i> , <i>C. signata</i> , <i>C. imperialis</i> e <i>C. miniata</i>	73
8.2	Espectro de RMN ¹³ C de heteropolímeros da fração Sobrenadante de Fehling obtidos de <i>Cladonia salmonea</i> , <i>C. clathrata</i> , <i>C. ibitipocae</i> , <i>C. connexa</i> e <i>C. substellata</i>	74
9	Espectro de RMN ¹³ C do polissacarídeo residual resultante da degradação de Smith parcial da galactomanoglucana de <i>Cladonia miniata</i>	76
10	Espectro de RMN ¹³ C da fração sobrenadante de Fehling de <i>Cladia aggregata</i>	84
11	Espectro de RMN ¹³ C da fração sobrenadante de Fehling de <i>Cladina stellaris</i>	85
12	Espectro de RMN ¹³ C da fração sobrenadante de Fehling de <i>Cladina confusa</i>	85
13.1	Região de C-1 de RMN ¹³ C de heteropolímeros da fração Precipitado de Fehling obtidos de <i>Cladonia substellata</i> , <i>C. ibitipocae</i> , <i>C. penicillata</i> , <i>C. crispatula</i> , <i>C. miniata</i> e <i>C. salmonea</i>	89
13.2	Região de C-1 de RMN ¹³ C de heteropolímeros da fração Precipitado de Fehling obtidos de <i>Cladonia connexa</i> , <i>C. imperialis</i> , <i>C. clathrata</i> , <i>C. furcata</i> 22975, <i>C. furcata</i> 23007 e <i>C. signata</i>	90

13.3	Região de C-1 de RMN ¹³ C de heteropolímeros da fração Precipitado de Fehling obtidos de <i>Cladonia amaurocraea</i> , <i>Cladonia stellaris</i> , <i>Cladonia confusa</i> e <i>Cladonia aggregata</i>	91
14	Fracionamento de monossacarídeos e oligossacarídeos em HPLC, fase reversa, detectados por IR. Fonte: <i>Cladonia substellata</i>	111
15	Fracionamento de oligossacarídeos em HPLC, fase normal, detectados por IR. Fonte: <i>Cladonia substellata</i>	113
16	Espectro de ¹ H, ¹³ C HMQC de α-D-Manp-(1→2)-αβ-D-Manp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	115
17	Espectro de ¹ H, ¹ H COSY de α-D-Manp-(1→2)-αβ-D-Manp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	116
18	Espectro de RMN ¹ H de α-D-Manp-(1→2)-αβ-D-Manp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	117
19	Espectro de ¹ H, ¹ H NOESY de α-D-Manp-(1→2)-αβ-D-Manp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	118
20	Espectro de RMN ¹ H de α-D-Manp-(1→3)-αβ-D-Galp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	120
21	Espectro de ¹ H, ¹ H COSY de α-D-Manp-(1→3)-αβ-D-Galp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	121
22	Espectro de ¹ H, ¹ H NOESY de α-D-Manp-(1→3)-αβ-D-Galp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	122
23	Espectro de ¹ H, ¹ H COSY de 1,2,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-3- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-α-D-manopiranosil)-αβ-D-galactopiranosil obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	124
24	Espectro de RMN ¹ H de α-D-Manp-(1→2)-[β-D-Glcp-(1→4)]-αβ-D-Manp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	126
25	Espectro de ¹ H, ¹ H COSY de α-D-Manp-(1→2)-[β-D-Glcp-(1→4)]-αβ-D-Manp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	127
26	Espectro de ¹ H, ¹ H NOESY de α-D-Manp-(1→2)-[β-D-Glcp-(1→4)]-αβ-D-Manp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	128
27	Espectro de ¹ H, ¹³ C HMQC de α-D-Manp-(1→2)-[β-D-Glcp-(1→4)]-αβ-D-Manp obtido da galactoglucomanana de <i>C. substellata</i>	129

28.1	Espectro de RMN ^1H de 1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i>	133
28.2	Espectro parcial de RMN ^1H de 1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i>	134
29.1	Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de 1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)-D- $\alpha\beta$ -manopiranosose obtido da galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i>	135
29.2	Região expandida do espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de 1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i>	136
30	Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY de 1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i>	137
31	Fracionamento de monossacarídeos e oligossacarídeos em HPLC, fase reversa, detectados por IR. Fonte: <i>Cladonia ibitipocae</i> , após 48 h, 96 h e 144 h em acetólise	139
32	Espectro de RMN ^1H de 1,3,6-tri- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)-[4- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)]- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i>	142
33	Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de 1,3,6-tri- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)-[4- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)]- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i>	143
34	Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY de 1,3,6-tri- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)-[4- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)]- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i>	145
35	Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY de 1,3,6-tri- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)-[4- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)]- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i>	146
36	Fracionamento de monossacarídeos e oligossacarídeos em HPLC, fase reversa, detectados por IR. Fonte: <i>Cladonia penicillata</i>	147
37	Fracionamento de monossacarídeos e oligossacarídeos em HPLC, fase reversa, detectados por IR. Fonte: <i>Cladonia crispatula</i>	149

LISTA DE TABELAS

1	Rendimento (g%) de frações obtidas de extrações de <i>Cladonia</i> spp. e <i>Cladia aggregata</i>	56
2	Rendimento (g%) e composição das frações obtidas do extrato alcalino de <i>Cladonia</i> spp. e <i>Cladia aggregata</i>	57
3	Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) obtidos da α -glucana de <i>Cladonia penicillata</i>	65
4	Propriedades dos polissacarídeos isolados da fração Sobrenadante de Fehling de <i>Cladonia</i> spp. e <i>Cladia aggregata</i>	68
5	Análise por metilação de galactomanoglucanas isoladas de <i>Cladonia connexa</i> e <i>Cladonia signata</i>	78
6	Propriedades dos heteropolissacarídeos isolados da fração Precipitado de Fehling de <i>Cladonia</i> spp. e <i>Cladia aggregata</i>	87
7	Análise por metilação de polissacarídeos (Precipitado de Fehling) isolados dos líquens	92
8	Análise por degradação de Smith de polissacarídeos (Precipitado de Fehling) isolados dos líquens	93
9	Dados de RMN ^1H para o dissacarídeo 2- <i>O</i> - α -D-manopiranosil- $\alpha\beta$ -D-manose	114
10	Dados de RMN ^1H para o dissacarídeo 3- <i>O</i> - α -D-manopiranosil- $\alpha\beta$ -D-galactopiranosose	119
11	Dados de RMN ^1H para o dissacarídeo 1,2,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-3- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-galactopiranosose	123
12	Dados de RMN ^1H para o trissacarídeo α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose	131
13	Dados de RMN ^1H para o dissacarídeo 1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose	138
14	Dados de RMN ^1H para o trissacarídeo 1,3,6-tri- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-manopiranosil)-[4- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)]- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose ..	141
15	Dados de RMN ^1H para os dissacarídeos α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- $\alpha\beta$ -D-Manp e β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-Manp (acetilados)	148
16	Dados de RMN ^1H para os dissacarídeos α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- $\alpha\beta$ -D-Manp e β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-Galp (acetilados)	150
17	Oligossacarídeos produzidos a partir de galactoglucomanas das espécies em estudo	153

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

~	- aproximadamente
[α]	- rotação específica
CCD	- cromatografia em camada delgada
CDCl_3	- clorofórmio deuterado
Cetavlon	- brometo de hexadeciltrimetilamônio
CH_3I	- iodeto de metila
COSY	- <i>correlated spectroscopy</i>
CP	- cromatografia em papel
CuSO_4	- sulfato de cobre
d	- dublete
-D-	- pertencente à série D
δ	- deslocamento químico
1 D	- monodimensional
2 D	- bidimensional
d.i.	- diâmetro interno
DEPT	- <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMS	- sulfato de dimetila
DMSO	- dimetil-sulfóxido
DMSO-d_6	- dimetil-sulfóxido deuterado
D_2O	- água deuterada
DSS	- 4,4 dimetil-4-silopentano-1-sulfonato
<i>f</i>	- furanosídico (a)
FN	- fase normal
FR	- fase reversa
Gal	- galactose
GC-MS	- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glc	- glucose
GPC	- cromatografia de gel permeação
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMQC	- <i>two-dimensional heteronuclear ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$)-multiple-quantum coherence spectroscopy</i>

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY	- <i>two-dimensional homonuclear ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-correlated NMR spectroscopy</i>
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY	- <i>two-dimensional homonuclear ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY	- <i>two-dimensional homonuclear ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-total correlated spectroscopy</i>
HMQC	- <i>heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy</i>
HPLC	- cromatografia líquida de alto desempenho
Hz	- Hz
IR	- índice de refração
J	- constante de acoplamento
M	- molar
M_w	- massa molecular
Man	- manose
MDa	- megadalton
MHz	- megahertz
NaBH_4	- boroidreto de sódio
NaIO_4	- periodato de sódio
NaOD	- hidróxido de sódio deuterado
nOe	- <i>nuclear Overhauser effect/ enhancement</i>
NOESY	- <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
p	- piranosídico (a)
ppm	- partes por milhão
p/v	- peso por volume
R_f	- relação entre a distância (em cm) percorrida pelo desconhecido e a distância percorrida pelo padrão
R_{lac}	- relação entre a distância (em cm) percorrida pelo desconhecido e a distância percorrida pela lactose no cromatograma
R_{mal}	- relação entre a distância (em cm) percorrida pelo desconhecido e a distância percorrida pela maltose no cromatograma
RMN	- ressonância magnética nuclear
RMN ^{13}C	- ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ^1H	- ressonância magnética nuclear de próton
r.p.m.	- rotações por minuto
sect.	- <i>section</i>

TFA	- ácido trifluoroacético
TLC	- cromatografia em camada delgada
TMS	- tetrametilsilano
TOCSY	- <i>total correlated spectroscopy</i>
v/v	- volume por volume
vs.	- <i>versus</i>

RESUMO

Nesta pesquisa, foram isoladas α -D-glucanas de *Cladonia* spp., *C. clathrata*, *C. connexa*, *C. crispatula*, *C. furcata*, *C. ibitipocae*, *C. imperialis*, *C. miniata*, *C. penicillata*, *C. salmonea* e *C. signata*, com o objetivo de avaliar seu possível significado quimiotaxonômico. Elas são insolúveis em água e foram obtidas por meio de sucessivas extrações alcalinas e fracionamento congelamento-degelo e então analisadas utilizando espectroscopia de RMN ^{13}C e ^1H (incluindo técnicas de COSY, TOCSY e HMQC), metilação, degradação de Smith, rotação específica e composição monossacarídica. Cada α -D-glucana mostrou conter ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) (proporção 1:1), determinadas pelas suas áreas relativas dos seus respectivos sinais de H-1 em δ 5,14 e 5,23. As respectivas áreas dos sinais de C-1 em δ 99,2 e 100,1, e aquelas de C-3 das unidades 3-O- (δ 82,6) e C-4 de 4-O-substituídas (δ 78,9) também foram similares para cada glucana. Todas as espécies estudadas possuem α -D-glucanas do tipo nigerana; os resultados indicam que estes polissacarídeos são uma característica do gênero *Cladonia*.

As galactomanoglucanas isoladas do sobrenadante de Fehling foram praticamente idênticas de acordo com seus espectros de RMN ^{13}C para todas as *Cladonia* spp. investigadas, e contêm cadeias principais de unidades de β -D-Glcp ligadas (1 \rightarrow 3) e substituídas em O-2,6. As ramificações são constituídas principalmente por β -D-Galf, β -D-Galp, β -D-Galf 6-O-substituídas, e unidades de α -D-Manp 2-O-, 4-O-, 6-O- e 2,3-di-O-substituídas. A única exceção foi a espécie *Cladonia furcata*, que apresentou uma isoliquenana com proporção de ligações α -Glcp-(1 \rightarrow 3)- e (1 \rightarrow 4)- igual a 2:1. *Cladia aggregata* mostrou um polissacarídeo diferente na fração sobrenadante da precipitação com solução de Fehling, indicando a presença de uma galactana; portanto esses polissacarídeos podem ter alguma aplicação no auxílio à taxonomia de espécies e gêneros correlatos.

Foram também comparadas as galactoglucomananas de treze espécies de líquens do gênero *Cladonia*. Elas mostraram homogeneidade na cromatografia de permeação em gel e são estruturalmente relacionadas, com cadeias principais de α -D-manopiranosose ligadas (1 \rightarrow 6), mas substituídas em diferentes padrões por unidades ramificadoras de α - e β -D-galacto-, β -D-gluco- e α -D-manopiranosose. As regiões de C-1 de seus espectros de RMN ^{13}C são típicas de espécies líquênicas e indicam diferenças entre os polissacarídeos. Acetólise parcial das galactoglucomananas de algumas espécies deram origem a oligossacarídeos e cinco foram identificados, α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- $\alpha\beta$ -D-Manp, β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-Manp, β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-Galp e as estruturas não descritas até o momento α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)- $\alpha\beta$ -D-Galp e α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)]- $\alpha\beta$ -D-Manp. Dados de metilação e degradação de Smith de cada galactoglucomanana confirmaram estes resultados. Enquanto a manobiose representa uma estrutura comum na estrutura dos heteropolissacarídeos de líquens, os outros oligossacarídeos parecem ser típicos dos diferentes polímeros precipitados com solução de Fehling.

ABSTRACT

α -D-Glucans were isolated from the *Cladonia* spp., *C. clathrata*, *C. connexa*, *C. crispatula*, *C. furcata*, *C. ibitipocae*, *C. imperialis*, *C. miniata*, *C. penicillata*, *C. salmonea* and *C. signata*, to evaluate their possible chemotaxonomic significance. They were isolated in their water-insoluble form via successive alkaline extraction and freeze-thawing and then investigated using ^{13}C and ^1H -NMR spectroscopy (including COSY, TOCSY and HMQC techniques), methylation analysis, and Smith degradation, and their specific rotations and monosaccharide compositions determined. Each α -D-glucan contained alternating (1 \rightarrow 3) and (1 \rightarrow 4)-linkages (1:1 ratio), as determined by the relative areas of their respective H-1 signals at δ 5.14 and 5.23. Also, the respective relative areas of C-1 signals at δ 99.2 and 100.1, and those of C-3 of 3-*O*- (δ 82.6) and C-4 of 4-*O*-substituted (δ 78.9) units, were similar for each glucan. All the species studied contain α -D-glucans of the nigeran type, which appears to be characteristic of the genus *Cladonia*.

The galactomannoglucans isolated from the Fehling supernatants were almost identical according to their ^{13}C NMR spectra for all *Cladonia* spp. investigated, and contained (1 \rightarrow 3)-linked main-chains of β -D-Glcp units, substituted at O-2,6. The side-chain structures were β -D-Galf, 6-*O*-substituted β -D-Galf, and 2-*O*-, 4-*O*-, 6-*O*- and 2,3-di-*O*-substituted α -D-Manp units. The only exception was *Cladonia furcata*, which contained an isolichenan with a ratio between α -Glcp-(1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 4)- linkages of 2:1. *Cladia aggregata* showed a different polysaccharide in the supernatant fraction of Fehling solution precipitation, indicating the presence of a galactan. Thus, these polysaccharide chemotypes may have some influence in aiding the taxonomy of the related species and genera.

The galactoglucomannans of thirteen species of the lichen genus *Cladonia* were compared. They were homogeneous on gel-filtration chromatography and structurally related, having (1 \rightarrow 6)-linked α -D-mannopyranosyl main-chains, but were substituted in different patterns by α - and β -D-galacto-, β -D-gluco- and α -D-mannopyranosyl side-chain groups. The C-1 portions of their ^{13}C NMR spectra are typical of the lichen species and indicate differences between the polysaccharides. Partial acetolysis of the galactoglucomannan from some species gave rise to oligosaccharides and five were identified, namely α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- $\alpha\beta$ -D-Manp, β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-Manp, β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- $\alpha\beta$ -D-Galp and the hitherto unknown α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)- $\alpha\beta$ -D-Galp and α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)]- $\alpha\beta$ -D-Manp structures. Methylation and Smith degradation data from each galactoglucomannan confirmed these results. Whereas the mannobiose represents a common structure in lichen heteropolysaccharides, the other oligosaccharides seem to be typical of different polymers precipitated with Fehling solution.

1 INTRODUÇÃO

1.1 LIQUENS E SUAS APLICAÇÕES

Líquens são organismos simbióticos constituídos por membros de até três reinos. O componente dominante é o fungo (reino Fungi) que, por ser incapaz de sintetizar seu próprio alimento, está associado a componentes que o produzem por fotossíntese. O organismo simbiótico pode ser uma alga (reino Protista) ou uma cianobactéria (reino Monera), antigamente chamada alga azul-esverdeada. Alguns fungos podem estar em associação com ambas ao mesmo tempo (THE SPECIAL biology of lichens). Apesar de os líquens serem constituídos por dois ou três organismos, seus nomes científicos referem-se apenas ao fungo que compõe a simbiose.

Em 1983 foi calculado (HAWKSWORTH e HILL, 1984) que existiam 13.500 espécies (aproximadamente 600 gêneros) de fungos liquenizados, o que corresponde a 20% dos fungos conhecidos. Os líquens crescem em locais do mundo natural que são impróprios ou limitados para a maioria dos outros organismos. Eles são pioneiros em rochas sem vegetação, areias do deserto, solos inóspitos, madeiras mortas, ossos de animais, metais enferrujados e cascas de árvores. Capazes de interromper seu metabolismo durante períodos de condições desfavoráveis, eles podem sobreviver em extremos de calor, frio e seca (THE SPECIAL biology of lichens).

A maioria dos líquens cresce vagarosamente, às vezes menos do que um milímetro por ano, e algumas espécies estão entre as mais antigas formas de vida na Terra. Como adaptações da vida em ambientes inóspitos, os líquens produzem um arsenal de mais de 500 compostos químicos, que servem para controlar a exposição à luz, repelir herbívoros, matar microorganismos agressores, e dissuadir a competição entre plantas (THE SPECIAL biology of lichens). Entre esses, existem muitos pigmentos e antibióticos que têm atribuído aos líquens importância econômica: na Europa, os líquens amarelados (principalmente do gênero *Cladonia*), são coletados para a extração do ácido úsnico, que é o princípio ativo de um efetivo antibiótico (HALE, 1979). Também na medicina, as espécies *Lobaria pulmonaria* e *Cetraria islandica* têm sido descritas como medicamentos para a cura da tuberculose pulmonar; *Usnea longissima* como

expectorante; *Usnea barbata*, no tratamento de feridas e doenças da pele e *Cladonia miniata* var. *sanguinea* na cura de estomatites cremosas ou “sapinhos” (XAVIER FILHO e RIZZINI, 1976). Os líquens também são utilizados como fonte de tintura no preparo de um indicador usado em laboratórios químicos, o papel de litmo (HALE, 1979). *Evernia prunastri* e *Pseudevernia furfuracea* são colhidas no sul da França, Marrocos e Iugoslávia, em grandes quantidades, na faixa de 8.000 a 10.000 toneladas/ano. Os líquens são misturados com a casca das árvores, subsequente extraídos com um solvente orgânico. O extrato final purificado é usado como substância fixadora de alguns perfumes (ELIX, 1996).

1.2 QUÍMICA DOS LIQUENS

As substâncias químicas produzidas pelos líquens são agrupadas, de acordo com a localização no talo, em produtos intracelulares e extracelulares. Os produtos extracelulares, denominados metabólitos secundários, são normalmente encontrados na medula ou no córtex, raramente em ambas as camadas. São ácidos alifáticos, meta- e para-depsídeos, depsídonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico (HONDA e VILEGAS, 1998). Atualmente são conhecidos cerca de 630 compostos provenientes do metabolismo secundário de líquens; a maior parte é considerada exclusiva destes organismos, pois apenas uma pequena minoria (50-60) ocorre em fungos de vida livre e plantas superiores (ELIX, 1996).

Os produtos intracelulares (carotenóides, aminoácidos e proteínas, glicolípídeos e carboidratos) estão ligados na parede celular e ao protoplasto, e são chamados de metabólitos primários. São freqüentemente solúveis em água e podem ser extraídos com água quente. Esses compostos ocorrem não somente em líquens, mas em fungos e algas de vida livre e em plantas superiores (HALE, 1983).

1.2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os líquens produzem os metabólitos secundários, que consistem em grande variedade de compostos alifáticos e aromáticos, mas sobretudo em ácidos fenólicos fracos, cujas investigações com propósito quimiotaxonômico se iniciaram em 1860 (ELIX, 1996). Cada líquen ordinariamente possui constituição química constante em relação a esses compostos, de modo que a mesma espécie apresentará a mesma substância liquênica, não importando onde foi coletada (HALE, 1979). Assim, isto significa que é possível identificar esses organismos com maior precisão com a verificação de suas composições em relação a essas substâncias (HALE, 1979), já que, devido às insignificantes e variáveis diferenças morfológicas de tais seres, muitas vezes não é permitida uma perfeita taxonomia e diferenciação das espécies.

Parece ter sido W. ZOPF, citado por HUNECK (1968) e HONDA e VILEGAS (1998) o autor do primeiro documento sobre quimiotaxonomia de líquens, em 1907, uma das mais importantes obras na área de Liquenologia. O livro é uma compilação de trabalhos por ele publicados em que se descrevem fórmulas empíricas, propriedades e ocorrência de 150 compostos. Este autor investigou algumas espécies do gênero *Evernia* e *Pseudevernia*, bem como espécies do gênero *Cladonia* e, desde então, muitos trabalhos têm sido realizados, a fim de estabelecer-se uma monografia química de todas as espécies existentes (CULBERSON C. F., 1972; HALE, 1979).

1.2.2 METABÓLITOS PRIMÁRIOS

1.2.2.1 Carotenóides

A presença de carotenóides tem sido aplicada em pesquisa taxonômica de fungos não-liquenizados (VALADON, 1976) e algas (LIAAEN-JENSEN, 1989; WEBER e WETTERN, 1980). Baseados neste fato, alguns pesquisadores (CZECZUGA *et al.*, 1986, 1987, 1988, 1991) realizaram uma série de investigações de carotenóides em líquens, que possuem funções

importantes, como fotoprotetores e precursores hormonais, de diversas partes do mundo, incluindo o Brasil, a fim de esclarecer se fatores ambientais podem modificar a composição de carotenóides nesses organismos e quais deles são constantes em uma espécie liquênica ou sua variedade. Nesses estudos ficou indicado que fatores ambientais, tais como clima e diferentes altitudes e latitudes, podem exercer influências significativas sobre a ocorrência dessas substâncias nos talos liquênicos; portanto, antes de os carotenóides serem utilizados como caracteres taxonômicos em líquens, é necessário obter mais informações sobre a maneira como eles são afetados por fatores ambientais.

A maior parte das pesquisas realizadas até agora consistem em um *screening* para os carotenóides eventualmente encontrados em líquens, o que é, em princípio, necessário para uma interpretação taxonômica (CZECZUGA *et al.*, 1991).

1.2.2.2 Aminoácidos e proteínas

Segundo HONDA e VILEGAS (1998), aminoácidos livres encontrados nos líquens são similares aos observados em vegetais. Dos aminoácidos que ocorrem em proteínas, alanina e ácido glutâmico são os predominantes em líquens. Além desses, podem ocorrer diferentes aminoácidos ou seus derivados, como sarcosina, taurina, citrulina, ácido aminobutírico.

A natureza das proteínas de líquens não está ainda bem estabelecida e poucas são as referências sobre o isolamento dessas moléculas. Os principais relatos na literatura tratam do isolamento de lectinas (HOWE e BARRETT, 1970; PETIT, 1982; PETIT *et al.*, 1983) e enzimas, como, por exemplo, a arginase (PLANELLES e LEGAZ, 1987). Proteínas de líquens também são investigadas, a fim de se estabelecerem suas funções no reconhecimento ou interação inicial entre a alga (ficobionte) e o fungo (micobionte) (BUBRICK *et al.*, 1981, 1985) e no controle do metabolismo dos simbioses (PEREZ-URRIA *et al.*, 1989).

1.2.2.3 Glicolipídeos

MACHADO *et al.* (1994) relataram pela primeira vez a presença de glicolipídeos em um líquen. Três destas moléculas foram extraídas de *Ramalina celastri*, sendo que o principal componente identificado foi *O*- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-galactopiranosil-(1 \leftrightarrow 1)-D-glicerol esterificado com ácidos graxos de cadeia longa, sendo alguns desses insaturados.

Outros líquens estão sendo investigados (SASSAKI *et al.*, 1999), a fim de se determinar se a presença de glicolipídeos é fenômeno comum nesses organismos.

1.2.2.4 Carboidratos

Segundo GORIN *et al.* (1993), carboidratos de líquens são divididos entre os de baixa e alta massa molecular. Os primeiros incluem os polióis, os quais são moléculas lineares poli-hidroxiladas, que contêm de 3 a 7 átomos de carbono, monossacarídeos redutores, como pentoses, metilpentoses, hexoses e hexuloses (cetoses) e oligossacarídeos. Estes são, principalmente, não redutores, como a sacarose, a trealose e os glicosídeos, ou redutores, como a gentibiose e a lactose.

Carboidratos de alta massa molecular são frequentemente polissacarídeos, que são comumente glucanas, a maioria das quais são moléculas lineares com configurações glicosídicas α ou β , ou heteropolissacarídeos com cadeia principal de manose. Essas estruturas estão também presentes em alguns glicopeptídeos. Tais componentes são isolados do micobionte, enquanto outros, como as xilanas, são provavelmente metabólitos dos ficobiontes.

1.2.2.4.1 Carboidratos de baixa massa molecular

A investigação mais abrangente destes componentes foi efetuada em 1953, quando LINDBERG *et al.* pesquisaram a presença dos polióis arabinitol, manitol e volemitol (D-glicero-D-talo-heptitol), dos dissacarídeos trealose e sacarose e do glicosídeo de poli-ol umbilicina (2-*O*-

β -D-galactofuranosil-D-arabinitol) em 60 espécies de líquens, sendo 5 da ordem Pyrenocarpeae, atualmente denominada de Verrucariales, gêneros *Dermatocarpon* e *Endocarpon*, e as demais da ordem Gymnocarpeae, atualmente Lecanorales, gêneros *Cladonia*, *Stereocaulon*, *Umbilicaria*, *Pertusaria*, *Parmelia*, *Ramalina*, *Anaptychia* e outros. Como resultado dessa pesquisa, foi demonstrado basicamente que as substâncias encontradas, ou seja, arabinitol, manitol, volemitol, trealose, sacarose e umbilicina, previamente já observadas em líquens, são constituintes de ocorrência geral nesses seres, como é o caso do manitol, ou então são características de grupos taxonômicos específicos, ou seja, o arabinitol nos líquens da ordem Lecanorales e o volemitol nos da ordem Verrucariales. Quanto aos demais componentes (trealose, sacarose e umbilicina), não foi indicado um parecer conclusivo sobre a sua distribuição em líquens.

Desde então, todos os estudos efetuados foram basicamente dirigidos para o isolamento e identificação de carboidratos de baixa massa molecular em líquens. Nos estudos quimiotaxonômicos, parece não haver aplicação desses componentes até o momento, devido a que, provavelmente, a sua distribuição é específica de certas espécies de líquens e não característica de determinados grupos taxonômicos.

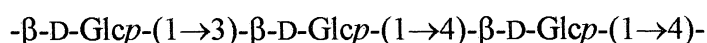
Dos polióis, manitol e arabinitol são os mais comuns em líquens; embora o primeiro tenha sido citado em todas as espécies analisadas, sua ausência foi assinalada na espécie *Ramalina usnea* (GORIN e IACOMINI, 1984), bem como pequenas quantidades em *Newropogon aurantiaco-ater* (BARON *et al.*, 1991) e no líquen basidiomiceto *Dictyonema glabratum* (como *Cora pavonia*, IACOMINI *et al.*, 1987). Outros polióis encontrados em líquens (GORIN *et al.*, 1988) foram: glicerol, *mio*-inositol, xilitol, sifulitol (1-deoxi-D-glicero-D-taloheptitol) e volemitol. Os oligossacarídeos identificados (GORIN *et al.*, 1988) foram: trealose, sacarose, 3-O- β -D-glucopiranosil-D-manitol, peltigerosídeo (3-O- β -D-galactofuranosil-D-manitol), umbilicina, 1-O- β -D-galactopiranosil-D-ribitol, O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-D-glicerol e lactose relatada numa *Sticta* sp. (CORRADI DA SILVA *et*

al., 1990), além de gentiobiose, -triose and -tetraose (CORRADI DA SILVA *et al.*, 1993b).

PUEYO (1980b) e CULBERSON C. F. (1969) relataram a presença dos monossacarídeos redutores arabinose, lixose, ribose, xilose, ramnose, tagatose, frutose, manose e galactose, identificados por cromatografia em papel; NISHIKAWA *et al.* (1973) identificaram frutose e glucose em vários líquens por cromatografia líquido-gasosa por meio de seus derivados trifluoroacetilados e trimetilsililados.

1.2.2.4.2 Polissacarídeos

Estudos documentados de carboidratos de líquens começaram em 1815, quando BERZELIUS extraiu de "Iceland moss" (*Cetraria islandica*) uma glucana insolúvel em água, hoje chamada liquenana; porém, somente após mais de um século, estudos químicos realizados por MEYER e GÜRTLER (1947a) demonstraram que essa molécula possuía rotação específica de +8°, consistente em uma configuração β , e ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção de 3:7, de acordo com dados de oxidação com metaperiodato de sódio, como é apresentado na estrutura 1:



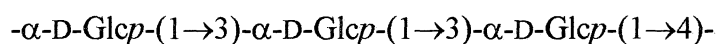
1

Essa estrutura foi confirmada por CHANDA *et al.* (1957), que purificaram essa molécula por solubilização em água quente, seguida por precipitação, mediante resfriamento e posterior complexação com solução de Fehling. Nesse mesmo ano, PEAT *et al.*, após efetuarem hidrólise ácida parcial do polissacarídeo, seguida pelo fracionamento e análise dos oligossacarídeos liberados, sugeriram que a cadeia da molécula era formada pela seqüência repetitiva de β -celotriose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 3); entretanto PERLIN e SUZUKI (1962) realizaram ensaios de enzimólise seletiva, de onde concluíram que a liquenana era representada pela

seqüência tetrassacarídica, em que duas ligações (1→4) adjacentes se alternavam por uma ligação (1→3) isolada; ocasionalmente, uma seqüência pentassacarídica, ou seja, uma ligação (1→3) seguida por três ligações (1→4) consecutivas, como indicado posteriormente pela caracterização de fragmentos formados por degradação de Smith controlada (FLEMING e MANNERS, 1966a) e espectroscopia de RMN ¹³C (GORIN, 1981).

Paralelamente ao isolamento e caracterização estrutural da liquenana, MEYER e GÜRTLER (1947b) isolaram uma mistura de polissacarídeos na solução sobrenadante por meio do resfriamento do extrato aquoso quente. Essa mistura, pela hidrólise ácida, apresentou glucose e pequenas quantidades de galactose e manose, que foi denominada de isoliquenina. Em 1957, CHANDA *et al.* obtiveram um polissacarídeo linear, cujo único monossacarídeo era a glucose, obtido na solução sobrenadante, como descrevem MEYER e GÜRTLER (1947b), porém com a remoção da liquenana residual por processos repetidos de congelamento e degelo desta solução. Uma purificação adicional da molécula de isoliquenina, hoje denominada isoliquenana, foi realizada mediante a precipitação fracionada com acetona do seu complexo cúprico solúvel em água. Esse polissacarídeo demonstrou ser uma α-D-glucana ($[\alpha]_D^{15} = +255^\circ$) linear que, na análise dos derivados metilados, mostrou a presença de ligações (1→3) e (1→4), sendo a relação molar dessas ligações determinada por oxidação quantitativa com metaperiodato de sódio, igual a 60:40. PEAT *et al.* (1961), submetendo o polímero em estudo à hidrólise ácida parcial e subsequente fracionamento em coluna de carvão-Celite, obtiveram o monossacarídeo D-glucose e os dissacarídeos nigerose [α-(1→3)] e maltose [α-(1→4)], confirmando a presença dessas ligações; entretanto, com os dados obtidos pela oxidação com metaperiodato de sódio, foi sugerida uma relação molar de 55:45 para essas ligações. FLEMING e MANNERS (1966b) efetuaram uma degradação de Smith controlada na isoliquenana e concluíram, pelos resultados obtidos, que as ligações (1→3) e (1→4) se encontravam em proporção molar de 56,5 e 43,5, respectivamente. GORIN e IACOMINI (1984), utilizando a espectroscopia de RMN ¹³C,

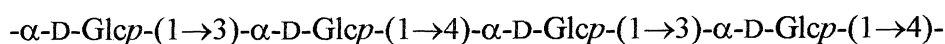
obtiveram para esse polímero extraído de *C. islandica*, espectros com sinais para C-3 (δ 82,1 e 81,9) e C-4 (δ 79,3) substituídos, em relação molar de 66:34, sugerindo estrutura com duas ligações consecutivas α -(1 \rightarrow 3), alternada por uma ligação α -(1 \rightarrow 4), como se observa na estrutura **2**. O espectro de RMN ^{13}C , obtido da isoliquenana, foi de grande interesse: a proporção de sinais para as substituições em O-3 e O-4 foi, respectivamente, de 66:34, indicando, assim, maior proporção de unidades substituídas em O-3 em relação aos valores de 60 e 55% anteriormente determinados (PEAT *et al.*, 1961).



2

LINDBERG e McPHERSON (1954) isolaram um polissacarídeo a partir da extração aquosa de *Umbilicaria pustulata* que, por hidrólise ácida parcial, forneceu apenas glucose. Este polímero, originalmente denominado "pustulin" por DRAKE (1943) e atualmente chamado pustulana, teve sua estrutura confirmada por HELLERQVIST *et al.* (1968), que demonstraram ser uma β -D-glucana linear com ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 6).

A partir dessas pesquisas com *C. islandica* e *U. pustulata*, muitos trabalhos foram realizados (IACOMINI *et al.*, 1988; NISHIKAWA *et al.*, 1974; TAKEDA *et al.*, 1972). Concluiu-se que a maioria das glucanas de líquens com micobiontes ascomicetos possuem estruturas análogas àquelas de líquenana e isoliquenana, porém com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) em diferentes proporções, até com estas alternadas, similares à nigerana, como pode ser observado na estrutura **3**:



3

Até a presente data, seis dessas glucanas insolúveis em água fria foram isoladas de duas espécies do gênero *Cladonia*, *C. crispata* e *C. squamosa* (NISHIKAWA *et al.*, 1974), e quatro espécies de *Cladina*, *C. mitis*, *C. rangiferina* subsp. *grisea* (NISHIKAWA *et al.*, 1974), *Cladina stellaris* (como *Cladonia alpestris*) e *Cladina confusa* (como *Cladonia confusa*) (IACOMINI *et al.*, 1985). Em outros estudos de glucanas, essa estrutura foi encontrada apenas no líquen *Flavoparmelia caperata* (como *Parmelia caperata*, TAKEDA *et al.*, 1970).

Caso extremo da diferença de proporção entre ligações (1→3) e (1→4) pode ser exemplificado pela glucana linear do tipo laminarana com ligações exclusivas β -(1→3) isolada do líquen *St. ramulosum* por BARON *et al.* em 1988. Outra estrutura inédita, no que se refere às glucanas, foi encontrada no líquen *Cetraria islandica* (HRANISAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC *et al.*, 1980), de onde foi isolado, mediante extração alcalina, um polímero ramificado com cadeia principal com unidades de glucose e ácido glucurônico ligadas (1→3) e cadeias laterais constituídas de glucose ligadas (1→4) e/ou (1→6) à cadeia principal. Além deste, nos polissacarídeos do tipo pustulana isolados dos líquens dos gêneros *Gyrophora* (NISHIKAWA *et al.*, 1969; SHIBATA *et al.*, 1968), *Umbilicaria* (NISHIKAWA *et al.*, 1970) e *Lasallia* (NISHIKAWA *et al.*, 1969; NISHIKAWA *et al.*, 1974; SHIBATA *et al.*, 1968) foram encontrados grupos *O*-acetil em suas estruturas químicas.

YOKOTA *et al.*, em 1979, mediante análises de RMN ^{13}C em homopolímeros de líquens, observaram que espectros muito semelhantes foram obtidos da espécie *Acroscyphus sphaerophoroides* e *Sphaerophorus globosus*, ambos da família *Sphaerophoraceae*. Espectros também semelhantes entre si foram observados para as homogluconas de *Pilophoron acicularis* e *Stereocaulom japonicum*, pertencentes a família *Stereocaulaceae*.

Assim, em 1981, TAKAHASHI *et al.* estudaram polissacarídeos de seis espécies de *Stereocaulon*, obtidos por extração aquosa a quente, purificados por congelamento e fracionados por coluna de DEAE-celulose. De posse desses resultados, os autores chegaram à conclusão de

que os líquens da família *Sterocaulaceae* investigados poderiam ser classificados em dois grupos, de acordo com os seus constituintes polissacarídicos solúveis em água fria, provenientes do processo de congelamento-degelo. Um grupo compreenderia os líquens *St. vesuvianum*, *St. tomentosum* e *St. intermedium*, que foram caracterizados pela presença de uma β -heteroglucana, contendo D-manose, D-galactose e D-glucose; o outro grupo seria constituído por *St. japonicum*, *St. sorendiferum*, e *St. exutum*, que continham α -glucanas com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção de 3:1, características de isoliquenanas.

IACOMINI *et al.* (1987) isolaram uma β -D-glucana do basidiolíquen *Dictyonema glabratum* (como *Cora pavonia*) altamente ramificada, com 21% de grupos terminais não redutores e unidades β -D-glucopiranosídicas 3-O-, 6-O- e 3,6-di-O-substituídas, indicando uma estrutura com cadeia principal que contém ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6). Essa estrutura parece ser típica de β -D-glucanas de basidiomicetos (ASPINALL, 1982b), as quais diferem dos componentes polissacarídicos de líquens ascomicetos, que contêm glucanas relativamente lineares, com menos de 10% de ramificações; indicam, desta forma, uma possível relação quimiotaxonômica dos líquens por meio destes polímeros.

Em 1991, BARON *et al.* isolaram do líquen *Newropogon aurantiaco-ater* uma liquenana composta por ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção de 17:8 e uma isoliquenana com a proporção destas ligações igual a 3:2. Estes polímeros são estruturalmente idênticos àqueles isolados de "Iceland moss" (*Cetraria islandica*) (MEYER e GÜRTLER, 1947a,b).

Estudos recentes mostram a caracterização de glucanas isoladas de líquens semelhantes àquelas já descritas na literatura: KRÄMER *et al.* (1995) propuseram o fracionamento e caracterização da isoliquenana e liquenana de *C. islandica* em quantidades preparativas e a remoção de taninos destas frações com o objetivo de utilizá-las como substância referência no controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Em 1996, SONE *et al.* estudaram polissacarídeos de *Gyrophora esculenta* solúveis em álcali a quente, de onde obtiveram duas β -D-glucanas ligadas (1 \rightarrow 6): a que forneceu maior rendimento mostrou ser similar à pustulana isolada de *Umbilicaria pustulata* (LINDBERG e McPHERSON, 1954). A outra sugeriu uma estrutura ramificada, com cadeia principal composta por β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) e ramificações da mesma unidade monossacarídica em O-3.

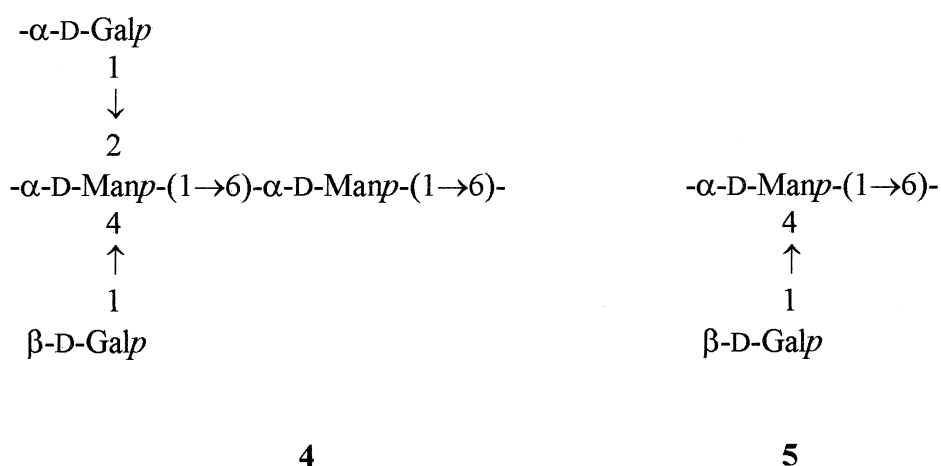
GORSHKOVA *et al.* (1997) estudaram glucanas isoladas de *Cetraria cucullata* e *C. islandica*, as quais resultaram em liquenanas insolúveis em água fria de estruturas idênticas entre si, bem como isoliquenanas solúveis em água. As determinações foram realizadas com métodos clássicos, como metilação, hidrólise enzimática, degradação de Smith e RMN ^{13}C .

Segundo GORIN *et al.* (1993), os polissacarídeos de líquens que contêm manose foram primeiramente descobertos por KARRER e JOOS em 1924, em extração com água quente de *Cetraria islandica* via complexo insolúvel de cobre formado com solução de Fehling. O polímero continha manose, galactose e glucose em proporção molar de 21:35:44, que provinham possivelmente de uma mistura de galactomanana e liquenana ou galactoglucomanana, observação que foi confirmada muito mais tarde: em 1943, GRANICHSTÄDTEN e PERCIVAL mostraram tratar-se de mistura de um heteropolímero, a galactomanana, e maior proporção de liquenana.

MICOVIC *et al.* (1969), ao pesquisarem a espécie *Evernia prunastri*, obtiveram galactomanana ácida com unidades terminais não redutoras de β -D-galactopiranosose, α -D-manopiranosose e ácido galacturônico, bem como unidades de manopiranosose 2-O-, 2,6-di-O- e 2,3,6-tri-O-substituídas.

A partir de 1984, com os trabalhos de GORIN, IACOMINI e seus colaboradores (GORIN e IACOMINI, 1984, 1985; IACOMINI *et al.*, 1985), as estruturas químicas de heteropolissacarídeos isolados de líquens foram elucidadas. O primeiro, em 1984, refere-se à determinação estrutural de polissacarídeos de *Cetraria islandica* e *Ramalina usnea*, com técnicas

analíticas de RMN ^{13}C e análises de metilação. As estruturas das duas galactomananas, obtidas por extração aquosa a quente, seguida por repetidos procedimentos de congelamento e degelo e posterior tratamento com solução de Fehling (0,42 e 2,1 g% de rendimento, respectivamente) foram diferentes, como indicam as regiões de C-1 de seus espectros. As análises químicas demonstraram que ambas continham uma cadeia principal de unidades de α -D-manopiranosose ligadas (1 \rightarrow 6), mas os padrões de substituição das cadeias laterais eram diferentes. A estrutura da galactomanana de *C. islandica* é mais ramificada do que aquela isolada de *R. usnea*, possui dois substituintes na mesma unidade da cadeia principal, como pode ser observado na estrutura 4. *R. usnea* possui uma estrutura predominante, como se demonstra em 5.

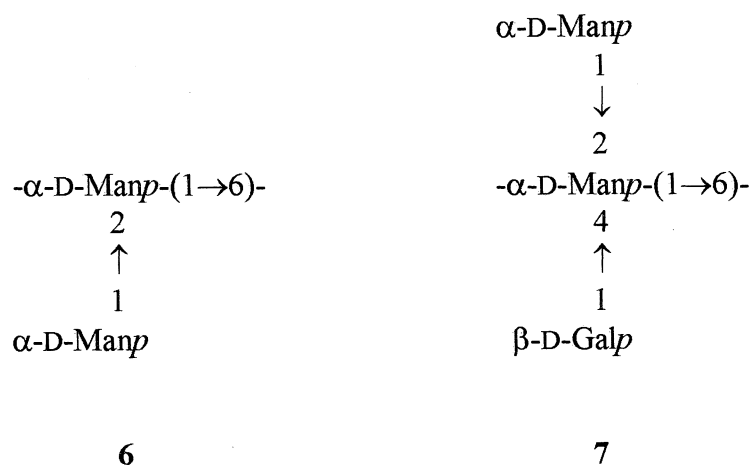


A acetólise parcial do polissacarídeo de *C. islandica* permitiu o isolamento de 2-O- α -D-manopiranosil-D-manose e 2-O- α -D-galactopiranosil-D-manose.

Seis outros líquens foram estudados pelos mesmos autores (GORIN e IACOMINI, 1985), *Parmelia sulcata*, *Stereocaulon paschale*, *Peltigera aphthosa*, *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbergii* e *Usnea* sp., onde galactomananas foram encontradas mediante a precipitação com solução de Fehling. Estudos estruturais demonstraram que a cadeia principal era igualmente

constituída de unidades de α -D-manopiranosose ligadas (1 \rightarrow 6), substituídas nas posições O-2 ou O-4 ou O-2,4 por α -D-manopiranosose-(1 \rightarrow 2), α -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 2), β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 4) e β -D-galactofuranose-(1 \rightarrow 4). A presença das duas primeiras ramificações foram confirmadas por dados obtidos de acetólise parcial, que forneceu os dissacarídeos 2-O- α -D-manopiranosil-D-manose e 2-O- α -D-galactopiranosil-D-manose.

Em estudo comparativo (IACOMINI *et al.*, 1985) entre galactomananas de três espécies do gênero *Cladonia*, *C. alpestris* (atualmente *Cladina stellaris*), *C. confusa* (atualmente *Cladina confusa*) e *C. amaurocraea* obtidas com extração com KOH aquoso a quente e posterior formação de complexos cúpricos insolúveis, verificou-se que as duas primeiras contêm uma cadeia principal composta por unidades de α -D-manopiranosose ligadas (1 \rightarrow 6), sendo algumas 4-O-substituídas por β -D-galactopiranosose (estrutura 5), 2-O-substituídas por α -D-manopiranosose (estrutura 6), ou ainda 2,4-di-O-substituídas (estrutura 7).



A acetólise parcial das galactomananas forneceu os seguintes produtos examinados por cromatografia em papel: 2-O- α -D-galactopiranosil-D-manose, 2-O- α -D-manopiranosil-D-manose e O- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-manose, os quais confirmam alguns fragmentos estruturais propostos pelos autores.

A precipitação por solução de Fehling de um extrato aquoso de *Dictyonema glabratum* (como *Cora pavonia*, IACOMINI *et al.*, 1987) forneceu um complexo cúprico insolúvel, cuja porção polissacarídica apresentou principalmente manose e xilose, com cadeia principal que contém unidades α -D-manopiranosil ligadas (1 \rightarrow 3), sendo 10% não substituída, 4-O- (10%) e 2,4-di-O- (10%) substituída por unidades β -D-xilopiranosídicas; isto demonstra diversidade estrutural deste heteropolissacarídico, tanto em relação à estrutura da cadeia principal quanto à natureza das cadeias laterais, se comparadas com aquelas dos componentes heteropoliméricos isolados de líquens com micobiontes ascomicetos, os quais possuem núcleos constituídos de unidades α -D-manopiranosídicos ligadas (1 \rightarrow 6) (ASPINALL, 1982b).

TEIXEIRA *et al.* (1992) submetem diversas espécies de líquens a extrações com solução alcalina e sucessivos tratamentos com solução de Fehling e fracionamento dos precipitados com solução de Cetavlon. Os polissacarídeos obtidos mediante a precipitação com solução de Fehling geralmente apresentavam composição similar àquela obtida mediante o precipitado com Cetavlon, porém com rendimentos maiores. Com exceção dos polissacarídeos que continham ácido urônico, poucas diferenças foram observadas na estrutura dos polissacarídeos precipitados com solução de Fehling e aqueles precipitados com Cetavlon em pH 8,5 na presença de borato. Dos heteropolímeros isolados, porém, *Tornabenia intricata* mostrou não conter galactose, e uma glucomanana foi isolada. Esta possui cadeia principal constituída por unidades de α -D-Manp ligadas (1 \rightarrow 6) substituídas em O-2 principalmente por cadeias laterais de α -D-Manp e menor proporção de α -D-Glcp. Quando submetida à acetólise parcial, o polímero forneceu α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)-D-Man, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)-D-Man e α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)-D-Manp-(1 \rightarrow 2)-D-Man. Esta e outras análises confirmaram a estrutura proposta para o polímero, aparentemente incomum em fungos liquenizados.

Uma galactoglucomanana isolada de *Parmotrema cetratum* foi estudada por CORRADI DA SILVA *et al.* (1993a): devido ao teor relativamente baixo de glucose em relação à manose e

galactose (9:46:45) na fração isolada no precipitado de Fehling, permanecia a dúvida se essa era contaminante ou se fazia parte da estrutura do polímero. Com a caracterização do dissacarídeo β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Manp, obtido a partir do polissacarídeo original por acetólise parcial, ficou confirmado que a glucose provém do heteropolímero, provavelmente como unidade terminal não-redutora da cadeia principal composta por α -D-Manp-(1 \rightarrow 6).

Heteropolissacarídeos de *Evernia prunastri* foram estudados (TEIXEIRA *et al.*, 1994), os quais diferem da estrutura proposta para o heteropolissacarídeo por MICOVIC *et al.* (1969). Dois polímeros foram purificados por precipitação com solução de Fehling e Cetavlon. Cada estrutura possui cadeia principal constituída por unidades de α -D-Manp-(1 \rightarrow 6) substituídas em diferentes padrões por α -D-Galp, β -D-Galp, α -D-GlcpA e β -D-Galf. A diferença fundamental entre ambas é que uma delas possui maior teor de ácido urônico que a outra. A acetólise e a hidrólise parciais mostraram a presença de alguns oligossacarídeos, entre eles: α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- $\alpha\beta$ -D-Glcp, α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)]- α -D-Manp e α -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- $\alpha\beta$ -D-Glcp.

TEIXEIRA *et al.* (1995) pesquisaram diferentes líquens de 23 espécies compreendidos em 13 gêneros, os quais foram divididos em 5 grupos diferentes, de acordo com a região de C-1 dos espectros de RMN ^{13}C de seus heteropolissacarídeos. Esses grupos foram baseados na ocorrência de sinais principais das regiões de C-1 dos espectros, os quais representam os componentes químicos principais dos heteropolímeros estudados; sugere-se, assim, que aqueles poderiam ser utilizados como "impressões digitais" numa possível base para a quimiotipagem. Similaridades intragenéricas e "intrafamília" das espécies estudadas foram mais frequentes que aquelas intergenéricas e "interfamília", porém algumas diferenças foram, às vezes, observadas dentro do mesmo gênero e família.

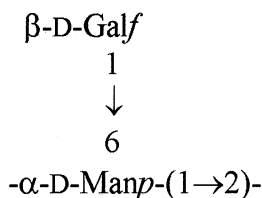
Galactomananas também foram obtidas de três outras espécies de líquens: *Cladonia furcata*, *Cladonia signata* e *Cladia aggregata* (WORANOVICZ, 1995). Estas mostraram cadeias principais idênticas e representadas por α -D-Manp unidas por ligações (1 \rightarrow 6), como aquelas

comumente encontradas nesses polímeros de diversas espécies liquênicas já investigadas. As cadeias laterais, por sua vez, são constituídas por unidades de α -D-Manp, α -D-Galp, β -D-Galp e β -D-Galf invariavelmente distribuídas nas posições 2 e/ou 4 das α -D-manopiranas. As análises demonstraram que a galactomanana de *C. furcata* é mais ramificada, além de poder apresentar maior número de unidades de β galactose ligadas à cadeia principal. A galactomanana de *Cladonia signata* destaca-se por apresentar unidades de α -D-Manp-(1→2)- α -D-Manp-(1→2) ligadas à cadeia principal, ao passo que *Cladia aggregata* parece demonstrar maior número de unidades da cadeia principal substituída em O-2 e O-4 em relação às demais. Tais estruturas são semelhantes às galactomananas isoladas de outros micobiontes ascomicetos, porém não idênticas em relação aos padrões de substituições das cadeias laterais. Essas características dos heteropolissacarídeos, associadas à determinação estrutural de seus homopolímeros, podem trazer, em associação com os aspectos morfológicos, características taxonômicas nesses seres.

SONE *et al.* (1996) isolaram uma galactomanana de *Gyrophora esculenta*, cuja cadeia principal também é composta de unidades de α -D-Manp-(1→6), substituída nas mesmas posições acima descritas; porém todas as unidades de D-galactose estão sob a forma β -furanosídica e localizadas nas posições terminais não redutoras. Dentre as galactomananas descritas, a de *G. esculenta* parece mais similar à isolada de *Actinogyra muehlenbergii* (GORIN e IACOMINI, 1985), ambas pertencentes à mesma família; entretanto a galactomanana da primeira é diferente quanto às unidades de D-galactose, que demonstra apenas a forma furanosídica, enquanto a segunda possui as formas furano- e piranosídicas.

Frações sobrenadantes do tratamento com solução de Fehling foram investigadas em *Cladina stellaris* (como *Cladonia alpestris*) e *Cladina confusa* (como *Cladonia confusa*), e em uma espécie de *Cladonia*, *C. amaurocraea* (IACOMINI *et al.*, 1985). Diferenças entre as frações de *Cladina* spp. foram visíveis de acordo com seus espectros de RMN ^{13}C , e confirmadas por análises adicionais, as quais mostraram que o polissacarídeo de *C. stellaris* contém unidades

consecutivas de α -D-manopiranosose ligadas (1 \rightarrow 2) (que provavelmente correspondem à cadeia principal) substituídas em O-6 por β -D-galactofuranose (estrutura **8**), enquanto o polímero isolado de *C. confusa* é aparentemente uma D-galactana com unidades piranosil e furanosil. Nenhum polissacarídeo foi obtido de *C. amaurocraea* nessa fração.



8

Em estudo comparativo de polissacarídeos isolados de líquens, WORANOVICZ, em 1995, isolou do sobrenadante de Fehling de *Cladonia furcata* uma isoliquenana com a proporção de ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) de 2:1. O teor de glucose desta fração (93%), bem como a proporção semelhante destas ligações foram também observados nos líquens *Cetraria islandica* (GORIN e IACOMINI, 1984) e *Stereocaulon ramulosum* (BARON *et al.*, 1988) nessa mesma fração. Valor semelhante dessa relação molar também foi encontrado em glucana isolada do *St. japonicum* (YOKOTA e SHIBATA, 1978), estimada em 2:1. Este fato pode apresentar interesse quimiotaxonômico, uma vez que não existe certeza de que o gênero *Stereocaulon* esteja relacionado, de forma próxima ou distante, ao gênero *Cladonia*.

As isoliquenanas, geralmente encontradas no sobrenadante de Fehling pelas pesquisas anteriormente realizadas, apresentam diferentes proporções de ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4), como é o caso de uma α -D-glucana em *Ramalina usnea* (GORIN e IACOMINI, 1984) e em *Ramalina ecklonii* (atualmente *R. celastri*, MICENO *et al.*, 1991), solúvel em água fria, sendo que a proporção dessas ligações foi estimada em 3:1.

Outros polissacarídeos, como galactomanoglucanas, não foram descritos em literatura até a presente data nessa fração. A única citação desse heteropolímero (GÓMEZ-MIRANDA *et al.*, 1990) refere-se à caracterização estrutural de material de parede celular do fungo *Gliocladium viride*, que foi obtido por extração alcalina e fracionado por meio de cromatografia de permeação em gel. A fração principal sugeriu a presença de um polímero com cadeia principal constituída por unidades de glucose ligadas (1→6), com ramificações nas posições O-2 e O-3. Manopiranosose e galactopiranosose ocorrem como unidades terminais não redutoras; galactofuranose ligada (1→6) e (1→2) também estão presentes. Segundo os autores, a composição química desse polissacarídeo e seu padrão de ligações mostraram nítidas diferenças quando comparado a outros fungos relacionados, pelo que poderia ser utilizado como marcador quimiotaxonômico.

1.3 TAXONOMIA E QUIMIOTAXONOMIA

As características mais utilizadas para a classificação dos líquens são as morfológicas, a química das substâncias liquênicas e também características ecológicas e biogeográficas (HAWKSWORTH e HILL, 1984). Dados relativos apenas à análise morfológica, muitas vezes, não elucidam a identificação de um dado espécime (HONDA e VILEGAS, 1998); o uso de informações químicas para fins de taxonomia deve-se ao fato de que esses organismos produzem metabólitos secundários, os quais são, em grande parte, exclusivos do grupo a que pertencem. Assim, essas substâncias podem conduzir a uma identificação mais segura. De fato, qualquer revisão taxonômica de líquens que não considere dados químicos provavelmente seja considerada incompleta pela maioria dos liquenólogos contemporâneos (HUNECK, 1968). Além desses, muitos outros compostos do metabolismo primário são obtidos dos líquens; portanto a determinação estrutural dessas substâncias pode contribuir como parâmetro adicional à taxonomia clássica.

Com relação à quimiotaxonomia, a identificação de líquens em gêneros e espécies tem sido conduzida por reações de coloração no talo, microcristalização, análise cromatográfica, análise por fluorescência e espectrometria de massas de metabólitos secundários (ELIX, 1996; HONDA e VILEGAS, 1998). Mais recentemente, tem sido sugerida a utilização de dados espectroscópicos de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C) de heteropolissacarídeos para sua identificação (YOKOTA *et al.*, 1979; TEIXEIRA *et al.*, 1995; WORANOVICZ, 1995). Nesse contexto, polissacarídeos de parede têm sido utilizados para a classificação de leveduras (GORIN e SPENCER, 1970) e fungos (LEAL *et al.*, 1992; LEAL *et al.*, 1993; LEAL *et al.*, 1997); nestes foram realizados até mesmo estudos em que os polissacarídeos originam anticorpos que podem ser usados para distinguir espécies relacionadas entre si (DOMENECH *et al.*, 1996).

1.4 OS GÊNEROS *Cladonia* E *Cladia*

Cladonia e *Cladia* são gêneros da classe Ascomycetes, ordem Lecanorales, família Cladoniaceae (JOLY, 1991). Todos os membros da família Cladoniaceae possuem o componente fotobionte do gênero *Trebouxia*, ou seja, uma alga verde unicelular (SWINSON e KROG, 1988). Cerca de apenas seis espécies de algas estão envolvidas em simbiose na família Cladoniaceae que, além de *Cladia*, *Cladonia* e *Cladina*, inclui outros 10 gêneros, cujas espécies são encontradas principalmente na Austrália (AHTI, 1999b).

De acordo com VON KREMPELHUBER citado por AHTI (1961), as primeiras descrições dos "líquens das renas" foram feitas por TABERNAEMONTANUS, em 1588, sob o nome de *Musgus corallinus*, e THAL, nesse mesmo ano, como *Musci candida in uliginibus species*. Muitos autores subseqüentes, entre o século XVI e XVIII, mencionaram esses líquens sob vários nomes; mas, por volta de 1850, o gênero *Cladonia* propriamente dito foi estabelecido. Desde então esse gênero tem sido vastamente estudado e, sem dúvida, os "líquens das renas" são

um dos mais bem conhecidos grupos de fungos liquenizados. Essas espécies são consideradas cosmopolitas, ou seja, crescem espontaneamente em diversas regiões do mundo, embora muitas delas sejam encontradas apenas no Brasil (AHTI, 1999b). Atualmente, existem cerca de 455 espécies descritas nesse gênero, e novas espécies estão sendo publicadas, o que indica que 490 espécies estarão descritas até o final do presente ano (AHTI, 1999a). Por outro lado, apenas 10 espécies compõem o gênero *Cladia*, sendo *C. aggregata* o único representante no Brasil.

Considerando que o grupo de Química de Carboidratos da Universidade Federal do Paraná é pioneiro no estudo de carboidratos isolados de líquens, e que as características utilizadas como critérios para a classificação dos líquens não produzem classificação inequívoca desses organismos, a determinação estrutural de polissacarídeos poderá contribuir com o aumento de informações com a finalidade taxonômica.

2 OBJETIVOS

Conforme se evidencia na literatura, os polissacarídeos podem representar função importante no auxílio à classificação taxonômica de fungos liquenizados. Este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar as estruturas de polissacarídeos de três frações isoladas e purificadas de diversas espécies de líquens do gênero *Cladonia*. Em decorrência desta proposição os objetivos específicos são:

2.1) Extração, purificação e caracterização estrutural de glucanas da fração Precipitado congelamento-degelo das espécies:

Cladonia (sect. *Cladonia*) *clathrata* Ahti & L. Xavier;

Cladonia (sect. *Ascyphiferae*) *connexa* Vain.;

Cladonia (sect. *Perviae*) *crispatula* (Nyl.) Ahti;

Cladonia (sect. *Ascyphiferae*) *furcata* (Huds.) Schrad. (duas amostras, nº 23007 e 22975);

Cladonia (sect. *Cladonia*) *ibitipocae* Ahti & S. Stenroos;

Cladonia (sect. *Cladonia*) *imperialis* Ahti & Marcelli;

Cladonia (sect. *Cocciferae*) *miniata* G. Mey.;

Cladonia (sect. *Cladonia*) *penicillata* Ahti & Marcelli;

Cladonia (sect. *Cocciferae*) *salmonia* S. Stenroos (duas amostras, nº 29692 e 29828);

Cladonia (sect. *Ascyphiferae*) *signata* (Eschw.) Vain.;

Cladonia (sect. *Unciales*) *substellata* Vain.;

Cladia aggregata (Sw.) Nyl.

O estudo dos componentes polissacarídicos de duas amostras diferentes de *C. furcata* deve-se ao fato de não se ter certeza, dentro da taxonomia clássica, de que uma seja a forma jovem da outra, ou de que as duas sejam espécies diferentes (MARCELLI, 1994a). Quanto às duas amostras de *C. salmonia*, o objetivo é avaliar suas composições polissacarídicas e seus rendimentos em amostras coletadas em locais diferentes (MARCELLI, 1996).

2.2) Extração, purificação e caracterização estrutural de heteropolímeros da fração Sobrenadante de Fehling das espécies em estudo.

2.3) Extração, purificação e caracterização estrutural de heteropolímeros da fração Precipitado de Fehling das espécies citadas.

2.4) Obtenção e purificação de oligossacarídeos dos heteropolissacarídeos originais obtidos no Precipitado de Fehling pelo método de acetólise parcial.

2.5) Caracterização estrutural dos oligossacarídeos por meio de técnicas uni- e bidimensionais de ressonância magnética nuclear de próton e carbono-13 (RMN ^1H e ^{13}C).

2.6) Comparação das estruturas caracterizadas destas espécies com outras do gênero *Cladonia* já estudadas e também com polissacarídeos isolados de outras espécies de líquens, procurando-se estabelecer informações com a finalidade taxonômica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LIQUENS EM ESTUDO

Os líquens estudados no presente trabalho foram:

Cladonia (sect. *Cladonia*) *clathrata* Ahti & L. Xavier (nº 22972);

Cladonia (sect. *Ascyphiferae*) *connexa* Vain. (nº 26816);

Cladonia (sect. *Perviae*) *crispatula* (Nyl.) Ahti (nº 26824);

Cladonia (sect. *Ascyphiferae*) *furcata* (Huds.) Schrad. (duas amostras, nº 23007 e 22975);

Cladonia (sect. *Cladonia*) *ibitipocae* Ahti & S. Stenroos (nº 26818);

Cladonia (sect. *Cladonia*) *imperialis* Ahti & Marcelli (nº 10686);

Cladonia (sect. *Cocciferae*) *miniata* G. Mey. (nº 26814);

Cladonia (sect. *Cladonia*) *penicillata* Ahti & Marcelli (nº 26878);

Cladonia (sect. *Cocciferae*) *salmonea* S. Stenroos (duas amostras, nº 29692 e 29828);

Cladonia (sect. *Ascyphiferae*) *signata* (Eschw.) Vain. (nº 22976);

Cladonia (sect. *Unciales*) *substellata* Vain. (nº 26817);

Cladia aggregata (Sw.) Nyl. (nº 22981).

3.1.1 COLETA E CLASSIFICAÇÃO

Todas as amostras foram coletadas e classificadas pelo Dr. Marcelo Pinto Marcelli, da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica, São Paulo, SP.

Os líquens *Cladonia clathrata*, *C. furcata* (23007 e 22975), *C. imperialis*, *C. signata* e *Cladia aggregata* foram coletados nas proximidades do Parque Nacional do Itatiaia (Estrada da Prateleira), localizado na Serra da Mantiqueira, município de Itamonte, MG, em 1993. *Cladonia connexa*, *C. crispatula*, *C. ibitipocae*, *C. miniata*, *C. penicillata* e *C. substellata* foram recolhidas da Serra da Ibitipocae, em Lima Duarte, MG, em 1994. *Cladonia salmonea* 29692 foi coletada no município de Caeté, MG, Serra da Piedade, e *C. salmonea* 29828, no município de

Brumadinho, MG, Serra da Moeda, onde faz parte importante da paisagem. Ambas foram coletadas em novembro de 1995.

3.1.2 ISOLAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DOS LIQUENS EM ESTUDO

As amostras de líquens foram limpas manualmente, a fim de serem retirados os vegetais contaminantes e pequenas pedras. Em seguida, moídas em moinho Wiley sob malha de 20 mesh, e transformadas em pó seco, posteriormente submetidas à extração e purificação conforme o Esquema I (p. 53).

As amostras foram tratadas por três processos seqüenciais de extração, como a seguir se descreve.

3.1.2.1 Extração clorofórmio-metanol

Cada amostra limpa e pesada foi deslipidificada com uma mistura de solventes clorofórmio-metanol (2:1, v/v, ~ 300 mL) (MACHADO *et al.*, 1994), sob refluxo, durante 2 horas, em banho-maria na temperatura de 60° C. O processo foi repetido por três vezes.

Essa etapa iniciou-se com as seguintes quantidades de cada líquen coletado para análise: *C. clathrata*, 55,2 g; *C. connexa*, 225,3 g; *C. crispatula*, 136,4 g; *C. furcata* (23007), 146,1 g; *C. furcata* (22975), 92,0 g; *C. ibitipocae*, 59,3 g; *C. imperialis*, 131,3 g; *C. miniata*, 42,0 g; *C. penicillata*, 75,9 g; *C. salmonea* (29692), 42,5 g; *C. salmonea* (29828), 273,8 g; *C. signata*, 277,2 g; *C. substellata*, 99,0 g; *Cladia aggregata*, 45,4 g.

Após cada extração, o extrato clorofórmio-metanólico foi filtrado a quente e evaporado até *secura* na temperatura ambiente, a fim de ser calculado o rendimento.

O material residual foi seco e então submetido ao próximo processo extrativo.

3.1.2.2 Extração metanol-água

O material remanescente da extração anterior foi mantido sob refluxo com metanol-água (4:1, v/v, ~ 300 mL), em banho-maria na temperatura de 60° C, durante 2 horas, por três vezes consecutivas.

Após cada extração, também os extratos metanol-aquosos foram filtrados a quente, concentrados sob pressão reduzida e liofilizados, a fim de ser calculado o rendimento.

O material residual foi novamente seco, a fim de ser submetido à última etapa de extração.

3.1.2.3 Extração alcalina

Os líquens remanescentes da extração metanol-água foram tratados com solução aquosa de KOH a 2% (concentração de 10% p/v), à temperatura de 100° C, durante 2 horas (IACOMINI *et al.*, 1985), na presença de NaBH₄. O material foi filtrado com a solução ainda quente.

O extrato alcalino foi neutralizado com ácido acético glacial a pH 7,0 em banho de gelo. Na sequência, os polissacarídeos foram precipitados com etanol absoluto numa proporção final de 3:1. A solução alcoólica foi deixada em congelador durante a noite, a fim de auxiliar a precipitação dos polissacarídeos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 3.200 r.p.m, durante 8 min, e o precipitado etanólico foi solubilizado em água destilada morna e dialisado contra água corrente durante 48 horas. Após a diálise, as misturas polissacarídicas em solução foram congeladas e liofilizadas, para obtenção dos respectivos rendimentos.

Os sobrenadantes etanólicos, após a redução do volume sob pressão reduzida aproximadamente a 300 mL, foram deionizados por resinas Dowex, inicialmente na forma catiônica e posteriormente na forma aniônica. As respectivas soluções deionizadas foram liofilizadas para a obtenção dos rendimentos, porém não foram analisadas no presente trabalho.

3.1.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.1.3.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo

As frações obtidas da extração alcalina de todas as espécies foram submetidas ao processo de purificação por congelamento e degelo. Cada mistura polissacarídica foi solubilizada em água destilada e, a seguir, submetidas ao congelamento e posterior degelo na temperatura ambiente. O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos demais componentes solúveis por centrifugação (10.000 r.p.m., 30 min, 4° C), segundo BARON *et al.* (1989). Esse processo de purificação foi repetido diversas vezes, até que o sobrenadante aquoso não formasse mais precipitado por congelamento e degelo, e o resíduo aquoso, após tentativa de solubilização em água, não apresentasse mais polissacarídeos solúveis em água fria, detectados pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), os quais estariam contaminando esse material. Após as etapas acima descritas, os sobrenadantes foram reunidos, bem como os precipitados, congelados e liofilizados. Tal processo deu origem a duas frações: o Precipitado e o Sobrenadante do congelamento e degelo.

A fração Precipitado congelamento-degelo, obtida pelo processo acima descrito para cada extrato alcalino, foi extraída mais uma vez com solução aquosa de KOH 2% a 100° C durante 2 horas. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram dialisados contra água corrente até pH neutro e o processo de congelamento-degelo repetido mais três vezes, a fim de removerem-se as galactomananas residuais. O precipitado foi tratado com solução de ácido acético aquoso 4% (v/v) na temperatura de 100° C, durante 2 horas, com o objetivo de removerem-se possíveis agregados de proteínas. Esta solução foi dialisada contra água corrente durante dois dias, e o último processo de congelamento-degelo foi realizado. O precipitado final de cada espécie resultou em uma glucana pura. As frações solúveis do congelamento e degelo foram posteriormente submetidas ao processo de purificação pelo emprego da solução de Fehling.

3.1.3.2 Separação dos polissacarídeos solúveis em água por precipitação com solução de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965)

Ao sobrenadante liofilizado do processo congelamento-degelo, que foi dissolvido em volume de água suficiente para solubilizá-lo (~300 mL), adicionou-se igual volume da solução de Fehling. Após forte agitação manual, este material foi levado ao congelador durante 10 min, e em seguida levado à geladeira por 48 horas.

O precipitado foi separado do sobrenadante de Fehling mediante centrifugação a 3.200 r.p.m., por 8 min.

O precipitado de Fehling foi lavado com solução aquosa de hidróxido de potássio 2% sob agitação e em seguida centrifugado a 3.200 r.p.m. por 8 min. Esta etapa foi realizada 4 vezes; na última vez foi realizada uma dosagem de açúcares no sobrenadante pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

O precipitado foi então lavado com metanol e então centrifugado a 3.200 r.p.m. por 8 min, processo que se realizou três vezes. Em seguida, o complexo cúprico insolúvel foi decomposto por agitação em suspensão aquosa de resina Dowex na forma catiônica durante 1 hora. Após filtração dos polissacarídeos em solução, o pH foi ajustado para 7,0. A resina foi lavada cinco vezes com água destilada, a fim de serem totalmente retirados os polissacarídeos. A presença deles foi verificada pelo teste de fenol-ácido sulfúrico. A solução dos polissacarídeos foi concentrada sob pressão reduzida, dialisada contra água corrente por 48 horas, congelada e liofilizada, a fim de ser obtido o rendimento.

O sobrenadante foi neutralizado com ácido acético glacial na temperatura de 0-2°C até pH 7,0. Em seguida, foi dialisado contra água corrente e então deionizado por resinas Dowex nas formas catiônica e aniônica. Após esses procedimentos, o material foi concentrado sob pressão reduzida, congelado e liofilizado para ser calculado o rendimento. Esse material foi submetido

a um novo processo de precipitação por solução de Fehling, e em seguida ao fracionamento por Cetavlon.

3.1.3.3 Separação dos polissacarídeos do sobrenadante de Fehling por precipitação com Cetavlon (brometo de hexadeciltrimetilamônio)

O material obtido na fração sobrenadante por solução de Fehling foi dissolvido em água destilada e submetido a um novo processo de fracionamento (ver Esquema II, p. 54); usou-se sal de amônio quaternário, em diferentes pH, como descrito por SCOTT (1965) e DUARTE e JONES (1971).

Uma solução aquosa de Cetavlon 3%, pH 7,0, foi adicionada em igual volume (~50 mL) à solução dos polissacarídeos em água. Após a agitação magnética por 30 min, a solução foi centrifugada a 3.200 r.p.m., durante 15 min. Houve formação de pequena quantidade de precipitado em pH 7,0, o qual foi descomplexado com solução de cloreto de sódio 4 M; à solução obtida foi adicionado excesso de etanol. Após a centrifugação a 8.000 r.p.m., por 30 min, o precipitado foi separado do sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais 3 vezes. Em seguida o precipitado foi redissolvido em água destilada, dialisado contra água corrente durante 48 horas, congelado e liofilizado.

Ao sobrenadante da porção tratada com Cetavlon 3%, adicionou-se igual volume de tampão borato, pH 8,5. Houve imediata formação de precipitado de coloração branca. Após agitação por 1 hora, o precipitado obtido na forma de complexo polissacarídico boratado com base quaternária também foi separado do sobrenadante mediante centrifugação a 3.200 r.p.m., por 20 min. O precipitado foi descomplexado da mesma maneira acima descrita, exceto que o agente descomplexador utilizado foi ácido acético em concentração 2 M. Após esses procedimentos, foi então calculado o rendimento dos materiais.

O sobrenadante da precipitação em pH 8,5 foi tratado com solução de NaOH M com o auxílio do potenciômetro e sob agitação até pH 10,0. Após 30 min, foi observada a presença de pequena quantidade de precipitado, que foi isolado e descomplexado da mesma maneira descrita para o precipitado em pH 7,0.

Finalmente, o pH do sobrenadante foi elevado a 12,0 com solução de NaOH M mantido em agitação. Após 30 min, também foi observada a presença de pouca quantidade de precipitado, que foi igualmente descomplexado.

Após, neutralizou-se a solução sobrenadante final com ácido acético concentrado na temperatura de 0-2° C. Realizou-se então um teste de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), o qual indicou a presença de açúcares nesta fração (sobrenadante de Cetavlon pH 12,0).

Essa porção teve seu volume reduzido no rotaevaporador; em seguida foi congelada e liofilizada. Após este tratamento, a amostra foi dissolvida em pequeno volume de água e os polissacarídeos foram precipitados em excesso de etanol absoluto. A mistura foi centrifugada em 3.500 r.p.m. durante 15 minutos; ao precipitado foi adicionado excesso de etanol novamente, processo que se repetiu mais duas vezes. O precipitado final foi redissolvido em água destilada, dialisado por 48 horas contra água corrente e liofilizado.

Os precipitados das etapas de complexação com Cetavlon e os sobrenadantes finais acima descritos tiveram os rendimentos e as composições monossacarídicas determinados para cada espécie liquênica.

No presente trabalho apenas as estruturas das frações precipitadas por Cetavlon com borato em pH 8,5 foram estudadas, e reservadas as outras frações para investigações futuras.

3.1.3.4 Purificação da fração Sobrenadante de Fehling precipitada em pH 8,5

O processo de precipitação em diferentes pHs acima descrito foi repetido para todas as

amostras que precipitaram em pH 8,5. Nesta etapa, a descomplexação da fração precipitada em pH 8,5 foi realizada em gradiente de solução de NaCl em diferentes molaridades, em 0,1 M e 0,2 M. Em NaCl 0,2 M toda a amostra foi descomplexada. A fração que apresentou maior rendimento, descomplexada em NaCl 0,2 M, teve sua etapa final de purificação alcançada com o uso de coluna de gel Sepharose CL-6B (46,0 x 1,0 cm d.i.) O eluente utilizado foi água destilada, no fluxo de 1 mL/min. O volume das frações coletadas foi igual a 1,8 mL.

3.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DOS LIQUENS EM ESTUDO

3.2.1 COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS

3.2.1.1 Hidrólise ácida total

Amostras de carboidratos (aproximadamente 5 mg) foram tratadas com solução aquosa de TFA (HOUGH *et al.*, 1972) 1 M (aproximadamente 1,5 mL), durante 8 horas a 100° C (WORANOVICZ, 1995). Após as hidrólises, o TFA remanescente foi removido por evaporação à secura das soluções hidrolisadas. Parte dos polissacarídeos hidrolisados foram dissolvidos em água e cromatografados em papel-técnica descendente, solvente 5:3:3 (1-butanol-piridina-água), revelador: nitrato de prata alcalino (TREVELYAN *et al.*, 1950). A outra parte foi levada à redução e acetilação, conforme se passa a descrever.

3.2.1.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida

As misturas de monossacarídeos obtidas das hidrólises ácidas totais foram reduzidas com NaBH₄ (WOLFROM e THOMPSON, 1963b) na temperatura ambiente, durante 16 horas. Após esse período, as soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica, a fim de serem removidos os íons sódio. Após filtração por algodão, as amostras foram levadas à secura sob

pressão reduzida. O ácido bórico resultante desse tratamento foi eliminado por co-distilação com metanol na forma de borato de metila.

Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1, v/v, 2 mL), durante 16 horas, na temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963a).

O processo de acetilação foi interrompido pela adição de gelo ao sistema; os alditóis acetilados foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual da fração clorofórmica foi removida da preparação mediante sucessivos tratamentos com solução aquosa de CuSO_4 a 2%. Após a eliminação total da piridina, a fração clorofórmica foi desidratada com o auxílio de sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão. Após secura, os acetatos de alditóis foram analisados por GC-MS, em colunas revestidas com OV-225 ou DB-225, a 220° C.

3.2.2 TESTE DE HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

3.2.2.1 Cromatografia de gel permeação (GPC)

Amostras de heteropolissacarídeos de todas as espécies (aproximadamente 2 mg) tanto da fração Precipitado de Fehling quanto da fração Precipitado de Cetavlon pH 8,5 foram dissolvidas em 0,3 mL de uréia 6 M. Em seguida, foram aplicadas em coluna de Sepharose CL-4B (61,0 x 1,7 cm d.i.). O eluente empregado foi água destilada e o volume das frações coletadas igual a 2 mL.

As frações coletadas da coluna foram monitoradas por meio do conteúdo de açúcar total, pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). A calibração da coluna foi efetuada com a eluição de dextranas de diferentes massas moleculares ($2,0 \times 10^6$, $5,0 \times 10^5$ e $2,66 \times 10^5$).

O volume de eluição de uma dextrana comercial (5 a 40×10^6) foi utilizado como volume morto da coluna.

Amostras de glucanas (aproximadamente 2 mg) foram dissolvidas em 0,3 mL de NaOH M e aplicadas em coluna de Sepharose CL-4B (61,0 x 1,7 cm d.i.). Elas foram eluídas com NaOH 0,05 M; as frações resultantes (2 mL) foram igualmente testadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico. O volume de eluição de uma dextrana comercial (5 a 40 MDa) foi utilizado como volume morto da coluna, utilizando como eluente solução de NaOH 0,05 M. A calibração da coluna foi realizada com a eluição de dextransas de massas moleculares de $2,0 \times 10^6$, $5,0 \times 10^5$, $2,66 \times 10^5$ e $8,16 \times 10^4$.

3.2.3 METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.2.3.1 Metilação dos polissacarídeos das frações Precipitado de Fehling e Sobrenadante de Fehling: polissacarídeos solúveis em água

Uma amostra de cada polissacarídeo (aproximadamente 40 mg) foi tratada com NaBH_4 , na temperatura ambiente, durante 2 horas. Após redução, os polissacarídeos foram dialisados contra água corrente durante a noite. A fração não dialisável foi evaporada até a secura sob pressão reduzida e submetida à metilação com sulfato de dimetila (DMS) em solução alcalina, segundo o processo descrito por HAWORTH (1915): o resíduo seco no balão foi dissolvido em 5 mL de solução aquosa de NaOH 40% p/v. Em seguida foram feitas 5 adições de 0,5 mL de DMS; na última houve prévia adição de mais 2 mL de NaOH 40% p/v. Esse procedimento foi realizado sob agitação magnética constante e na temperatura ambiente. Essa operação foi repetida por mais dois dias consecutivos; no quarto dia, o processo de metilação foi interrompido pelo aquecimento do sistema a 100°C durante 30 min, a fim de decompor o excesso de DMS. Após resfriamento a $0-2^\circ \text{C}$, o meio foi neutralizado com ácido acético glacial e levado à diálise contra água corrente por aproximadamente 96 horas. Decorrido esse período, os polissacarídeos parcialmente metilados foram liofilizados e submetidos ao tratamento com iodeto de metila em meio alcalino, de acordo com o método descrito por CIUCANU e KEREK (1984). Ao

polissacarídeo parcialmente metilado foi adicionado DMSO, conforme a proporção mantida pelo método original. Após a solubilização, NaOH seco e pulverizado foi adicionado. A mistura (50 mg polissacarídeo: 5 mL DMSO: 200 mg NaOH: 1 mL CH₃I) foi agitada por 15 min e, então, foi adicionado iodeto de metila. Após a agitação por 15 min, a reação foi interrompida com água na temperatura de 0-2° C. Em seguida, esse material foi levado à diálise contra água corrente por aproximadamente 96 horas.

A fração não dialisável foi evaporada em pressão reduzida, liofilizada e remetida pelo mesmo método acima descrito. Para a fração Sobrenadante de Fehling mais uma repetição do método de CIUCANU e KEREK (1984) foi necessária.

O polissacarídeo foi extraído com clorofórmio e lavado diversas vezes com água destilada. O solvente foi evaporado, e o material secado em aparelho de Abderhalden durante a noite.

O polissacarídeo permetilado foi inicialmente analisado por espectroscopia de infravermelho e em seguida derivatizado, o que resultou nos seus respectivos acetatos de alditóis, como descrito no item 3.2.3.3.

3.2.3.2 Metilação da glucana de *C. penicillata*: polissacarídeo insolúvel em água

O polissacarídeo (40 mg), após redução com NaBH₄, foi parcialmente metilado três vezes com solução aquosa de NaOH 40% p/v e DMS (HAWORTH, 1915); o processo foi completado com NaOH-DMSO-CH₃I (CIUCANU e KEREK, 1984) até o material não apresentar absorção de banda de OH em espectroscopia de infravermelho (3400 cm⁻¹). O produto metilado foi derivatizado para seus respectivos acetatos de alditóis, como a seguir se descreve.

3.2.3.3 Análise dos polissacarídeos metilados na forma de acetatos de alditóis

Uma amostra de cada polissacarídeo metilado (2 a 10 mg) foi submetida à metanólise com solução de ácido clorídrico em metanol a 3,5% (v/v, 2 mL), sob refluxo, por 2 horas, em banho-maria na temperatura de 100°C (GORIN e IACOMINI, 1984). Após a adição de carbonato de prata para eliminação do ácido na forma de cloreto de prata, foi realizada uma filtração com papel de filtro. O filtrado foi evaporado à secura sob pressão reduzida e submetida à hidrólise com 1,5 mL de ácido sulfúrico 0,5 M, durante 14 horas, na temperatura de 100° C. O excesso de ácido sulfúrico foi eliminado com carbonato de bário. O filtrado límpido foi tratado com boroidreto de sódio, durante 16 horas, na temperatura ambiente. Decorrido o período de redução, os íons sódio foram eliminados 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; os acetatos de alditóis resultantes foram analisados por GC-MS em colunas capilares revestidas com OV-225 ou DB-225 como se descreve em Métodos Analíticos Gerais.

A diferenciação entre a fonte dos derivados 3-*O*-metil e 4-*O*-metil-manitol foi realizada por metanólise (solução de ácido clorídrico em metanol 3%), sob refluxo, durante 5 horas (GORIN e IACOMINI, 1984). Os produtos foram neutralizados com carbonato de prata e, após, foram acetilados pelo método convencional com anidrido acético e piridina e analisados conforme se descreveu anteriormente em coluna revestida com OV-225.

3.2.4 DEGRADAÇÃO TIPO SMITH DE POLISSACARÍDEOS

3.2.4.1 Degradação de polissacarídeos seguida de hidrólise ácida total

Uma amostra de cada polissacarídeo (50 mg) foi oxidada com solução de metaperiodato de sódio 0,05 M (50 mL), durante 96 horas, na temperatura ambiente e na ausência de luz

(ABDEL-AKHER *et al.*, 1952; HAY *et al.*, 1965; IACOMINI *et al.*, 1981). A oxidação foi interrompida com a adição de 2 mL de etilenoglicol; a solução oxidada, após 20 min sob agitação, foi dialisada contra água corrente por 16 horas. Após a diálise, a solução com o polialdeído foi tratada com boroidreto de sódio, durante 6 horas, na temperatura ambiente. O excesso de agente redutor foi decomposto pela adição de solução aquosa de ácido acético 2 M até pH 7,0, na temperatura de 0-2° C; a solução reduzida foi dialisada contra água corrente, durante 48 horas. A solução resultante teve seu volume reduzido a 25 mL; a oxidação com metaperiodato de sódio, seguida da redução com boroidreto de sódio, foi repetida mais uma vez, com igual procedimento. No final dessa etapa, a fração não dialisável foi liofilizada. O produto da liofilização foi submetido à hidrólise com 1,5 mL de TFA 1 M, na temperatura de 100° C, durante 8 horas, seguido de redução e acetilação como se descreve no item 3.2.1.2.

3.2.4.2 Degradação da glucana de *Cladonia penicillata* seguida de hidrólise ácida parcial

A glucana (20 mg) foi oxidada conforme se descreveu no item anterior. Ao final do processo o material foi concentrado a 20 mL; a hidrólise parcial foi efetuada por ajuste do pH a 2,0 com solução diluída de H₂SO₄, na temperatura de 100° C durante 30 min. Após a deionização e evaporação da solução, esta foi analisada por cromatografia em papel, conforme descrito no item 3.3.1.1, a qual evidenciou a presença exclusiva de 2-*O*- α -D-glucopiranosil-D-eritritol.

3.2.5 DETERMINAÇÃO DA CADEIA PRINCIPAL DA GALACTOMANOGLUCANA DE

Cladonia miniata

O heteropolímero (67 mg) foi oxidado conforme descrito no item 3.2.4.1. Ao final do processo o material foi liofilizado (30,9 mg) e a hidrólise parcial foi realizada em 2,5 mL de solução de TFA pH 1,7, na temperatura de 100° C durante 35 min. Após a evaporação da solução

até secura, o material foi suspenso em 10 mL de água destilada e precipitado em excesso de etanol. Após centrifugação a 14.000 r.p.m. durante 20 min, a fração sobrenadante foi concentrada sob pressão reduzida e testada quanto à presença de carboidratos pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Em seguida foi liofilizada, reduzida, acetilada e analisada conforme se descreveu anteriormente, em coluna revestida com OV-225.

A fração precipitada em etanol foi ressuspensa em água e dialisada em sistema fechado por 48 horas. Após a liofilização, a fração foi utilizada para determinação da composição monossacarídica, e análises de RMN ¹³C e rotação específica.

3.2.6 ACETÓLISE PARCIAL DOS POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO PRECIPITADO DE FEHLING

Os oligossacarídeos foram obtidos por acetólise conforme o método descrito por LEE e BALLOU (1965): uma amostra de cada polissacarídeo (aproximadamente 200 mg) foi dissolvida em uma mistura de ácido acético glacial: anidrido acético: ácido sulfúrico 98% na proporção de 10:10:1 v/v. Durante o processo, a temperatura da mistura foi mantida a 20° C. A produção de oligossacarídeos foi monitorada por cromatografia em camada delgada, comparando-se com padrões de monossacarídeo (manose penta-acetato) e dissacarídeos (maltose e lactose octa-acetatos). A fase móvel utilizada foi acetato de etila: hexano (1:1) e revelada com a mistura sulfato cérico 1% e ácido molíbdico 1,5% em solução aquosa de ácido sulfúrico 10% a 100° C. A média de seis dias foi ideal para a produção de oligossacarídeos. No final deste período, a mistura foi centrifugada a 3.100 r.p.m., durante 15 minutos. A porção sobrenadante foi colocada em aproximadamente 40 mL de uma mistura de água e gelo, e o pH da solução foi ajustado para 5,5 pela adição de hidróxido de sódio 40%. Posteriormente o material acetolisado foi extraído com clorofórmio, o qual foi lavado com bicarbonato de sódio 1M. Este processo foi repetido três

vezes. A fração clorofórmica foi desidratada com o auxílio de sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão. Em seguida a mistura foi levada à secura sob pressão reduzida e liofilizada, a fim de ser obtido o rendimento.

Quando necessário, os oligossacarídeos acetolisados acima descritos foram submetidos à desacetilação. Estes foram dissolvidos em mistura de clorofórmio: metanol (2:1) e desacetilados pela adição de quantidade catalítica de metóxido de sódio em metanol. Após repouso por 1 hora na temperatura ambiente, foi adicionado ácido acético 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 misturas de resina catiônica e aniônica na proporção de 3:1. Após a filtração, as amostras em solução foram congeladas e liofilizadas, para a obtenção dos respectivos rendimentos. Os oligossacarídeos obtidos por acetólise foram purificados em coluna de sílica gel ou HPLC, e tiveram suas estruturas determinadas por técnicas de RMN ^1H , como descrito no item 3.3.2.1.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.3.1.1 Cromatografia em papel (CP) e em camada delgada (TLC)

As análises cromatográficas qualitativas em papel foram desenvolvidas pela técnica descendente, em papel Whatman nº 1, com o sistema de solvente 1-butanol-piridina-água 5:3:3 (v/v) (HOUGH e JONES, 1962). A detecção de carboidratos foi realizada com os reagentes de nitrato de prata alcalino (TREVELYAN *et al.*, 1950) e de cloridrato de *p*-anisidina (HOUGH *et al.*, 1950).

Cromatografias em camada delgada foram realizadas em placas de alumínio revestidas com sílica gel 60F-254 (Merck). Os sistemas de solventes utilizados foram: acetato de etila-

metanol-água 4:2:1 (v/v) para amostras polares, e acetato de etila-hexano 1:1 (v/v) para amostras não polares. A visualização dos carboidratos foi obtida pela borrifação da placa com mistura de sulfato cérico 1% e ácido molíbdico 1,5% em H₂SO₄ 10% e seca com ar quente.

3.3.1.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em cromatógrafo a gás "VARIAN", modelo 3300, acoplado a um espectrômetro de massa da marca FINNIGAN ION-TRAP, modelo 810 R-12 e equipado com coluna capilar de sílica fundida revestida com OV-225 (30 m x 0,25 mm d.i.) e DB-225 (15 m x 0,25 mm d.i.). A temperatura da primeira foi mantida a 50° C, e, então, rapidamente programada a 40° C/min, até 220° C e mantida constante. A temperatura de injeção da última foi 50° C e mantida constante (220° C). O gás de arraste utilizado foi hélio ultrapuro, com fluxo de 2 mL/min.

Essas colunas foram empregadas para a quantificação de acetatos de alditóis e acetatos de alditóis parcialmente metilados, identificados pelos seus perfis característicos (JANSSON *et al.*, 1976) de fragmentação e pelos seus tempos de retenção, que foram comparados com aqueles de padrões injetados. As áreas dos picos foram obtidas por integração automática.

3.3.1.3 Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)

As misturas de oligossacarídeos foram dissolvidas em acetonitrila grau HPLC ou água MilliQ (para amostras acetiladas ou na forma livre respectivamente) e filtradas através de membrana de filtração com poros de 0,45 µm. A separação foi realizada em HPLC modelo WATERS™ e equipado com controlador WATERS™ 600. Os eluatos foram monitorados pelo índice de refração (IR), com auxílio de refratômetro WATERS 410 DIFFERENTIAL acoplado ao aparelho. O sistema foi controlado pelo programa MILLENIUM, versão 2.10. As colunas

usadas para separação foram DELTA-PAK™ C¹⁸- WATERS (fase reversa), 8 mm x 100 mm (analítica) ou 25 mm x 100 mm (semi-preparativa) e ALLTECH CARBOHYDRATE 10 micron-WATERS (C), 4,1 mm x 300 mm (fase normal). Os oligossacarídeos acetilados foram eluídos em mistura de água e acetonitrila na proporção 3:2 (v/v), com fluxo de 3 mL/min. Nos casos em que um único pico continha mais de um oligossacarídeo, a desacetilação foi realizada e as misturas foram recromatografadas em coluna de fase normal acima citada na mistura de solventes acetonitrila: água (3:2 v/v), com fluxo de 2,2 mL/min.

3.3.1.4 Cromatografia em coluna de sílica gel

2-*O*- α -D-manopiranosil- $\alpha\beta$ -D-manose isolado de *Cladonia imperialis* foi purificado utilizando-se coluna cromatográfica da seguinte maneira: uma amostra da mistura de oligossacarídeos foi dissolvida em 0,3 mL da mistura de solventes acetato de etila: metanol: água (4:2:1). Em seguida foi aplicada em coluna de sílica gel (20,0 x 2,0 cm d.i.). O eluente empregado foi o mesmo utilizado para dissolver a amostra, e o volume das frações coletadas igual a 2 mL. O total de 30 frações foi coletado.

As frações obtidas da coluna foram monitoradas por meio de TLC, utilizando-se a mesma mistura de solventes acima citada como fase móvel. Para a visualização, a placa foi borrifada com a mistura de sulfato cérico 1% e ácido molíbdico 1,5% em H₂SO₄ 10%, como se descreve no item 3.3.1.1.

O mesmo dissacarídeo, porém na forma acetilada, foi obtido de galactoglucomanana isolada de *Cladonia ibitipocae*: α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)-D-Manp foi purificado e caracterizado na forma do seu correspondente derivado acetil, devido a maior facilidade em determinar sua estrutura através de RMN.

1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose foi purificado utilizando-se coluna cromatográfica da seguinte maneira: uma amostra da mistura

de oligossacarídeos foi dissolvida em 0,3 mL da mistura de solventes acetato de etila:hexano (1:1). Este material foi aplicado em coluna de sílica gel (20,0 x 2,0 cm d.i.). O eluente empregado foi o mesmo utilizado para dissolver a amostra, porém em proporção 2:1, e o volume das frações coletadas igual a 2 mL. Trinta frações de 2 mL cada uma foram coletadas, as quais foram monitoradas por TLC. As frações que apresentaram maior concentração em carboidratos tiveram seu $r_{f\text{lac}}$ igual a 1,0. Estas foram analisadas por RMN- 1D (^1H) e 2D (COSY, TOCSY e NOESY), e forneceram os valores apresentados em Resultados e Discussão.

3.3.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.3.2.1 Ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H)

Os espectros de RMN ^1H uni- e bidimensionais [COSY (ZÄHRINGER *et al.*, 1995), NOESY (AGRAWAL, 1992), TOCSY (BRAUNSCHWEILER e ERNST, 1983) e HMQC (FRIEBOLIN, 1993)] foram obtidos pelo uso do espectrômetro BRUKER WM-400 e -600 MHz a 25° C, incorporados ao transformador de Fourier.

Os oligossacarídeos derivatizados foram dissolvidos em CDCl_3 ; os não substituídos foram dissolvidos em D_2O . Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) relativos à ressonância do TMS ($\delta = 0$) para espectros cujas amostras foram dissolvidas em CDCl_3 e relativos ao DSS para aquelas dissolvidas em D_2O .

As glucanas insolúveis em água foram dissolvidas em D_2O com NaOH 3% e analisadas em aparelho BRUKER DRX-400 na temperatura de 30° C. Experimentos bidimensionais foram obtidos apenas para a glucana de *Cladonia penicillata* e obtidos na temperatura de 70° C. A amostra foi dissolvida em DMSO-d_6 com pequena quantidade de D_2O , a fim de realizar as trocas dos grupos OH.

Os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento foram obtidos de análises de primeira ordem dos espectros.

3.3.2.2 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN ^{13}C)

Os espectros foram obtidos pelo uso do espectrômetro BRUKER AC-300 e CXP-300, (polissacarídeos da fração Precipitado de Fehling) e BRUKER DRX-400 (glucanas e polissacarídeos da fração Sobrenadante de Fehling), incorporados ao transformador de Fourier. Os polissacarídeos solúveis em água foram analisados com soluções de D_2O ; aqueles insolúveis em água, dissolvidos em DMSO-d_6 e um pequeno volume de D_2O . As amostras foram analisadas em tubos de 150 x 5 mm d.i. na temperatura de 70° C.

Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) relativos à ressonância do TMS externa ($\delta = 0$) determinada em experimento separado e à ressonância do DSS interna no caso dos oligossacarídeos não derivatizados; e, ainda, relativos à ressonância do TMS interna para oligossacarídeos acetilados.

3.3.3 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

A determinação de carboidratos totais foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Os complexos coloridos resultantes da reação foram lidos a 490 nm.

3.3.4 POLARIMETRIA

As rotações específicas de amostras solúveis em água foram obtidas com soluções aquosas 1% (p/v) em polarímetro digital RUDOLPH RESEARCH AUTOPOL II, exceto no caso de oligossacarídeos, cuja concentração foi 0,1%. As glucanas insolúveis em água foram

dissolvidas em solução aquosa de NaOH 2% e analisadas em polarímetro AUTOPOL III a 589 nm na temperatura de 25° C e em concentração final de 0,1%.

3.3.5 MÉTODOS COMPLEMENTARES

Os métodos complementares utilizados nos experimentos foram:

- a) Os reagentes e solventes utilizados apresentavam característica P.A., exceto os utilizados para cromatografia líquida de alta precisão, que possuíam “grau HPLC”;
- b) As pesagens de precisão foram feitas em balanças analíticas SAUTER, modelo KG-D-7470 e METTLER AE 160. Para outras pesagens foi utilizada a balança MICRONAL modelo B-1600;
- c) Os líquens foram moídos em moinho WILEY, sob malha de 20 mesh;
- d) As concentrações de soluções foram realizadas em rotaevaporador FISATOM, modelo 802, sob pressão reduzida, cuja temperatura não ultrapassava os 50° C;
- e) As liofilizações de soluções foram feitas em aparelhos VIRTIS, modelo 10-145 MR-BA e LABCONCO;
- f) As centrifugações foram realizadas em centrífugas BECKMAN, modelos J21B e J2-HS (10.000 r.p.m.) e CELM, modelo LS-II1053 (3.200 r.p.m.);
- g) A espectroscopia na região visível foi efetuada em aparelho DIGIMED DME-21 e SPECTRONIC 20 GENESYS;
- h) As determinações espectrofotométricas na região do infravermelho (400 cm^{-1} a 350 cm^{-1}) foram realizadas em aparelhos BECKMAN ACCULAB TM₁₀ e BOMEN HARTMANN & BRAUN MB em filmes de CHCl_3 , quando o material era solúvel em tal solvente sobre células de NaCl, ou em pastilhas de KBr;

- i) As medidas e aferições de concentrações hidrogeniônicas (pH) foram procedidas em potenciômetros MICRONAL, modelo B222 e CORNING, modelo 7;
- j) 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^+) e/ou com resina aniônica (Dowex 2 x 8 - forma HCO_3^-) e posterior filtração por papel ou por algodão;
- k) A precipitação dos polissacarídeos em excesso de etanol corresponde aproximadamente a uma parte da solução de polissacarídeos para 3 até 5 partes de etanol.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Treze amostras de líquens do gênero *Cladonia* e uma do gênero *Cladia*, cujos fragmentos estão mostrados nas Figuras 1.1, 1.2 e 1.3, foram submetidas à pesquisa dos seus polissacarídeos, dando-se ênfase ao estudo comparativo dos homo- e heteropolímeros.

Entre as 455 espécies descritas de *Cladonia*, aproximadamente 100 são encontradas em abundância no Brasil, especialmente na Serra do Ibitipoca, MG, que foi chamada de “Paraíso das Cladonias” por TEUVO AHTI em 1993 (MARCELLI, 1994b). Todas as espécies em estudo possuem identificação referente aos números de coleta e foram depositadas no herbário Maria Eneyda P. Kauffmann Fidalgo, cuja sigla oficial internacional é SP, do Instituto de Botânica de São Paulo.

Cladonia clathrata, *C. imperialis*, *C. furcata*, *C. signata* e *Cladia aggregata* foram coletadas no município de Itamonte, MG, entre 2.000 e 2.150 m de altitude, entre plantas herbáceas e gramíneas em campos de altitude e na beira da estrada para o Parque Nacional do Itatiaia. *Cladonia signata* tem aparência de *Cladina*, tendo sido referida para este gênero por vários autores (AHTI, 1961). Essa espécie lembra *Cladina confusa* (R. Sant.) Folmann & Ahti, bem delicada, já estudada pelo grupo de Química de Carboidratos da Universidade Federal do Paraná quanto aos seus carboidratos (IACOMINI *et al.*, 1985). É encontrada nas Guianas e, no Brasil, nos Estados do Amazonas e Minas Gerais. *Cladonia furcata* se desenvolve no solo, sobre troncos em decomposição; sua distribuição geográfica é ampla, incluindo Austrália, Nova Zelândia, Ásia, Europa, América do Norte e Central, Colômbia, Venezuela, Brasil, Chile e Argentina (STENROOS *et al.*, 1992). *C. imperialis* é encontrada na Serra da Mantiqueira, principalmente no Parque Nacional do Itatiaia no Rio de Janeiro e Minas Gerais, em afloramentos de rochas das florestas úmidas. Pelo contrário, *C. clathrata* cresce em ambientes arenosos e abertos; é localizada em abundância, especialmente nas proximidades da costa. É encontrada em parte do nordeste brasileiro, da Paraíba ao Espírito Santo e também em Minas Gerais.

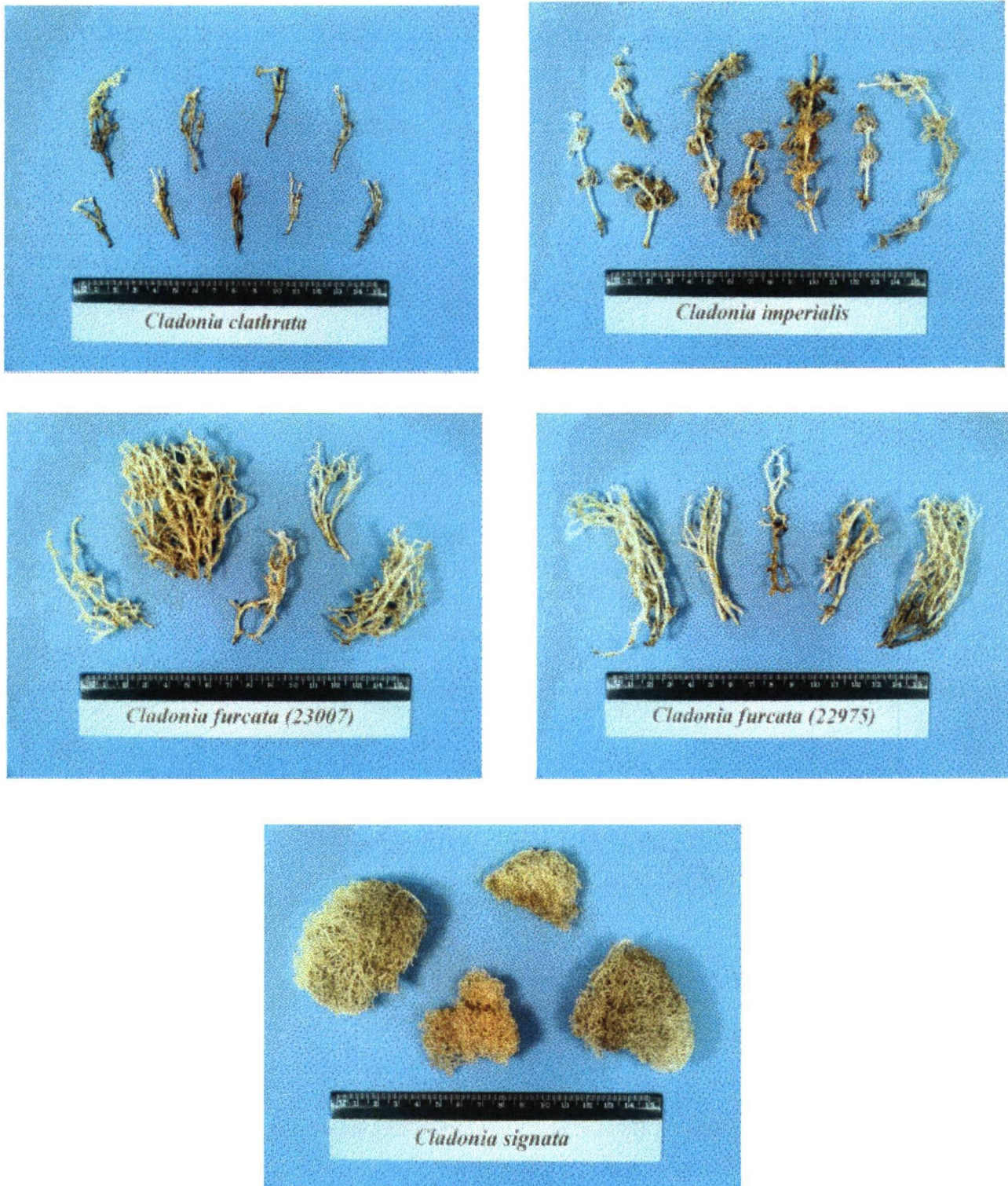


FIGURA 1.1 - Fragmentos dos líquens *Cladonia clathrata*, *C. imperialis*, *C. furcata* (23007), *C. furcata* (22975) e *C. signata*.

Cladonia connexa, *C. crispatula*, *C. ibitipocae*, *C. penicillata*, *C. miniata* e *C. substellata*, coletadas no município de Lima Duarte, MG, crescem em tufos, sobre a fina capa de solo arenoso-humoso que se encontra sobre a rocha quartzítica ou mesmo diretamente sobre a rocha, exceto *C. miniata*, que cresce sobre caules queimados de *Vellozia*. As espécies crescem diretamente expostas ao sol ou na pouca sombra fornecida por arvoretas de poucos galhos; atingem maior tamanho quando crescem no caminho da água de escoamento, na encosta da montanha, como é o caso dos indivíduos amostrados.



FIGURA 1.2 - Fragmentos dos líquens *Cladonia connexa*, *C. crispatula*, *C. ibitipocae* e *C. penicillata*.

Cladonia salmonea n° 29692, coletada em MG, Caeté, Serra da Piedade, cresce exposta em frestas do chão rochoso do campo rupestre. A de n° 29828, proveniente do município de Brumadinho, MG, Serra da Moeda, Retiro das Pedras, cresce no chão rochoso plano, principalmente em frestas e cantos no campo rupestre. A espécie é muito comum nos terrenos ricos em minério de ferro desse Estado e é parte importante da paisagem na Serra da Moeda.

A espécie representante do gênero *Cladia* neste estudo, *C. aggregata*, pertence a este gênero, e não ao gênero *Cladonia*, por apresentar o talo vertical perfurado lateralmente, embora, em 1827, esta espécie tenha sido conhecida como *Cladonia aggregata* e, em 1938, como subespécie *subminiata* desta mesma espécie (STENROOS *et al.*, 1992).

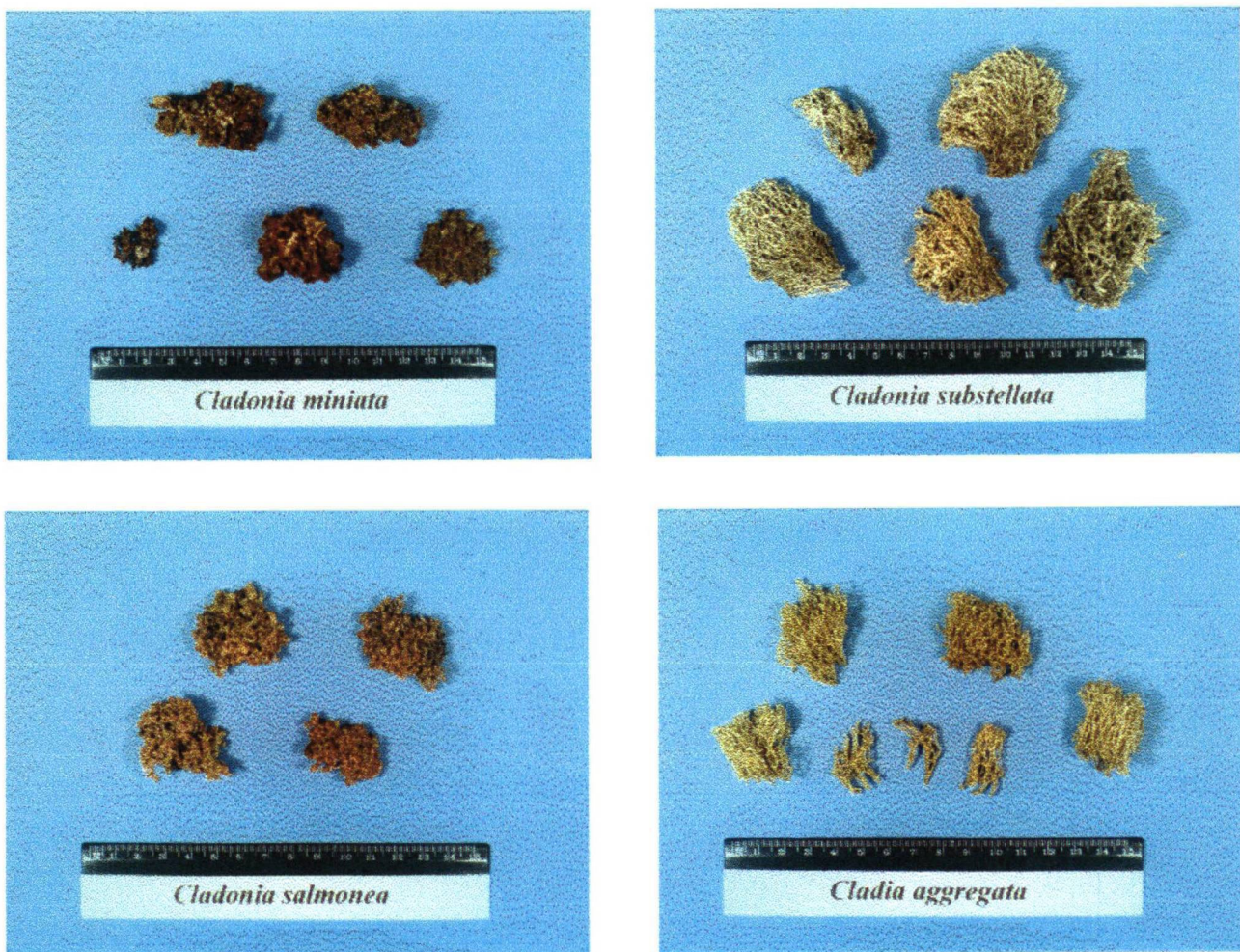
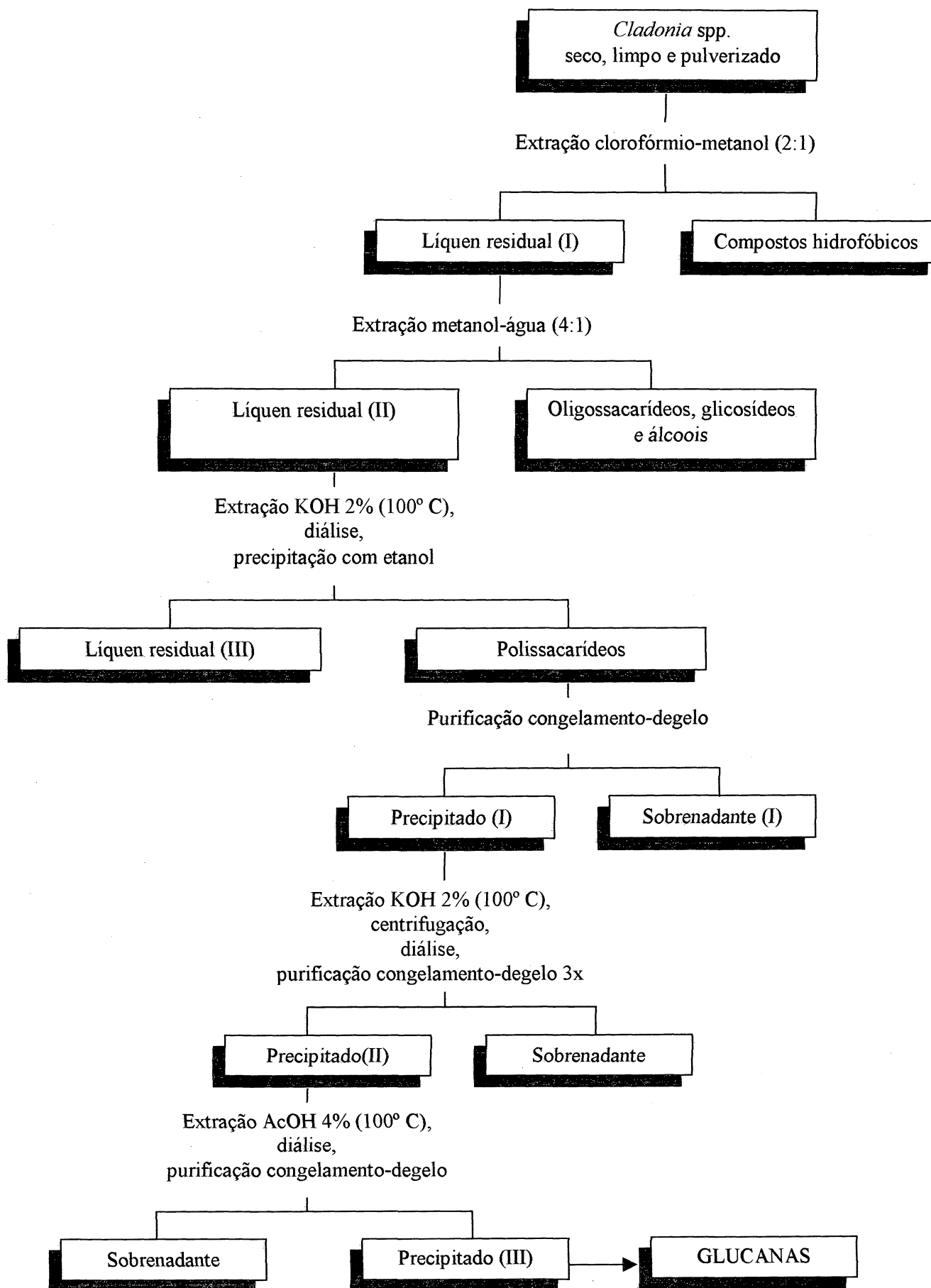
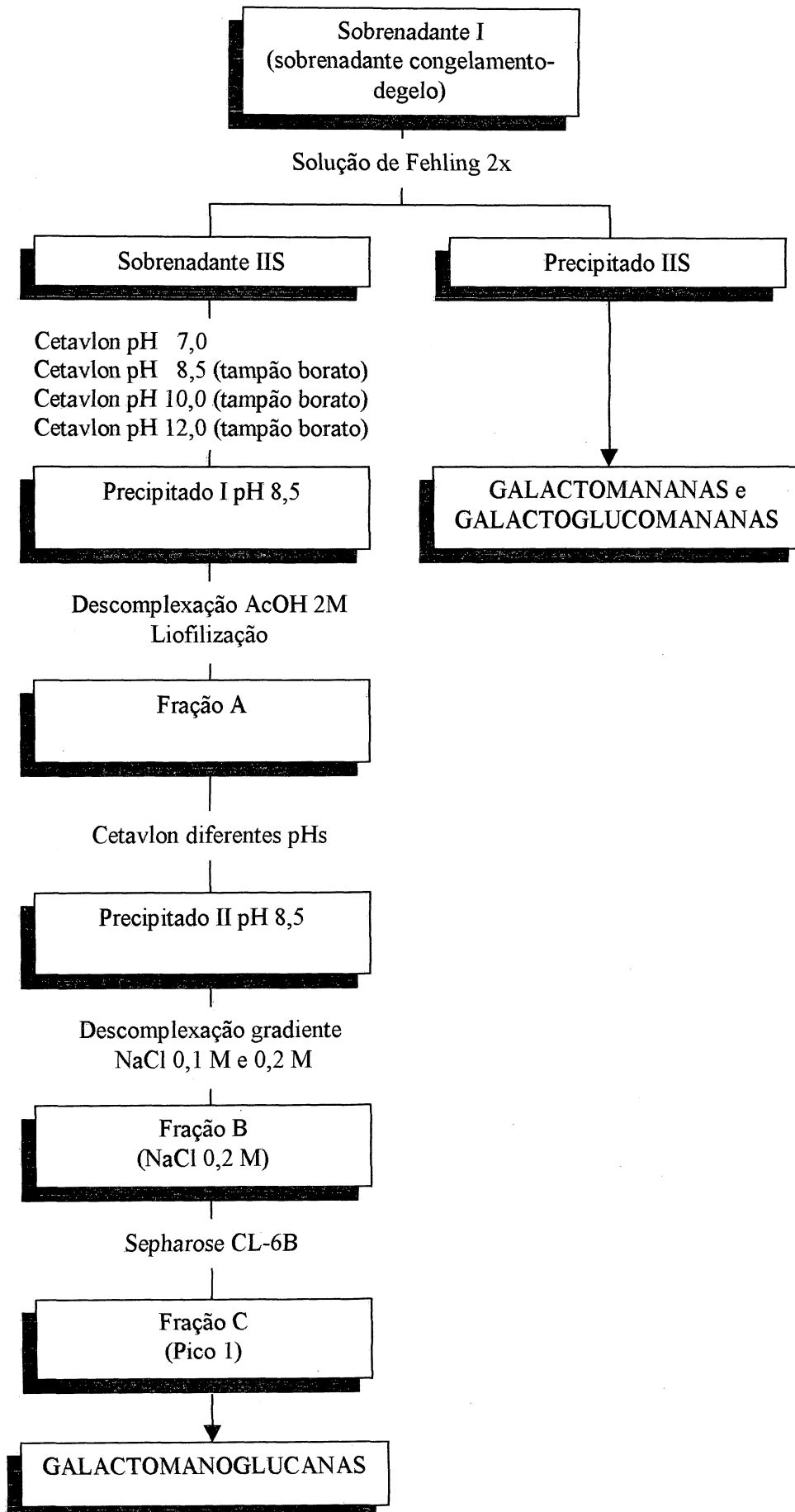


FIGURA 1.3 - Fragmentos dos líquens *Cladonia miniata*, *C. substellata*, *C. salmonea* e *Cladia aggregata*.

ESQUEMA I



ESQUEMA II



4.1 COMPONENTES SOLÚVEIS NOS EXTRATOS CLOROFÓRMIO-METANÓLICO E METANOL-AQUOSO

As amostras extraídas com clorofórmio-metanol, processo que remove pigmentos e outras substâncias lipossolúveis, como glicolipídeos, apresentaram diferentes porcentagens de rendimento nesta etapa de extração. Os rendimentos para as espécies em estudo estão apresentados na Tabela 1, o que demonstrou que esta etapa pode fornecer diferentes quantidades, seja pelo fato de serem espécies diferentes ou mesmo a época de coleta, o local ou ainda de distintas fases de crescimento dos líquens em estudo. Essas frações foram reservadas para avaliações posteriores, especialmente no que se refere à ocorrência e caracterização estrutural de glicolipídeos em fungos liquenizados.

Os líquens posteriormente extraídos com a mistura metanol-água apresentaram pequenas diferenças quanto à porcentagem de rendimento desta etapa de extração (Tabela 1). A literatura mostra que essa fração é rica em carboidratos de baixa massa molecular, especialmente álcoois como arabinitol, xilitol e manitol, e mono- e oligossacarídeos (galactose, glucose, lactose, sacarose e outros) (CULBERSON C. F., 1969; PUEYO, 1980a,b, 1981; GORIN *et al.*, 1993).

Nos estudos quimiotaxonômicos parece não haver aplicação destes componentes até o momento, devido a que, provavelmente, a sua distribuição é específica a certas espécies de líquens e não característica de determinados grupos taxonômicos; portanto os extratos metanol-aquosos das espécies em estudo foram acondicionados, a fim de serem realizadas investigações posteriores, principalmente para a avaliação do metabolismo nesses seres.

4.2 POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO ALCALINA

Os materiais residuais, após extração com clorofórmio-metanol e metanol-água, foram tratados com solução de KOH 2%, como exposto no Esquema I.

TABELA 1 - Rendimento (g%) de frações obtidas de extrações de *Cladonia* spp. e *Cladia aggregata*.

LÍQUEN	Clorofórmio : Metanol (g%) ^a	Metanol : Água (g%) ^a
<i>C. clathrata</i>	3,5	2,2
<i>C. connexa</i>	3,6	1,1
<i>C. crispatula</i>	3,9	1,7
<i>C. furcata</i> 22975	2,2	2,4
<i>C. furcata</i> 23007 ¹	6,2	2,3
<i>C. ibitipocae</i>	3,4	1,8
<i>C. imperialis</i>	2,9	2,1
<i>C. miniata</i>	4,6	2,0
<i>C. penicillata</i>	3,2	1,7
<i>C. salmonea</i> 29692	9,7	1,5
<i>C. salmonea</i> 29828	4,1	1,2
<i>C. signata</i> ¹	2,7	1,6
<i>C. substellata</i>	6,4	1,4
<i>Cladia aggregata</i> ¹	5,2	1,6

^aRendimento calculado com base no peso total do líquen.

¹: Dados obtidos da tese de Mestrado da autora.

Os extratos alcalinos, após neutralização, tiveram seus polissacarídeos precipitados com excesso de etanol. Os precipitados etanólicos, que forneceram diferentes rendimentos para as espécies em estudo, variaram de 3,1 a 18,4 g% (Tabela 2). Como todas as amostras tiveram o mesmo tratamento nas etapas de extração, essa diferença pode provir de fatores ambientais ou ser característica de cada espécie.

Pela análise por GC-MS dos acetatos de alditóis obtidos dos materiais hidrolisados, foi evidenciada a presença de manose, galactose e glucose. Esses materiais, quando submetidos a processos de congelamento e degelo sucessivos para separação dos polissacarídeos solúveis em

água fria daqueles insolúveis, forneceram duas frações: Precipitado do congelamento e degelo, insolúvel em água fria, e o Sobrenadante do gelo e degelo, solúvel em água fria.

TABELA 2 - Rendimento (g%) e composição das frações obtidas do extrato alcalino de *Cladonia* spp. e *Cladia aggregata*.

LÍQUEN	Extração com álcali a quente (g%) ^a	Precipitado "Cong.-Degelo"		Sobrenadante "Cong.-Degelo"	
		(g%) ^a	Man:Gal:Glc (mol%) ^b	(g%) ^a	Man:Gal:Glc (mol%) ^b
<i>C. clathrata</i>	6,0	0,7	13:23:63	5,5	52:35:13
<i>C. connexa</i>	6,5	1,2	33:32:21	4,6	56:44:0
<i>C. crispatula</i>	6,4	1,8	25:28:41	3,9	47:36:14
<i>C. furcata</i> 22975	3,7	0,4	19:30:49	2,8	34:28:36
<i>C. furcata</i> 23007 ¹	9,6	1,2	22:25:50	8,7	28:24:48
<i>C. ibitipocae</i>	15,8	2,7	39:27:32	12,6	60:35:2
<i>C. imperialis</i>	3,9	0,8	63:16:20	3,2	51:35:12
<i>C. miniata</i>	17,1	2,3	21:17:61	12,6	61:25:14
<i>C. penicillata</i>	3,1	0,9	21:16:61	2,3	49:40:10
<i>C. salmonea</i> 29692	18,4	3,7	25:17:59	13,8	42:45:12
<i>C. salmonea</i> 29828	10,3	1,5	24:17:57	8,9	47:33:18
<i>C. signata</i> ¹	3,7	0,5	28:30:41	2,4	31:31:48
<i>C. substellata</i>	6,0	1,1	38:27:31	4,0	63:29:7
<i>Cladia aggregata</i>	8,3	2,0	45:44:9	4,4	46:44:10

^aRendimento calculado com base no peso total do líquen. ^bPor GC-MS, como acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura 40° C→220° C.

¹: Dados obtidos da tese de Mestrado da autora.

Ambas as frações apresentaram como componentes monossacarídicos, na forma de acetatos de alditóis, glucose, galactose e manose (exceto *C. ibitipocae*, que apresentou, além destas, 7% de ramnose no precipitado congelamento-degelo), e tanto o precipitado quanto o

sobrenadante do processo congelamento-degelo foram purificados por processos que serão discutidos a seguir. Deve ser observado que a proporção da fração solúvel em água fria (2,3 g% a 13,8 g%) foi maior do que a insolúvel (0,4 g% a 3,7 g%), fato observado anteriormente em estudo realizado com *Cladina stellaris* (como *Cladonia alpestris*), *Cladina confusa* (como *Cladonia confusa*) (IACOMINI *et al.*, 1985), *Cladia aggregata* e outras espécies de *Cladonia* (WORANOVICZ, 1995).

4.2.1 POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO PRECIPITADO CONGELAMENTO-DEGELO

Após o término do procedimento de congelamento-degelo, a fração insolúvel em água fria foi investigada quanto à sua composição monossacarídica e respectivos rendimentos. Todas as espécies em estudo apresentaram como componentes monossacarídicos na forma de acetatos de alditóis, glucose, galactose e manose (Tabela 2). Como se observa, para a maioria das espécies o componente encontrado em maior proporção foi a glucose, o que indica a presença de glucanas insolúveis em água fria nesta fração, porém provavelmente contaminadas com polissacarídeos da fração solúvel em água fria.

As frações obtidas no primeiro passo do congelamento-degelo foram submetidas ao processo de purificação descrito em Materiais e Métodos, item 3.1.3.1. Este procedimento foi essencial para obtenção de glucanas purificadas: o conteúdo percentual de glucose, que variou de 20 a 63% no Precipitado I (Esquema I, p. 53), aumentou até 98,9% nas frações puras (Precipitado III, Esquema I).

O conteúdo de glucose para cada uma das espécies acima citadas foi: *Cladonia clathrata*: 97,9%; *C. connexa*: 95,0%; *C. crispatula*: 98,9%; *C. furcata*: 96,5%; *C. ibitipocae*: 94,8%; *C. imperialis*: 97,0%; *C. miniata*: 95,0%; *C. penicillata*: 96,5% *C. salmonea*: 93,0% e *C. signata*: 98,6%.

Deve ser notado que, devido ao baixo rendimento dessa fração, e acrescentando o fato de que parte do material de algumas espécies foi perdido durante as tentativas de suas purificações, não foi possível obter o material purificado de todas as espécies em estudo. Assim, os líquens que não tiveram a fração Precipitado III totalmente caracterizada foram *Cladonia substellata* e *Cladia aggregata*.

O perfil de eluição das glucanas estudadas em coluna de Sepharose CL-4B, das dez espécies, exibiu apenas um pico nos cromatogramas, comportando-se como homogêneas no experimento realizado, embora todos tenham apresentado pequena polidispersidade na sua massa molecular. Também pelo emprego de filtração em gel, realizou-se a determinação da massa molecular com o uso da mesma coluna, a qual variou de $5,4 \times 10^4$ a $7,6 \times 10^4$. Ainda com relação à pureza das glucanas, apenas pequenas diferenças em suas porcentagens de manose, galactose e glucose foram encontradas, mas os sinais dos possíveis contaminantes não foram detectados quando analisados por RMN ^{13}C , os quais se mostraram idênticos (Figura 2).

O assinalamento de cada ^{13}C das α -D-glucanas (1 \rightarrow 3)- (1 \rightarrow 4), no total de 12 sinais, que indicam uma cadeia com dois tipos de unidade ou ligação, foi possível levando-se em consideração a intensidade relativa dos picos, e foi confirmado pela observação dos espectros de RMN ^{13}C de outras D-glucanas (YOKOTA *et al.*, 1979). Quando integrados, os dois sinais anoméricos de C-1 e C-1' [ligação (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) respectivamente] em δ 99,2 e 100,1, demonstraram a proporção de 1,00: 1,16. A fim de estabelecer os deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H para todas as espécies em estudo, técnicas de RMN 1D e 2D (COSY, TOCSY e HMQC) foram utilizadas. Os experimentos bidimensionais foram realizados para *C. penicillata* (resultados na Tabela 3, p. 65) e, como as demais glucanas apresentaram espectros unidimensionais de RMN ^{13}C e ^1H idênticos, ou seja, mostraram os mesmos deslocamentos químicos, podem ser consideradas moléculas iguais. A integração das áreas correspondentes ao H-1 forneceu a proporção de ligações (1 \rightarrow 3)- (1 \rightarrow 4), uma vez que não há sobreposição de sinais

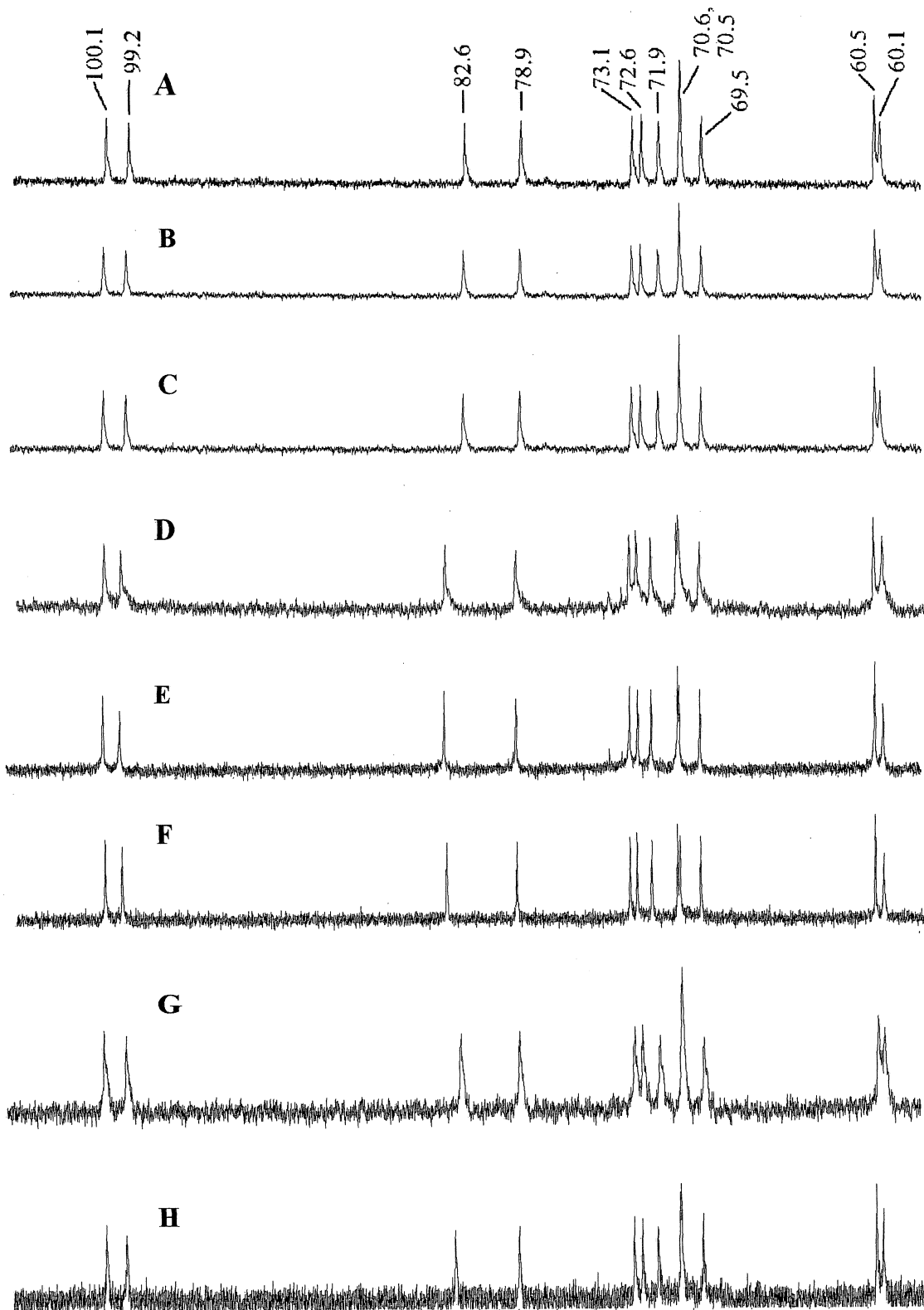


FIGURA 2 - Espectro de RMN ^{13}C em $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$ a 70°C (deslocamentos químicos em δ , ppm) de α -glucanas obtidas de *C. penicillata* (A), *C. crispatula* (B), *C. clathrata* (C), *C. ibitipocae* (D), *C. furcata* (E) *C. signata* (F), *C. imperialis* = *C. miniata* (G) e *C. connexa* = *C. salmonea* (H).

nesta região. Os valores encontrados para cada glucana foram: *C. penicillata*: 1,00: 1,00; *C. furcata*: 1,00: 1,04; *C. signata*: 1,00: 1,08; *C. imperialis*: 1,00: 1,01; *C. crispatula*: 1,00: 1,03; *C. ibitipocae*: 1,00: 1,10; *C. connexa*: 1,00: 1,05; *C. clathrata*: 1,00: 1,03.

Além disso, a proporção de derivados *O*-metilaldose obtidos da glucana de *C. penicillata*, correspondendo respectivamente às ligações (1→3) e (1→4), ou seja, 2,4,6-tri-*O*-metilglucose e 2,3,6-tri-*O*-metilglucose, foi 1:1, o que está de acordo com os resultados observados nas análises de RMN ^1H para cada espécie.

A análise do espectro de RMN ^1H de *C. penicillata* mostrou os sinais da glucana com dois sinais anoméricos em campo baixo (Figura 3), indicando uma possível ligação α .

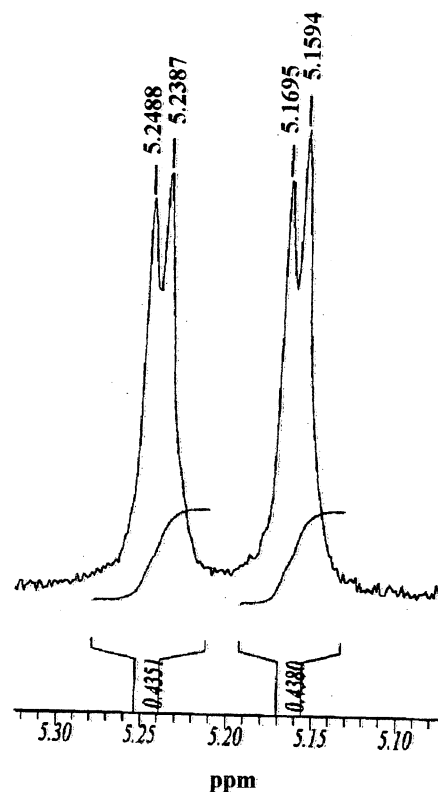


FIGURA 3 - Integração da região de H-1 do espectro de RMN ^1H da α -glucana isolada de *C. penicillata* em $\text{D}_2\text{O} + \text{NaOH}$ 3%, a 30° C. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm.

Os sinais em δ 82,8 e em 78,9 sugerem ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) respectivamente. Na análise do DEPT, os sinais correspondentes a CH₂ apareceram invertidos e com deslocamentos químicos em δ 60,1 e 60,5 para C-6 [α -(1 \rightarrow 3)] e C-6' [α -(1 \rightarrow 4)] respectivamente, o que demonstra não haver substituição em C-6.

No experimento COSY (Figura 4) foi possível identificar os H-2 e H-3 de cada unidade: o sinal de H-1 (δ 5,14) correlacionou com δ 3,48 (H-2), e este com δ 3,70 (H-3). Este deslocamento foi confirmado por correlação com o sinal em δ 82,6 (HMQC, Figura 5), típico de α -glucose ligada (1 \rightarrow 3). A correlação de H-3 e H-4 no espectro de COSY forneceu o valor de δ 3,52. Ainda para as unidades ligadas (1 \rightarrow 3), o deslocamento em δ 60,1 de C-6 mostrou correlação com o sinal em δ 3,76 (H-6) no HMQC. A partir desta informação, H-5 (δ 4,03) e H-4 (δ 3,52, confirmando correlação entre H-3 e H-4), assim como C-5 (δ 70,5) e C-4 (δ 69,5) foram obtidos.

O sinal em δ 5,23 (H-1') possui correlação com δ 3,55 (H-2') e este, por sua vez, com δ 3,73 (H-3'). Pelo experimento de HMQC (Figura 5) foi possível identificar os demais prótons das duas diferentes unidades de glucose: para a unidade substituída em C-4', o respectivo H-4' foi facilmente obtido por correlação com o sinal em δ 78,9, característico de glucose ligada (1 \rightarrow 4), que forneceu o valor de δ 3,57. Assim, voltando aos experimentos homo- e heteronucleares COSY e HMQC, obteve-se os valores de H-5' (δ 3,88) e C-5' (δ 73,1). Finalmente, C-6' (δ 60,5) mostrou correlação com H-6' em δ 3,63.

A configuração α sugerida pelos experimentos de RMN destas moléculas foi confirmada por suas rotações específicas altamente positivas (entre 126° e 152°), e similares àquelas de nigerana (GORIN *et al.*, 1993).

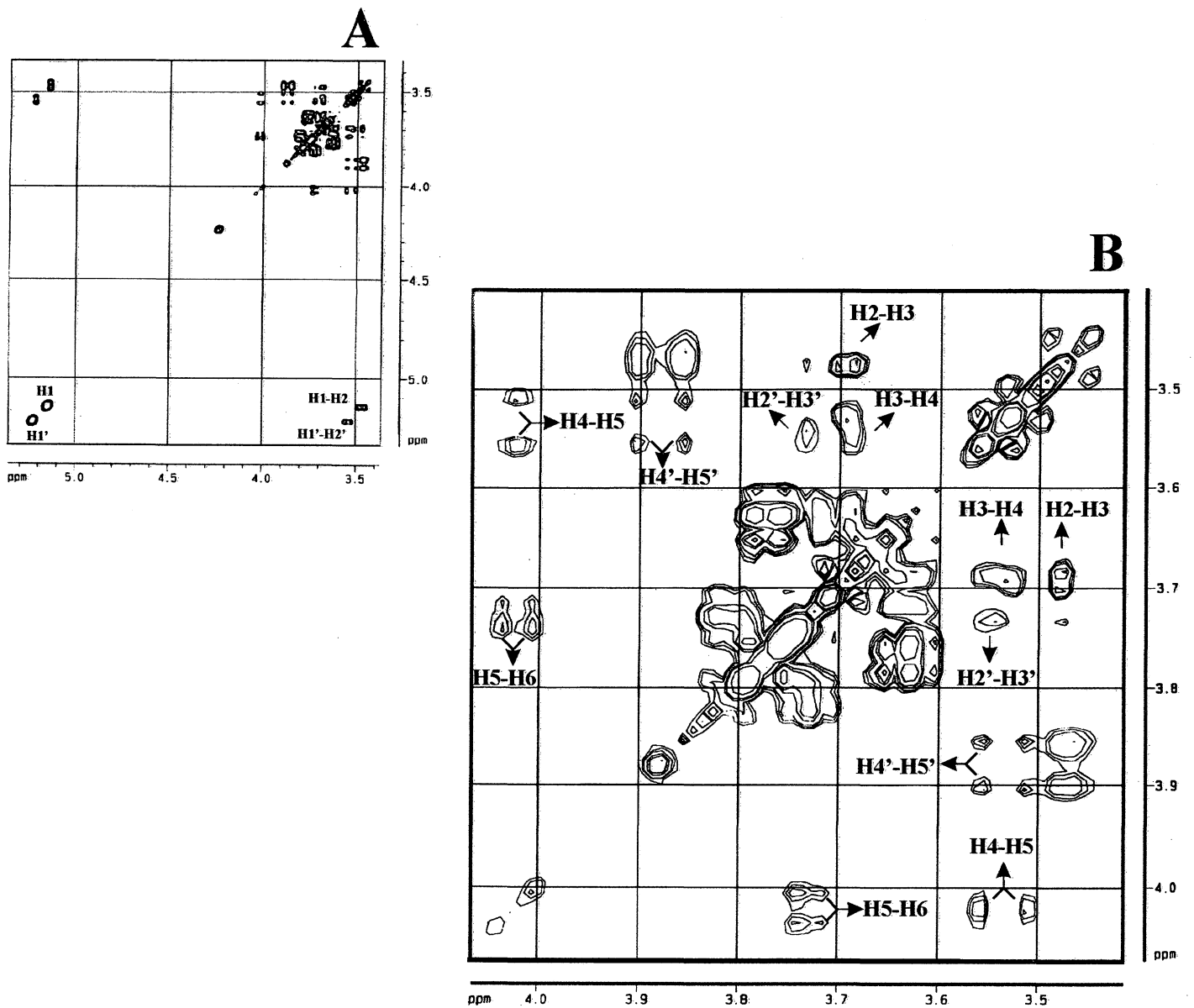


FIGURA 4 - Espectro de ^1H , ^1H COSY da α -glucana isolada de *C. penicillata* (A) em DMSO-d_6 + D_2O , a 70°C . Região expandida (B). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. H1-H2: correlação entre H-1 e H-2 das unidades ligadas (1 \rightarrow 3); H1'-H2': unidades ligadas (1 \rightarrow 4).

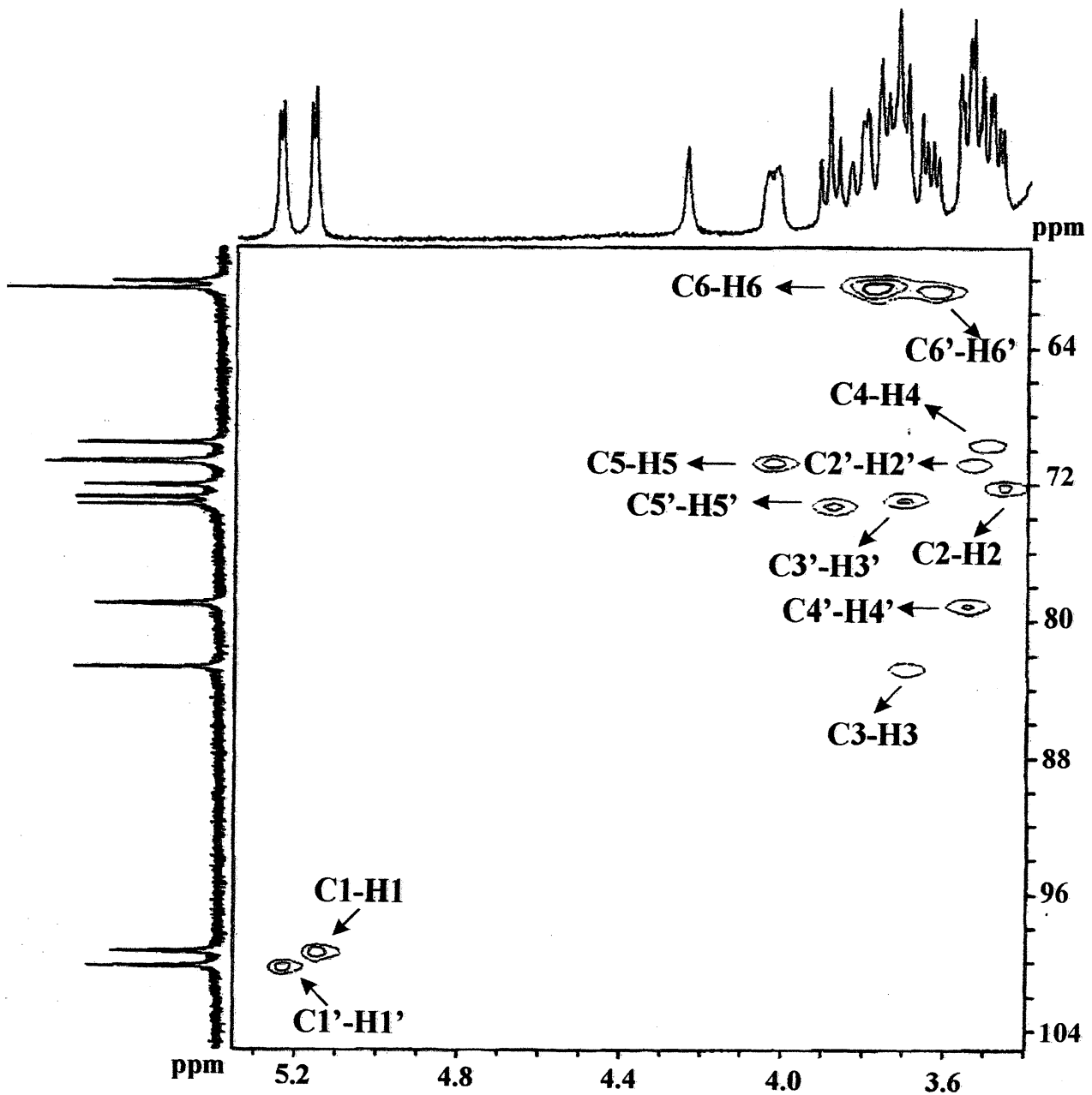


FIGURA 5 - Espectro de ^1H , ^{13}C HMQC da α -glucana isolada de *C. penicillata* em $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$, a 70°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. C1-H1: correlação entre C-1 e H-1 das unidades ligadas (1 \rightarrow 3); C1'-H1': unidades ligadas (1 \rightarrow 4).

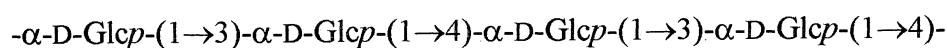
TABELA 3 - Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) obtidos da α -glucana de *C. penicillata*.

Unidades de H e C	α (1 \rightarrow 3)		α (1 \rightarrow 4)	
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
H-1/C-1	5,14	99,2	5,23	100,1
H-2/C-2	3,48	71,9	3,55	70,6
H-3/C-3	3,70	82,6	3,73	72,6
H-4/C-4	3,52	69,5	3,57	78,9
H-5/C-5	4,03	70,5	3,88	73,1
H-6/C-6	3,76	60,1	3,63	60,5

Dados obtidos dos seguintes experimentos: ^1H (amostra dissolvida em NaOD-D₂O), ^{13}C , COSY, TOCSY e HMQC (amostra dissolvida em DMSO-d₆).

A seqüência de ligações em uma glucana pode ser determinada pelo procedimento de degradação de Smith controlada (FLEMING e MANNERS, 1966a), que envolve as reações: oxidação com periodato, redução com NaBH₄ e hidrólise ácida parcial. Com a glucana isolada de *C. penicillata*, este procedimento forneceu exclusivamente 2-O- α -D-glucopiranosil-D-eritritol, detectado por CP. Isto indica que a maioria das unidades de glucose 3-O-substituídas estão situadas entre aquelas 4-O-substituídas, o que está de acordo com a estrutura proposta.

Os dados mostraram que o processo de congelamento-degelo forneceu glucanas semelhantes à nigerana (estrutura 1) em diferentes rendimentos para cada *Cladonia* sp., a qual foi encontrada também em *Cladonia crispata* e *C. squamosa* (NISHIKAWA *et al.*, 1974).



Além disso, glucanas idênticas foram obtidas pelo processo congelamento-degelo de quatro espécies de *Cladina*: *Cladina mitis*, *C. rangiferina* subsp. *grisea* (NISHIKAWA *et al.*, 1974), *Cladina stellaris* (rendimento 0,12%, como *Cladonia alpestris*) e *Cladina confusa* (rendimento 0,3%, como *Cladonia confusa*), exceto que a última apresentou a proporção de 1,13:1,00 de ligações (1→3) e (1→4) respectivamente (IACOMINI *et al.*, 1985), isto é, similar àquelas de *Cladonia* spp., indicando forte ponto de vista quimiotaxonômico para os dois gêneros.

Muitas outras glucanas isoladas pelo mesmo processo foram estudadas, mas com exceção de *Flavoparmelia caperata* (como *Parmelia caperata*, TAKEDA *et al.*, 1970), todas mostraram diferentes proporções de ligações (1→3) e (1→4), que variam entre 2:1 e 3:1 (GORIN *et al.*, 1988). Assim, sugerimos que estes valores poderiam ter valia na taxonomia de líquens. A fim de comprovar se este polissacarídeo é um *fingerprint* em *Flavoparmelia* spp., outras espécies devem ser investigadas, considerando que apenas uma delas foi estudada.

A maioria das α -D-glucanas lineares são solúveis em água fria, com exceção das nigeranas, devido à sua proporção molar relativamente alta (1:1) de ligações (1→4) [a amilose, por exemplo, com ligações exclusivas (1→4), é insolúvel em água fria]. Outras α -D-glucanas, como isoliquenanas com ligações (1→3) e (1→4) com proporções de 2:1, 3:1, 4:1 não são usualmente encontradas na fração Precipitado congelamento-degelo, mas no Sobrenadante de Fehling (GORIN *et al.*, 1993). Por outro lado, liquenanas (β -D-glucanas) são polissacarídeos insolúveis em água fria e são normalmente encontradas no processo de congelamento-degelo, o que neste caso não ocorreu.

Estudos químicos em líquens até o momento mostraram que todas as espécies do gênero *Cladonia* e *Cladina* investigadas possuem o mesmo polissacarídeo na fração Precipitado congelamento-degelo. Parece provável que a nigerana é comum a todas as espécies destes gêneros. Outras frações isoladas destes líquens serão discutidas a seguir.

4.2.2 POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO SOBRENADANTE DE FEHLING

Ao sobrenadante aquoso, resultante do fracionamento congelamento-degelo, foi adicionada a solução de Fehling, do que resultou a formação de complexo cúprico insolúvel, o precipitado de Fehling, e o sobrenadante de Fehling.

O material solúvel, correspondente ao sobrenadante de Fehling, apresentou diferentes rendimentos, como pode ser evidenciado na Tabela 4. Dentre as espécies em estudo, o líquen *C. furcata* 23007 apresentou rendimento elevado em carboidratos (4,6%) quando comparado com aqueles das demais espécies. Devido ao seu alto teor de glucose (93%) bem como da amostra 22975 (90%), provou tratar-se de uma glucana. Valores aproximados de teor de glucose foram encontrados para as isoliquenanas isoladas da fração Sobrenadante de Fehling dos líquens *Cetraria islandica* (GORIN e IACOMINI, 1984) e *Stereocaulon ramulosum* (BARON *et al.*, 1988). O espectro de RMN ^{13}C (Figura 6, p. 69) da glucana de *C. furcata* mostrou três sinais em δ 101,9, 101,2 e 100,9 para C-1 das unidades de α -D-glucopiranoose; dois sinais em δ 82,3 e 82,1 que correspondem a unidades ligadas em C-3, pois um sinal com deslocamento de δ 87,6 corresponderia a unidades β ; um sinal em δ 79,5 para C-4 substituído das unidades de glucopiranoose e um sinal em δ 62,5 correspondente aos átomos de carbono ligados a grupos hidroxil primários não-substituídos (C-6).

A atribuição de sinais apresentou similaridades aos da isoliquenana obtida de *C. islandica* e *St. ramulosum*. Essa atribuição a determinados átomos de carbono foi facilitada pela comparação dos dados de RMN ^{13}C mostrados nesses espectros, com os fornecidos para polissacarídeos de glucose lineares, constituídos por ligações α -(1 \rightarrow 3) e/ou α -(1 \rightarrow 4) (COLSON *et al.*, 1974; YOKOTA *et al.*, 1979). A ligação α foi confirmada pela sua rotação específica, 173,1°, próxima à de polissacarídeos que contêm mais ligações do tipo α do que β .

A integração das áreas da análise de RMN ^{13}C apresentou a proporção de ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) de 2:1 (estrutura **2**) (WORANOVICZ, 1995). Diferentes proporções dessas ligações

foram encontradas, como é o caso de uma α -D-glucana de *Ramalina usnea* (GORIN e IACOMINI, 1984) e *Ramalina celastri* (como *R. ecklonii*, MICENO *et al.*, 1991), solúvel em água fria, cuja proporção de ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) foi estimada em 3:1.



2

TABELA 4 - Propriedades dos polissacarídeos isolados da fração Sobrenadante de Fehling de *Cladonia* spp. e *Cladia aggregata*.

LÍQUEN	Sobrenadante de Fehling		Precipitado Cetavlon pH 8,5		
	Rendimento (g%) ^a	Man: Gal: Glc (mol%) ^b	Rendimento (g%) ^a	Man: Gal: Glc (mol%) ^b	$^{\circ}[\alpha]_D^{25}$
<i>C. clathrata</i>	1,3	43:37:17	0,9	46:41:10	+11,2°
<i>C. connexa</i>	0,7	39:46:10	0,2	47:40:11	+8,1°
<i>C. crispatula</i>	0,7	38:44:16	0,3	38:44:15	-0,7°
<i>C. furcata</i> (23007)	4,6	3:2:93	-	-	+173,1°
<i>C. furcata</i> (22975)	1,8	5:5:90	-	-	+172,9°
<i>C. ibitipocae</i>	0,8	23:27:3	0,4	40:47:10	-7,9°
<i>C. imperialis</i>	1,4	44:34:20	0,8	48:40:10	+27,6°
<i>C. miniata</i>	1,4	46:45:9	0,7	48:40:10	-3,0°
<i>C. penicillata</i>	0,6	46:49:3	0,1	39:43:16	N.D.
<i>C. salmonea</i> (29692)	2,9	37:34:20	0,5	41:47:10	N.D.
<i>C. salmonea</i> (29828)	2,8	37:34:23	0,5	41:47:10	N.D.
<i>C. signata</i>	0,4	45:34:20	0,2	48:37:13	+24,2°
<i>C. substellata</i>	0,4	35:50:9	0,1	40:49:10	-4,0°
<i>Cladia aggregata</i>	0,6	28:41:25	< 0,1	7:84:6	N.D.

^aRendimento calculado com base no peso total do líquen. ^bPor GC-MS, como acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura 40° C \rightarrow 220° C. ^cEm polarímetro Rudolph Research Autopol II.

N.D.: Não determinado devido à coloração escura das amostras

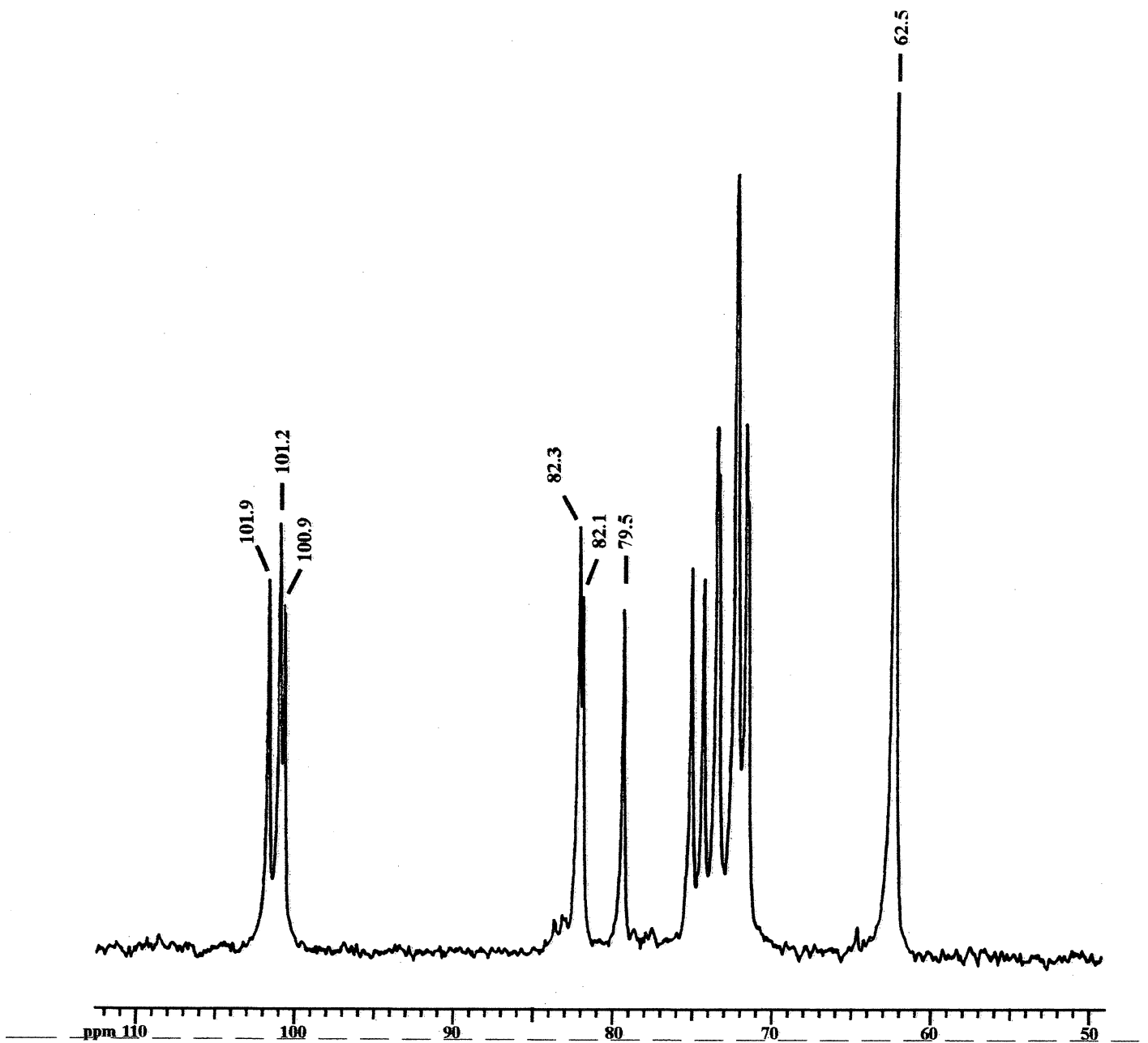


FIGURA 6 - Espectro de RMN ^{13}C da glucana obtida por extração alcalina de *Cladonia furcata*, em óxido de deutério (D_2O), a 70°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm.

Em estudo realizado com a isoliquenana de *C. islandica* (GORIN e IACOMINI, 1984) foi determinada a proporção de 1,9:1 para estas ligações. Para *St. ramulosum* (BARON *et al.*, 1988) as mesmas ligações apresentaram-se em relações molares de 1,6:1. Assim, a estrutura da isoliquenana de *C. furcata* apresentou forte semelhança com as isoladas destas espécies. Valor semelhante dessa relação molar também foi encontrada para a glucana isolada de *St. japonicum*, estimada em 2:1 (YOKOTA e SHIBATA, 1978).

O grau de pureza apresentado pela isoliquenana foi surpreendente, pois este fato não foi alcançado nas outras espécies em estudo para a mesma fração do sobrenadante de Fehling. Esta mostrou ser constituída por manose, galactose, glucose e traços de pentoses (ramnose, arabinose, xilose) em todas as espécies, com exceção de *C. ibitipocae*, que demonstrou possuir quantidade considerável das três últimas (11:22:14 respectivamente). Os rendimentos da fração Sobrenadante de Fehling foram diferentes entre os líquens: os menores valores foram encontrados para *C. signata* e *C. substellata* (0,4% em relação ao peso seco do líquen), aproximadamente dez vezes menos que o encontrado para *C. furcata* 23007. Valores diferentes também foram encontrados para espécies de *Cladina* e *Cladonia* (IACOMINI *et al.*, 1985): *Cladina stellaris* (como *Cladonia alpestris*), 1,1g%; *Cladina confusa* (como *Cladonia confusa*), 0,75g% e *Cladonia amaurocraea*, na qual nenhum polissacarídeo foi encontrado nessa fração.

A fração Sobrenadante de Fehling obtida para cada líquen foi submetida ao fracionamento com Cetavlon em diferentes pHs. A porção precipitada na presença de tampão borato (pH 8,5), denominada A, foi investigada em relação à sua composição monossacarídica (Tabela 4), que mostrou galactose, manose, além de glucose e traços de pentoses. A composição da fração A, quando comparada à do sobrenadante de Fehling original, apresentou pequenas diferenças, como a diminuição do conteúdo de glucose em alguns casos, ou aumento de manose ou galactose; no entanto os espectros de RMN ¹³C mostraram as regiões de C-1 bastante diferenciadas, indicando a importância desta etapa de fracionamento.

Os heteropolímeros originais precipitados em Cetavlon pH 8,5 foram submetidos ao teste de homogeneidade em coluna de gel permeação Sepharose CL-4B, o qual mostrou mais de um pico correspondente a carboidrato para todas as amostras (Figura 7); portanto a fração não foi considerada totalmente homogênea por este experimento.

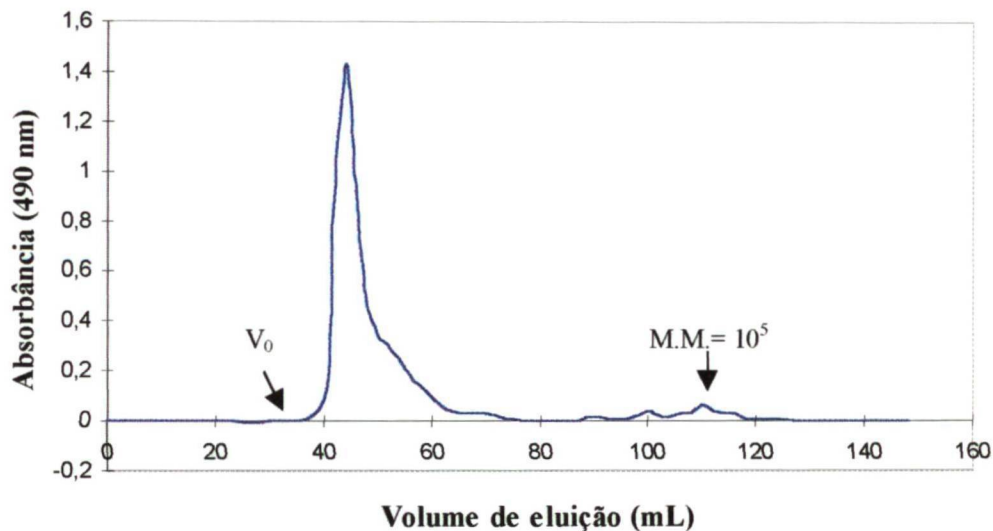


FIGURA 7 - Cromatograma da fração precipitada em pH 8,5 obtida a partir do sobrenadante de Fehling em coluna de gel Sepharose CL-4B (61,0 x 1,7 cm d.i.). A amostra é de *Cladonia crispatula*; o eluente utilizado foi água destilada e o volume das alíquotas igual a 2 mL. V_0 = volume morto.

Assim, as próximas etapas de purificação da fração Cetavlon pH 8,5 foram realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos para *Cladonia crispatula*, *C. connexa* e *C. signata*, utilizando descomplexação por gradiente de NaCl e filtração em gel (Esquema II, p. 54). Como a provável impureza mostrou possuir massa molecular em torno de 10^5 , a purificação foi realizada em coluna de Sepharose CL-6B, onde a fração principal eluiu no volume morto e o contaminante ficou retido e eluído posteriormente. Assim, a fração correspondente ao pico principal foi

coletada (Esquema II, fração C) e analisada por RMN ^{13}C , que demonstrou ser idêntica à fração A, ou seja, antes da passagem da amostra pela coluna (Figura 8.1, A e B). Uma possível explicação para este fato é a ocorrência da polidispersidade em polissacarídeos ou então a porcentagem desta impureza ser baixa, a ponto de não ser detectada pela técnica de RMN ^{13}C . Esses passos de purificação (frações A, B e C) não mostraram diferenças consideráveis na composição monossacarídica, exceto que a diminuição do teor de pentoses foi alcançada. Também pelo emprego de filtração em gel, realizou-se a determinação da massa molecular dos heteropolímeros, com o uso da coluna preparada com Sepharose CL-4B, e calibrada com a eluição de dextrans-padrão de diferentes massas moleculares. Os polissacarídeos desta fração apresentaram massa molecular média de 1,7 MDa, correspondente a $1,7 \times 10^6$.

Com o objetivo de verificar os tipos de ligações glicosídicas presentes nos heteropolissacarídeos precipitados em Cetavlon pH 8,5 e avaliar o grau de ramificação, foram realizados espectros de RMN ^{13}C para todas as espécies em estudo, além de análises de metilação e degradações de Smith. As análises de RMN ^{13}C foram realizadas para os heteropolissacarídeos preparados mediante os fracionamentos com Cetavlon e, mais especificamente para *C. crispatula*, *C. connexa* e *C. signata*, com amostra após descomplexação com gradiente de NaCl e fracionamento pela coluna de Sepharose. Como estas frações apresentaram os mesmos espectros de RMN ^{13}C e pequenas diferenças nas suas composições monossacarídicas, os polissacarídeos das outras espécies não foram purificados pelas etapas adicionais (B e C, Esquema II).

Ao contrário de *C. furcata* 23007 e 22975, que apresentaram uma isoliquenana solúvel após um único tratamento com solução de Fehling, as demais espécies de *Cladonia* mostraram polímeros com estruturas muito complexas nesta fração. Esta complexidade foi refletida nos espectros de RMN ^{13}C (Figuras 8.1 e 8.2), muito semelhantes para todas as espécies e com vários sinais na região de C-1, cada um deles representando ao menos uma estrutura diferente.

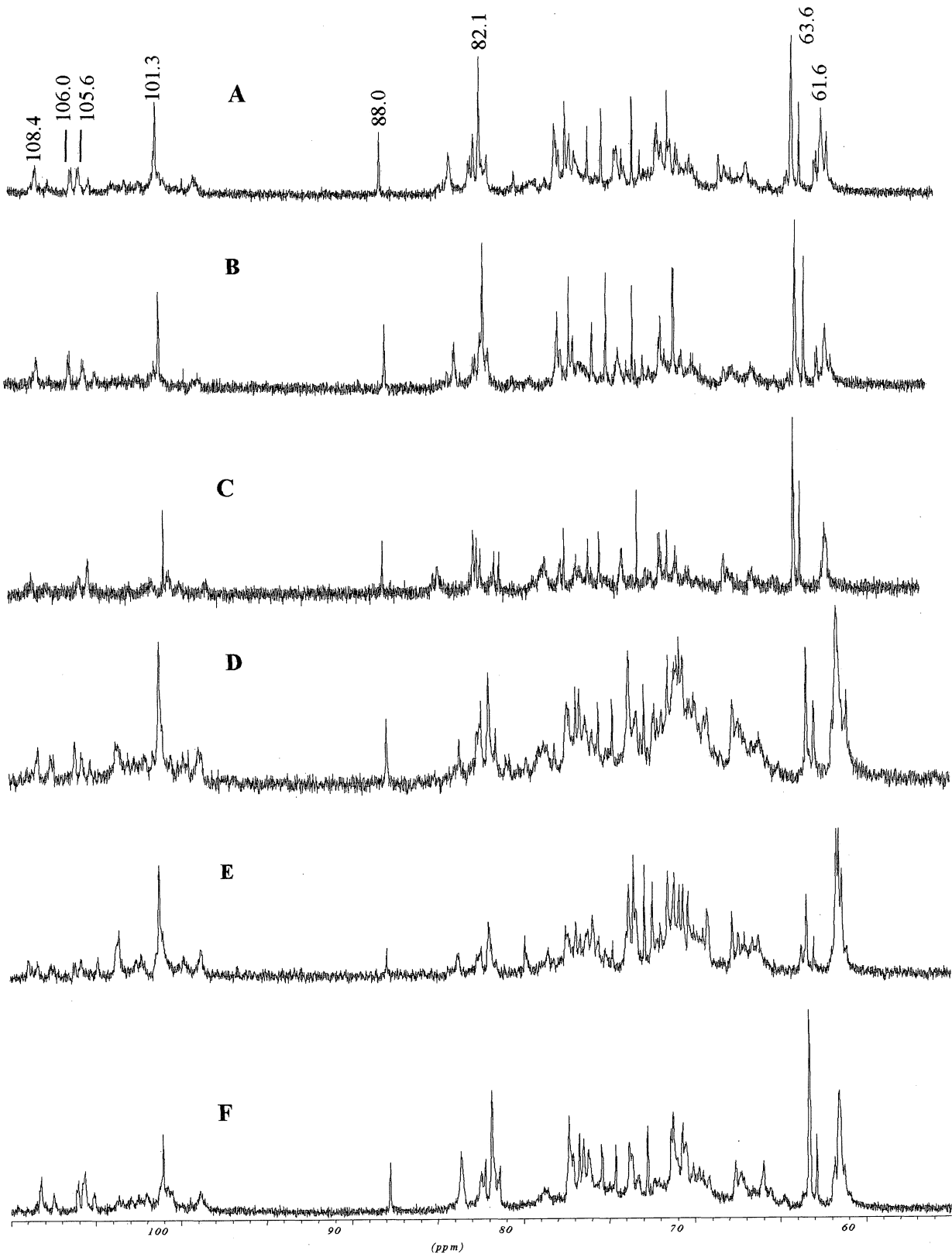


FIGURA 8.1 - Espectro de RMN ^{13}C em D_2O a 70°C (deslocamentos químicos em δ , ppm) de heteropolímeros da fração Sobrenadante de Fehling obtidos de *Cladonia crispatula* (A), *C. crispatula* fração C (B), *C. penicillata* (C), *C. signata* (D), *C. imperialis* (E), *C. miniata* (F).

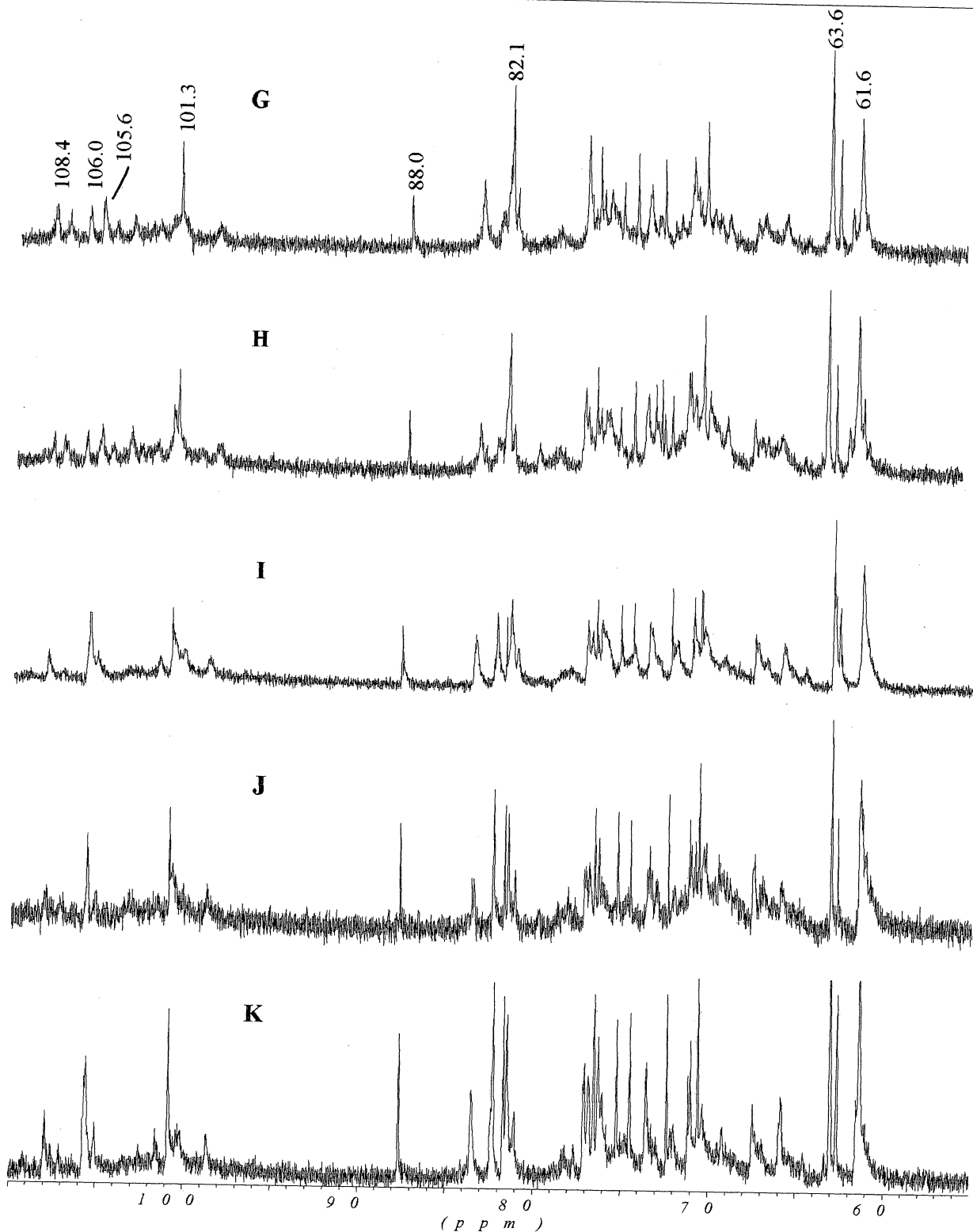
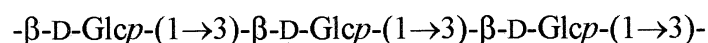


FIGURA 8.2 - Espectro de RMN ^{13}C em D_2O a 70°C (deslocamentos químicos em δ , ppm) de heteropolímeros da fração Sobrenadante de Fehling obtidos de *Cladonia salmonea* (G), *C. clathrata* (H), *C. ibitipocae* (I), *C. connexa* (J) e *C. substellata* (K).

Como pode ser observado (Figuras 8.1 e 8.2), existe forte semelhança entre os assinalamentos dos espectros, especialmente o sinal proeminente em δ 101,3 na região de C-1 e em δ 88,0, na região de C-3 substituído. Este último forneceu informação sobre a estrutura da cadeia principal dos polímeros desta fração: o sinal em δ 88,0, característico de ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3), sugeriu que se os polissacarídeos tivessem a cadeia principal composta por manose, galactose ou glucose com este tipo de ligação, produziria, após dois ciclos de degradação controlada de Smith e hidrólise ácida parcial (a fim de remover as ramificações degradadas pelo periodato de sódio), um polímero linear e com exclusiva ligação (1 \rightarrow 3). Assim, o heteropolissacarídeo original isolado de *C. miniata* foi oxidado e hidrolisado parcialmente conforme se descreve em Materiais e Métodos, o qual produziu uma fração precipitada em etanol (14,9%) composta quase exclusivamente de glucose, analisada como alditol acetato.

A análise de RMN ^{13}C mostrou 6 picos (Figura 9) em δ 103,7 (C-1), 86,6 (C-3), 76,5 (C-5), 73,9 (C-2), 68,7 (C-4) e 61,3 (C-6), correspondentes àqueles de uma β -laminarana original (BARON *et al.*, 1988), composta exclusivamente de unidades de β -D-glucose ligadas (1 \rightarrow 3) (estrutura 3). A configuração β foi confirmada pela análise de HMQC (dados não mostrados), que apontou deslocamento químico de δ 4,8 para H-1 e pela constante de acoplamento entre H-1 e H-2, que foi igual a 7,84.



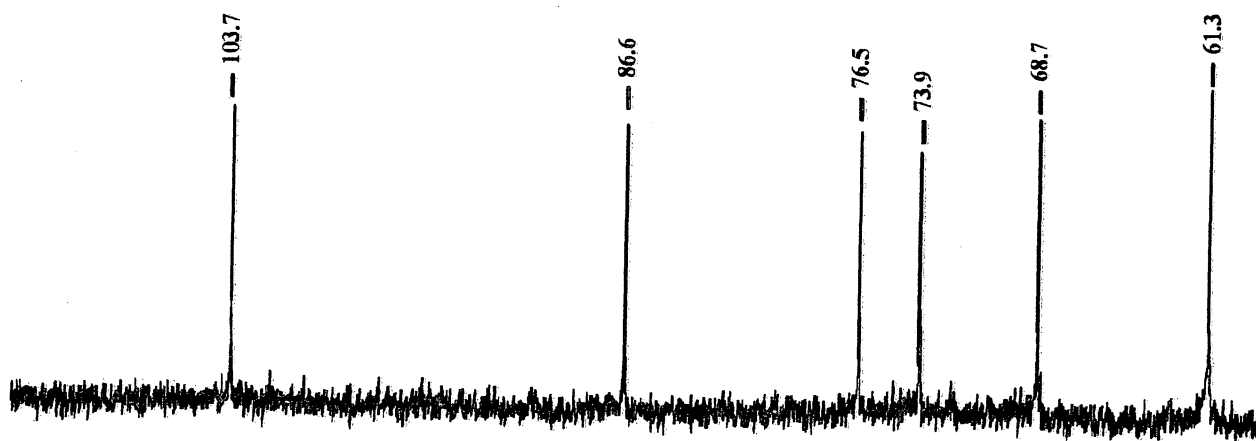


FIGURA 9 - Espectro de RMN ¹³C do polissacarídeo residual resultante da degradação de Smith parcial da galactomanoglucana de *C. miniata*, em NaOD, a 70° C. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm.

A fração sobrenadante obtida da hidrólise ácida parcial, e analisada como alditol acetato sem sofrer nenhuma outra hidrólise, apresentou como componentes glicerol (73%), eritritol (4%), treitol (10%) e outro componente desconhecido (9%), resultante provavelmente de duas unidades de monossacarídeos oxidadas pelo NaIO₄ mas não hidrolisadas. Este resultado confirma que a maioria das unidades que ramificam o polímero não são resistentes ao NaIO₄.

Além do sinal em δ 88,0, comum a todos os polissacarídeos mostrados nas Figuras 8.1 e 8.2, os espectros de RMN ¹³C mostraram na região de C-1 um sinal proeminente em δ 101,3, que pode corresponder a unidades de α -D-Man_p ligadas (1→6) (GORIN, 1973). Além deste, são observados vários sinais entre δ 108,6 e 105,0, indicativos de unidades furanosídicas e provavelmente representando unidades terminais não redutoras ligadas de diferentes maneiras à

molécula. Para a maioria das espécies em estudo, estes sinais são pequenos em relação ao mais pronunciado, em δ 101,3 porém os espectros de *C. connexa*, *C. ibitipocae* e *C. substellata* apresentaram o sinal em δ 106,0 relativamente intenso em comparação aos outros mostrados. Pelo fato destes heteropolímeros não terem sido previamente estudados, não é possível fazer a atribuição de sinais sem antes analisar os dados de metilação e degradação de Smith. Como os espectros de RMN ^{13}C se mostraram praticamente idênticos para todas as espécies, exceto os três que apresentaram o sinal em δ 106,0 relativamente proeminente na região indicativa de unidades furanosídicas, foram escolhidas duas amostras para serem realizadas as análises químicas de determinação estrutural: *C. signata*, que mostrou os sinais na região de δ 108,6-105,0 com aproximadamente a mesma intensidade, e *C. connexa*, que possui o sinal em δ 106,0 intenso, uma vez que esta é, aparentemente, a diferença considerável entre as moléculas em estudo desta fração.

4.2.2.1 Galactomanoglucana de *Cladonia connexa*

Após a determinação do rendimento deste polímero em relação ao peso total do líquen, que foi de 0,2 g%, bem como a sua composição, que foi de manose, galactose e glucose em relação molar de 47:40:11 (Tabela 4), esse polissacarídeo foi submetido à análise de RMN ^{13}C , o qual mostrou-se praticamente idêntico aos espectros da mesma fração dos outros líquens aqui mostrados. Por outro lado, esta fração possui estruturas diferentes daquelas isoladas das galactomananas (IACOMINI *et al.*, 1985; TEIXEIRA *et al.*, 1995; WORANOVICZ *et al.*, 1997) e galactoglucomananas (WORANOVICZ *et al.*, 1999) isoladas da fração Precipitado de Fehling. A análise de metilação mostrou uma estrutura complexa, com formação de 14 derivados metilados em diferentes proporções para o heteropolissacarídeo isolado de *C. connexa*. Estes dados podem ser observados na Tabela 5, com os principais acetatos de alditóis parcialmente metilados: 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-manose (6 mol%), 2,3,5,6-tetra-*O*-metil-galactose (18 mol%) e

2,3,4,6-tetra-*O*-metil-galactose (9%), que correspondem a grupos terminais não redutores de manose e galactose furanosídicos e piranosídicos respectivamente; unidades de Man α 2-*O*- (3,4,6-tri-*O*-metil manose, 15%), 4-*O*- (2,3,6- tri-*O*-metil manose, 14%), 6-*O*- (2,3,4- tri-*O*-metil manose, 4%) e 2,3-di-*O*- (4,6-di-*O*-metil manose, 8%) substituídas; e ainda, unidades de glucose substituídas em O-2 (3,4,6-tri-*O*-metilglucose, 5%) e galactose substituídas em O-6 (2,3,5-tri-*O*-metilgalactose, 6%) e O-3,6 (2,4-di-*O*-metil galactose, 4%). Além desses, o derivado 4-*O*-metil glucitol (6%), que corresponde à glucose 2,3,6-tri-*O*-substituída.

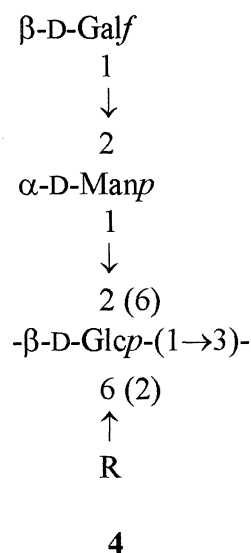
TABELA 5 - Análise por metilação de galactomanoglucanas isoladas de *Cladonia connexa* e *Cladonia signata*^a.

GALACTOMANOGLUCANAS			
<i>O</i> -METILALDITOL ^b	<i>C. connexa</i>	<i>C. signata</i>	Tipo de ligação glicosídica
2,3,4,6-Me ₄ -Man	6	5	Man α -(1→
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	18	12	Gal α -(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	9	12	Gal β -(1→
3,4,6-Me ₃ -Man	15	20	→2-Man α -(1→
3,4,6-Me ₃ -Glc	5	2	→2-Glc β -(1→
2,4,6-Me ₃ -Man	1	-	→3-Man α -(1→
2,3,6-Me ₃ -Man	14	8	→4-Man α -(1→ e/ou →5-Man α -(1→
2,3,4-Me ₃ -Man	4	7	→6-Man α -(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal	6	6	→6-Gal α -(1→
4,6-Me ₂ -Man	8	5	→2,3-Man α -(1→
2,6-Me ₂ -Gal	2	-	→3,4-Gal β -(1→ e/ou →3,5-Gal α -(1→
2,6-Me ₂ -Glc	-	3	→3,4-Glc β -(1→ e/ou →3,5-Glc α -(1→
2,3-Me ₂ -Man	2	3	→4,6-Man α -(1→ e/ou →5,6-Man α -(1→
3,4-Me ₂ -Man	-	3	→2,6-Glc β -(1→
2,3-Me ₂ -Gal	-	2	→4,6-Gal β -(1→ e/ou →5,6-Gal α -(1→
2,4-Me ₂ -Gal	4	2	→3,6-Gal β -(1→
4-Me-Glc	6	8	→2,3,6-Glc β -(1→

^aProporção (%) da área do pico relativa à área total dos picos.

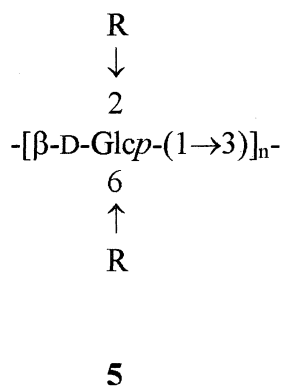
^bAnalisado como peracetato.

A alta porcentagem de unidades terminais não redutoras de galactofuranose (18%) mantém coerência com a análise de RMN ^{13}C do polissacarídeo (ver Figura 8.2), que mostrou sinais em campo baixo na região de C-1 entre δ 108,6 e 106,3, indicativos de β -D-configuração de Gal f (GORIN *et al.*, 1981). Estas unidades contribuem para a baixa rotação específica de + 8,1, próxima de um polissacarídeo que contém mais ligações do tipo β que α em comparação com os polímeros precipitados com solução de Fehling (WORANOVICZ *et al.*, 1997, 1999); contudo unidades de α -D-manopiranosose parecem estar presentes em considerável proporção nesta fração, uma vez que o espectro de RMN ^{13}C mostrou na região de C-1 um sinal proeminente em δ 101,3, típico de unidades substituídas de α -D-manopiranosose (GORIN e MAZUREK, 1982). Como os dados de metilação mostraram elevada porcentagem de unidades de Man p 2- O -substituídas (15%), Gal f terminal não redutora (18%) e Glc p 2,3,6-tri- O -substituída (6%), a qual corresponde à cadeia principal, o polissacarídeo pode apresentar o fragmento estrutural 4:

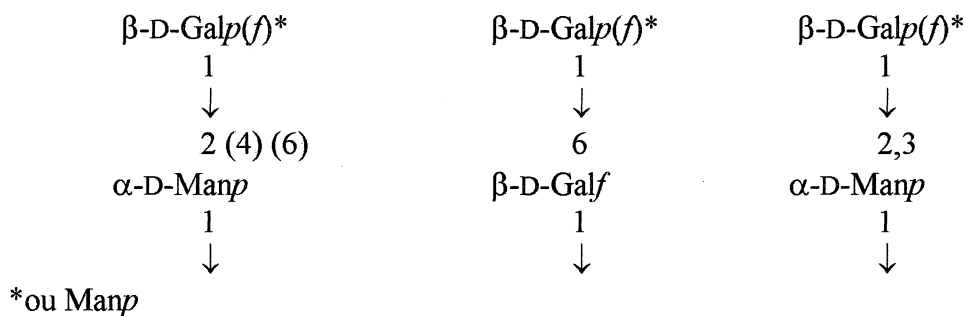


R= Man p mono- (2- O -, 4- O - ou 6- O -) ou disubstituída (2,3-di- O -); ou Gal f monosubstituída (6- O -); ou Gal p disubstituída (3,6-di- O -).

Em resumo, o heteropolímero possui cadeia principal composta por unidade de β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3) com ramificações em O-2 e O-6. Além da estrutura 4, outros fragmentos podem ser sugeridos, uma vez que vários pontos de ramificação podem ser apresentados pelos dados de metilação (estrutura 5).



Onde R pode se representado por diferentes unidades ramificadoras:



Para caracterização mais completa da estrutura dessa galactomanoglucana, ainda resta dúvida sobre a forma como as unidades ramificadoras estão ligadas à cadeia principal do polímero. Para isto, resultados relativos à acetólise parcial, enzimólise e hidrólise ácida parcial devem ser realizados; porém pelos resultados realizados, podemos concluir que a cadeia principal desses polímeros consiste em unidades de β -D-glucopiranosose (1 \rightarrow 3) substituídos em O-2 e O-6 sob diferentes modelos por unidades de D-manopiranosose e D-galactopiranosose substituídas

e ainda unidades de D-galactofuranose terminal não redutora principalmente, diferentes daqueles encontrados em outros gêneros estudados (IACOMINI *et al.*, 1985).

4.2.2.2 Galactomanoglucana de *Cladonia signata*

A espécie *C. signata*, como pode ser observado na Tabela 4 (p. 68), apresentou rendimento de heteropolissacarídeo de 0,2 g% em relação ao peso do líquen seco. A análise de sua composição em monossacarídeos, após as etapas de purificação, mostrou a presença de manose, galactose e glucose em relação molar de 48:37:13 e rotação específica de +24,2°, menor que a encontrada para as galactoglucomanas em estudo. A análise do polímero por coluna de permeação em gel indicou que ele é homogêneo nesse experimento, com massa molecular aproximada de $1,7 \times 10^6$, como para a galactomanoglucana de *C. connexa*.

A análise de metilação mostrou, como para o polímero de *C. connexa*, uma estrutura complexa com formação de 15 derivados *O*-metilados em diferentes proporções. Essa complexidade foi refletida no seu espectro de RMN ^{13}C , o qual contém muitos sinais na região de C-1, cada qual representando pelo menos uma estrutura diferente. Na Tabela 5 (p. 78), onde são apresentados os dados relativos às análises de metilação, podemos observar para o polissacarídeo de *C. signata* os seguintes acetatos de alditóis parcialmente metilados: 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-manose (5 mol%), 2,3,5,6-tetra-*O*-metil-galactose (12 mol%), 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-galactose (12 mol%), correspondentes a grupos terminais não redutores; 3,4,6-tri-*O*-metil-manose (20 mol%), 2,3,6-tri-*O*-metil-manose e 2,3,4-tri-*O*-metil-manose (8 e 7 mol%), referentes a unidades de manose mono substituídas, e 4,6-di-*O*-metil-manose (5 mol%) que correspondem à manose dissustituída. Unidades de Galf substituídas em O-6 (2,3,5-tri-*O*-metil-galactose, 6 mol%) também estão presentes. Pequena proporção dos derivados 2,6-di-*O*-metil-glucose, 2,3-di-*O*- e 3,4-di-*O*-metil-manose (3 mol% de cada) podem representar pontos de

ramificação na molécula. O derivado 4-*O*-mono-metil-glucose (8 mol%) sugere que a cadeia principal do polímero, ligada (1→3), seja substituída em O-2,6.

Esse polímero, quando analisado por RMN ^{13}C , mostrou sinais em campo baixo na região de C-1 entre δ 108,6 e 106,3 (ver Figura 8.1), indicativos de β -configuração de *Gal*f (GORIN *et al.*, 1981). Essas unidades contribuem para a rotação específica relativamente baixa de + 24,2°, mais próximo de um polissacarídeo semelhante que contém mais unidades β -D do que α -D, em comparação com os polímeros precipitados com solução de Fehling; contudo unidades de α -D-*Man*p parecem estar presentes em proporção considerável nessa fração, uma vez que o espectro de RMN ^{13}C contém na região de C-1 um sinal proeminente em δ 101,3, típico de unidades de α -D-*Man*p substituídas (GORIN e MAZUREK, 1982). Os dados de metilação mostraram alta porcentagem de unidades de *Man*p 2-*O*-substituída (3,4,6 tri-*O*-metil-manose, 20 mol%), o que sugere que a estrutura 4 (p. 79) também está presente nesse polímero. Os dados de metilação sugerem unidades de *Man*p substituídas em O-2 por unidades de β -D-*Gal*f ou β -D-*Gal*p. As unidades de manose devem estar ligadas à cadeia principal de glucose nas posições O-2,6, uma vez que 4-*O*-metilglucitol foi o principal derivado de glucose encontrado na análise de metilação. Derivados di-*O*- e tri-*O*-metil-manose indicam que *Man*p também pode estar substituída nas posições O-4, O-6 e O-2,3 especialmente por unidades terminais não redutoras de *Gal*f e *Gal*p (estrutura 5, p. 80).

A presença de 2,3,5-tri-*O*-metilgalactitol sugere a presença de unidades *Gal*f substituídas em O-6 e podem representar unidades de ramificação da cadeia principal de glucose. Além disso, vários picos na região em δ 108,6-106,3 na região de C-1 de seu espectro de RMN ^{13}C e a alta proporção de unidades terminais não redutoras de galactofuranose também indicam que elas podem estar em diferentes ambientes, especialmente substituindo manose nas posições O-2, O-4 e O-6. O sinal em δ 106,0, menos intenso do que no polímero isolado de *C. connexa*, pode ser explicado pela proporção mais baixa de unidades terminais não redutoras de *Gal*f (representadas

pelo derivado 2,3,5,6-tetra-*O*-metil-galactose em *C. signata*, 12 mol%) em comparação com aquela (18 mol%).

Com base nesses dados não é possível propor a estrutura completa para a galactomanoglucana; porém a cadeia principal consiste em unidades de β -D-Glcp ligadas (1 \rightarrow 3) substituída em vários padrões por cadeias laterais, especialmente aquelas de β -D-Galf, β -D-Galp e unidades de α -D-Manp substituídas em O-2, O-4, O-6 e O-2,3.

Este tipo de heteropolímero não foi descrito até a presente data em fungos liquenizados. A única citação de uma galactomanoglucana em literatura provém de um estudo de polissacarídeos de parede celular no fungo *Gliocladium viride* (GÓMEZ-MIRANDA *et al.*, 1990), onde foram identificadas três galactomanoglucanas com pequenas diferenças em suas composições químicas. As análises de metilação e degradação de Smith sugeriram que as cadeias principais de dois desses polímeros são constituídas por glucose ligadas (1 \rightarrow 6), com ramificações em O-2 e O-3. Manp e Galp ocorrem como unidades terminais não redutoras, além de Galf-(1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 2).

4.2.2.3 Polissacarídeo de *Cladia aggregata*

O polissacarídeo obtido de *Cladia aggregata* no sobrenadante de Fehling foi isolado com rendimento menor que 0,1%, o que, considerando a quantidade inicial de material (45,4 g), dificultou a análise estrutural desta fração; porém é diferente da fração correspondente isolada de *Cladonia* spp., como pode ser visto pelo seu conteúdo de galactose (84%, Tabela 4) e pelo espectro de RMN ^{13}C (Figura 10). Este mostrou a região de C-1 mais simples que a dos polímeros de *Cladonia* spp. estudados (com exceção de *C. furcata*, *ver* Figuras 6, 8.1 e 8.2), com três picos principais em δ 103,1, 101,6 e 99,8. O pico em δ 88,0, característico de C-3 substituído, também não está presente. A relação manose:galactose:glucose (7:84:6) desta fração é semelhante à encontrada para *Cladina confusa* (IACOMINI *et al.*, 1985), igual a 4:86:10

respectivamente, mas o espectro de RMN ^{13}C desta mostrou-se distinto, com picos principais em δ 108,8 e 102,2. Também este polímero não teve sua estrutura esclarecida devido à escassez de material, contudo os autores sugeriram a presença de unidades de β -D-galactofuranosil na molécula, uma vez que sinais de C-1 estão presentes em campo baixo (δ 107,0-111,0), o que não ocorreu em *Cladia aggregata*.

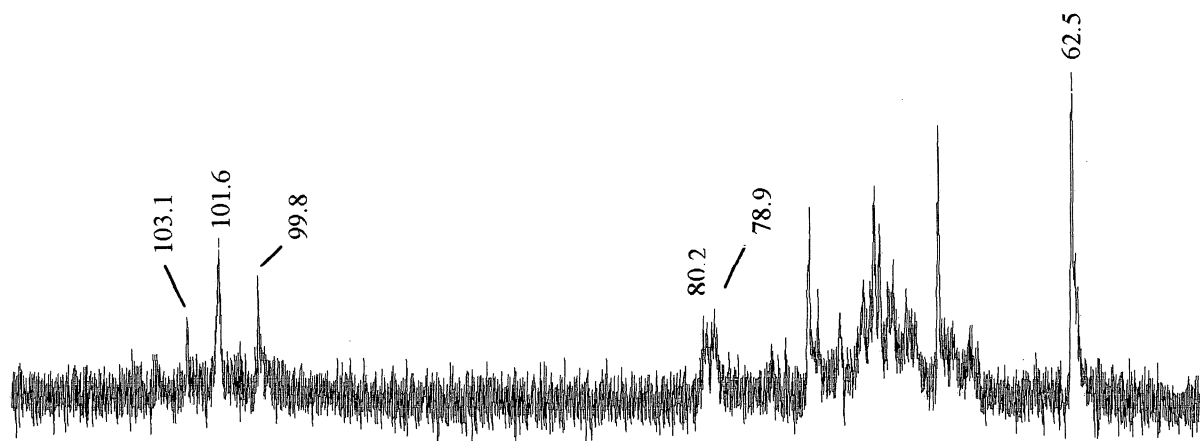


FIGURA 10 - Espectro de RMN ^{13}C da fração Sobrenadante de Fehling de *Cladia aggregata* em D_2O , a 70°C . Deslocamentos químicos expressos em δ , ppm.

Em contraste com as galactomanoglucanas da fração Sobrenadante de Fehling aqui investigadas em *Cladonia*, *Cladina stellaris* (como *Cladonia alpestris*) e *Cladina confusa* (como *Cladonia confusa*) (IACOMINI *et al.*, 1985) mostraram diferentes estruturas na mesma fração de acordo com RMN ^{13}C (Figuras 11 e 12) e análise de metilação. Apesar de algumas similaridades evidentes, como unidades terminais não redutoras de β -D-Galp, as estruturas das cadeias principais são distintas da β -D-glucana ligada (1 \rightarrow 3) aqui estabelecida. Os autores sugeriram que o heteropolímero de *C. stellaris* possui unidades consecutivas de α -D-Manp-(1 \rightarrow 2), que provavelmente correspondem à cadeia principal, substituídas em O-6 por β -D-Galf. Quanto ao polissacarídeo de *C. confusa*, possivelmente se trata de uma D-galactana com unidades pirano- e

furanosil. Deve ser notado que nenhum polissacarídeo foi encontrado no sobrenadante de Fehling em *Cladonia amaurocraea*, a qual também não apresentou nigerana como polissacarídeo insolúvel em água fria, mas sim pustulana.

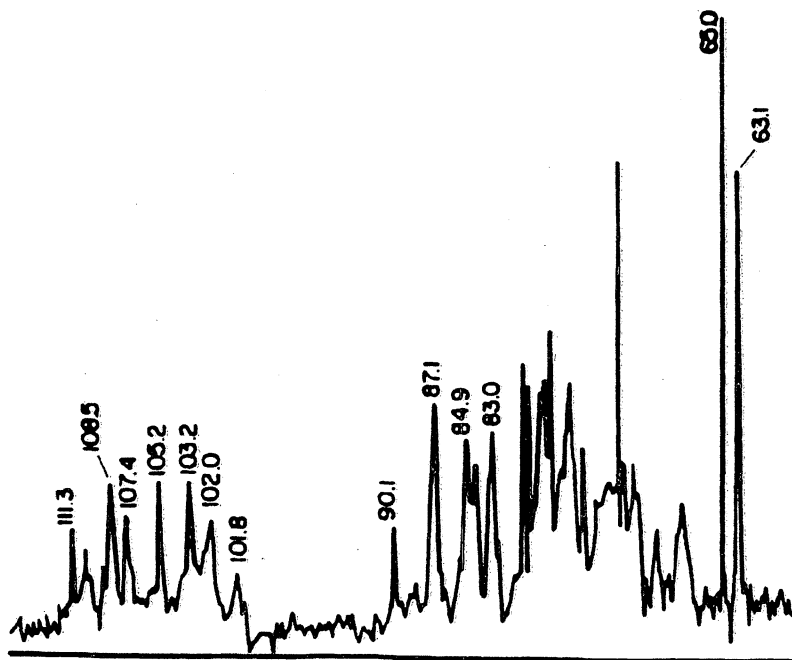


FIGURA 11 - Espectro de RMN ¹³C do sobrenadante de Fehling de *Cladina stellaris* (IACOMINI *et al.*, 1985), em D₂O, a 70° C. Deslocamentos químicos expressos em δ, ppm.

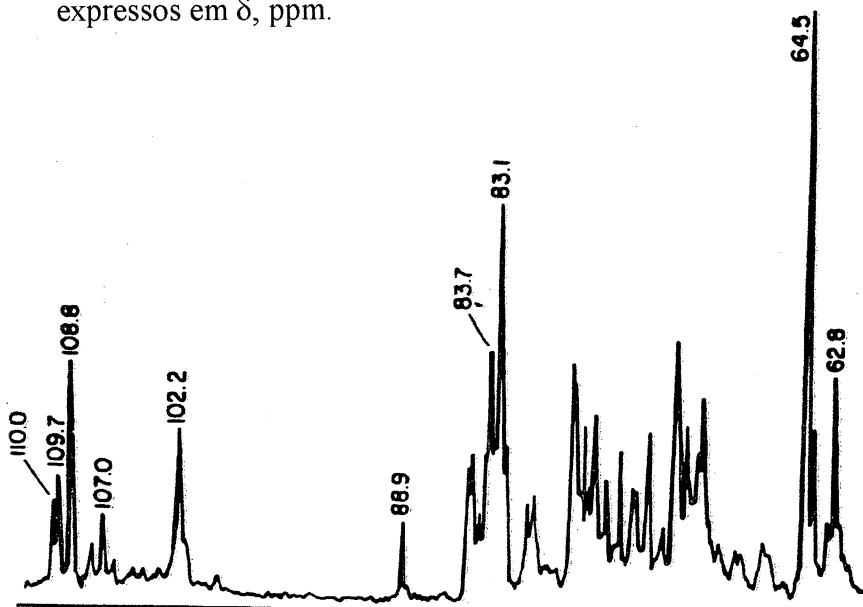


FIGURA 12 - Espectro de RMN ¹³C do sobrenadante de Fehling de *Cladina confusa* (IACOMINI *et al.*, 1985), em D₂O, a 70° C. Deslocamentos químicos expressos em δ, ppm.

Enquanto as nigeranas aparentemente representam uma estrutura comum nos gêneros *Cladonia* e *Cladina*, os polissacarídeos isolados da fração Sobrenadante de Fehling podem ajudar a caracterizar os membros do gênero *Cladonia*.

4.2.3 POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO PRECIPITADO DE FEHLING

O material complexado por solução de Fehling das espécies em estudo apresentou diferentes rendimentos nesta etapa, que variou de 0,8 a 8,6 g% em relação ao peso do líquen seco, como se observa na Tabela 6. Para o conhecimento dos componentes monossacarídicos dessas frações isoladas, os polissacarídeos foram hidrolisados por 8 horas como se descreve em Materiais e Métodos, de acordo com a curva de hidrólise previamente estabelecida (WORANOVICZ, 1995). Todos os polímeros em estudo apresentaram manose, galactose e glucose, com pequenas diferenças entre eles. O perfil de eluição dos polissacarídeos estudados nas frações do Precipitado de Fehling em coluna de Sepharose CL-4B exibiu apenas um pico nos cromatogramas, comportando-se como homogêneas no experimento realizado. Esses polímeros foram então denominados galactoglucomananos.

Em estudo anterior com essa fração (WORANOVICZ, 1995), foi verificado que uma etapa adicional de fracionamento com sal de Cetavlon não é necessária, uma vez que ambas as frações, Precipitado de Fehling e posterior Precipitado de Cetavlon pH 8,5 apresentaram as mesmas características de homogeneidade durante o processo de filtração em gel, espectros de RMN ^{13}C praticamente idênticos e pequenas diferenças nas suas composições monossacarídicas.

Com o objetivo de verificar os tipos de ligações glicosídicas presentes nos polissacarídeos e avaliar o grau de ramificação, foram realizados espectros de RMN ^{13}C , além de análises de metilação e degradação tipo Smith, como veremos a seguir. Posteriormente, a fim de determinar mais especificamente as diferenças e semelhanças entre os polissacarídeos do

Precipitado de Fehling, foram produzidos e estudados alguns oligossacarídeos que representam segmentos estruturais dessas moléculas.

TABELA 6 - Propriedades dos heteropolissacarídeos isolados da fração Precipitado de Fehling de *Cladonia* spp e *Cladia aggregata*.

LÍQUEN	PRECIPITADO DE FEHLING		
	Rendimento (g%) ^a	Man: Gal: Glc (mol%) ^b	$^{\circ}[\alpha]_D^{20}$
<i>C. clathrata</i>	1,0	55:34:10	+62,2°
<i>C. connexa</i>	3,0	55:38:5	+64,5°
<i>C. crispatula</i>	1,3	63:29:7	+43,7°
<i>C. furcata</i> (23007) ¹	1,3	55:42:3	+63,5°
<i>C. furcata</i> (22975)	0,8	54:43:3	+61,4°
<i>C. ibitipocae</i>	8,6	60:35:2	+51,6°
<i>C. imperialis</i>	1,0	54:40:6	+72,8°
<i>C. miniata</i>	7,0	65:21:12	+51,5°
<i>C. penicillata</i>	0,8	60:38:2	+68,8°
<i>C. salmonea</i> (29692)	5,6	62:28:10	N.D.
<i>C. salmonea</i> (29828)	3,4	62:28:10	N.D.
<i>C. signata</i> ¹	1,2	57:39:4	+87,9°
<i>C. substellata</i>	2,7	59:27:12	+63,1°
<i>Cladia aggregata</i> ¹	2,0	50:42:4	+84,7°

^aRendimento calculado com base no peso total do líquen. ^bPor GC-MS, como acetatos de alditóis, coluna OV-225, temperatura 40° C→220° C. ^cEm polarímetro Rudolph Research Autopol II.

¹: Dados obtidos da tese de Mestrado da autora.

N.D.: Não determinado devido à coloração escura das amostras.

4.2.3.1 Galactoglucomanana de *Cladonia substellata*

O heteropolissacarídeo obtido da precipitação com solução de Fehling contém galactose, manose e glucose em proporção molar de 27:59:12, e a cromatografia em coluna de gel Sepharose CL-4B indicou a homogeneidade do material com M_w igual a $1,8 \times 10^6$.

A análise de metilação mostrou uma estrutura complexa, com formação de 12 derivados metilados em proporções significativas, o que indicou uma estrutura similar àquelas isoladas de outros heteropolímeros isolados de líquens do gênero *Cladonia* (IACOMINI *et al.*, 1985; WORANOVICZ *et al.*, 1997). Esta complexidade foi refletida no seu espectro de RMN ^{13}C , que contém muitos sinais na região de C-1 (Figura 13.1). Esses correspondem, de acordo com os dados de metilação (Tabela 7, p. 92), a unidades terminais não redutoras de manopirranose (18%), galactopirranose (11%) e glucopirranose (9%), cuja porcentagem total corresponde à cadeia principal de manopirranose, que contém unidades 2-*O*- (3%), 4-*O*- (7%), 6-*O*- (2%), 4,6-di-*O*- (9%), 2,6-di-*O*- (5%) e 2,4,6-tri-*O*- (15%) substituídas. Unidades de galactopirranose 3-*O*- (9%) e 4-*O*-substituídas (4%) também se mostraram presentes, além de glucopirranose 4-*O*-substituída (4%).

Essas estruturas e proporções concordaram com os dados obtidos na degradação de Smith do polissacarídeo (Tabela 8, p. 93), que mostrou grande conteúdo de glicerol, 33%, porém mais baixo do que o obtido em outras espécies do gênero *Cladonia* (IACOMINI *et al.*, 1985; WORANOVICZ *et al.*, 1997). Este componente foi obtido principalmente de unidades terminais não redutoras de Man α p, Gal α p e Glc α p, mas também de unidades de Man α p substituídas em O-6 e O-2,6. A alta porcentagem de eritritol liberada neste caso proveio de unidades de Man α p e Glc α p substituídas em O-4 (16%), enquanto a proporção mais baixa de treitol (3%) foi formada de unidades de Gal α p similarmente substituídas. A detecção de manitol (22%) confere com a presença de unidades de Man α p 2,4,6-tri-*O*-substituídas (15%). O alto conteúdo de galactitol (20%) também é coerente com as unidades de Gal α p substituídas em O-3 e resistentes ao periodato de sódio.

O espectro de RMN ^{13}C da galactoglucomanana mostrou sinais em C-1 (Figura 13.1) que indicaram uma estrutura ramificada, com grupos terminais não redutores de β -D-Gal α p (δ 104,7)

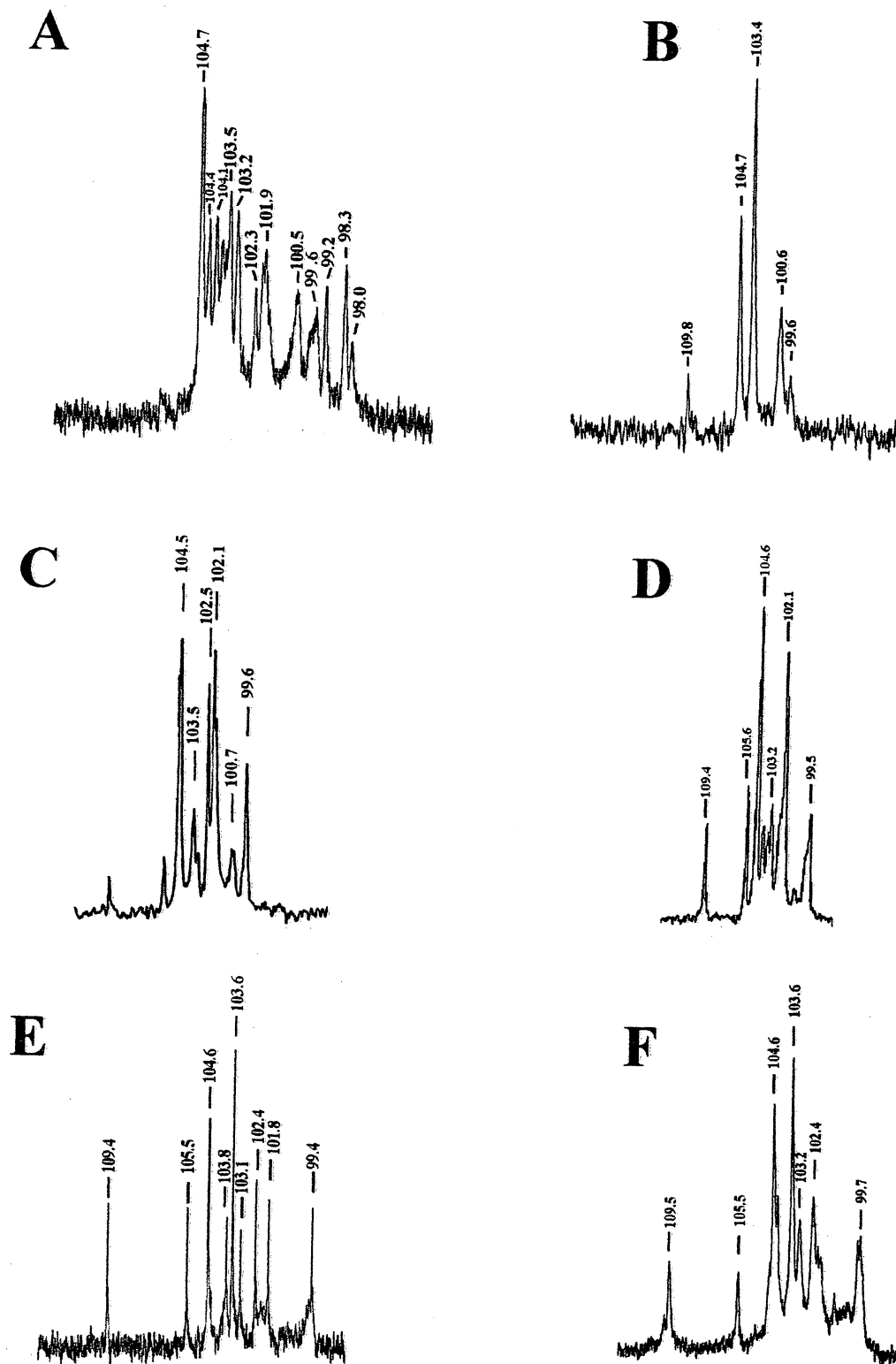


FIGURA 13.1 - Região de C-1 de RMN ^{13}C em D_2O a 70°C (deslocamentos químicos em δ , ppm) de heteropolímeros da fração Precipitado de Fehling obtidos de *Cladonia substellata* (A), *C. ibitipocae* (B), *C. penicillata* (C), *C. crispatula* (D), *C. miniata* (E) e *C. salmonea* (F).

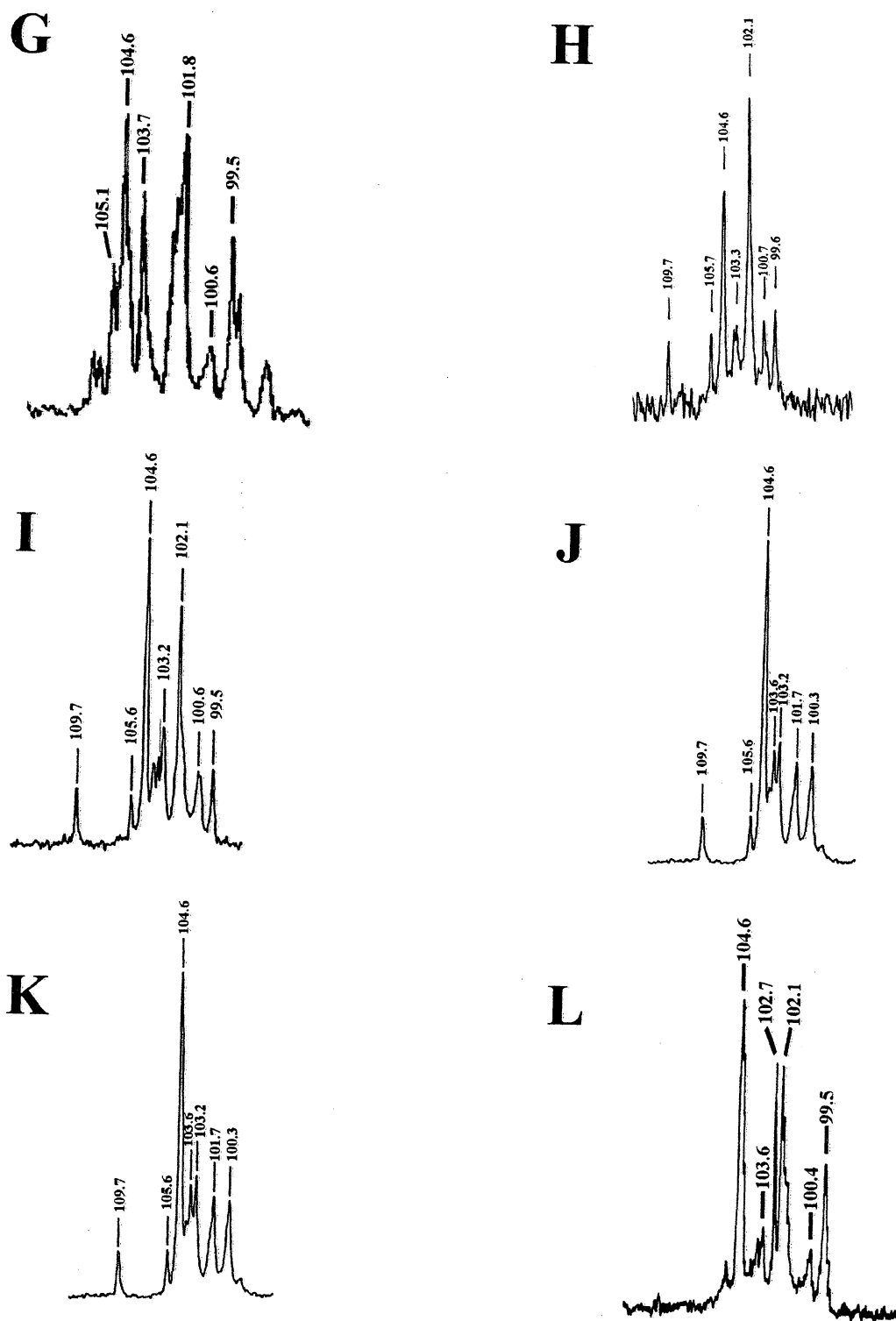


FIGURA 13.2 - Região de C-1 de RMN ^{13}C em D_2O a 70°C (deslocamentos químicos em δ , ppm) de heteropolímeros da fração Precipitado de Fehling obtidos de *Cladonia connexa* (G), *C. imperialis* (H), *C. clathrata* (I), *C. furcata* 22975 (J), *C. furcata* 23007 (K) (WORANOVICZ *et al.*, 1997) e *C. signata* (L) (WORANOVICZ *et al.*, 1997).

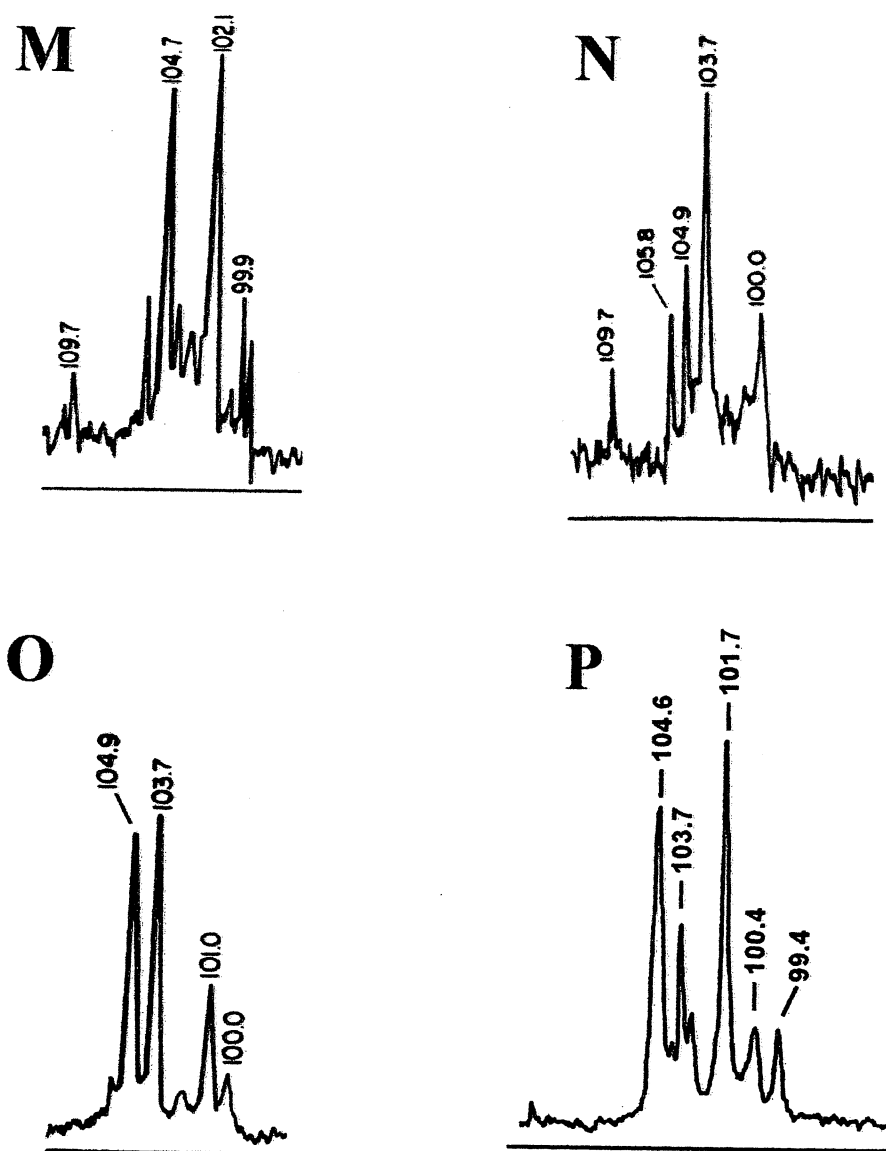


FIGURA 13.3 - Região de C-1 de RMN ^{13}C em D_2O a 70°C (deslocamentos químicos em δ , ppm) de heteropolímeros da fração Precipitado de Fehling obtidos de *Cladonia amaurocraea* (M), *Cladonia stellaris* (N), *Cladonia confusa* (O) (IACOMINI *et al.*, 1985) e *Cladonia aggregata* (P) (WORANOVICZ, 1995).

TABELA 7 - Análise por metilação de polissacarídeos (Precipitado de Fehling) isolados dos líquens.

O-metilalditol ^b	Heteropolissacarídeos (mol%) ^a											
	<i>C. clathrata</i>	<i>C. connexa</i>	<i>C. crispatula</i>	<i>C. furcata</i>	<i>C. ibitipocae</i>	<i>C. imperialis</i>	<i>C. miniata</i>	<i>C. penicillata</i>	<i>C. salmonea</i>	<i>C. signata</i>	<i>C. substellata</i>	<i>C. aggregata</i>
2,3,4,6-Me ₄ -Man	10	16	5	16	25	14	18	10	15	10	18	8
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	-	-	10	-	2	-	8	-	3	-	9	-
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	3	2	4	3	5	4	4	3	4	-	-	-
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	20	17	17	40	19	22	13	30	16	32	11	42
3,4,6-Me ₃ -Man	4	3	5	-	-	12	1	12	1	10	3	-
2,4,6-Me ₃ -Glc	6	-	5	-	-	-	4	-	7	4	-	-
2,3,6-Me ₃ -Man	-	-	2	-	-	-	2	3	3	-	7	-
2,4,6-Me ₃ -Gal	-	5	-	-	-	-	-	-	4	-	9	1
2,3,4-Me ₃ -Man	16	12	6	3	7	4	3	5	14	18	2	8
2,3,6-Me ₃ -Gal	-	11	13	-	-	4	13	7	-	-	4	-
2,3,6-Me ₃ -Glc	-	5	-	-	-	-	3	1	-	-	4	-
2,3,4-Me ₃ -Gal	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3-Me ₂ -Man	17	7	8	19	3	11	6	8	15	7	9	16
3,4-Me ₂ -Man	6	2	4	1	7	4	4	3	5	4	5	3
3-Me-Man	15	15	16	18	27	22	17	15	12	16	15	22

^a Proporção (%) da área do pico relativa à área total dos picos.

^b Analisado como peracetato.

C. furcata n° 22975 e 23007 (WORANOVICZ, 1995) apresentaram resultados idênticos na análise de metilação.

Resultados referentes à *Cladonia signata* e *Cladia aggregata* foram obtidos da tese de Mestrado da autora.

TABELA 8 - Análise por degradação de Smith de polissacarídeos (Precipitado de Fehling) isolados dos líquens.

Alditóis Acetatos	Heteropolissacarídeos ^a (mol%) ^b											
	<i>C. clathrata</i>	<i>C. connexa</i>	<i>C. crispatula</i>	<i>C. furcata</i>	<i>C. ibitipocae</i>	<i>C. imperialis</i>	<i>C. miniata</i>	<i>C. penicillata</i>	<i>C. salmonea</i>	<i>C. signata</i>	<i>C. substellata</i>	<i>C. aggregata</i>
Glicerol	61	50	42	60	44	57	56	62	64	69	33	52
Eritritol	12	9	13	16	4	10	14	10	11	7	16	17
Treitol	2	10	9	2	2	4	7	5	4	2	3	6
Manitol	20	20	30	20	44	27	19	20	16	20	22	23
Galactitol	2	10	1	1	3	1	2	1	-	1	20	1
Glucitol	3	1	5	1	-	1	2	2	1	1	2	1

^a Proporção (%) da área do pico relativa à área total dos picos.

^b Por GC-MS, como acetatos de alditóis.

C. furcata n° 22975 e 23007 (WORANOVICZ, 1995) apresentaram resultados idênticos na análise de degradação de Smith.

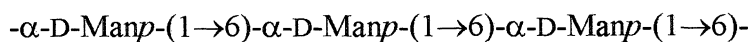
Resultados referentes à *Cladonia signata* e *Cladia aggregata* foram obtidos da tese de Mestrado da autora.

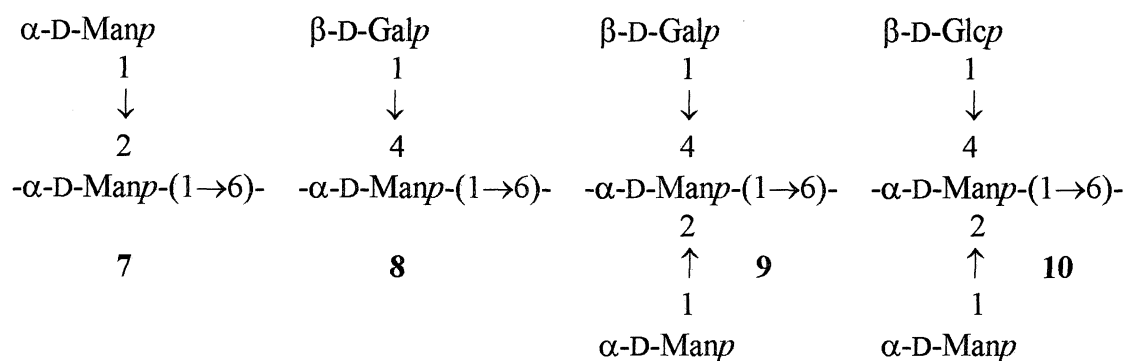
ligados (1→4) (GORIN e MAZUREK, 1975) e de α -D-Manp (δ 103,5) ligados (1→2) a unidades de α -D-Manp (IACOMINI *et al.*, 1985). Além destes, sinais em δ 100,5 e 99,6, indicando, respectivamente, unidades de Manp da cadeia principal 6-O- (GORIN, 1981) e 2,6-di-O-substituídas (GORIN e MAZUREK, 1982).

Sua rotação específica (+63°) foi diminuída em relação àquela de um polímero composto por unidades de α -D-Manp (+89°), devido à presença de unidades de β -D-Galp (HAWORTH *et al.*, 1937).

Do ponto de vista quimiotaxonômico, existem similaridades entre a galactoglucomanana isolada de *C. substellata* e as isoladas das outras espécies em estudo, apesar de que a primeira seja provavelmente a mais complexa, como pode ser evidenciado pelos dados de RMN ^{13}C (Figuras 13.1, 13.2, 13.3). Como as demais, ela é composta por cadeia principal de unidades de α -D-Manp ligadas (1→6) (estrutura 6) substituída principalmente em O-2 por unidades de α -D-Manp (estrutura 7; sinal em δ 103,5) e em O-4 por unidades de β -D-Galp (estrutura 8; sinal em δ 104,7). A possibilidade de unidades de α -D-Galp ligadas (1→2) à cadeia principal existe em virtude do sinal em δ 102,3 (GORIN e MAZUREK, 1982). A presença de dissubstituintes em O-2,4 na galactoglucomanana de *C. substellata* foi mostrada pela análise de metilação (15%, Tabela 7) e degradação de Smith (22%, Tabela 8).

Esses valores são altos quando comparados com o conteúdo de glucose do polímero (12%), o que sugere a presença de substituintes em O-2 e O-4 de unidades de α -D-Manp e β -D-Galp respectivamente (estrutura 9), bem como de α -D-Manp e β -D-Glcp (estrutura 10).





A acetólise parcial deste polímero forneceu mais informações da estrutura fina dessa molécula, como pode ser observado no item 4.2.4.

4.2.3.2 Galactoglucomanana de *Cladonia ibitipocae*

O polissacarídeo precipitado com solução de Fehling mostrou galactose, manose e glucose em proporção molar de 35:60:2; a eluição em coluna de gel Sepharose CL-4B indicou uma preparação homogênea com M_w igual a $2,0 \times 10^6$.

A análise de metilação mostrou a presença de unidades terminais não redutoras de Manp (25%), Galp (19%), Galf (5%) e Glcp (2%). Além destas, unidades de Manp 6-O- (7%), 4,6-di-O- (3%), 2,6-di-O- (7%) e 2,4,6-tri-O-substituídas (27%) correspondentes à cadeia principal (Tabela 7). A análise de degradação de Smith da galactoglucomanana mostrou principalmente glicerol (44%) proveniente das unidades terminais não redutoras e manitol (44%), coerente com esses dados.

O espectro de RMN ^{13}C mostrou sinais na região de C-1 (Figura 13.1) em δ 99,6, 100,6, 103,4 e 104,7, também observados no polissacarídeo isolado de *C. substellata*, porém menos complexo. Um sinal de baixa intensidade em δ 109,8 foi atribuído a unidades de β -D-Galf, o que indica que estas unidades podem estar ligadas às de α -D-Manp ligadas (1→6) (GORIN *et al.*, 1981).

A rotação específica de $+52^\circ$ é consistente com a mistura de estruturas α -D-Manp e β -D-Galp. A galactoglucomanana de *C. ibitipocae*, como os outros heteropolímeros da fração Precipitado de Fehling isolados de outras espécies de *Cladonia*, possui cadeia principal composta por unidades de α -D-Manp ligadas (1 \rightarrow 6) e substituídas em diversos padrões em O-2 (7), O-4 (8) e O-2,4 (9 e 10). A presença deste foi confirmada por estudos de metilação (27%, Tabela 7) e degradação de Smith (44%, Tabela 8). Igualmente para a galactoglucomanana isolada de *C. substellata*, estes valores são altos quando comparados com o conteúdo de glucose (2%) do polissacarídeo, o que confirma a presença de dissubstituintes na cadeia principal de manose. O sinal intenso em δ 103,4 sugere a presença de unidades de α -D-Manp ligadas à cadeia principal (IACOMINI *et al.*, 1985).

Os dados de metilação e RMN ^{13}C da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* sugerem uma estrutura menos complexa do que os outros polímeros precipitados com solução de Fehling descritos em literatura (IACOMINI *et al.*, 1985; WORANOVICZ *et al.*, 1997) e os do presente trabalho, embora existam estruturas em comum. Oligossacarídeos produzidos por acetólise parcial a partir desse polímero auxiliaram no estudo comparativo das espécies aqui apresentadas (item 4.2.4).

4.2.3.3 Galactoglucomanana de *Cladonia penicillata*

Na Tabela 6, onde são mostrados os rendimentos e composições dos heteropolissacarídeos, o líquen *Cladonia penicillata* apresentou rendimento de 0,8 g% em relação ao peso do líquen seco; a análise da composição mostrou a presença de manose, galactose e glucose em relação molar de 60:38:2. Após a determinação da homogeneidade por meio do experimento realizado por filtração em gel, esse polímero foi submetido à análise de RMN ^{13}C (Figura 13.1), e demonstrou sinais na região de C-1 semelhantes aos de galactomananas isoladas de líquens (BARON *et al.*, 1989; GORIN e IACOMINI, 1984, 1985) já

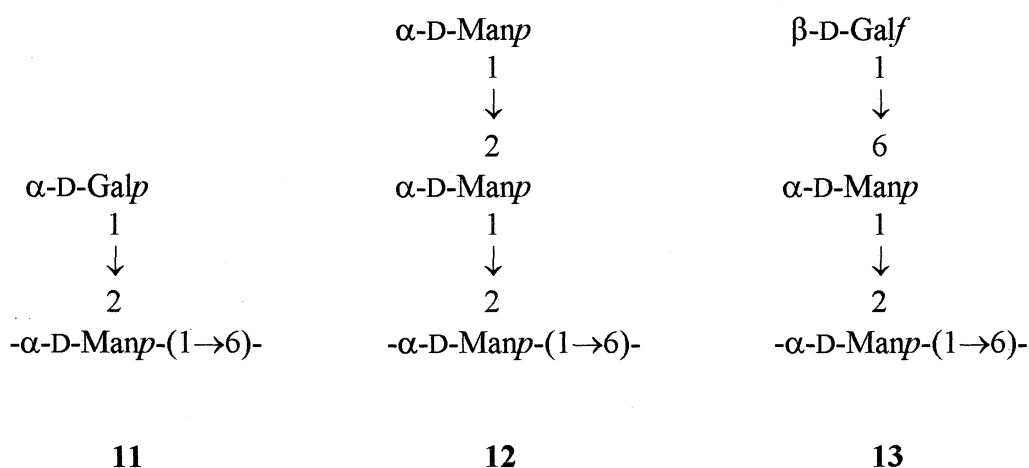
estudadas. Nesse espectro pode-se observar sinais proeminentes em δ 104,5, 102,5 e 102,1, que indicam, respectivamente, unidades de extremidades não-redutoras de β -D-Galp ligadas (1 \rightarrow 4) à α -D-Manp 6-O substituída (GORIN e MAZUREK, 1975; HALL e JOHNSON, 1969), unidades terminais não redutoras de α -D-Galp ligadas (1 \rightarrow 2) à cadeia principal de α -D-Manp (1 \rightarrow 6) e unidades internas da cadeia lateral de α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp (GORIN e MAZUREK, 1982). O sinal intenso em δ 104,5 foi confirmado pelo sinal em δ 76,9 na região de C-5, ao passo que o sinal em δ 102,1 foi confirmado pelo sinal em δ 80,9 na região de C-2. Outros sinais menos intensos foram observados na região de C-1 em δ 103,5, 100,7 e 99,6, que podem corresponder, respectivamente, a unidades de α -D-Manp ligadas (1 \rightarrow 2) a unidades de α -D-Manp (IACOMINI *et al.*, 1985), unidades de α -D-Manp ligadas por (1 \rightarrow 6) (GORIN, 1981) e unidades de Manp 2,6-di-O-substituídas (GORIN e MAZUREK, 1982); o sinal em δ 100,7 foi confirmado pelo sinal em δ 80,0 na região de C-2, correspondente à unidade de manopiranosose 6-O-substituída (GORIN e MAZUREK, 1982).

Os dados de análise de metilação desse polímero podem ser observados na Tabela 7, com os seguintes acetatos de alditóis parcialmente metilados: 2,3,4,6-tetra-O-metil-manose (10 mol%); 2,3,5,6-tetra-O-metil-galactose (3 mol%); 2,3,4,6-tetra-O-metil-galactose (30 mol%), que correspondem a grupos terminais não redutores; unidades de Manp 2-O- (3,4,6-tri-O-metil-manose, 12 mol%), Manp 4-O- (2,3,6-tri-O-metil-manose, 3 mol%), Manp 6-O-substituídas (2,3,4-tri-O-metil-manose, 5 mol%), e ainda unidades de Manp 4,6-di-O- (2,3-di-O-metil-manose, 8 mol%), 2,6-di-O- (3,4-di-O-metil-manose, 3 mol%) e 2,4,6-tri-O- (3-O-metil-manose, 15 mol%) substituídas. Além desses, o derivado 2,3,6-tri-O-metil-galactitol (7 mol%), que corresponde à galactose 4-O-substituída.

A alta porcentagem de unidades terminais não redutoras de galactopiranosose (30 mol%) condiz com a análise de RMN ¹³C do polissacarídeo (Figura 13.1), que mostrou sinais de β

e α galactose por meio dos sinais em δ 104,5 e 102,5 respectivamente, e que correspondem aos fragmentos estruturais **8** e **11**.

Outro sinal característico de *C. penicillata* em δ 102,1, correspondente a α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2), também se apresenta de acordo com o derivado 3,4,6-tri-*O*-metilmanose, que corresponde a unidades de Manp 2-*O*-substituídas, como se observa na estrutura **12**.



Os valores de porcentagem molar encontrados para cada derivado confirmam a relação manose:galactose:glucose anteriormente obtida por análise dos monossacarídeos como acetatos de alditóis, a qual apresentou, como pode ser observado na Tabela 6, os valores de 60:38:2 respectivamente.

A oxidação com periodato de sódio seguida pela degradação de Smith é um dos métodos que auxiliam na elucidação da estrutura química de polissacarídeos. A galactomanana de *C. penicillata*, quando submetida a esses tratamentos, originou como produtos finais (Tabela 8), glicerol (62 mol%), eritritol (10 mol%), treitol (5 mol%), manitol (20 mol%) e traços de das galactitol e glucitol (1 e 2 mol% respectivamente). Assim, esses resultados indicaram que 20%

unidades de manopiranoose, presumivelmente presentes na cadeia principal da molécula do heteropolissacarídeo, seriam tri-*O*-substituídas em O-2,4,6, o que tornaria estas unidades de manose resistentes à oxidação pelo periodato e, por conseguinte, seriam recuperadas na forma de manitol, e 10% das unidades substituídas em O-4,6, responsáveis pela produção de eritritol. Esses dados estão de acordo com os de metilação, em que se encontrou 15 mol% do derivado 3-*O*-metil-manose e 8 mol% do derivado 2,3-di-*O*-metil-manose. Além disto, 5% das unidades de galactopiranoose seriam substituídas em O-4; daí o aparecimento de treitol, e do respectivo derivado metilado 2,3,6-tri-*O*-metil-galactose (7 mol%), indicando, em conjunto com os dados de metilação, que a maioria das unidades de galactose presentes nesse polímero são terminais não redutoras. Os 62% remanescentes surgiram do restante da molécula, ou seja, das unidades terminais não redutoras de manose e galactose, bem como das unidades de manopiranoose substituídas em O-2, O-6 e O-2,6.

A rotação específica dos polissacarídeos estudados depende das proporções relativas de ligações α -D e β -D. Assim, a rotação óptica específica desses polímeros é determinada pelas ligações β das unidades de galactose e α das unidades de manose e galactose, ou seja, o fator determinante da rotação óptica é o número de unidades D-galactose que substituem a cadeia principal de manana. A rotação específica encontrada para o heteropolímero de *Cladonia penicillata*, como pode ser observado na Tabela 6, $+68,8^\circ$, sugere que unidades α e β estão presentes na estrutura do polissacarídeo. Tal configuração foi confirmada pela análise do espectro de RMN ^{13}C dessa molécula (Figura 13.1), que mostrou forte sinal para C-1 em δ 104,5 característico de unidades de β -D-galactopiranoose ligadas a α -D-manopiranoose, como pode ser evidenciado no fragmento estrutural **8**.

Deste modo, com os dados relacionados anteriormente (WORANOVICZ *et al.*, 1997), ficou demonstrado que a galactoglucomanana existente na fração Precipitado de Fehling

apresentou, na cadeia principal, unidades de α -D-manopiranosose unidas por ligação (1 \rightarrow 6), como se apresenta na estrutura 6.

Essas unidades, de acordo com os resultados de metilação e de degradação de Smith, eram não substituídas (~5%, segundo metilação; estrutura 6), 4-*O*- (~10%, segundo degradação tipo Smith; estrutura 8), 2,4-di-*O*- (~20%, conforme degradação tipo Smith, 15% conforme metilação; estruturas 9 e 10) e 2-*O*- (~4%, segundo metilação; estruturas 7 e 11) substituídas por unidades terminais não redutoras de manopiranosose e galactopiranosose principalmente. Deve ser ainda observado que parte da ramificação da cadeia principal de α -D-manopiranosose é do tipo α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2), correspondente ao derivado 3,4,6-tri-*O*-metil-manose (~12%, segundo metilação; estrutura 12).

Pode-se, desta forma, concluir que a cadeia principal desses polímeros consiste em unidades de α -D-manopiranosose (1 \rightarrow 6) substituídas em O-2 e/ou O-4 sob diferentes modelos por grupos α -D-manopiranosil e β -D-galactopiranosil principalmente, como os encontrados na maioria dos líquens estudados pelo grupo (IACOMINI *et al.*, 1985; TEIXEIRA *et al.*, 1995; WORANOVICZ *et al.*, 1997; WORANOVICZ *et al.*, 1999).

Para caracterização mais completa da estrutura dessa galactoglucomanana, a acetólise parcial foi realizada (ver item 4.2.4), cujos resultados confirmaram a presença de alguns fragmentos estruturais discutidos.

4.2.3.4 Galactoglucomanana de *Cladonia crispatula*

O espectro de RMN ^{13}C do polissacarídeo isolado de *C. crispatula* via precipitação com Fehling (Figura 13.1, p. 89) apresentou sinais intensos em δ 104,6 (unidades terminais não redutoras de β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 4)- α -D-manopiranosose; GORIN e IACOMINI, 1985) e 102,1 (unidades internas da cadeia lateral de α -D-manopiranosose-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosose;

GORIN e MAZUREK, 1982). Sinais adicionais em δ 99,5, 105,6 e 109,4 correspondem, respectivamente, a unidades de α -D-manopiranosose 2,6-di-*O*-substituída (GORIN e MAZUREK, 1982), sendo o segundo de origem desconhecida, e unidades de β -D-galactofuranose (GORIN *et al.*, 1981), provavelmente representando unidades terminais não redutoras ligadas por (1 \rightarrow 6) à manopiranosose (estrutura 13, p. 98). Sinais com esses deslocamentos químicos ocorrem em heteropolissacarídeos de outros líquens (IACOMINI *et al.*, 1985; TEIXEIRA *et al.*, 1995; WORANOVICZ *et al.*, 1997), sugerindo estruturas similares.

Na análise de metilação, esta fração apresentou 12 acetatos de alditóis parcialmente metilados (Tabela 7, p. 92) em quantidades significantes, também indicando similaridades com os heteropolímeros isolados de outros líquens do gênero *Cladonia*. De acordo com esta análise, o polissacarídeo é ramificado com unidades terminais não redutoras de Manp (5%), Glcp (10%), Galp (17%) e ainda Galf (4%). Além dessas, unidades de Manp 2-*O*- (5%), 4-*O*- (2%) e 6-*O*-substituídas (6%), Glcp 3-*O*- (5%) e Galp 4-*O*- e/ou Galf 5-*O*-substituídas (13%). Unidades de Manp, que servem como pontos de ramificação, correspondem à cadeia principal de α -D-Manp-(1 \rightarrow 6) substituída em O-4,6 (8%), O-2,6 (4%) e O-2,4,6 (16%).

Esse polissacarídeo, quando submetido à degradação de Smith, apresentou, como se mostra na Tabela 8, p. 93, os seguintes produtos: glicerol (42%), eritritol (13%), treitol (9%), manitol (30%), glucitol (5%) e galactitol (1%). Deste modo, os resultados indicaram que 30% das unidades de Manp, possivelmente presentes na cadeia principal da molécula, eram substituídas em O-2,4,6, tornando essas unidades resistentes à oxidação. Tal resultado não estava de acordo com o respectivo derivado metilado (3-*O*-metil-manose, 16%); por isso foi realizada uma oxidação adicional com NaIO₄, o que não alterou o resultado; 13% das unidades de Manp substituídas em O-4 (2%) e O-4,6 (8%) produziram eritritol; o mesmo tipo de substituição em unidades de Galp (13%) deram origem ao treitol. O glucitol foi proveniente de unidades de Glcp

3-*O*-substituídas (2,4,6-tri-*O*-metil glucose). O restante da molécula, ou seja, unidades terminais não redutoras de manose, galactose, glucose, bem como as unidades substituídas em *O*-2, *O*-6 e *O*-2,6 (51%), suscetíveis ao NaIO₄, originaram o glicerol.

Como para as outras galactomananas, o polímero de *C. crispatula* apresentou valor de rotação específica (+43,7°), que sugere a presença de unidades α e β nessa molécula, mas o menor valor de $[\alpha]$ encontrado para a estrutura pode provir do maior número de unidades β ligada à cadeia de α -D-Manp correspondentes à galactose e glucose.

Com os dados apresentados evidencia-se que o polímero possui unidades de α -D-Manp unidas por ligações (1→6) que, provavelmente, fazem parte da cadeia principal (6% segundo metilação, estrutura 6), 4-*O*- (8% segundo metilação, estrutura 8), 2,4-di-*O*- (16% segundo metilação, estruturas 9 e 10) e 2-*O*- (4%, segundo metilação, estruturas 7 e 11) substituídas por unidades terminais não redutoras de Manp e Galp principalmente. Unidades de Glcp 3-*O*-substituída (5% segundo metilação e degradação de Smith) e Galp 4-*O*- e/ou 5-*O*-substituída (13% segundo metilação e 9% conforme degradação de Smith) também estão presentes.

A fim de elucidar os segmentos da estrutura desse polímero, foram realizadas análises referentes à acetólise parcial, como pode ser evidenciado no item 4.2.4.

4.2.3.5 Galactoglucomanana de *Cladonia miniata* e *C. salmonea*

Estudos preliminares da galactoglucomanana de *C. miniata* (rendimento 7%, rotação específica +51,5°) mostraram semelhanças com aquelas isoladas de *C. salmonea* 29692 e 29828 (rendimento 5,6% e 3,4% respectivamente). As duas últimas, por sua vez, apresentaram-se idênticas em todas as análises de caracterização estrutural, e por isso serão discutidas sem distinção.

Os heteropolímeros de *C. miniata* e *C. salmonea* apresentaram homogeneidade na análise de cromatografia de permeação em gel (M_w s $1,9 \times 10^6$) e composição monossacarídica igual a

manose, galactose e glucose em proporções de 65:21:12 e 62:28:10 respectivamente. Apesar de os seus espectros de RMN ^{13}C (Figura 13.1 E e F) apresentarem similaridades, as análises de metilação e degradação de Smith mostraram que os dois polímeros são estruturalmente diferentes.

As regiões de C-1 dos espectros de RMN ^{13}C de ambos os polissacarídeos apresentaram sinais proeminentes em δ 103,6 (unidades terminais não redutoras de α -D-manopiranosose; IACOMINI *et al.*, 1985) e 104,6 (unidades terminais não redutoras de β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 4)- α -D-manopiranosose; GORIN e IACOMINI, 1985). Outros sinais em δ 102,4 e 99,4 correspondem à α -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosose (GORIN e MAZUREK, 1982) e unidades 2,6-di-*O*-substituídas de α -D-manopiranosose respectivamente (GORIN e MAZUREK, 1982). Além desses, os espectros de RMN ^{13}C dos polissacarídeos apresentaram sinais indicadores de unidades furanosil em δ 109,5 e 105,5. Esses grupos são responsáveis pela rotação específica relativamente baixa do polissacarídeo de *C. miniata* (+ 51,5°), quando comparada à dos outros polímeros do precipitado de Fehling estudados (Tabela 6): como exemplo, a galactomanana isolada de *C. signata*, que não apresentou esses sinais, e possui rotação específica de + 87,9° (WORANOVICZ *et al.*, 1997).

A análise de metilação das duas galactoglucomananas mostrou diferenças estruturais (Tabela 7): a isolada de *C. miniata* contém unidades não redutoras de Manp (18%), Glcp (8%), Galf (4%) e Galp (13%). Além dessas, unidades de Manp 4-*O*- (2%), 6-*O*- (3%), 4,6-di-*O*- (6%), 2,6-di-*O*- (4%) e 2,4,6-tri-*O*-substituídas (17%), unidades de Glcp 3-*O*- (4%) e 4-*O*-substituídas (3%) e unidades de Galp 4-*O*- e/ou Galf 5-*O*-substituídas (13%). O polissacarídeo isolado de *C. salmonea* apresentou estruturas similares, mas contém unidades de Galp 3-*O*-substituídas (4% vs. 0%), e mais unidades de Manp 6-*O*- (14% vs. 3%) e 2,6-di-*O*-substituídas (15 vs. 6%). Unidades de Galp 4-*O*- e/ou Galf 5-*O*-substituídas não foram encontradas e unidades de Manp 2,4,6-tri-*O*-substituídas em conteúdo mais baixo (12% vs. 17%). Esta diminuição refletiu-se nas

análises de degradação de Smith, a qual forneceu 16% de manose convertida a manitol acetato para a galactoglucomanana de *C. salmonea*, enquanto a de *C. miniata* forneceu 19%.

Para a galactoglucomanana de *C. miniata* eritritol + treitol (21%) foi formado, correspondendo, principalmente, às unidades de Man β 4-*O*- (2%) e 4,6-di-*O*-substituída (6%) + Gal 4- e/ou 5-*O*-substituída (13%) + Glcp 4-*O*-substituída (3%) = 24%. Para *C. salmonea*, os valores correspondentes para as unidades de Man β são 3% e 15% respectivamente (total 18%), o que está de acordo com o conteúdo de eritritol formados a partir desta molécula.

4.2.3.6 Galactoglucomanana de *Cladonia connexa*

A espécie *C. connexa*, como pode ser observado na Tabela 6, apresentou rendimento de heteropolissacarídeos de 3,0 g% em relação ao peso do líquen seco. A análise de sua composição em monossacarídeos mostrou a presença de manose, galactose e glucose em relação molar de 55:38:5; após a determinação da homogeneidade do polímero por filtração em gel, este foi submetido à análise de RMN ^{13}C . Como pode ser observado na Figura 13.2, os sinais apresentados na região de C-1 por essa espécie também são típicos de galactomananas previamente estudadas em líquens (BARON *et al.*, 1989; GORIN *et al.*, 1993; IACOMINI *et al.*, 1985); mostram, para essa molécula, sinais proeminentes em δ 104,6 e 101,8, correspondentes, respectivamente, a unidades de extremidades não-redutoras de β -D-Galp ligadas (1 \rightarrow 4) à α -D-Man β 6-*O* substituída (GORIN e MAZUREK, 1975; HALL e JOHNSON, 1969) (estrutura 8, p. 95) e unidades de 2,4-di-*O*-substituídas da cadeia principal de α -D-Man β -(1 \rightarrow 6) (GORIN e IACOMINI, 1984, 1985) (estruturas 9 e 10, p. 95).

Sinais menores em δ 103,7, 100,6 e 99,5 também são observados; o sinal em δ 103,7 é característico de extremidades não redutoras de α -D-Man β ligadas (1 \rightarrow 2) à α -D-Man β 6-*O*-substituída (IACOMINI *et al.*, 1985); os sinais em δ 100,6 e 99,5 podem corresponder, respectivamente, às unidades da cadeia principal de α -D-Man β ligadas (1 \rightarrow 6), que são Man β 6-

O-substituída (estrutura 6, p. 94) e substituídas em *O*-2 por cadeias laterais (GORIN e MAZUREK, 1982), ou seja, 2,6-di-*O*-substituídas (estruturas 7 e 11, p. 95 e 98 respectivamente). Um sinal em δ 105,1, provavelmente proveniente de unidades furanosídicas, também foi observado.

O sinal intenso em δ 104,6, característico de unidades de β -Galp (GORIN e MAZUREK, 1975) foi confirmado pelo sinal em δ 77,0 na região de C-5 (GORIN e MAZUREK, 1982).

Como pode ser observado na Tabela 7, p. 92, onde são apresentados os dados referentes à análise de metilação, obtiveram-se os seguintes acetatos de alditóis parcialmente metilados: 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-manose (16 mol%), 2,3,5,6-tetra-*O*-metil-galactose (2 mol%) e 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-galactose (17 mol%), que correspondem a grupos terminais não redutores; unidades de Manp 2-*O*- (3,4,6-tri-*O*-metil-manose, 3 mol%), 6-*O*- (2,3,4-tri-*O*-metil-manose, 12 mol%), 4,6-di-*O*- (2,3-di-*O*-metil-manose, 7 mol%), 2,6-di-*O*- (3,4-di-*O*-metil-manose, 2 mol%) e 2,4,6-tri-*O*- (3-mono-*O*-metil-manose, 15 mol%) substituídas. Além desses, derivados tri-*O*-metilados de galactose, que indicam substituição em O-3 (2,4,6-tri-*O*-metil-galactose, 5 mol%), O-4 e/ou O-5 (2,3,6-tri-*O*-metil-galactose, 11 mol%) e em O-6 (2,3,4-tri-*O*-metil-galactose, 3 mol%). O derivado 2,3,6-tri-*O*-metil-glucose (5%) corresponde a unidades de Glcp 4-*O*- e/ou Glcf 5-*O*-substituídas. Deve ser observado que o derivado 2,3,5,6-tetra-*O*-metil-galactose foi evidenciado em pequena porcentagem, o que representa estar de acordo com o espectro de RMN ^{13}C , que apresenta sinal de pequena intensidade indicador de unidades furanosídicas.

A baixa porcentagem molar (2 mol%) do derivado 3,4-di-*O*-metil-manose indica que poucas unidades de α -D-Manp ligadas (1 \rightarrow 6) e que provavelmente façam parte da cadeia principal desse polímero estejam substituídas em *O*-2, que corresponderiam a unidades de manopiranosil 2,6-di-*O*-substituídas. Como podemos observar, a cadeia principal deste polímero encontra-se menos substituída do que a maioria dos heteropolímeros em estudo: esta apresenta alto percentual (12 mol%) de unidades α -D-Manp (1 \rightarrow 6) livres; a porcentagem molar de 7 mol%

do derivado 2,3-di-*O*-metil-manose indica que essas mesmas unidades de α -D-Manp ligadas (1→6) estão substituídas em O-4 e que correspondem a unidades de manopiranosil 4,6-di-*O*-substituídas.

A galactoglucomanana de *C. connexa*, quando submetida à oxidação com periodato de sódio, seguida pela degradação de Smith, apresentou como produtos finais, na forma de acetatos de alditóis (ver Tabela 8), glicerol (50 mol%), coerente com os dados de metilação como o 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-manose e galactose, 2,3,5,6-tetra-*O*-metil-galactose, bem como os derivados 3,4,6-tri-*O*-metil-manose, 2,3,4-tri-*O*-metil-manose, 2,3,4-tri-*O*-metil-galactose e 3,4-di-*O*-metil-manose, os quais perfazem um total de 55 mol%. Além desses, eritritol (9 mol%), que corresponde aos derivados 2,3,6-tri-*O*-metil-glucose e 2,3-di-*O*-metil-manose (5 + 7%); treitol (10 mol%), que corresponde ao derivado 2,3,6-tri-*O*-metil-galactose; manitol (20 mol%), ao derivado 3-*O*-metil-manose e galactitol (10 mol%), ao derivado 2,4,6-tri-*O*-metil-galactose. Deste modo, os resultados indicaram que aproximadamente 20% das unidades de manopiranosose, provavelmente presentes na cadeia principal da molécula desta galactoglucomanana, eram substituídas em O-2,4,6, tornando, assim, estas unidades resistentes à oxidação pelo periodato, sendo então recuperadas na forma de manitol. Além disto, 20 % das unidades de galactopiranosose não seriam terminais não redutoras, como normalmente se observa em moléculas heteropolissacarídicas isoladas de líquens, mas estariam ligadas às unidades de α -D-Manp-(1→6) por ligação glicosídica (1→4) e (1→3), responsáveis pela produção de treitol e galactitol respectivamente, fato não observado até a presente data em líquens.

Como para os outros polímeros em estudo, a rotação específica de +64,5° sugere que unidades α e β estão presentes na estrutura da galactoglucomanana. Esta configuração também foi confirmada pela análise do espectro de RMN ¹³C desse polímero (Figura 13.2), que mostra sinal intenso para C-1 em δ 104,6, característico de unidades de β -D-galactopiranosose ligadas a α -D-manopiranosose.

Assim, os dados apresentados demonstram que o heteropolímero possui unidades de α -D-manopiranosose unidas por ligação (1 \rightarrow 6) que, provavelmente, fazem parte da cadeia principal (~12 mol% segundo metilação, estrutura **6**), 4-*O*- (~7 mol%, segundo metilação), 2,4-di-*O*- (~20 %, conforme degradação tipo Smith, 15 % segundo metilação) e 2-*O*- (~2 %, conforme dados de metilação) substituídas por unidades terminais não redutoras de manopiranosose e galactopiranosose principalmente. Unidades de galactose 3-*O*-, 4-*O*- e/ou 5-*O* e 6-*O*-substituídas e também de glucose 4-*O*-substituídas indicam ser pontos de ramificação da molécula.

Dados relativos à forma sobre como as unidades ramificadoras de D-Manp e D-Galp estão ligadas à molécula foram obtidos por acetólise parcial (ver item 4.2.4). Estudos posteriores com enzimas específicas deverão ser conclusivos sobre como esses constituintes se ligam preferencialmente à cadeia principal do polímero; igualmente, como as outras galactoglucomananas aqui estudadas, pode-se sugerir que a cadeia principal desse polímero consiste em unidades de α -D-manopiranosose ligados (1 \rightarrow 6) substituídos sob diferentes padrões por grupos α -D-manopiranosil e β -D-galactopiranosil principalmente.

4.2.3.7 Galactoglucomanana de *Cladonia imperialis* e *C. clathrata*

Estudos preliminares da galactomanana de *C. imperialis* mostraram que esta é semelhante à de *C. clathrata*. As regiões de C-1 dos espectros de RMN ^{13}C dos polissacarídeos (Figura 13.2 H e I respectivamente) mostraram similaridades e apresentaram sinais proeminentes em δ 104,6 (estrutura **8**, p. 95) e δ 102,1 (estrutura **12**, p. 98). Outras semelhanças foram encontradas nas proporções de manose, galactose e glucose nas frações Sobrenadante congelamento-degelo (Tabela 2, p. 57), Sobrenadante (Tabela 4, p. 68) e Precipitado de Fehling (Tabela 6, p. 87). Diferenças foram encontradas, contudo, nas rotações específicas, que foram de +72,8° para a galactomanana de *C. imperialis* e +62,2° para a isolada de *C. clathrata*. Os dados de metilação (Tabela 7) revelaram unidades terminais não redutoras de galactopiranosose (22%) e

manopiranoses (14%), e unidades de manopiranoses substituídas em O-2 (12%), O-6 (4%), O-4,6 (11%), O-2,6 (4%) e O-2,4,6 (22%) para o polímero de *C. imperialis*. Os valores correspondentes para o polissacarídeo de *C. clathrata* foram 20 e 10% de unidades terminais não redutoras de galacto- e manopiranoses respectivamente. Para unidades de manopiranoses O-substituídas, os valores correspondentes foram 4, 16, 17, 6 e 15%. Ambos os polissacarídeos mostraram uma pequena proporção de unidades de galactofuranose, o que está de acordo com seus espectros de RMN ^{13}C , que mostraram um sinal em δ 109,7 (estrutura **13**, p. 98); portanto estas galactomananas ramificadas possuem provavelmente uma cadeia principal composta por estrutura de uma α -D-manopiranosil ligada (1 \rightarrow 6) (estrutura **6**, p. 94), similar àquelas de outras galactomananas isoladas de outros líquens.

Similaridade também foi observada na análise de degradação de Smith (Tabela 8, p. 93) dessas galactomananas. Além disto, os produtos mostraram alta proporção de glicerol (57% e 61% respectivamente), quando comparados, por exemplo, aos obtidos de *C. crispatula*, *C. ibitipocae* e *C. substellata*. Outra diferença observada foi a porcentagem de manitol formada na degradação de Smith dos polissacarídeos de *C. imperialis* e *C. clathrata* (20 e 27%, respectivamente), comparados com os de *C. ibitipocae* (44% cada), indicando diferenças nas proporções de unidades de manopiranosil substituídas em O-2,4,6 (estruturas **9** e **10**, p. 95). As galactomananas dessas espécies contêm cadeias principais que são O-substituídas nas mesmas posições daquelas de outras previamente investigadas em líquens do gênero *Cladonia* (IACOMINI *et al.*, 1985; WORANOVICZ, 1995).

4.2.3.8 Galactoglucomanana de *Cladonia furcata* 22975

Seguindo o procedimento de extração com KOH similar àquele utilizado para todas as espécies, o polissacarídeo obtido na fração Precipitado de Fehling (rendimento 0,8%) teve a rotação específica igual a +61,4° e composto por manose (54%), galactose (43%) e glucose (3%).

O espectro de RMN ^{13}C desta fração mostrou ser idêntico ao obtido para *Cladonia furcata* 23007 no precipitado de Fehling (WORANOVICZ *et al.*, 1997), como pode ser observado na Figura 13.2 J e K, p. 90, porém diferente das outras espécies em estudo. Apesar de que os espectros possuem sinais em comum em δ 104,6 (estrutura **8**, p. 95) e 100,3 (estrutura **6**, p. 94), suas respectivas proporções são diferentes. A região de C-1 do espectro de *C. furcata* 22975 também apresentou sinais em δ 109,7 (unidades não redutoras de β -D-galactofuranose ligadas 1 \rightarrow 6 a unidades de α -D-manopirranose; estrutura **13**, p. 98, GORIN *et al.*, 1981) e em δ 105,6, de origem desconhecida, idênticos aos de *C. furcata* 23007. Esses grupos, que estão presentes em proporção considerável, causaram a relativa diminuição da rotação específica, comparada com a obtida para *C. signata*. A análise de metilação (Tabela 7, p. 92) também não mostrou diferenças entre as duas amostras de *C. furcata*, que demonstraram a presença, como principais componentes, de unidades terminais não redutoras de galactopirranose (40%) e manopirranose (16%) e também unidades de manopiranosil substituídas em O-6 (3%), O-4,6 (19%), O-2,6 (1%) e O-2,4,6 (18%). Unidades terminais não redutoras de galactofuranose (3%) também foram encontradas. Apesar das similaridades com as outras *Cladonia* em estudo, o material isolado de *C. furcata* apresentou valor diferente de glicerol (60%) na análise de degradação de Smith (Tabela 8, p. 93), proveniente sobretudo de unidades terminais não redutoras de manopirranose e galactopirranose. O conteúdo relativamente alto de eritritol (16%) liberado originou-se das unidades de manopirranose substituídas em O-4 (estrutura **8**). A detecção de manitol acetato mostrou que 20% das unidades de manopiranosil são 2,4,6-tri-O-substituídas (estruturas **9** e **10**).

4.2.3.9 Características comuns dos heteropolímeros isolados da fração Precipitado de Fehling

Com base nas investigações realizadas com heteropolissacarídeos fracionados e precipitados com solução de Fehling, foi verificado que estas moléculas apresentam cadeias

principais com estruturas idênticas e representadas por α -D-Manp unidas por ligações (1→6). As cadeias laterais, que correspondem principalmente a unidades terminais não redutoras de α -D-Galp-(1→2)-, β -D-Galp-(1→4)-, β -D-Galf-(1→2)-, β -D-Galf-(1→6)-, α -D-Glcp-(1→2)-, β -D-Glcp-(1→4)- e α -D-Manp-(1→2)-, ocorrem como monossubstituintes ou como dissubstituintes nas posições O-2 e/ou O-4.

Com os dados de RMN ^{13}C , metilação, degradação de Smith e acetólise parcial, pode-se concluir que as estruturas mostraram não ser idênticas, mas estruturalmente relacionadas; como pode ser observado na Tabela 7 (p. 92), que evidencia os acetatos de alditóis parcialmente metilados obtidos dos polissacarídeos metilados, a porcentagem e a presença de alguns derivados variam nas espécies em estudo. Aparentemente *C. furcata* é a que apresenta maior número de unidades terminais não redutoras (59%). Esta espécie, além de *C. imperialis*, *C. miniata* e *C. substellata* também parecem ser as mais ramificadas no presente estudo, porque a porcentagem de unidades de manose 6-O-substituídas (2,3,4-tri-O-metil-manose) foi menor que 5%. Por outro lado, os polímeros de *C. furcata*, *C. ibitipocae* e *C. signata* (WORANOVICZ, 1995) parecem os mais simples dos investigados em *Cladonia* spp., visto que possuem o menor número de derivados metilados. Esta observação pode ser confirmada pelo seus espectros de RMN ^{13}C (Figuras 13.1 e 13.2, p. 89 e 90), cujas regiões de C-1, especialmente a de *C. ibitipocae*, são relativamente simples entre os líquens estudados.

Os polissacarídeos isolados de gêneros da mesma família, como *Cladina alpestris*, *C. confusa* (como *Cladonia alpestris* e *Cladonia confusa*, IACOMINI *et al.*, 1985) e *Cladia aggregata* (WORANOVICZ, 1995) mostraram, com os sinais de RMN ^{13}C (Figura 13.3, p. 91), características semelhantes com relação à cadeia principal e seus substituintes já comentados.

Os dados indicaram que as estruturas de galactomananas e galactoglucomananas são típicas das espécies de líquens; apesar das similaridades entre espécies do mesmo gênero, cada polissacarídeo precipitado com solução de Fehling parece característico da espécie.

4.2.4 OLIGOSSACARÍDEOS

Os oligossacarídeos foram produzidos a partir de galactoglucomananas obtidas na fração Precipitado de Fehling e purificados como se descreve em Materiais e Métodos. Eles foram estudados para elucidar a estrutura fina e estabelecer semelhanças e diferenças mais específicas entre os polissacarídeos dessa fração.

4.2.4.1 Oligossacarídeos isolados de *Cladonia substellata*

A acetólise parcial da galactoglucomanana de *C. substellata* originou uma mistura de pelo menos seis produtos acetilados, de acordo com seu perfil de HPLC, fase reversa (Figura 14). As condições utilizadas foram as citadas em Materiais e Métodos, item 3.3.1.3, e a concentração de material injetado foi 600 mg/mL. Esses foram FR-1, correspondente ao solvente (tempo de retenção 1,3 min), FR-2 (1,7 min, 7% da área total), FR-3 (2,5 min, 28%), FR-4 (3,7 min, 34%), FR-5 (4,9 min, 6%), FR-6 (6,25 min, 13%) e FR-7 (8,0 min, 12%).

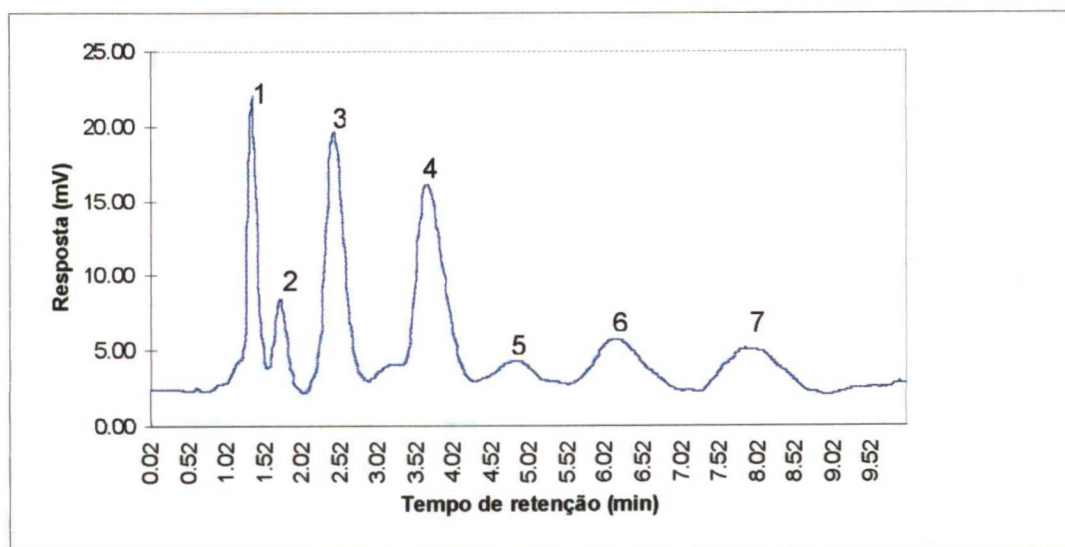
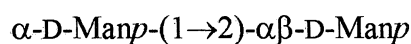


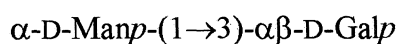
FIGURA 14 - Fracionamento de monossacarídeos e oligossacarídeos em HPLC, fase reversa, coluna Delta-Pak™C¹⁸-Waters, detectados por IR. Fonte: *C. substellata*. Eluentes: 60% água, 40% acetonitrila. Fluxo: 3,0 mL/min.

As frações correspondentes a cada pico foram coletadas e monitoradas por TLC e RMN ^1H . O componente FR-4 apresentou R_{lac} igual a 0,8 quando analisada em TLC, fase móvel acetato de etila: hexano (1:1) e os espectros de RMN ^1H e $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY sugeriram a presença da mistura acetilada de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ e $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$.

O espectro de RMN ^1H da fração FR-4 apresentou sinais para dois H-1 $_{\alpha}$ s em δ 6,24 (d, $J_{1,2} = 2,1$ Hz) e em δ 6,40 (d, $J_{1,2} = 3,7$ Hz) e um sinal de H-1 $_{\beta}$ em δ 5,64 (d, $J_{1,2} = 8,01$ Hz), que correspondem, respectivamente, às unidades redutoras de $\alpha\text{-D-Manp}$, $\alpha\text{-D-Galp}$ e $\beta\text{-D-Galp}$ (a forma α é predominante em relação à β). Além desses, dois sinais de H-1 em δ 4,94 (d, $J_{1,2} = 1,8$ Hz) e δ 5,02 (d, $J_{1,2} = 1,6$ Hz) relativos às unidades não redutoras de $\alpha\text{-D-Manp}$ dos dois oligossacarídeos. Dados de COSY obtidos a 25°C para esta fração apresentaram assinalamentos inequívocos dos sinais de H-1, sugerindo a presença dos dois dissacarídeos acetilados anteriormente citados (estruturas **14** e **15**).



14



15

Os valores em campo baixo, δ 6,40, 6,24 e 5,64 dos H-1 redutores devem-se ao fato de o respectivo carbono conter um grupo acetil, tornando, desta forma, H-1 mais desblindado. A ligação glicosídica (1 \rightarrow 3) da estrutura **15** foi facilmente determinada por COSY devido à absorção em campo alto de H-3 (δ 4,23) da unidade redutora. C-3 de $\alpha\text{-D-Galp}$, quando acetilado, mostra para o respectivo próton o valor de δ 5,32 (dados experimentais não mostrados); por isso, se este carbono está comprometido em ligação glicosídica, e conseqüentemente não possui o grupo acetil, faz com que o correspondente hidrogênio absorva

em campo mais alto. Da mesma forma, o sinal de H-3 de β -Galp não apareceu em campo baixo. Em β -Galp acetilada, essa ressonância ocorre em δ 5,08. Assim, como o sinal de H-2 desta unidade acetilada da estrutura **15** forneceu correlação com H-3 em δ 3,98, a ligação 1 \rightarrow 3 foi confirmada.

As formas acetiladas destes oligossacarídeos não puderam ser separadas por cromatografia em sílica gel (fase normal), utilizando diferentes fases móveis [acetato de etila: hexano (1:1, 1,5:1, 2:1) e acetato de etila: tolueno (1:1)]. Assim, a mistura dos dois dissacarídeos foi desacetilada conforme se descreve em Materiais e Métodos, e novamente tentou-se purificação em sílica gel. Duas misturas de eluentes foram utilizadas: acetato de etila: metanol: água (4:2:1) e n-butanol: etanol: água (2:1:1). Como a separação não foi satisfatória, optou-se por separação em HPLC, fase normal. O perfil obtido pode ser observado na Figura 15, que mostrou três componentes, sendo FN-1 o pico relativo ao solvente (tempo de retenção 1,7 min), FN-2 (6,6 min, 34%) e FN-3 (8,2 min, 66%).

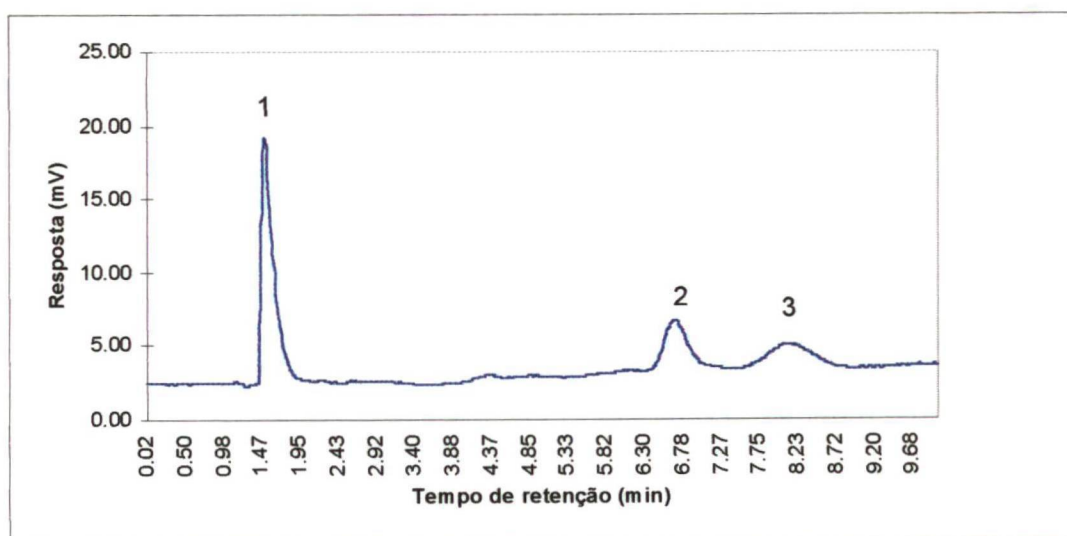


FIGURA 15 - Fracionamento de oligossacarídeos em HPLC, fase normal, coluna Alltech Carbohydrate-Waters, detectados por IR. **1**, solvente; **2**, α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α β -D-Manp; **3**, α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)- α β -D-Galp. Fonte: *C. substellata*. Eluentes: 30% água, 70% acetonitrila. Fluxo: 2,2 mL/min. Concentração: 10 mg/mL.

O componente FN-2 foi isolado e seu espectro de RMN ^1H mostrou dois sinais principais de H-1, que corresponderam àqueles de uma amostra autêntica de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Manp}$ em δ 5,02 (H-1'; d, $J_{1,2} = 1,2$ Hz) e 5,36 (H-1; d, $J_{1,2} = 1,7$ Hz). A análise de HMQC (Figura 16) mostrou sinais de C-1 correspondentes à $\alpha\text{-D-Manp}$ em δ 92,8 e 102,2 para as unidades redutoras e não redutoras respectivamente. A correlação de H-2 da unidade redutora em δ 3,93 com o respectivo C-2 em δ 79,4 sugeriu que a ligação é do tipo (1 \rightarrow 2).

Os sinais de próton de cada anel foram assinalados via COSY (Figura 17), iniciando-se de cada sinal anomérico e foram confirmados pelo espectro de TOCSY, o que permitiu o assinalamento completo dos sinais de próton desta molécula (Figura 18). O espectro de NOESY (Figura 19) do dissacarídeo mostrou fortes contatos interresíduo entre H-1'/H-2, confirmando a estrutura 14. Os dados obtidos das análises de RMN originaram os dados da Tabela 9.

TABELA 9 - Dados de RMN ^1H ^a para o dissacarídeo 2-O- $\alpha\text{-D-manopiranosil-}\alpha\beta\text{-D-manose}$.

Unidade	Deslocamentos químicos ^1H (δ) e constantes de acoplamento					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a / b
$\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Manp}$	5,36	3,93	3,67	3,78	3,73	3,74
	$J_{1,2}$ (1,2)	$J_{1,2}$ (1,2)	$J_{2,3}$ (3,4)	$J_{3,4}$ (n.d.)	$J_{4,5}$ (n.d.)	$J_{5,6a}$ (5,0)
		$J_{2,3}$ (3,5)	$J_{3,4}$ (9,6)	$J_{4,5}$ (10,4)	$J_{5,6}$ (n.d.)	$J_{6a,6b}$ (11,5)
$\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$	5,01	4,04	3,83	3,61	3,75	3,85
	$J_{1,2}$ (1,7)	$J_{1,2}$ (1,8)	$J_{2,3}$ (3,3)	$J_{3,4}$ (9,5)	$J_{5,6a}$ (4,1)	$J_{6a,6b}$ (12,6)
		$J_{2,3}$ (3,3)	$J_{3,4}$ (9,5)	$J_{4,5}$ (9,7)	$J_{5,6b}$ (2,0)	

^aEm D_2O ; deslocamentos químicos em ppm relativos ao DSS interno, e constantes de acoplamento em parênteses (Hz)

n.r.: não resolvido

n.d.: a constante de acoplamento não foi determinada devido à sobreposição dos sinais.

Principais nOes interglicosídicos:

H₁ manose não-redutora \leftrightarrow H₂ manose redutora

H₁ manose redutora \leftrightarrow H₂ manose redutora

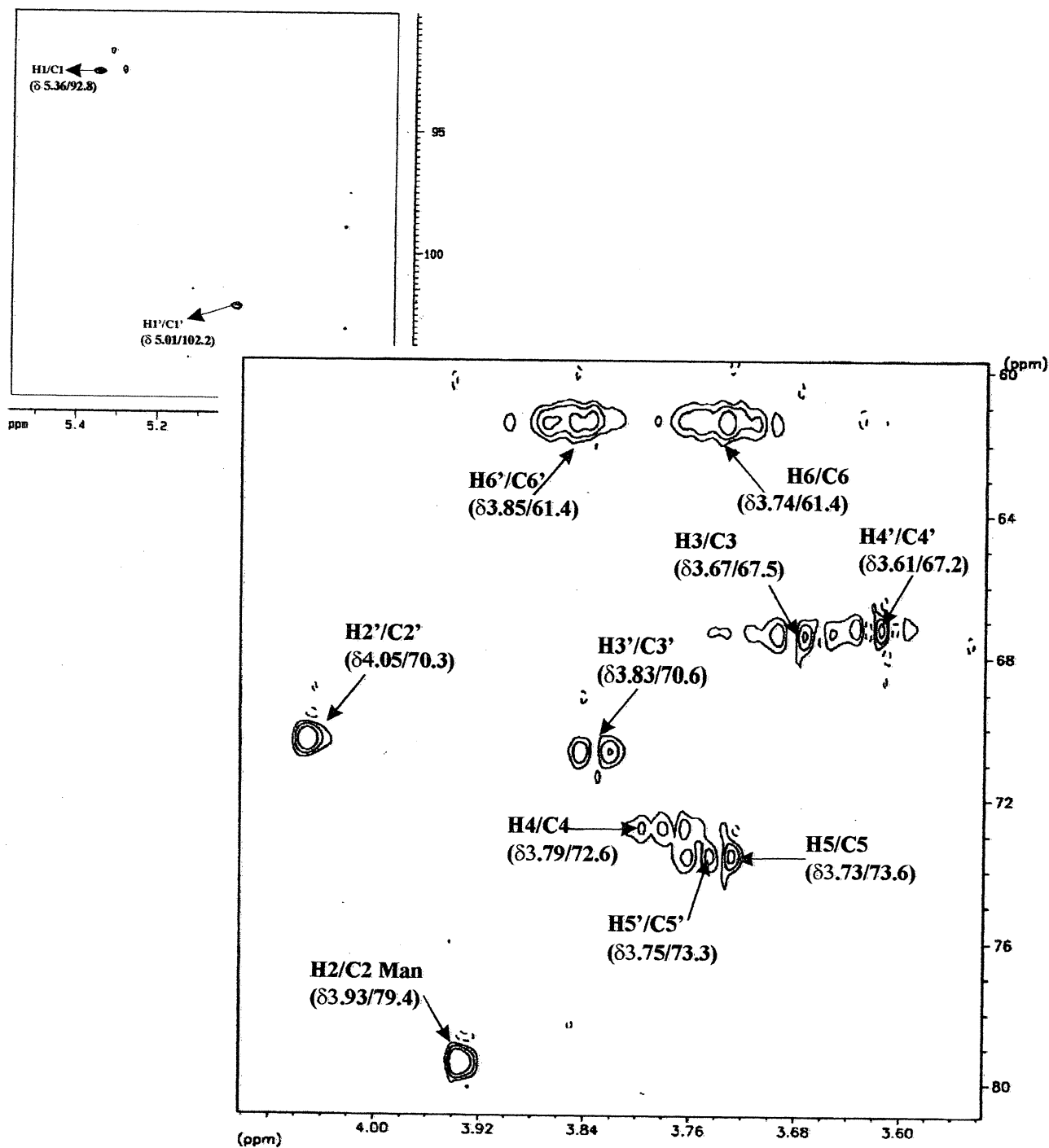


FIGURA 16 - Espectro de ^1H , ^{13}C HMQC de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ obtido da galactoglucomanana de *C. substellata* em D_2O , a 25°C . À esquerda, a região anomérica. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. $\text{H1}/\text{C1}$ e $\text{H1}'/\text{C1}'$ correspondem à $\alpha\text{-D-Manp}$ redutora e não redutora respectivamente.

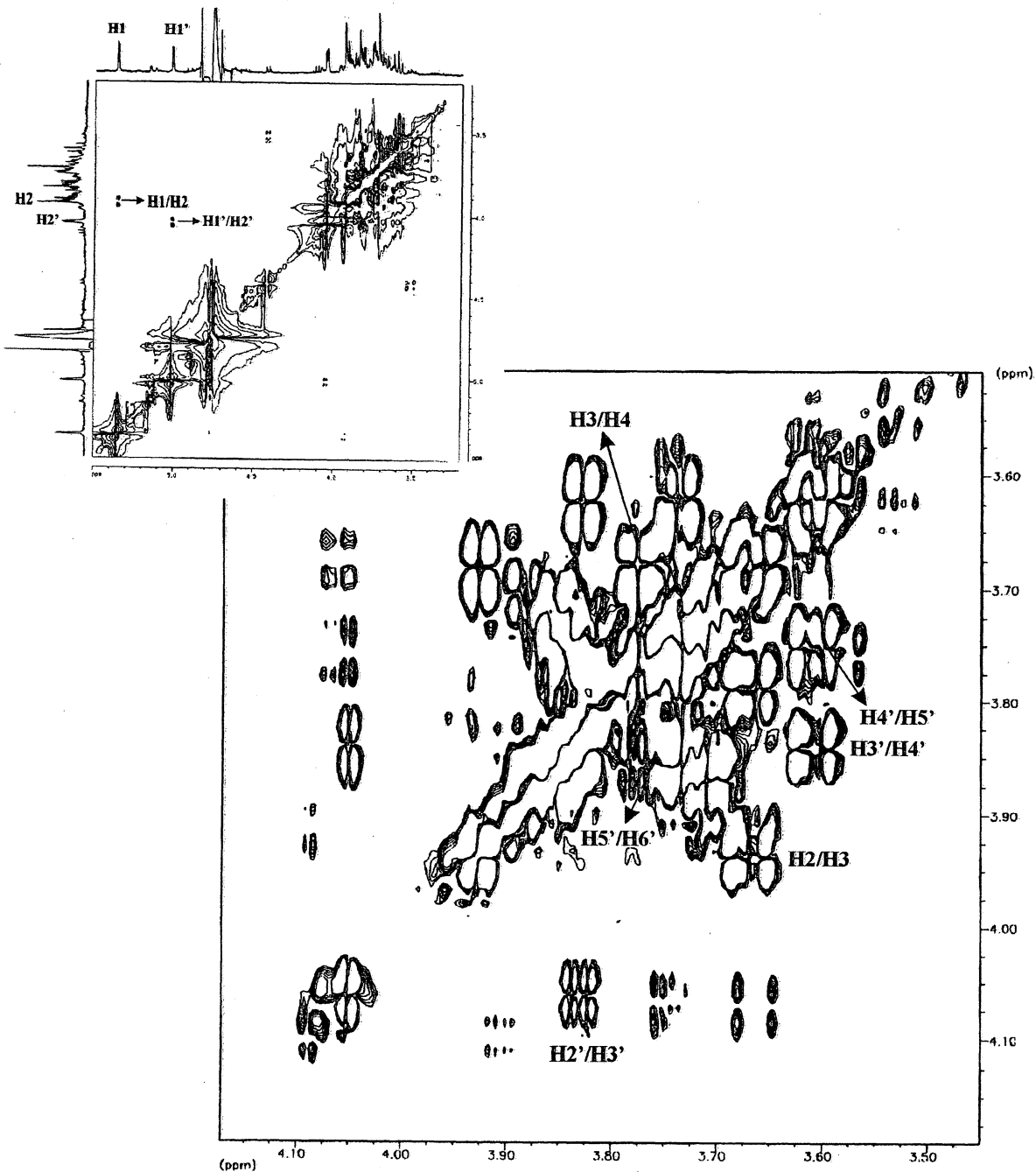


FIGURA 17 - Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ obtido da galactoglucomanana de *C. substellata* em D_2O , a 25°C . À esquerda, a região anomérica. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. A unidade não redutora foi representada por Hn' (n indica o próton de cada unidade).

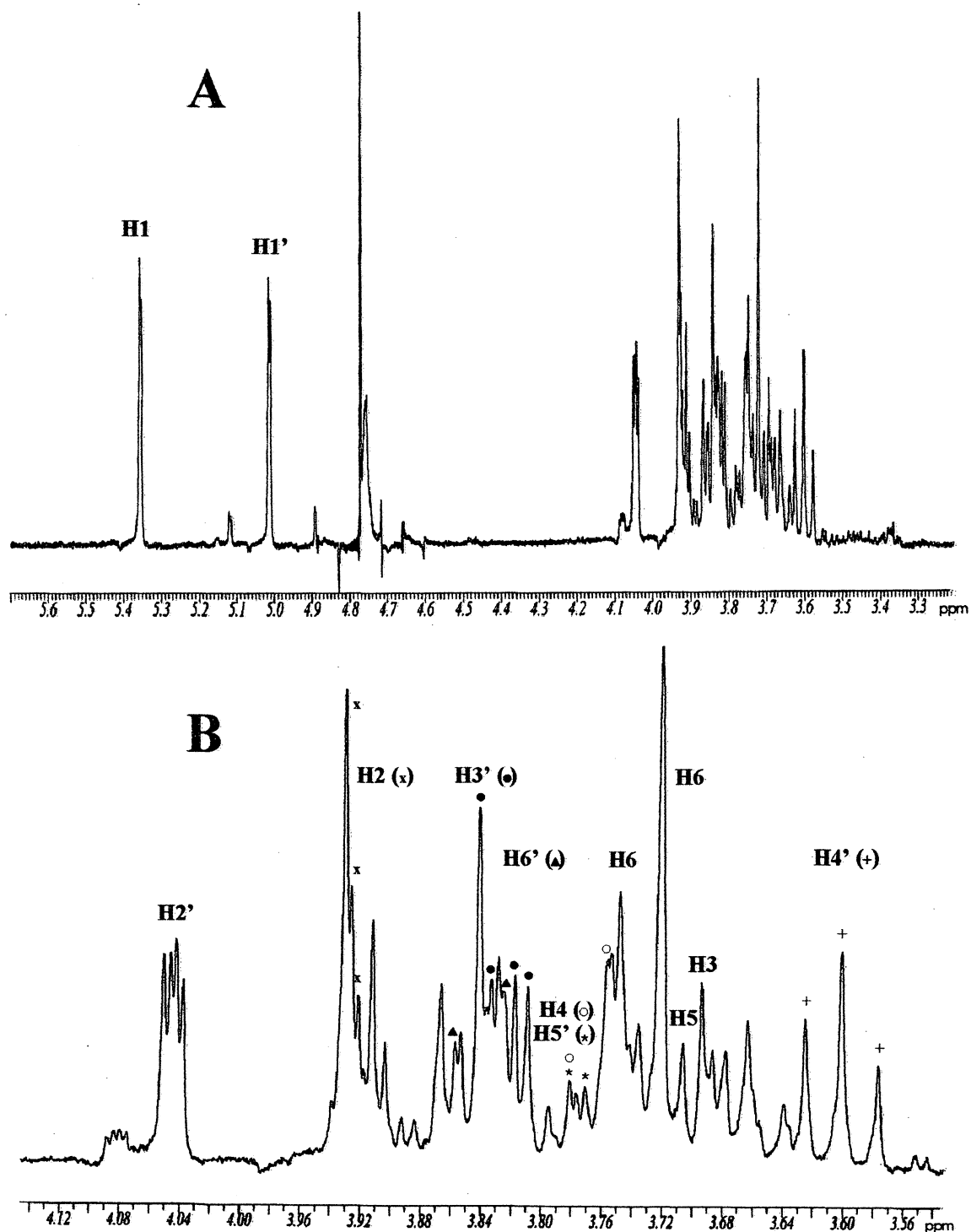


FIGURA 18 - Espectro de RMN ^1H de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ obtido da galactoglucomanana de *C. substellata* em D_2O , a 25°C (A). Região expandida entre δ 4,12 e 3,56 (B). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. A unidade não redutora foi representada por Hn' (n indica o próton de cada unidade).

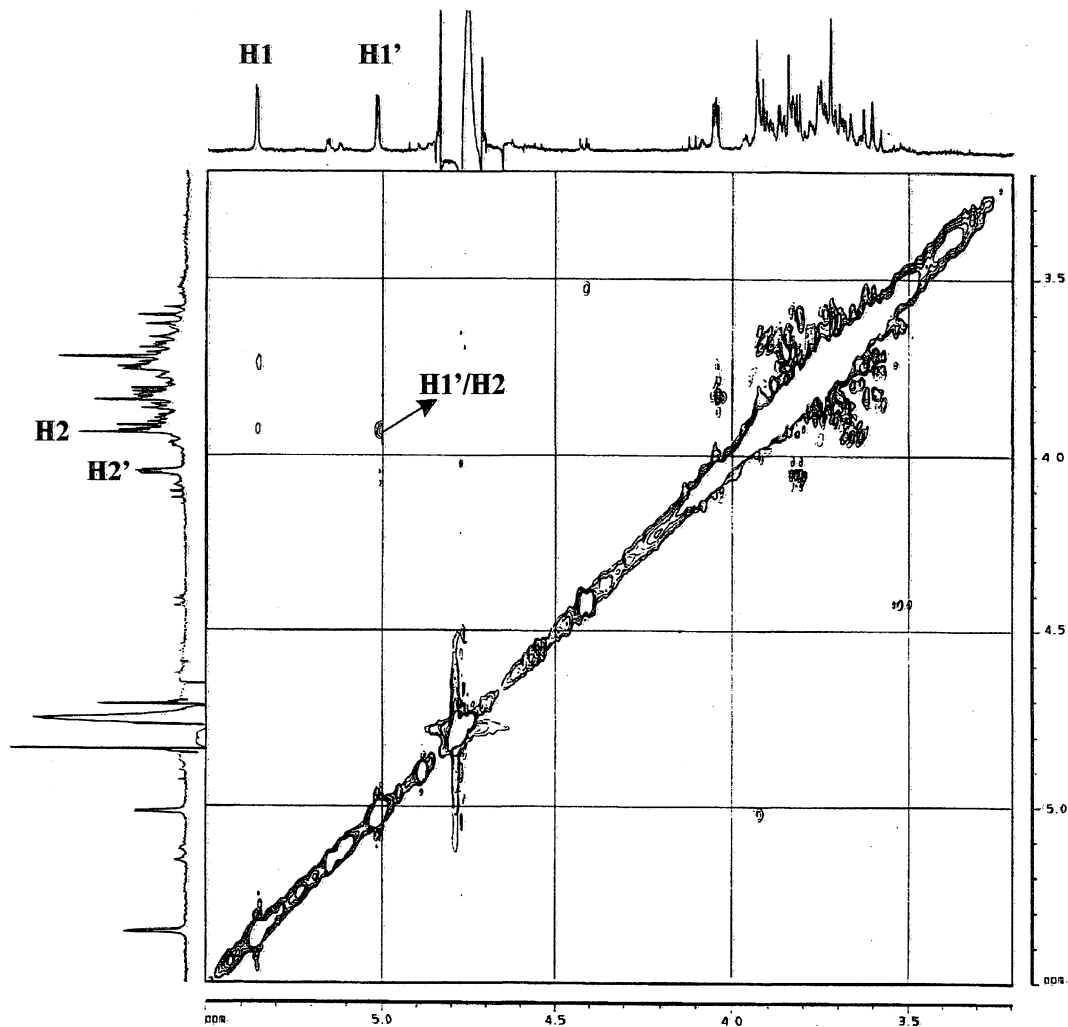


FIGURA 19 - Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ obtido da galactoglucomanana de *C. substellata* em D_2O , a 25°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. A unidade não redutora foi representada por Hn' (n indica o próton de cada unidade).

O componente FN-3 forneceu o valor de rotação específica de +24° e a composição monossacarídica correspondente à manose e galactose na proporção de 1:1. A análise de RMN ¹H mostrou a região anomérica composta por quatro dubletes correspondentes respectivamente a H-1 da unidade não redutora de α-D-Manp ligada à α-D-Galp (δ 5,03; $J_{1,2} = 1,6$ Hz), H-1 da unidade não redutora de Manp ligada à β-D-Galp (δ 5,02; $J_{1,2} = 1,7$ Hz), e unidades redutoras de α-D-Galp (δ 5,26; $J_{1,2} = 3,9$ Hz) e β-D-Galp (δ 4,60; $J_{1,2} = 7,9$ Hz) (Figura 20). Dados de COSY (Figura 21), NOESY (Figura 22) e TOCSY foram obtidos a fim de estabelecer os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento (Tabela 10).

TABELA 10 - Dados de RMN ¹H^a para o dissacarídeo 3-O-α-D-manopiranosil-αβ-D-galactopiranosose.

Unidade	Deslocamentos químicos ¹ H (δ) e constantes de acoplamento					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a / b
→3)-α-D-Galp	5,26	3,87	3,94	4,22	4,05	3,89-3,85
	$J_{1,2}$ (3,89)	$J_{1,2}$ (3,81)	$J_{2,3}$ (10,38)	$J_{3,4}$ (2,90)	$J_{4,5}$ (n.d.)	$J_{5,6}$ (n.d.)
		$J_{2,3}$ (10,38)	$J_{3,4}$ (3,13)	$J_{4,5}$ (0,7)	$J_{5,6}$ (n.d.)	$J_{6a,6b}$ (n.d.)
→3)-β-D-Galp	4,60	3,53	3,74	4,16	3,76-3,65	3,70/ 3,76-3,65
	$J_{1,2}$ (7,90)	$J_{1,2}$ (7,90)	$J_{2,3}$ (10,22)	$J_{3,4}$ (3,36)	$J_{4,5}$ (n.d.)	$J_{5,6a}$ (7,7)
		$J_{2,3}$ (10,0)	$J_{3,4}$ (3,59)	$J_{4,5}$ (n.r.)	$J_{5,6}$ (n.d.)	$J_{6a,6b}$ (12,8)
α-D-Manp (1→	5,03 ^b 5,02 ^c	3,98	3,67	4,05	3,65-3,75	3,91-3,83
	$J_{1,2}$ (1,68)	$J_{1,2}$ (1,68)	$J_{2,3}$ (3,28)	$J_{3,4}$ (9,77)	$J_{4,5}$ (9,55)	$J_{5,6}$ (n.d.)
	$J_{1,2}$ (1,75)	$J_{2,3}$ (3,51)	$J_{3,4}$ (9,77)	$J_{4,5}$ (n.d.)	$J_{5,6b}$ (2,52)	$J_{6a,6b}$ (n.d.)

^a Em D₂O; deslocamentos químicos em ppm relativos ao DSS interno, e constantes de acoplamento em parênteses (Hz)

n.r.: não resolvido

n.d.: a constante de acoplamento não foi determinada devido à sobreposição dos sinais.

^b α-Man ligada à α-Gal; ^c α-Man ligada à β-Gal

Principal nOe interglicosídico: H₁ manose não redutora ↔ H₃ galactose terminal redutora

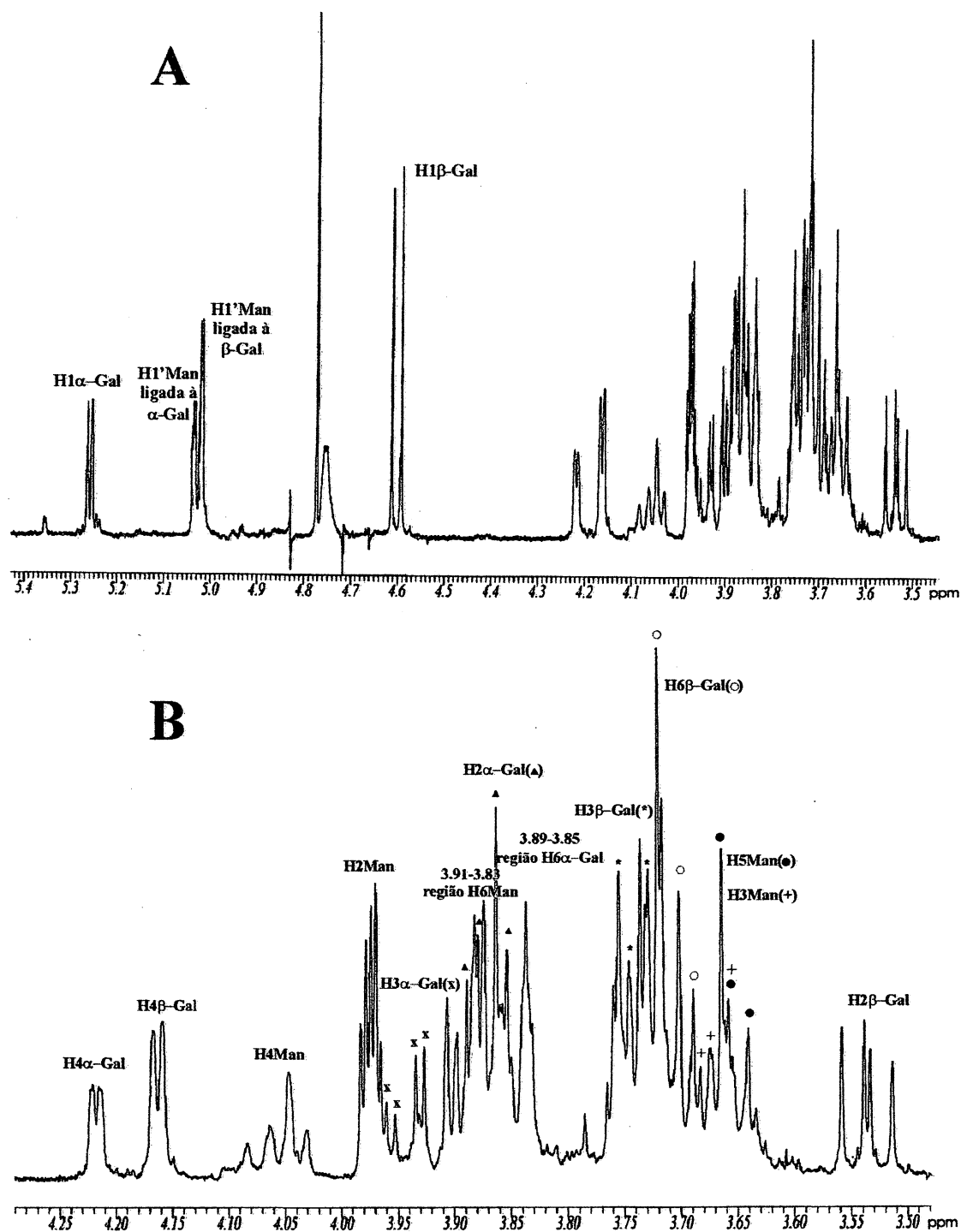


FIGURA 20 - Espectro de RMN ^1H de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$ obtido da galactoglucomanana de *C. substellata* em D_2O , a 25°C (A). Região expandida entre δ 4,25 e 3,50 (B). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. As unidades não redutoras foram representadas por Hn' (n indica o próton de cada unidade).

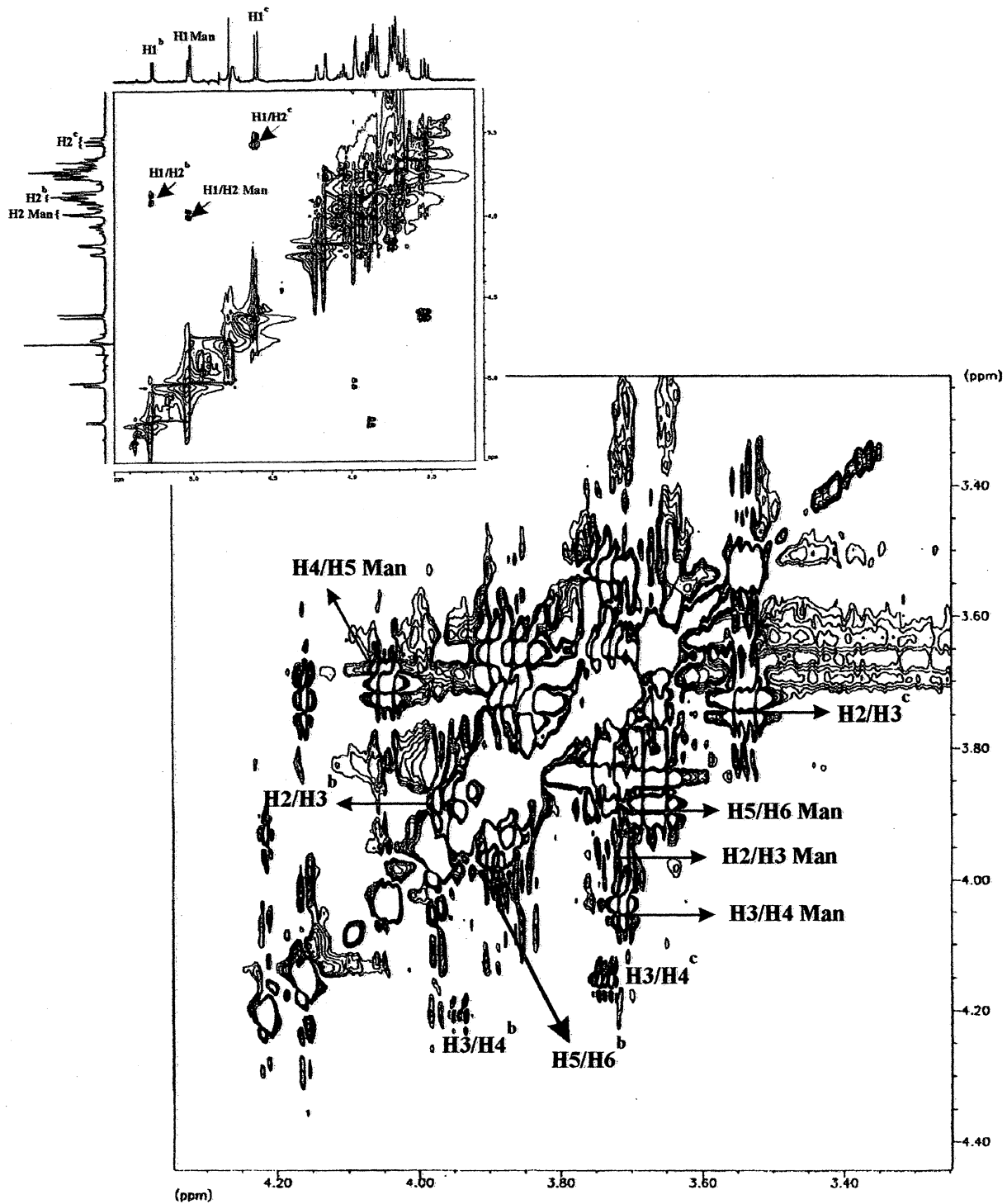


FIGURA 21 - Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$ obtido da galactoglucomanana de *C. stellata* em D_2O , a 25° . À esquerda, a região anomérica. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. $\alpha\text{-D-Galp}$ foi representada por b e $\beta\text{-D-Galp}$ por c .

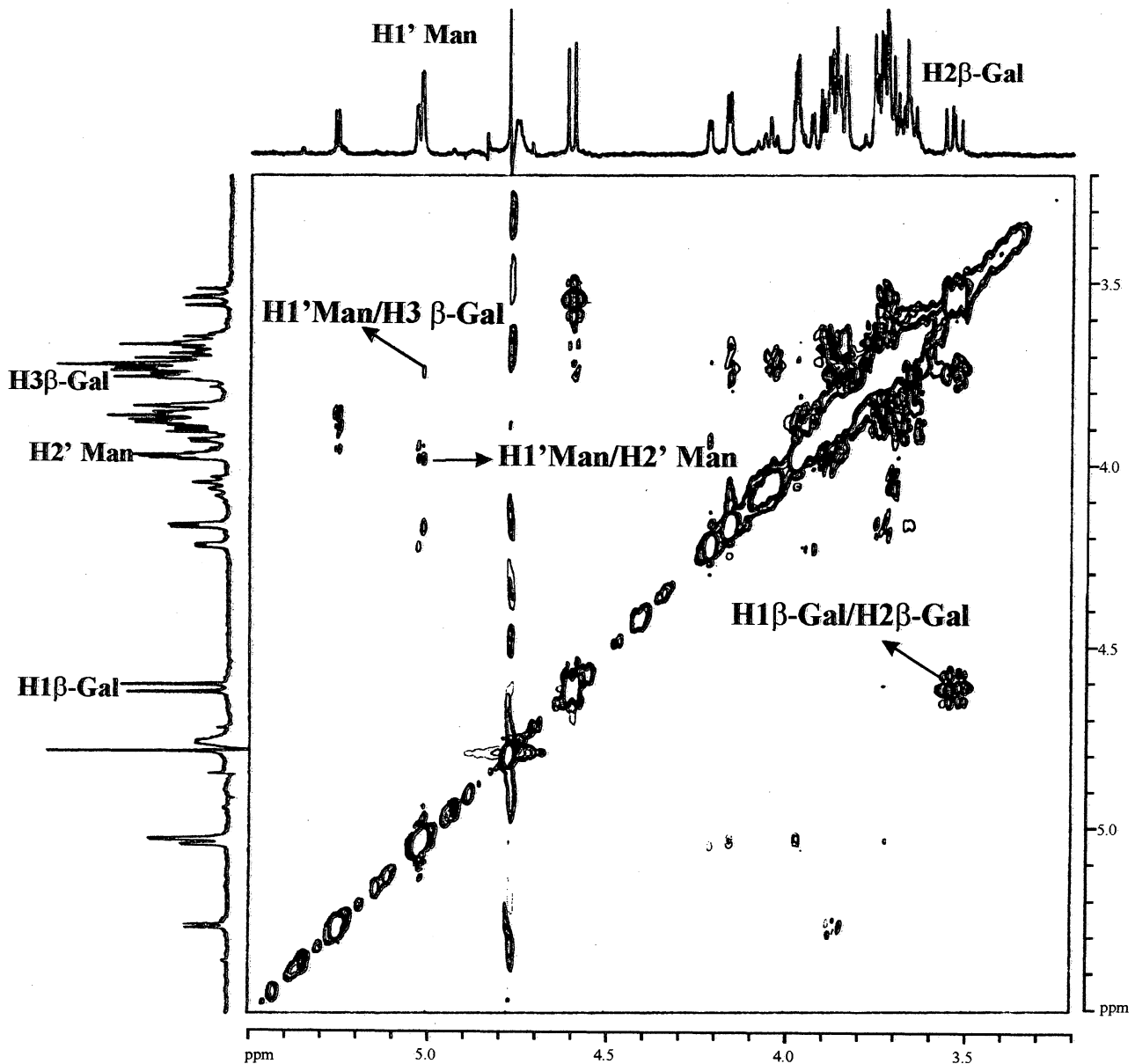


FIGURA 22 - Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$ obtido da galactoglucomanana de *C. substellata* em D_2O , a 25°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. A unidade não redutora foi representada por Hn' (n indica o próton de cada unidade).

A fim de confirmar as conclusões a respeito desta molécula, parte da amostra do dissacarídeo foi acetilado com anidrido acético e piridina na proporção de 1:1 e analisado novamente em RMN. Os espectros ^1H -RMN (1D) e COSY (Figura 23) confirmaram os dados obtidos para a molécula na forma livre e forneceram os dados da Tabela 11.

TABELA 11 - Dados de RMN $^1\text{H}^a$ para o dissacarídeo 1,2,4,6-tetra-*O*-acetil-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-galactopiranosose.

Unidade	Deslocamentos químicos ^1H (δ) e constantes de acoplamento					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a / b
$\rightarrow 3$)- α -D-Galp	6,40 $J_{1,2}$ (3,7)	5,23 $J_{1,2}$ (3,8) $J_{2,3}$ (10,2)	4,23 $J_{2,3}$ (10,2) $J_{3,4}$ (3,4)	5,48 $J_{3,4}$ (3,2) $J_{4,5}$ (1,1)	4,22-4,26 $J_{4,5}$ (n.d.) $J_{5,6}$ (n.d.)	4,24 $J_{5,6}$ (n.d.) $J_{6a,6b}$ (12,6)
$\rightarrow 3$)- β -D-Galp	5,64 $J_{1,2}$ (8,3)	5,31 $J_{1,2}$ (8,2) $J_{2,3}$ (10,1)	3,98 $J_{2,3}$ (10,2) $J_{3,4}$ (3,4)	5,42 $J_{3,4}$ (3,2) $J_{4,5}$ (1,0)	4,11 $J_{4,5}$ (1,1) $J_{5,6a}$ (7,6)	4,16-4,24 $J_{5,6a}$ (n.d.) $J_{6a,6b}$ (11,9)
α -D-Manp(1 \rightarrow)	5,04 ^b 5,05 ^c $J_{1,2}$ (1,6) $J_{1,2}$ (1,4)	5,10 $J_{1,2}$ (1,6) $J_{2,3}$ (3,2)	5,15 $J_{2,3}$ (3,5) $J_{3,4}$ (10,2)	5,24 $J_{3,4}$ (10,7) $J_{4,5}$ (9,9)	3,93 $J_{4,5}$ (9,9) $J_{5,6a}$ (2,5) $J_{5,6b}$ (5,1)	4,18 $J_{5,6a}$ (2,9) $J_{6a,6b}$ (12,5)

^a Em CDCl_3 ; deslocamentos químicos em ppm relativos ao TMS interno, e constantes de acoplamento em parênteses (Hz)

n.r.: não resolvido

n.d.: a constante de acoplamento não foi determinada devido à sobreposição dos sinais.

^b α -Man ligada à α -Gal

^c α -Man ligada à β -Gal

β -Gal é predominante em relação à α -Gal (porque o anômero predominante β foi acetilado com piridina e anidrido acético).

Principal nOe interglicosídico:

H_1 manose não redutora \leftrightarrow H_3 galactose terminal redutora

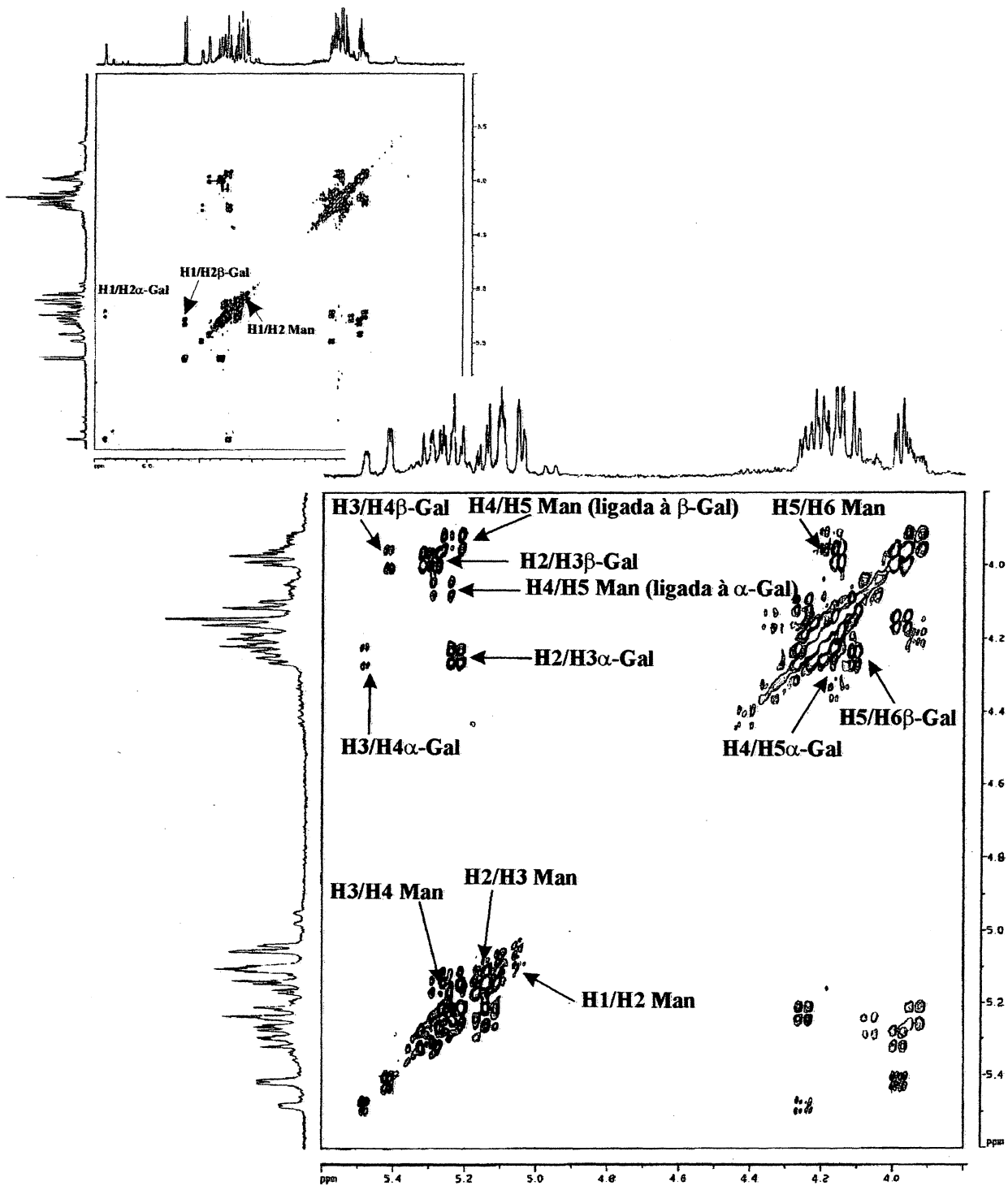


FIGURA 23 - Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de 1,2,4,6-tetra-*O*-acetil-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-galactopiranosose obtido da galactoglucomanana de *C. substellata* em CDCl_3 , a 25°C . À esquerda, a região anomérica. Deslocamentos químicos em δ (ppm). α -D-Galp foi representada por ^b e β -D-Galp por ^c.

O componente FR-6 (ver Figura 14, p. 111) indicou a presença de um trissacarídeo. No entanto, como o componente principal demonstrou estar contaminado, este foi desacetilado e purificado por HPLC, utilizando-se coluna de fase normal, conforme descrito para a fração de dissacarídeos. O perfil no HPLC indicou um pico principal no tempo 9,92 minutos, que mostrou ser composto por manose e glucose em proporção molar de 2:1 e forneceu o valor de $+3^\circ$ na análise de rotação específica.

O espectro de RMN ^1H (Figura 24) mostrou 3 sinais de H-1 de áreas aproximadamente iguais em δ 4,55 (d, $J_{1,2} = 8,04$ Hz), 5,10 (d, $J_{1,2} = 1,60$ Hz) e 5,42 (d, $J_{1,2} = 1,78$ Hz), que correspondem, respectivamente, às unidades de β -D-Glcp e unidades não redutora e redutora de α -D-Manp. Também podem ser observados sinais de pequena intensidade do trissacarídeo correspondente ao composto de ponta redutora β -D-Manp; porém, como a forma predominante da Manp em solução é alfa, somente este anômero foi estudado.

Assim, com auxílio das análises de RMN bidimensionais e utilizando o programa WIN-NMR, as correspondentes correlações foram determinadas, ou seja, a partir de H-1 foram determinados os H-2, e assim por diante. Os deslocamentos químicos e constante de acoplamento obtidos com auxílio de H,H COSY (Figura 25) são mostrados na Tabela 12. As análises bidimensionais permitiram o assinalamento de todos os prótons desta molécula (ver Figura 24).

Como existem duas unidades de manose e uma de glucose, a seqüência destas unidades foi determinada pelo espectro de NOESY (Figura 26), o qual indicou que H-1 da unidade não redutora de α -D-Manp (A) produziu um nOe interresidual com H-2 da unidade redutora de Manp (C). Da mesma forma, o H-1 da unidade não redutora de β -Glcp (B) mostrou nOe interresidual com H-4 ligado à C-4. Com o objetivo de estabelecer os sinais de ^{13}C , análise de HMQC (Figura 27) forneceu os seguintes deslocamentos químicos para os C-1: unidade

reduzora de α -Manp, δ 92,7; unidade não reduzora de α -Manp, δ 102,4; e unidade não reduzora de β -Glc p, δ 102,9.

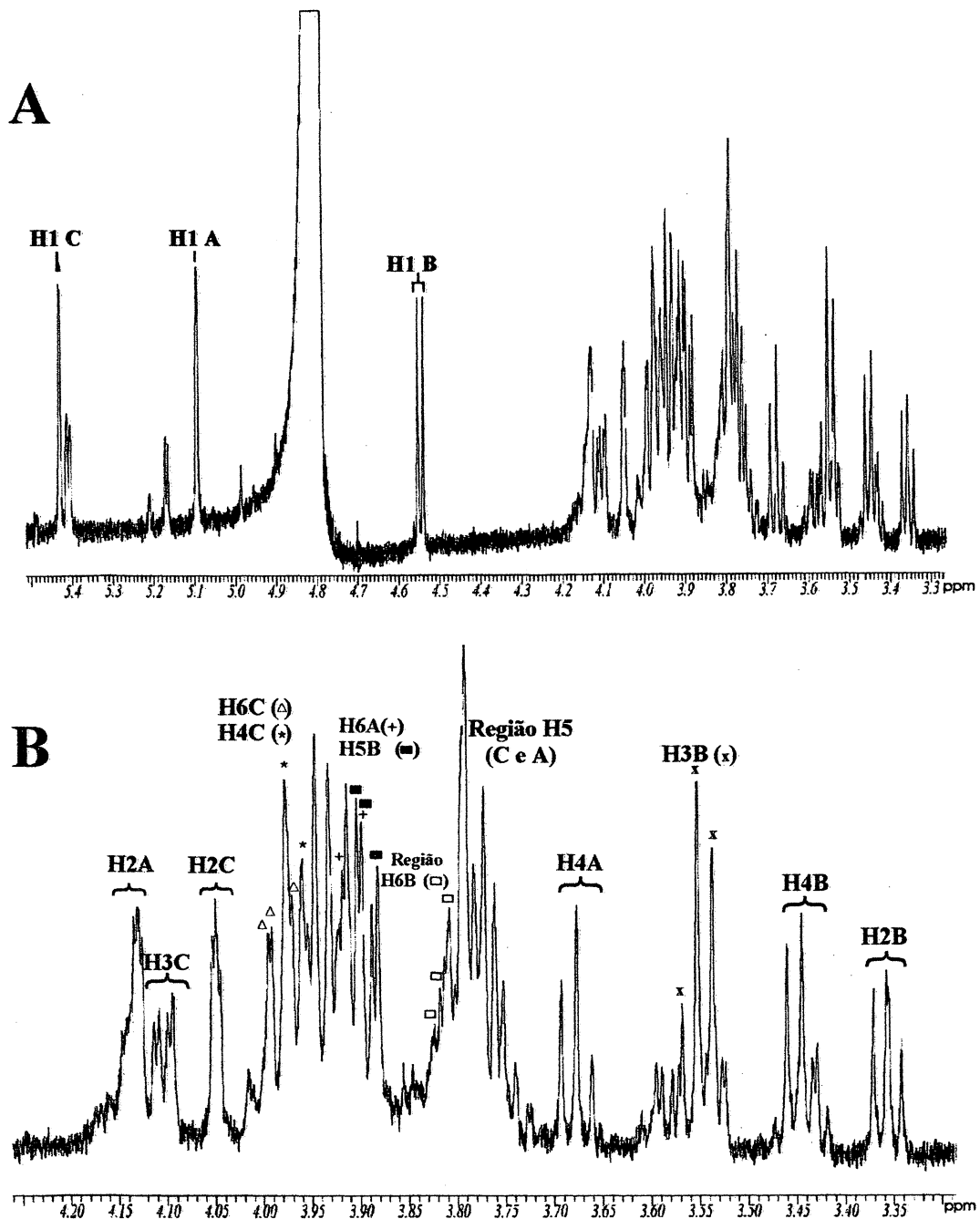


FIGURA 24 - Espectro de RMN ^1H de α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Glc p-(1 \rightarrow 4)]- α β -D-Manp obtido da galactoglucomanana de *C. substellata* em D_2O , a 25°C (A). Região expandida entre δ 4,20 e 3,35 (B). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. A: unidade não reduzora de α -D-Manp; B: unidade não reduzora de β -D-Glc p; C: unidade reduzora de α -D-Manp.

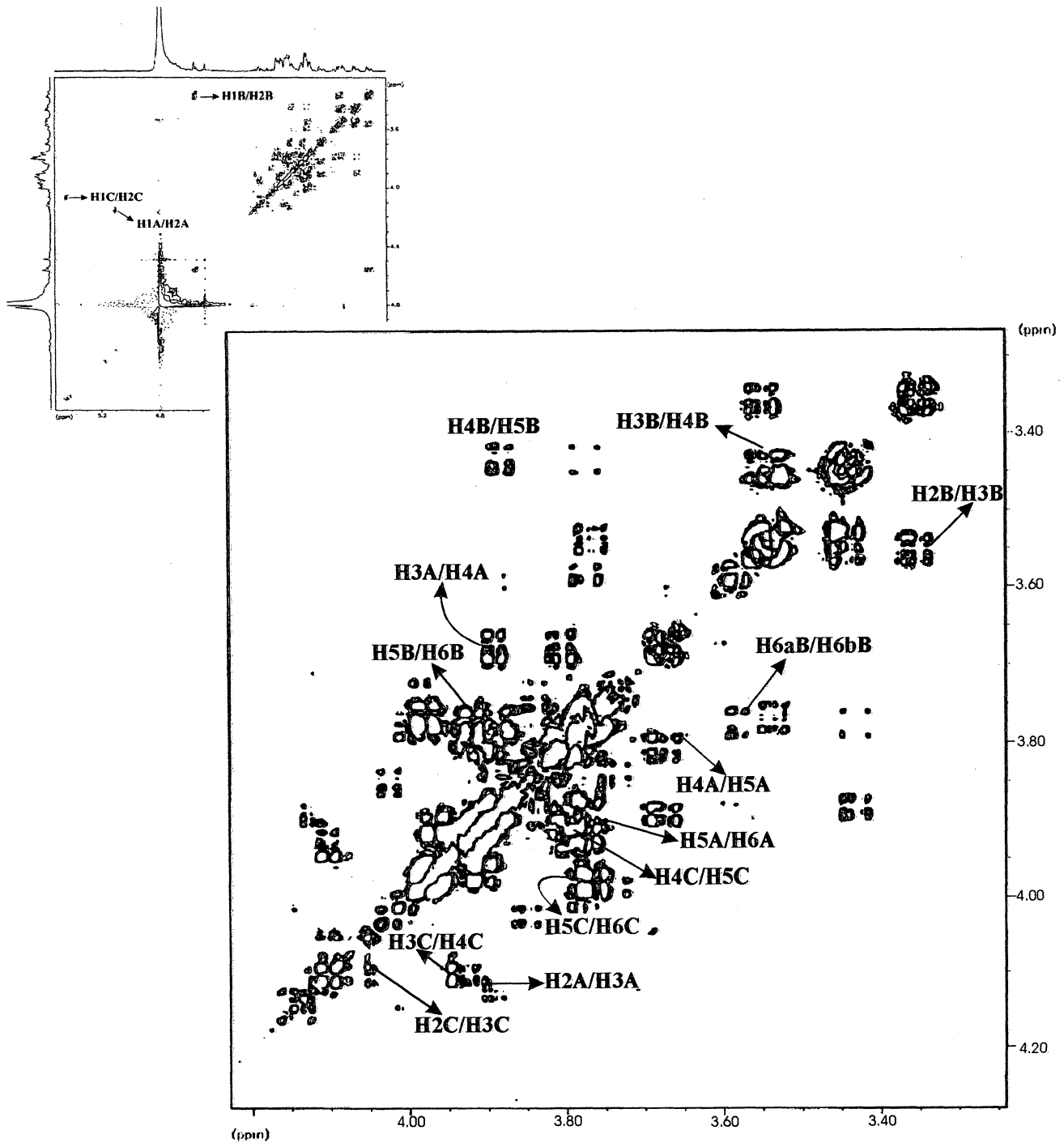


FIGURA 25 - Espectro de ^1H , ^1H COSY de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}[\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)]-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ obtido da galactoglucomanana de *C. substellata* em D_2O , a 25° . À esquerda, a região anomérica. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. A: unidade não redutora de $\alpha\text{-D-Manp}$; B: unidade não redutora de $\beta\text{-D-Glcp}$; C: unidade redutora de $\alpha\text{-D-Manp}$.

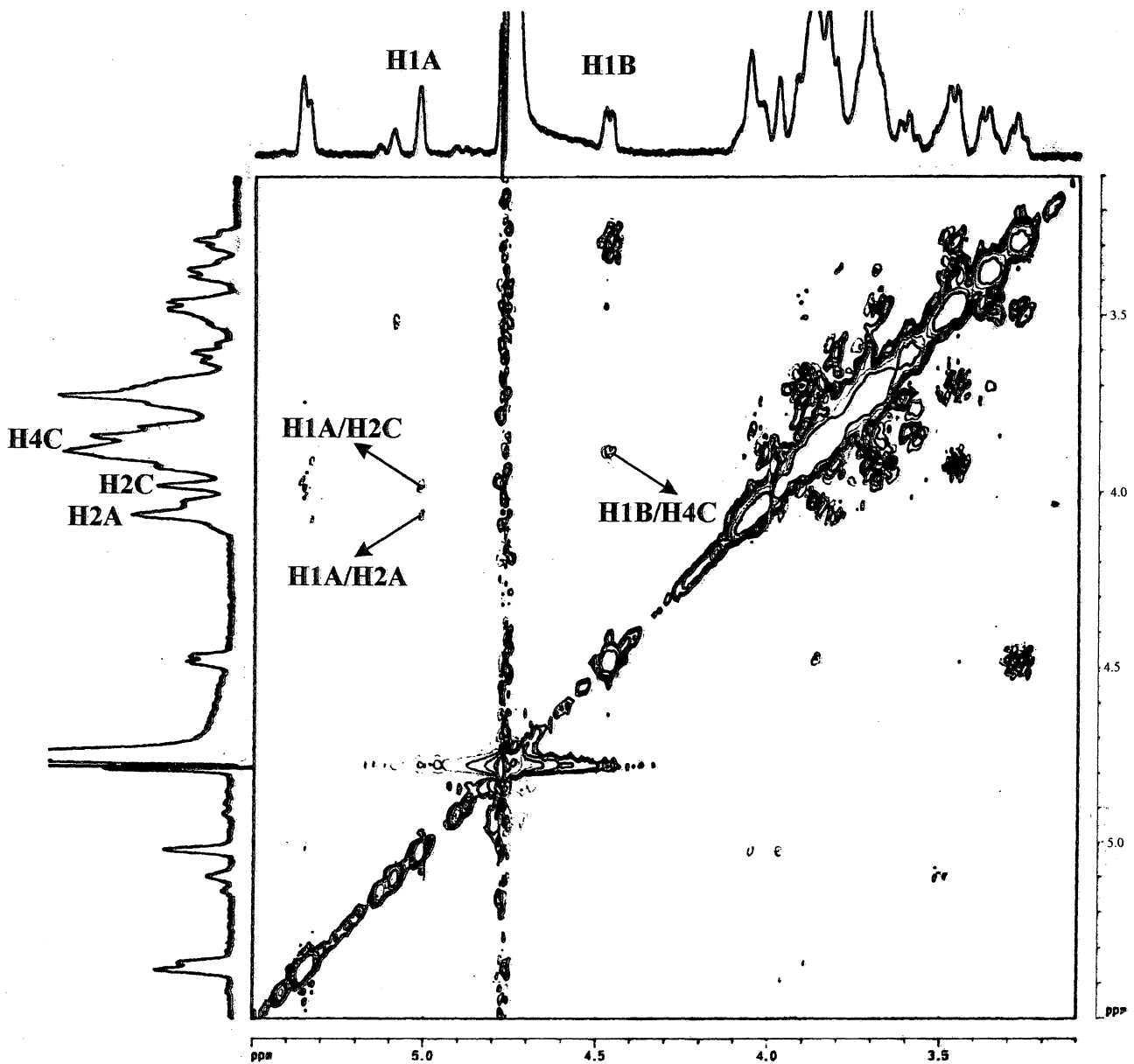


FIGURA 26 - Espectro de ^1H , ^1H NOESY de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}[\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)]-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ obtido da galactoglucomanana de *C. substellata* em D_2O , a 25°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. A: unidade não redutora de $\alpha\text{-D-Manp}$; B: unidade não redutora de $\beta\text{-D-Glcp}$; C: unidade redutora de $\alpha\text{-D-Manp}$.

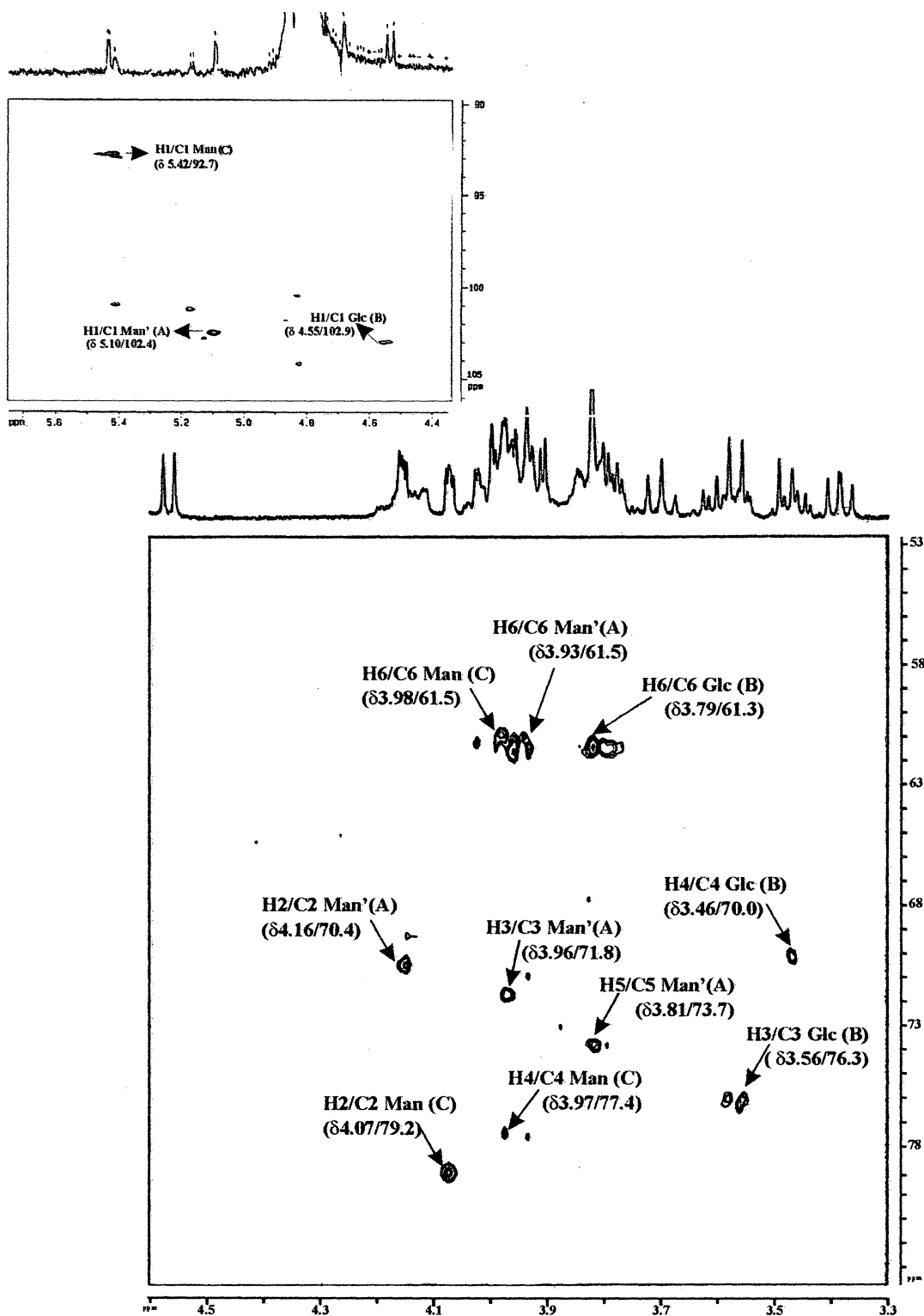
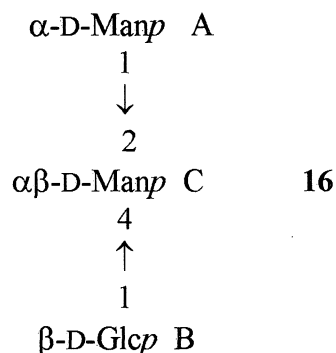


FIGURA 27 - Espectro de ^1H , ^{13}C HMQC de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}[\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)]-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ obtido da galactoglucomanana de *C. stellata* em D_2O , a 25°C . À esquerda, a região anomérica. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , ppm. A: unidade não redutora de $\alpha\text{-D-Manp}$; B: unidade não redutora de $\beta\text{-D-Glcp}$; C: unidade redutora de $\alpha\text{-D-Manp}$.

As correlações de H-2 e H-4 da unidade redutora de Manp com os respectivos C-2 em δ 79,2 e C-4 em δ 77,4 também sugeriram que as ligações são do tipo (1→2) e (1→4).

Esses dados condizem com a estrutura ramificada representada em **16**.



Outros deslocamentos químicos e constantes de acoplamento foram determinados por meio de COSY e TOCSY, os quais podem ser observados na Tabela 12.

O dissacarídeo representado pela estrutura **14** parece comum aos polissacarídeos isolados de líquens; o da estrutura **15** foi descrito pela primeira vez na literatura (WORANOVICZ *et al.*, 1999). Este provavelmente se refere a uma ramificação da cadeia principal da manana ligada (1→6) e está de acordo com os dados de metilação e degradação de Smith: o derivado 2,4,6-tri-*O*-metil-galactose provém das mesmas unidades que originaram o galactitol com a oxidação com periodato de sódio, ou seja, unidades de Galp 3-*O*-substituídas. Com isso, novo fragmento estrutural pode ser sugerido para a galactoglucomanana isolada de *C. substellata*, embora ainda seja necessário obter informação sobre como esta unidade de galactose está ligada ao polissacarídeo.

A elucidação do trissacarídeo ramificado (estrutura **16**) foi de grande importância, pois os dados mostraram que a glucose é um componente do heteropolissacarídeo isolado de *C. substellata*, apesar de ignorar-se se este é um fator comum em espécies de *Cladonia* spp. previamente estudadas. Assim, é possível referir-se aos polímeros isolados da fração

Precipitado de Fehling como galactoglucomananas, quando a glucose se faz presente como componente monossacarídico.

A

TABELA 12 - Dados de RMN ^1H ^a para o trissacarídeo $\alpha\text{-D-manopiranosil-(1}\rightarrow\text{2)-}[\beta\text{-D-glucopiranosil-(1}\rightarrow\text{4)]-}\alpha\beta\text{-D-manopiranosil}$.

B

C

Unidade	Deslocamentos químicos ^1H (δ) e constantes de acoplamento					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a / b
A	5,10	4,13	3,90	3,68	3,80	3,92
	$J_{1,2}$ (1,60)	$J_{1,2}$ (2,03)	$J_{2,3}$ (3,48)	$J_{3,4}$ (9,58)	$J_{4,5}$ (10,17)	$J_{6a,6b}$ (12,6)
		$J_{2,3}$ (3,50)	$J_{3,4}$ (9,66)	$J_{4,5}$ (9,58)	$J_{5,6a}$ (4,9)	
B	4,55	3,35	3,55	3,45	3,88	3,78
	$J_{1,2}$ (8,04)	$J_{1,2}$ (8,73)	$J_{2,3}$ (9,0)	$J_{3,4}$ (9,39)	$J_{4,5}$ (9,75)	$J_{5,6a}$ (2,40)
		$J_{2,3}$ (8,77)	$J_{3,4}$ (9,39)	$J_{4,5}$ (9,75)	$J_{5,6b}$ (2,90)	$J_{6a,6b}$ (12,7)
C	5,42	4,05	4,11	3,95	3,78	3,98
	$J_{1,2}$ (1,78)	$J_{1,2}$ (1,95)	$J_{2,3}$ (3,39)	$J_{3,4}$ (9,00)	$J_{4,5}$ (10,17)	$J_{5,6a}$ (4,3)
		$J_{2,3}$ (3,40)	$J_{3,4}$ (8,73)	$J_{4,5}$ (10,2)	$J_{5,6a}$ (4,9)	$J_{6a,6b}$ (n.d.)

^a Em D_2O ; deslocamentos químicos em ppm relativos ao DSS interno, e constantes de acoplamento em parênteses (Hz)

n.r.: não resolvido

n.d.: a constante de acoplamento não foi determinada devido à sobreposição de sinais.

Principais nOes interglicosídicos:

H-1A \leftrightarrow H-2C

H-1B \leftrightarrow H-4C

4.2.4.2 Oligossacarídeos isolados de *Cladonia ibitipocae*

O dissacarídeo $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ foi purificado e caracterizado na forma do seu correspondente derivado acetil devido à maior facilidade em determinar sua estrutura através de RMN, como mostrado a seguir.

A conveniência em analisá-los na forma acetilada consiste principalmente no fato de que não existe grupo acetil no carbono envolvido na ligação glicosídica. Desta forma, o próton correspondente torna-se mais blindado e, conseqüentemente, absorve em campo mais alto. O mesmo ocorre com H-1 da unidade não redutora da molécula. Assim, torna-se evidente o tipo de ligação glicosídica do oligossacarídeo em estudo com a análise de RMN ^1H (1D); portanto a acetilação foi útil na análise de unidades terminais redutoras dos açúcares e na completa determinação da estrutura desta molécula, fornecendo espectros de RMN simplificados, livres de complicações devido aos anômeros redutores; porém a fim de confirmar o tipo de ligação, dados de nOe foram igualmente levados em consideração. Além disso, a etapa correspondente à desacetilação dos oligossacarídeos não foi necessária, o que significa maior rapidez no processo.

1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)-D-manopiranosose foi purificado com utilização de coluna cromatográfica conforme descrito em Materiais e Métodos, item 3.3.1.4. As frações que apresentaram maior concentração em carboidratos tiveram seu R_{lac} igual a 1,0. Estas foram analisadas por RMN 1D (^1H) e 2D (COSY, TOCSY e NOESY), e forneceram os valores apresentados na Tabela 13, p. 138.

O espectro de RMN ^1H (Figuras 28.1 e 28.2) mostrou 2 sinais de H-1 em δ 6,24 ($J_{1,2} = 2,1$ Hz) e 4,94 ($J_{1,2} = 1,8$ Hz), que equivalem, respectivamente, às unidades redutora e não-redutora de α -D-manopiranosose. O valor em campo baixo, δ 6,24 de H-1 redutor deve-se ao fato de o respectivo carbono conter um grupo acetil, tornando, desta forma, H-1 mais desblindado. A ligação glicosídica (1 \rightarrow 2) foi facilmente determinada devido à absorção em campo alto de H-2 (δ 4,03) da unidade redutora. O correspondente carbono, quando acetilado, mostra para o respectivo hidrogênio o valor de δ 5,26 (dados experimentais não mostrados); portanto quando este carbono está comprometido em ligação glicosídica e, conseqüentemente, não possui o grupo acetil, faz com que o correspondente hidrogênio absorva em campo mais alto.

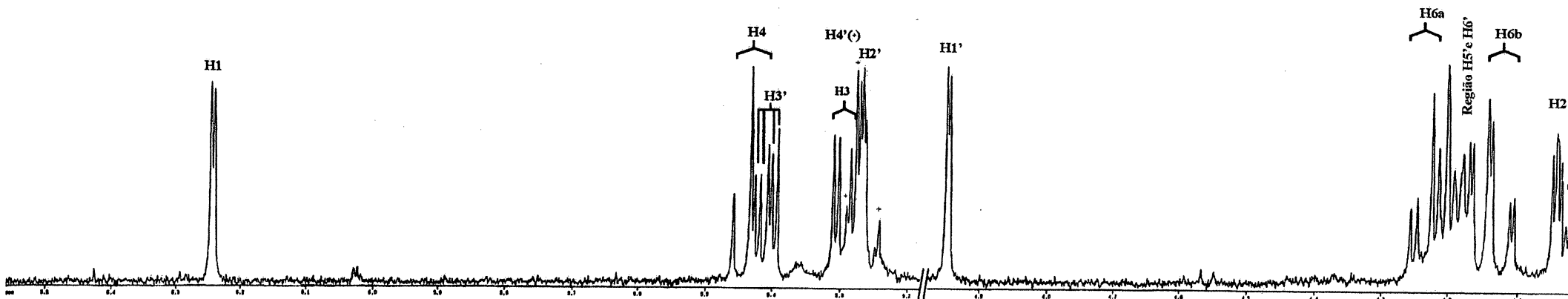


FIGURA 28.1 - Espectro de RMN ^1H de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)-D- $\alpha\beta$ -manopiranosose obtido da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* em CDCl_3 , a 25° C. Deslocamentos químicos em δ (ppm). A unidade não redutora foi representada por Hn' (n indica o próton de cada unidade).

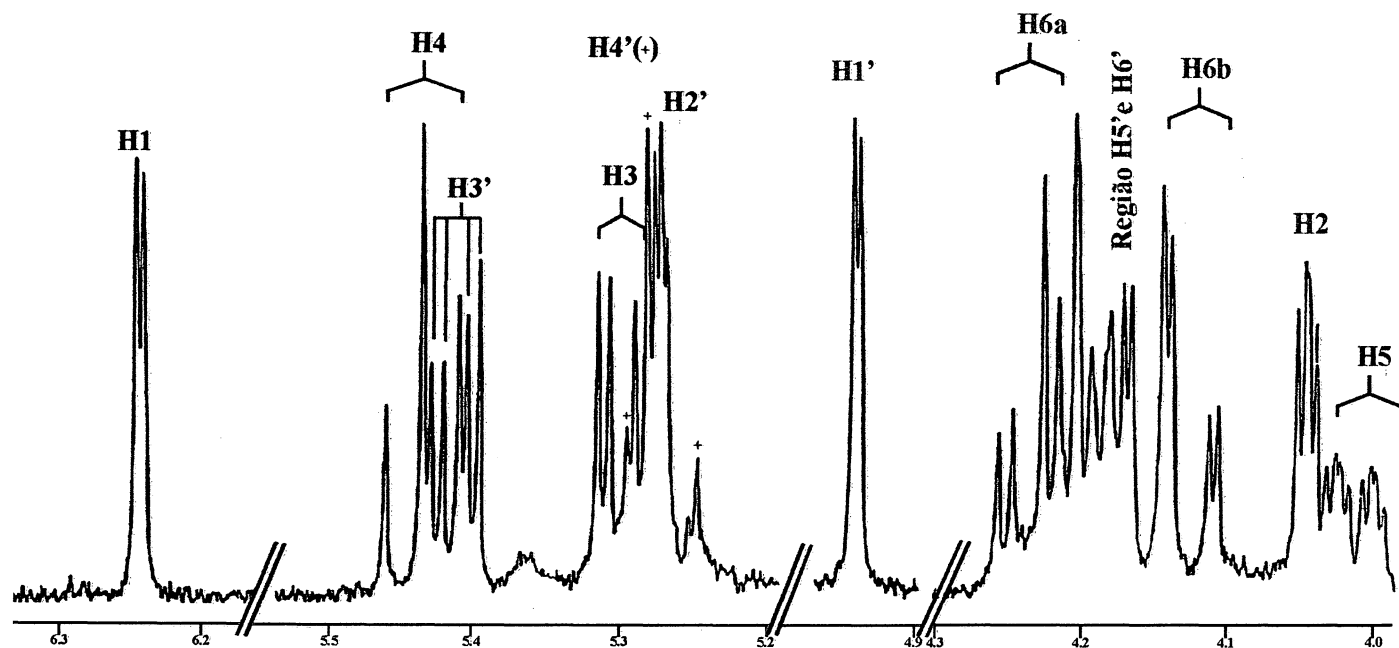


FIGURA 28.2 - Espectro parcial de RMN ^1H de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* em CDCl_3 , a 25°C . Deslocamentos químicos em δ (ppm). A unidade não redutora foi representada por Hn' (n indica o próton de cada unidade).

O espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Figuras 29.1 e 29.2) forneceu os dados necessários para estabelecer os dados mostrados na Tabela 13. Esses valores se basearam em dados experimentais obtidos de monossacarídeos acetilados, analisados por meio de técnicas de RMN 1D e 2D, além de dados descritos na literatura (OGAWA e YAMAMOTO, 1982). A análise de NOESY (Figura 30) confirmou que a ligação glicosídica deste dissacarídeo é do tipo 1 \rightarrow 2, onde podemos observar um contato interresidual entre H-1 e H-2 das unidades não-redutora e redutora de manopiranosose (H-1' e H-2) respectivamente.

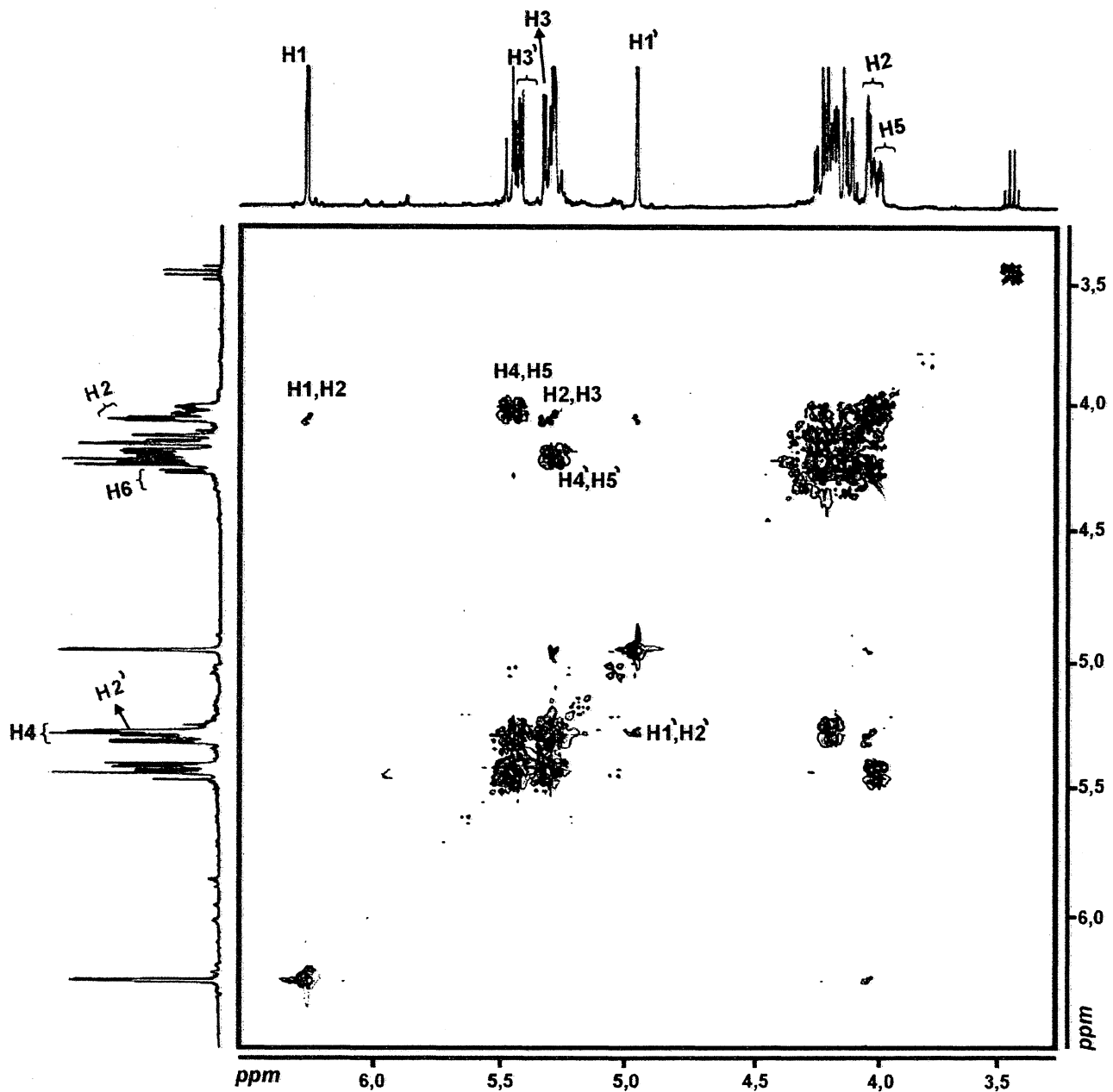


FIGURA 29.1 - Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* em CDCl_3 , a 25°C . Deslocamentos químicos em δ (ppm). A unidade não redutora foi representada por Hn' (n indica o próton de cada unidade).

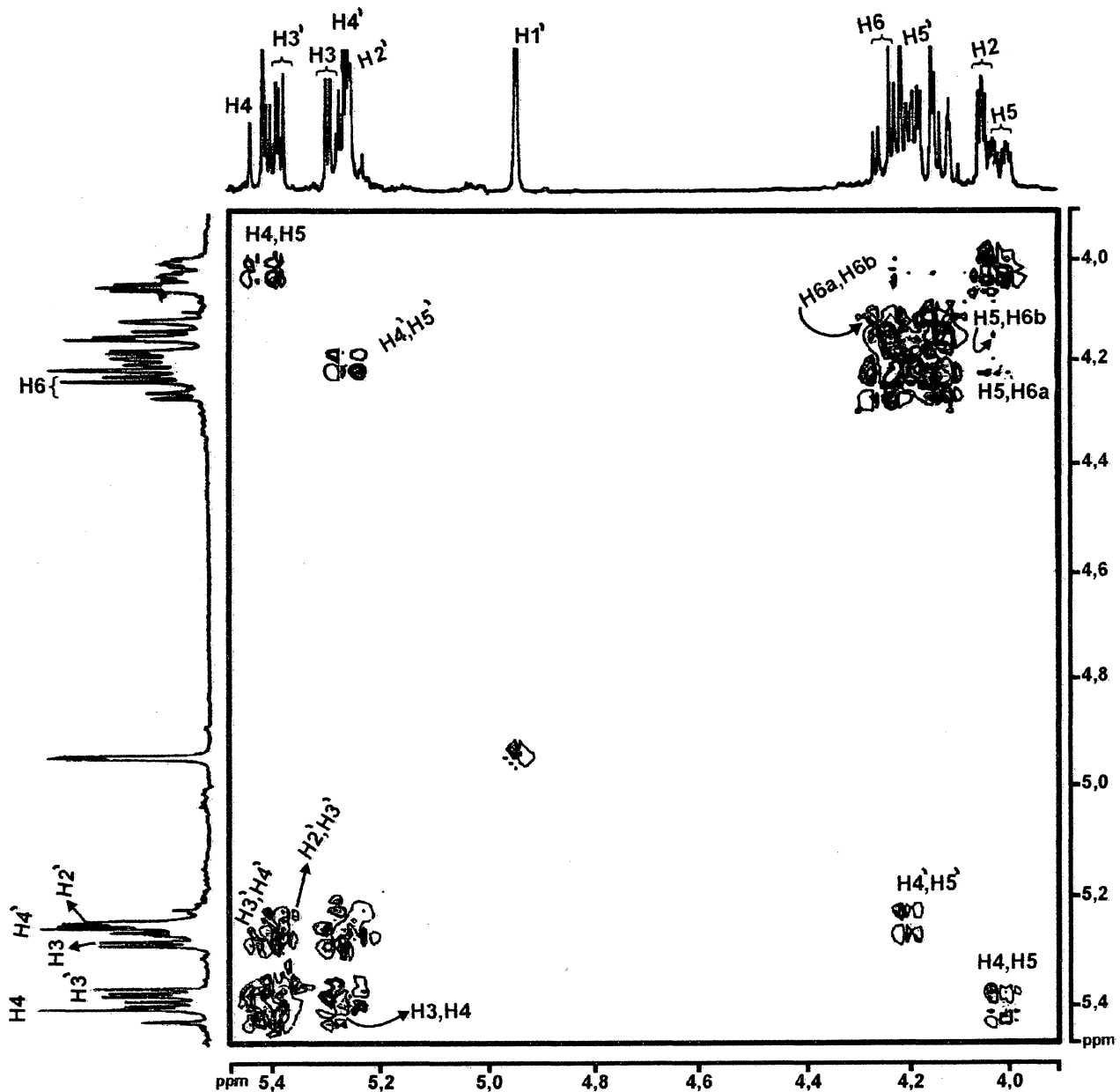


FIGURA 29.2 – Região expandida do espectro de $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* em CDCl_3 , a 25°C . Deslocamentos químicos em δ (ppm). A unidade não redutora foi representada por Hn' (n indica o próton de cada unidade).

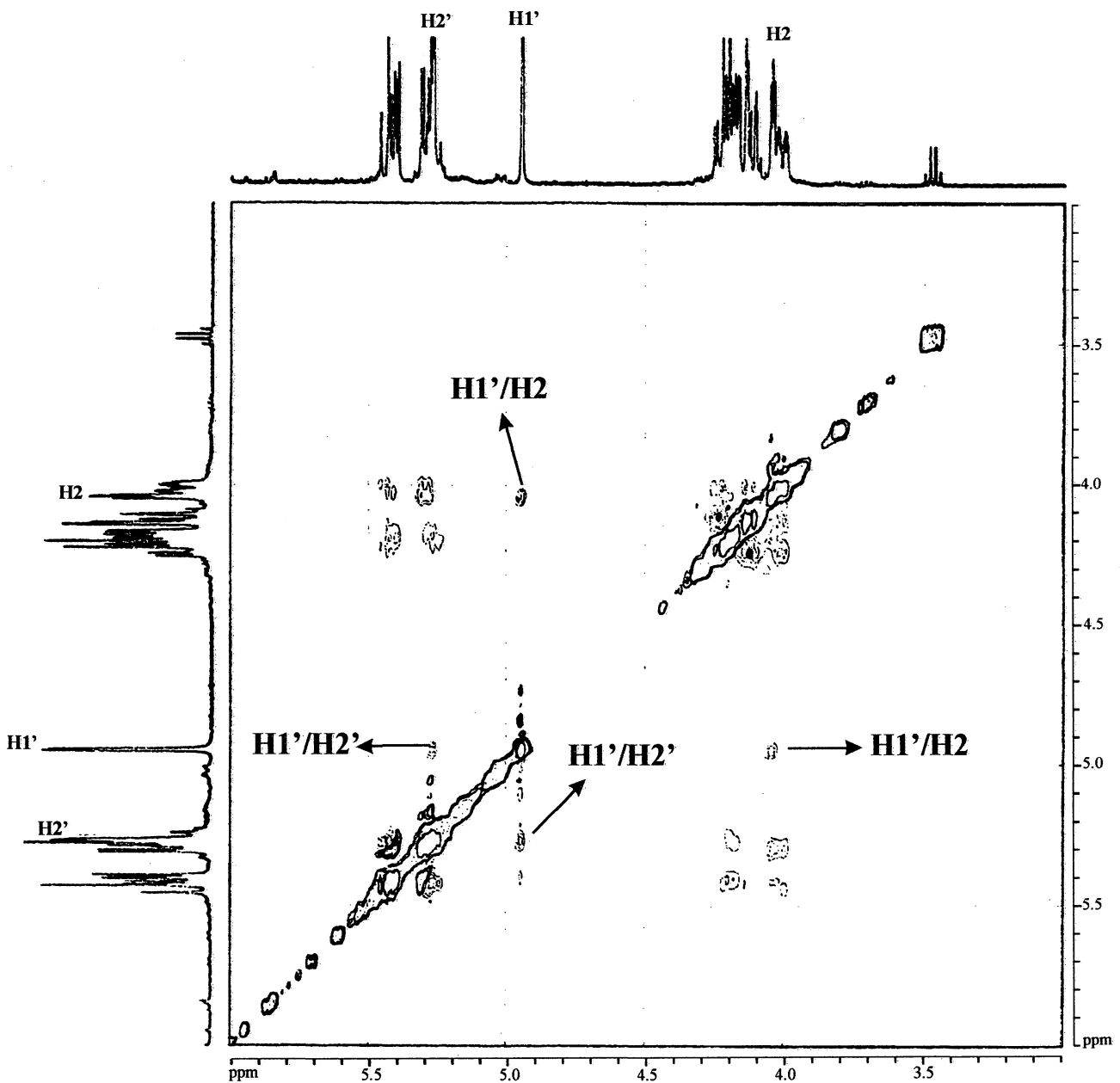


FIGURA 30 - Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)- α -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* em CDCl_3 , a 25°C . Deslocamentos químicos em δ (ppm). A unidade não redutora foi representada por Hn' (n indica o próton de cada unidade).

TABELA 13 - Dados de RMN ^1H ^a para o dissacarídeo 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)- α β -D-manopiranosose.

Unidade	Deslocamentos químicos ^1H (δ) e constantes de acoplamento					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a / b
\rightarrow 2)- α -D-Manp	6,24	4,03	5,29	5,43	4,01	4,23;4,12
	$J_{1,2}$ (2,1)	$J_{1,2}$ (2,4)	$J_{2,3}$ (3,0)	$J_{3,4}$ (10,0)	$J_{5,6a}$ (4,0)	$J_{5,6a}$ (4,0)
		$J_{2,3}$ (3,0)	$J_{3,4}$ (10,0)	$J_{4,5}$ (10,1)	$J_{5,6b}$ (2,5)	$J_{5,6b}$ (2,2)
						$J_{6a,6b}$ (12,4)
α -D-Manp-(1 \rightarrow	4,94	5,26	5,41	5,26	4,17	4,2-4,17;4,15
	$J_{1,2}$ (1,8)	$J_{1,2}$ (1,6)	$J_{2,3}$ (3,4)	$J_{3,4}$ (10,1)	$J_{5,6a}$ (4,1)	$J_{5,6b}$ (2,4)
		$J_{2,3}$ (3,2)	$J_{3,4}$ (9,)	$J_{4,5}$ (9,5)	$J_{5,6b}$ (2,4)	$J_{6a,6b}$ (12,5)

^a Em CDCl_3 ; deslocamentos químicos em ppm relativos ao TMS interno, e as constantes de acoplamento em parênteses (Hz)

n.r.: não resolvido

n.d.: a constante de acoplamento não foi determinada devido à sobreposição dos sinais.

Principais nOes interglicosídicos:

H_1 manose não-redutora \leftrightarrow H_2 manose redutora

H_1 manose redutora \leftrightarrow H_2 manose redutora

Misturas de oligossacarídeos foram também obtidas com outros solventes: acetato de etila: hexano (3:1) e acetato de etila 100%. Estas frações foram igualmente monitoradas por CCD e análises de RMN, mas eles não puderam ser separados porque não havia quantidade suficiente de material nestas frações.

Os produtos de acetólise parcial da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* foram examinados por HPLC em coluna de fase reversa após 48, 96 e 144 horas de reação (Figuras 31 A, 31 B e 31 C). Os componentes apresentaram tempos de retenção idênticos para cada tempo,

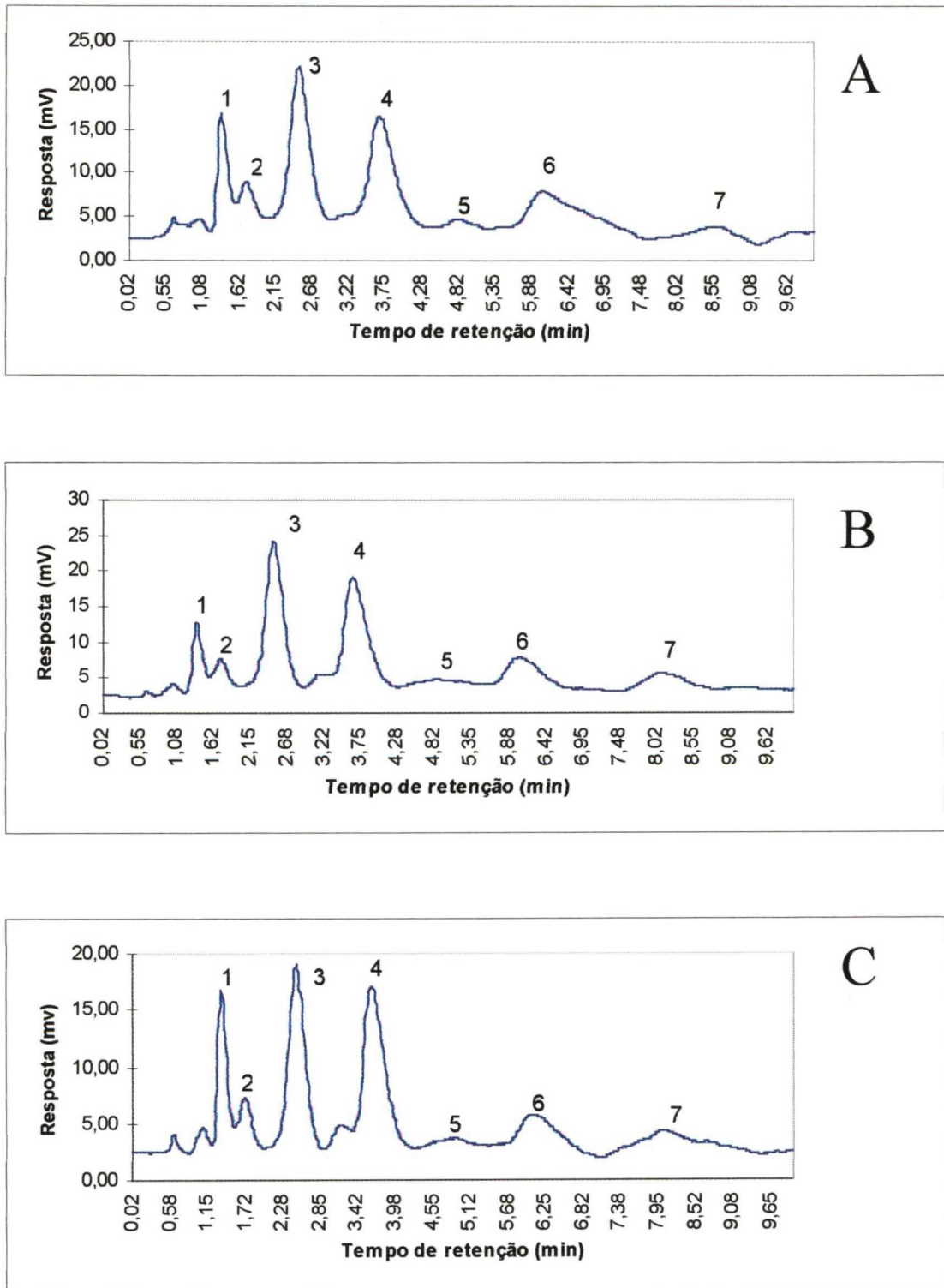


FIGURA 31 - Fracionamento de monossacarídeos e oligossacarídeos em HPLC, fase reversa, coluna Delta-Pak™C¹⁸-Waters, detectados por IR. Fonte: *C. ibitipocae*, após 48 (A), 96 (B) e 144 horas (C) em acetólise. Eluentes: 60% água, 40% acetonitrila. Fluxo: 3,0 mL/min. Concentração: A: 390 mg/mL; B: não determinada; C: 815 mg/mL.

mas o rendimento foi maior após 144 horas (aproximadamente o dobro do rendimento encontrado em 48 horas).

Todos os picos tiveram tempo de retenção no HPLC e R_f s na TLC que corresponderam aos obtidos para o heteropolissacarídeo de *C. substellata*; entretanto a análise de RMN ^1H mostrou que o componente equivalente a FR-4 continha apenas $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ e não $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$ acetilado.

O isolamento de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ por dois diferentes métodos nos leva a concluir que este dissacarídeo provavelmente é predominante no heteropolissacarídeo isolado de *C. ibitipocae*, quando o método de acetólise é utilizado para a produção de oligossacarídeos. Além disso, não houve diferença na composição da fração correspondente ao pico FR-4 dos cromatogramas relacionados ao tempo de acetólise, o que significa, para esta galactoglucomanana, que o número de horas não alterou a produção deste dissacarídeo.

Outra fração de oligossacarídeo correspondente ao pico FR-6 (Figura 31) foi analisada também na forma acetilada. Desta fração foi isolado o oligossacarídeo 1,3,6-tri-*O*-acetil-(2,3,4,6-tetra-*O*- acetil- α - D- manopiranosil)- [4-*O*- (2,3,4,6- tetra- *O*- acetil- β - D- glucopiranosil)]- D-manopiranosose. Este trissacarídeo teve sua estrutura elucidada por meio de RMN 1D (^1H) e 2D (COSY, TOCSY, NOESY), como pode ser observado nas Figuras 32, 33, 34 e 35 e forneceram os valores apresentados na Tabela 14.

O espectro de RMN ^1H (Figura 32) mostrou 3 sinais de H-1 em δ 6,13 ($J_{1,2} = 2,1\text{Hz}$), 4,92 ($J_{1,2} = 1,8\text{ Hz}$) e 4,59 ($J_{1,2} = 8,1\text{Hz}$), que equivalem, respectivamente, às unidades redutora e não redutora de $\alpha\text{-D-manopiranosose}$ e da unidade de $\beta\text{-D-glucopiranosose}$. Como se explicou anteriormente, o valor em campo baixo de H-1 redutor deve-se ao fato de o respectivo carbono conter um grupo acetil, tornando, desta forma, este hidrogênio mais desblindado. As ligações glicosídicas foram determinadas com auxílio dos espectros de COSY (Figura 33) e TOCSY

(Figura 34), que permitiram a determinação dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento.

TABELA 14 - Dados de RMN $^1\text{H}^a$ para o trissacarídeo 1,3,6-tri-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)-[4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)]- $\alpha\beta$ -

D-manopiranose.

A

B

C

Unidade	Deslocamentos químicos ^1H (δ) e constantes de acoplamento					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a / b
A	4,92	5,37	5,29	5,32	4,13	4,21-4,17
	$J_{1,2}$ (1,83)	$J_{1,2}$ (1,83)	$J_{2,3}$ (n.r.)	$J_{3,4}$ (n.r.)	$J_{4,5}$ (10,38)	$J_{6a,6b}$ (12,4)
		$J_{2,3}$ (2,75)	$J_{3,4}$ (n.r.)	$J_{4,5}$ (n.r.)	$J_{5,6a}$ (4,27)	$J_{5,6a}$ (n.d.)
				$J_{5,6b}$ (2,0)	$J_{5,6b}$ (n.d.)	
B	4,59	4,95	5,16	5,11	3,76	4,48;4,08
	$J_{1,2}$ (8,09)	$J_{1,2}$ (8,09)	$J_{2,3}$ (9,0)	$J_{3,4}$ (9,46)	$J_{4,5}$ (9,61)	$J_{5,6a}$ (3,66)
		$J_{2,3}$ (9,0)	$J_{3,4}$ (9,46)	$J_{4,5}$ (9,61)	$J_{5,6a}$ (3,05)	$J_{5,6b}$ (2,14)
				$J_{5,6b}$ (1,83)	$J_{6a,6b}$ (12,7)	
C	6,13	3,99	5,30	4,13	3,91	4,45;4,15
	$J_{1,2}$ (2,14)	$J_{1,2}$ (n.r.)	$J_{2,3}$ (n.d.)	$J_{3,4}$ (9,61)	$J_{4,5}$ (9,92)	$J_{5,6a}$ (3,70)
		$J_{2,3}$ (2,60)	$J_{3,4}$ (n.d.)	$J_{4,5}$ (9,43)	$J_{5,6a}$ (3,7)	$J_{5,6b}$ (3,0)
				$J_{5,6b}$ (2,14)	$J_{6a,6b}$ (12,4)	

^a Em CDCl_3 ; deslocamentos químicos em ppm relativos ao TMS interno, e constantes de acoplamento em parênteses (Hz)

n.r.: não resolvido

n.d.: a constante de acoplamento não foi determinada devido à sobreposição de sinais.

Principais nOes interglicosídicos:

$\text{H}_{1A} \leftrightarrow \text{H}_{2C}$

$\text{H}_{1B} \leftrightarrow \text{H}_{4C}$

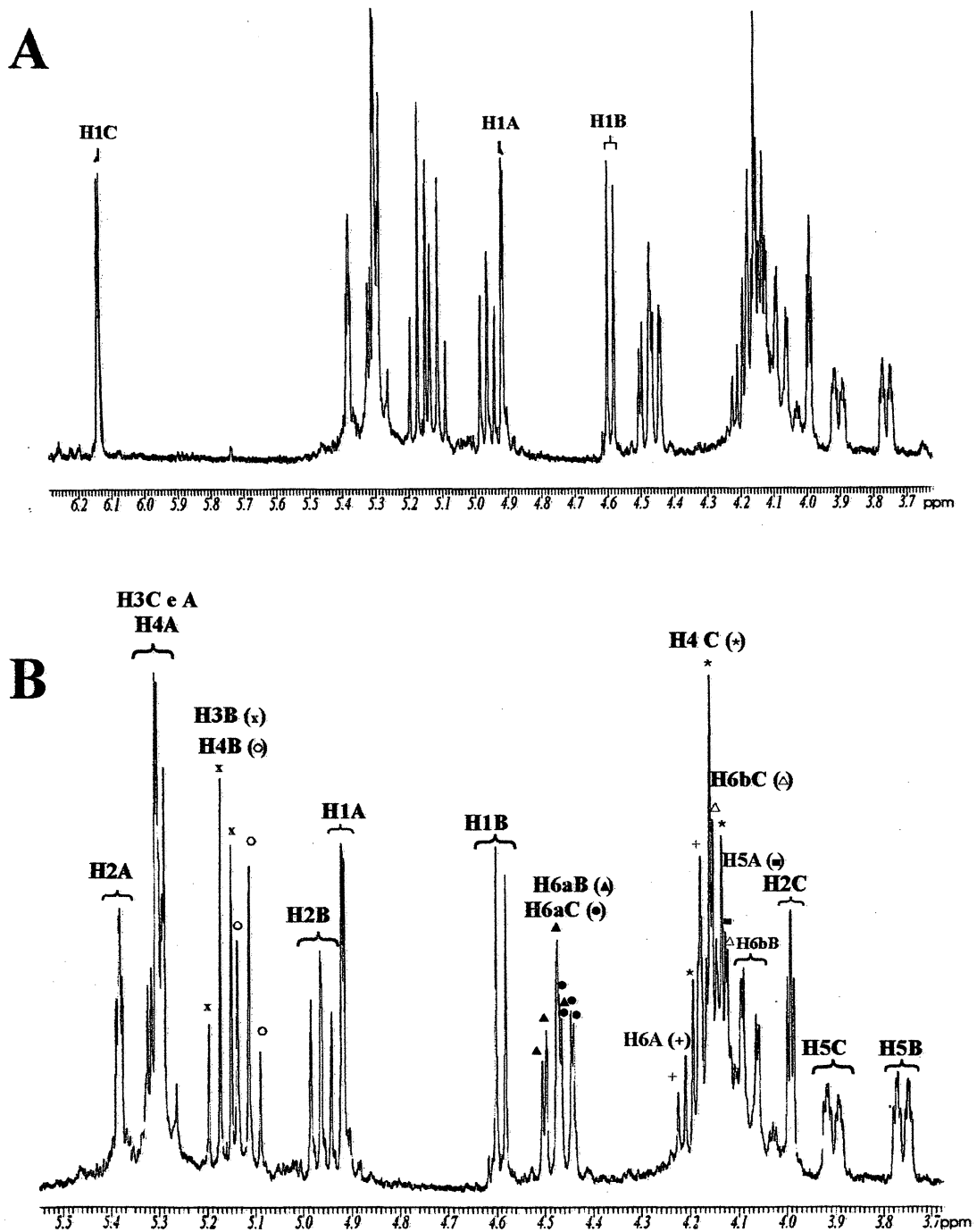


FIGURA 32 - Espectro de RMN ^1H de 1,3,6-tri-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)-[4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)]- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* em CDCl_3 , a 25°C (A). Região expandida entre δ 5,5 e 3,7 (B). Deslocamentos químicos em δ (ppm). A: unidade não redutora de α -D-Manp; B: unidade não redutora de β -D-Glcp; C: unidade redutora de α -D-Manp.

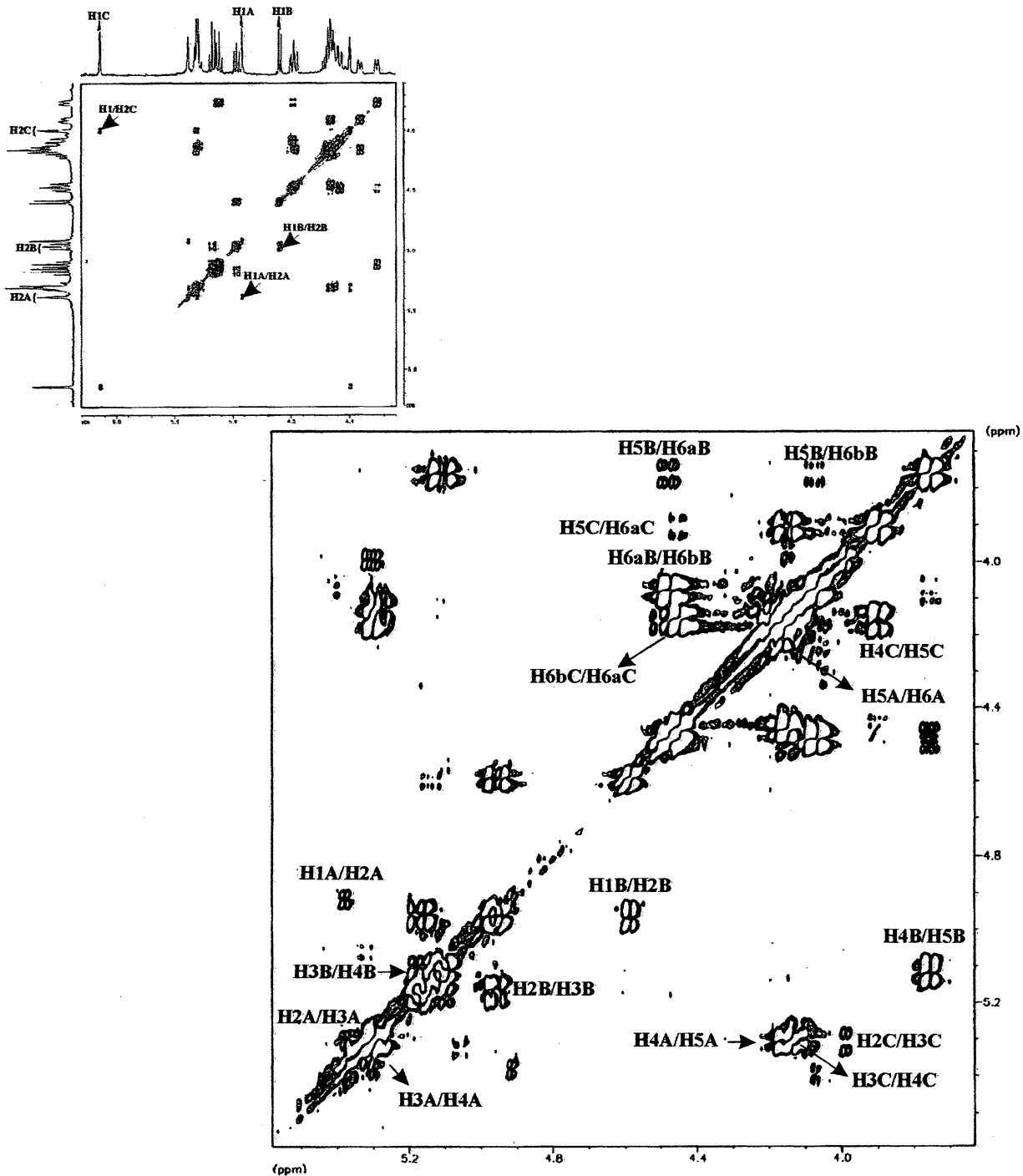


FIGURA 33 - Espectro de ^1H , ^1H COSY de 1,3,6-tri-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)-[4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)]- $\alpha\beta$ -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* em CDCl_3 , a 25°C . À esquerda, a região anomérica. Deslocamentos químicos em δ (ppm). A: unidade não redutora de α -D-Manp; B: unidade não redutora de β -D-Glcp; C: unidade redutora de α -D-Manp.

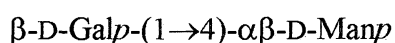
Nesse experimento, o espectro TOCSY (Figura 34) foi importante na elucidação de qual sinal de H-4 corresponde às unidades redutora e não-redutora de manose, pois H-3 das unidades de Man α p absorvem muito próximas uma da outra (5,29 e 5,30 ppm): a correlação de H-2 com H-5 da unidade redutora é evidente neste espectro; portanto ao conhecer o sinal de H-5 da unidade redutora, a correlação obtida no COSY foi definitiva para definir H-4 desta unidade. Com isto, foi comprovado que Man α p terminal redutora possui C-2 e C-4 envolvidos em ligações glicosídicas, pois seus respectivos H-2 e H-4 absorvem em campo alto (3,99 e 4,13 ppm respectivamente), ou seja, não existe o grupo acetil nestas posições.

O tipo de ligação desta molécula foi confirmado pelo espectro de NOESY (Figura 35), que mostrou principais nOes interglicosídicos entre H-1 de Man α p não-redutora com H-2 da Man α p redutora e também entre H-1 da unidade de Glc α p com H-4 da unidade redutora de Man α p.

4.2.4.3 Oligossacarídeos isolados de *Cladonia penicillata*

α -D-Man α p-(1 \rightarrow 2)- α β -D-Man α p e β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α β -D-Man α p foram obtidos e detectados exatamente da mesma maneira que se descreve para a mistura de dissacarídeos de *C. substellata* (item 4.2.4.1). O perfil de eluição em HPLC, fase reversa, mostrado na Figura 36 (p. 147), é muito semelhante aos mostrados para *C. ibitipocae* e *C. substellata*.

As alíquotas correspondentes a cada pico foram coletadas e analisadas por RMN 1 H. A fração do pico 4 mostrou ser composta pela mistura de α -D-Man α p-(1 \rightarrow 2)- α β -D-Man α p (**14**, p. 112) e β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α β -D-Man α p (**17**) na forma acetilada mediante análises de RMN 1 H e COSY. Os dados podem ser analisados na Tabela 15 (p. 148).



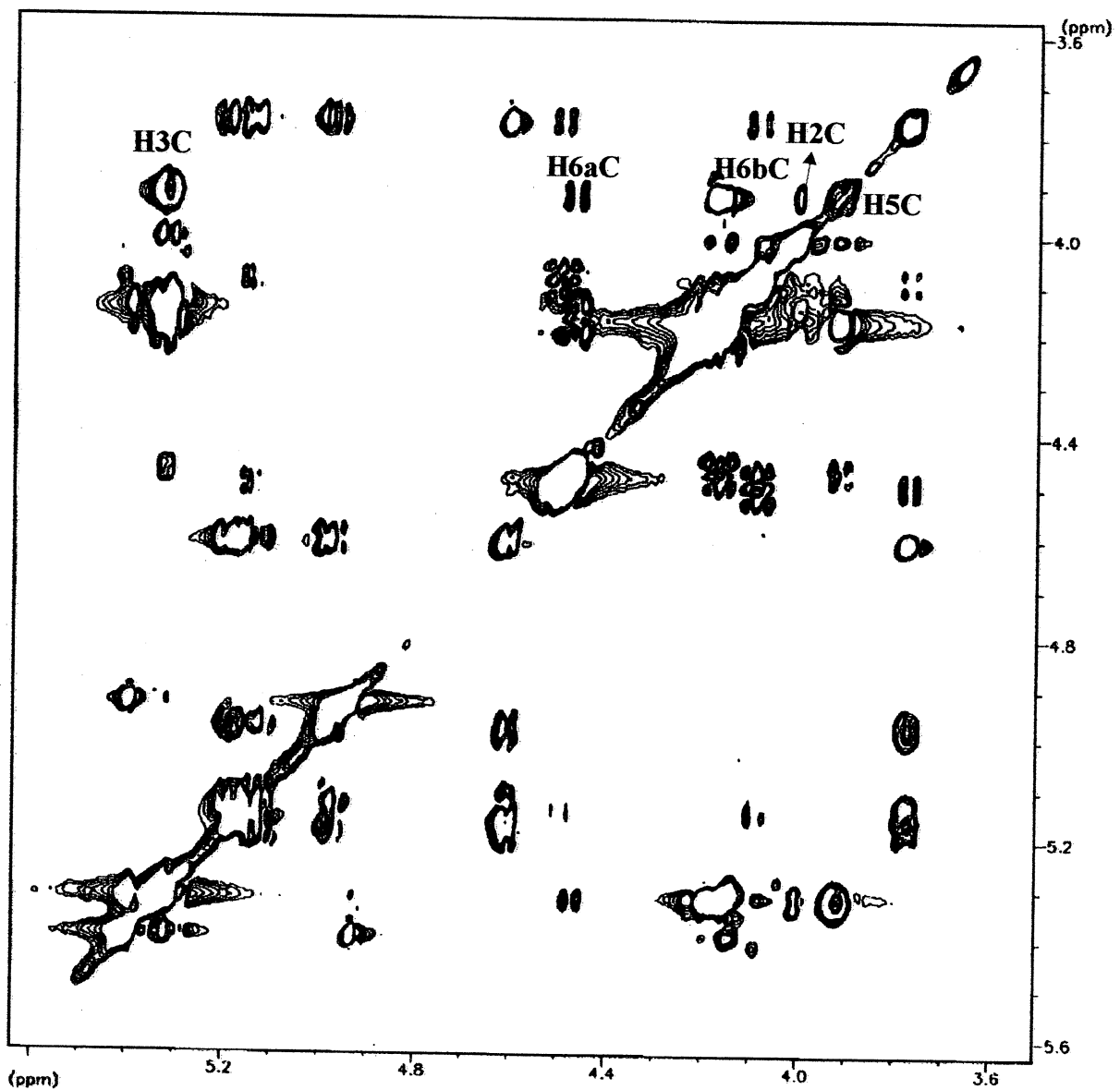


FIGURA 34 - Espectro de ^1H , ^1H TOCSY de 1,3,6-tri-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)-[4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)]- α -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* em CDCl_3 , a 25°C . Deslocamentos químicos em δ (ppm). C: unidade redutora de α -D-Manp.

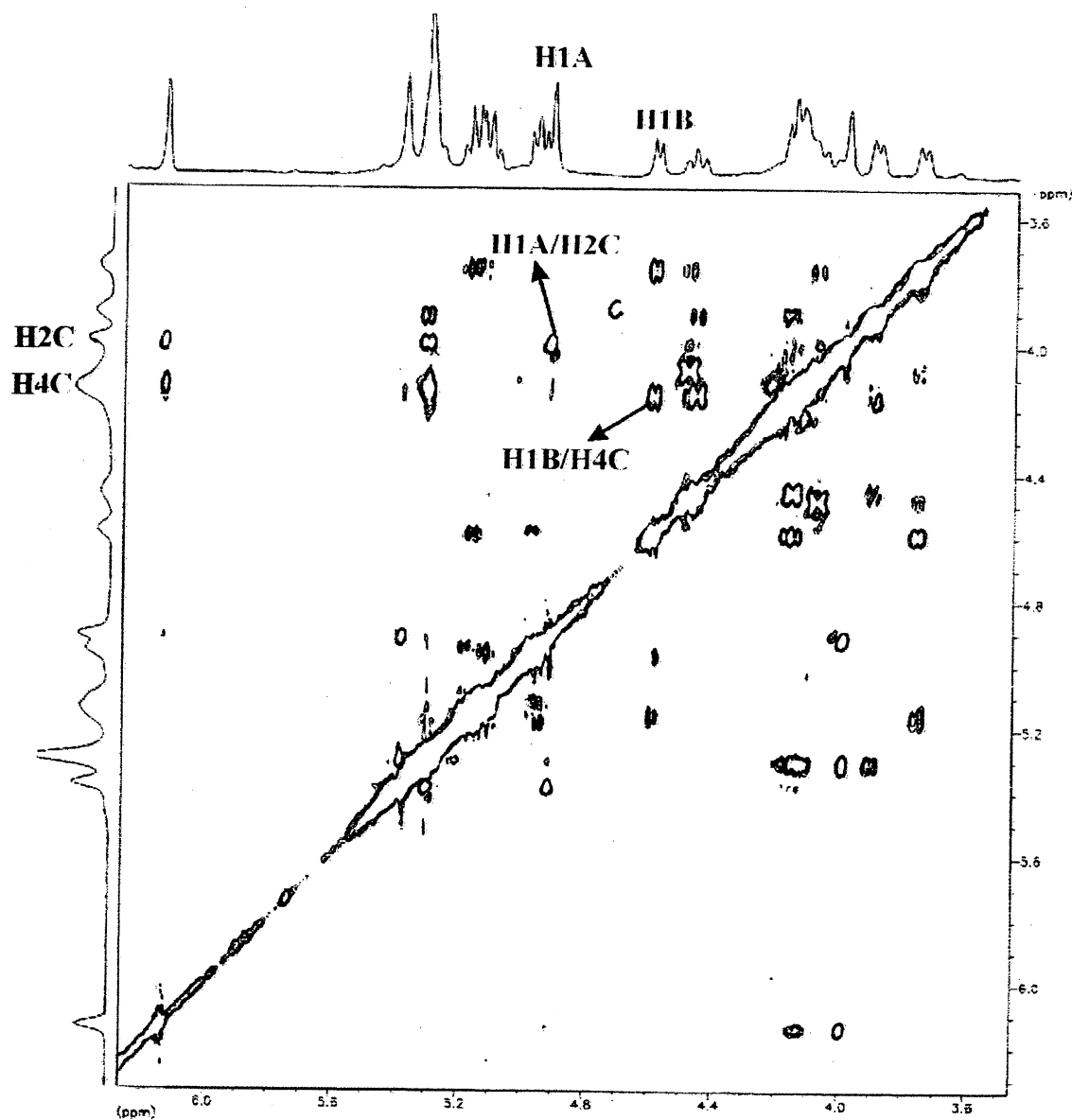


FIGURA 35 - Espectro de ^1H , ^1H NOESY de 1,3,6-tri-*O*-acetil-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosil)-[4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)]- α β -D-manopiranosose obtido da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* em CDCl_3 , a 25°C . Deslocamentos químicos em δ (ppm). A: unidade não redutora de α -D-Manp; B: unidade não redutora de β -D-Glcp; C: unidade redutora de α -D-Manp.

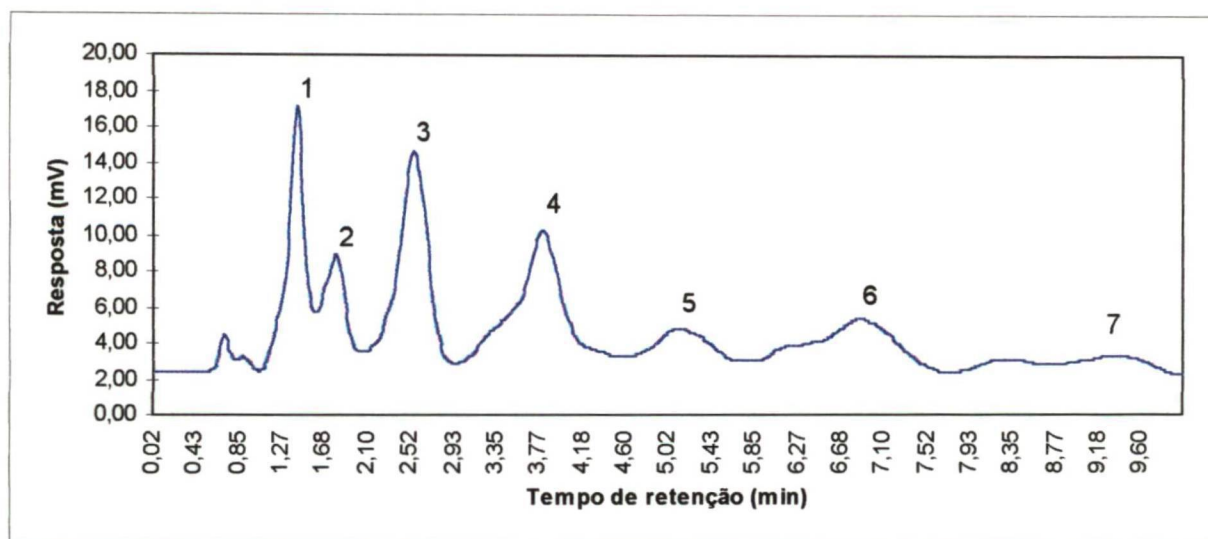


FIGURA 36 - Fracionamento de monossacarídeos e oligossacarídeos em HPLC, fase reversa, coluna Delta-PakTMC¹⁸-Waters, detectados por IR. Fonte: *C. penicillata*. Eluentes: 60% água, 40% acetonitrila. Fluxo: 3,0 mL/min. Concentração: 880 mg/mL.

Como se afirmou anteriormente, a presença de α -D-Manp-(1→2)- α -D-Manp foi confirmada comparando-se com o espectro puro desta molécula na forma acetilada.

O fragmento estrutural 17 provavelmente se refere às unidades de β -D-Galp ligadas à cadeia principal de unidades de manose ligadas (1→6) (δ 104,6 no espectro de RMN ¹³C), presentes em todos os polissacarídeos em estudo. Como as condições de obtenção dos oligossacarídeos foram iguais para todas as amostras, é possível que *C. penicillata* apresente maior proporção dessas ramificações em sua galactoglucomanana em relação às outras espécies.

A fração correspondente ao pico 6 (Figura 36) mostra a presença de uma molécula

diferente das anteriormente citadas e sugere a presença de um tetrassacarídeo.

TABELA 15 - Dados de RMN $^1\text{H}^a$ para os dissacarídeos $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ e $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ (acetilados) em CDCl_3 .

Unidade	Deslocamentos químicos ^1H (δ) e constantes de acoplamento					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a e 6b
$\rightarrow\text{2)-D-Manp}$	6,24	4,03	5,29	5,43	4,01	4,12
	$J_{1,2}$ (2,1)	$J_{2,3}$ (3,0)	$J_{3,4}$ (10,0)	$J_{4,5}$ (10,1)	$J_{5,6a}, J_{5,6b}$ (4,0; 2,5)	$J_{6a,6b}$ (12,4)
$\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$	4,94	5,26	5,41	5,26	4,17	4,15-4,21
	$J_{1,2}$ (1,8)	$J_{2,3}$ (3,2)	$J_{3,4}$ (9,9)	$J_{4,5}$ (n.d.)	$J_{5,6}$ (n.d.)	$J_{6a,6b}$ (n.d.)
$\rightarrow\text{4)-D-Manp}$	6,02	5,23	5,36	3,97	4,15	4,35; 4,08
	$J_{1,2}$ (2,2)	$J_{2,3}$ (3,4)	$J_{3,4}$ (10,0)	$J_{4,5}$ (n.r.)	$J_{5,6}$ (n.d.)	$J_{6a,6b}$ (n.d.)
$\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$	4,56	5,15	4,99	5,35	3,99	4,20-4,00
	$J_{1,2}$ (8,0)	$J_{2,3}$ (10,5)	$J_{3,4}$ (3,4)	$J_{4,5}$ (n.r.)	$J_{5,6a}$ (7,3)	$J_{6a,6b}$ (n.d.)

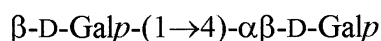
^a Constantes de acoplamento são mostradas em parênteses (Hz)

n.r.: não resolvido

n.d.: constante de acoplamento não determinada devido à sobreposição dos sinais.

4.2.4.4 Oligossacarídeos isolados de *Cladonia crispatula* e *C. miniata*

A mistura dos dissacarídeos $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ (14) e $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$ (18) foram obtidos e detectados exatamente da mesma maneira que se descreveu para os oligossacarídeos no item anterior. O perfil de eluição em HPLC, fase reversa, para os oligossacarídeos obtidos de *C. crispatula* é mostrado na Figura 37. O perfil de eluição obtido para a espécie *C. miniata* foi idêntico.



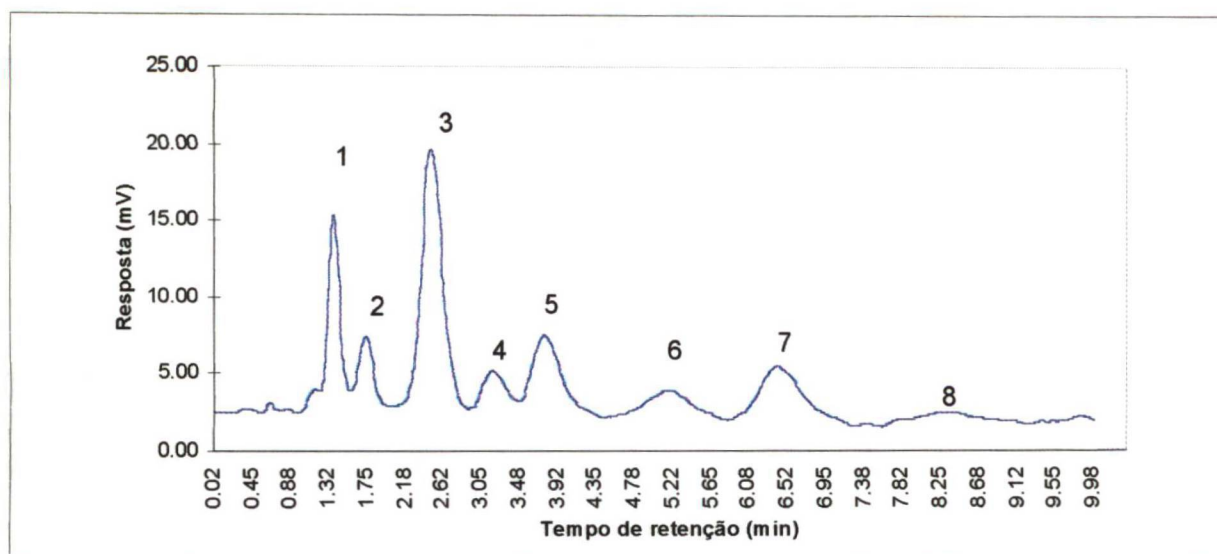


FIGURA 37 - Fracionamento de monossacarídeos e oligossacarídeos em HPLC, fase reversa, coluna Delta-Pak™C¹⁸-Waters, detectados por IR. Fonte: *C. crispatula*. Eluentes: 60% água, 40% acetonitrila. Fluxo: 3,0 mL/min. Concentração: 880 mg/mL.

As alíquotas correspondentes a cada pico foram coletadas e analisadas por RMN ¹H. As frações correspondentes aos picos 4 e 5 mostraram ser compostas pela mistura dos dois dissacarídeos citados, por meio de análises de RMN ¹H e COSY. Os dados obtidos destas análises constam na Tabela 16.

A presença de α -D-Manp-(1→2)- α β-D-Manp nesta fração foi evidenciada comparando-se com o espectro puro desta molécula (isolada de *C. ibitipocae*) na forma acetilada.

O dissacarídeo correspondente à galactobiose foi observado em menor quantidade nesta fração, quando comparado à manobiose e foi analisado da mesma forma que para as moléculas acetiladas anteriormente descritas. O sinal em δ 4,25, correspondente ao H-4 de β -D-Galp não redutora, foi indicativo da substituição em O-4 desta unidade, uma vez que se encontra em campo mais alto que a respectiva unidade acetilada, que apresentaria sinal em δ 5,26 (dados experimentais).

TABELA 16 - Dados de RMN $^1\text{H}^a$ para os dissacarídeos $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ e $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\beta\text{-D-Galp}$ (acetilados) em CDCl_3 .

Unidade	Deslocamentos químicos ^1H (δ) e constantes de acoplamento					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a e 6b
$\rightarrow\text{2)-D-Manp}$	6,24	4,03	5,29	5,43	4,01	4,12
	$J_{1,2}$ (2,1)	$J_{2,3}$ (3,0)	$J_{3,4}$ (10,0)	$J_{4,5}$ (10,1)	$J_{5,6a}, J_{5,6b}$ (4,0; 2,5)	$J_{6a,6b}$ (12,4)
$\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$	4,94	5,26	5,41	5,26	4,17	4,15-4,21
	$J_{1,2}$ (1,8)	$J_{2,3}$ (3,2)	$J_{3,4}$ (9,9)	$J_{4,5}$ (n.d.)	$J_{5,6}$ (n.d.)	$J_{6a,6b}$ (n.d.)
$\rightarrow\text{4)-D-Galp}$	6,29	5,34	5,24	4,25	4,20	4,08 (H-6a)
	$J_{1,2}$ (3,7)	$J_{2,3}$ (9,5)	$J_{3,4}$ (3,0)	$J_{4,5}$ (2,0)	$J_{5,6}$ (n.d.)	$J_{6a,6b}$ (12,4)
$\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$	4,43	5,22	4,99	5,36	4,20-4,00	4,20-4,00
	$J_{1,2}$ (7,9)	$J_{2,3}$ (10,4)	$J_{3,4}$ (3,4)	$J_{4,5}$ (n.r.)	$J_{5,6}$ (n.d.)	$J_{6a,6b}$ (n.d.)

^a Constantes de acoplamento são mostradas em parênteses (Hz)

n.r.: não resolvido

n.d.: constante de acoplamento não determinada devido à sobreposição dos sinais.

A galactobiose provavelmente se refere, como no caso dos outros dissacarídeos estudados, a uma ramificação da cadeia principal do polímero e se encontra de acordo com os dados de metilação e degradação de Smith: o derivado 2,3,6-tri-*O*-metil-galactose (13% para cada espécie) provém das mesmas unidades que originaram o treitol (9% para *C. crispatula* e 6% para *C. miniata*) com a oxidação com periodato de sódio, ou seja, unidades de Galp 4-*O*-substituídas. Com isso, a galactobiose pode ser sugerida como uma ramificação das galactoglucomanas isoladas dessas espécies, embora seja interessante investigar sobre como este dissacarídeo esteja ligado ao polissacarídeo.

A fração correspondente ao pico 7 da Figura 37 mostrou a presença do mesmo trissacarídeo (estrutura 16) obtido nas espécies *Cladonia ibitipocae* e *C. substellata*.

4.2.4.5 Oligossacarídeos isolados de *Cladonia connexa*

Os dissacarídeos provenientes da galactoglucomanana de *C. connexa* purificados por HPLC mostraram-se idênticos aos obtidos para *C. substellata*. É interessante observar que, além de *C. salmonea*, cujos fragmentos estruturais não foram investigados, as únicas espécies que produziram galactitol na degradação de Smith e o derivado 2,4,6-tri-*O*-metil-galactose na análise de metilação, foram *C. connexa* e *C. substellata*. Isto pode explicar o motivo por que o dissacarídeo α -D-Manp-(1→3)- α -D-Galp foi encontrado somente nessas duas espécies.

Ainda assim, o pico que correspondeu ao trissacarídeo isolado de *C. substellata* não apresentou os mesmos sinais quando analisados por RMN ^1H . Aparentemente é a mesma molécula que indicou ser um tetrassacarídeo em *C. penicillata*.

O fato de *C. connexa* e *C. penicillata* não terem apresentado o trissacarídeo comum às outras espécies pode ser explicado pela ausência de glucose terminal não redutora nos dados de metilação. Apesar de suas galactoglucomananas conterem este monossacarídeo envolvido em outros tipos de ligação na molécula (ver Tabela 7, p. 92), o fragmento estrutural 10 (p. 95) aparentemente não está presente na fração Precipitado de Fehling de *Cladonia connexa* e *C. penicillata*.

4.2.4.6 Oligossacarídeo isolado de *Cladonia imperialis*

2-*O*- α -D-Manopiranosil- α -D-manose também foi purificado utilizando-se coluna cromatográfica, conforme se descreve em Materiais e Métodos (item 3.3.1.4). As frações obtidas foram monitoradas por meio de cromatografia em camada delgada, utilizando-se a mesma mistura de eluentes da fase móvel (acetato de etila: metanol: água, 4:2:1). Para revelação foi utilizada a mistura de sulfato cérico 1% e ácido molíbdico 1,5% em H_2SO_4 10%.

Duas frações apresentaram maior concentração em carboidratos (nº 15 e 20), observadas por TLC. A primeira apresentou uma mistura de monossacarídeos por meio de

RMN ^1H (dados não mostrados). A fração nº 20, que mostrou R_{mal} igual a 1,0, mostrou ser composta pelo dissacarídeo $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$, detectado por técnicas de RMN (1D e 2D).

O espectro de RMN ^1H mostrou 2 sinais de H-1 em δ 5,36 ($J_{1,2} = 1,2$ Hz) e 5,01 ($J_{1,2} = 1,7$ Hz), que equivalem, respectivamente, às unidades redutora e não redutora de $\alpha\text{-D-Manp}$, além de um pequeno sinal em δ 5,12 ($J_{1,2} = 1,6$ Hz), correspondente à forma $\beta\text{-D-Manp}$ (a forma α é predominante). Todos os sinais observados no espectro de RMN ^1H desta molécula são idênticos àqueles de $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\beta\text{-D-Manp}$ isolado de *C. substellata* (Figura 18, p. 117), o que indica que este dissacarídeo também é predominante no heteropolímero de *C. imperialis* quando a acetólise parcial é realizada. Os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento são mostrados na Tabela 9, p. 114.

O resumo dos oligossacarídeos produzidos a partir das galactoglucomanas via acetólise parcial, purificados e caracterizados pode ser observado na Tabela 17.

TABELA 17 - Oligossacarídeos produzidos a partir de galactoglucomananas das espécies em estudo.

Oligossacarídeo	<i>C. connexa</i>	<i>C. crispatula</i>	<i>C. ibitipocae</i>	<i>C. imperialis</i>	<i>C. miniata</i>	<i>C. penicillata</i>	<i>C. substellata</i>
α -D-Manp-(1→2)- α β -D-Manp	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
α -D-Manp-(1→3)- α β -D-Galp	✓						✓
β -D-Galp-(1→4)- α β -D-Manp						✓	
β -D-Galp-(1→4)- α β -D-Galp		✓			✓		
α -D-Manp-(1→2)-[β -D-Glcp-(1→4)]- α β -D-Manp		✓	✓		✓		✓

5 CONCLUSÕES

O estudo e pesquisa desta dissertação permitem elencar as seguintes conclusões:

5.1) Glucanas do tipo nigerana, ou seja, polímeros que contêm ligações alternadas de α -D-glucose (1 \rightarrow 3)- e (1 \rightarrow 4) na proporção de 1:1, foram encontradas em todas as espécies de *Cladonia* investigadas. Parece provável que a nigerana seja comum a todas as espécies deste gênero.

5.2) Com exceção de *Cladonia furcata* (nº 23007 e 22975), todas as espécies de *Cladonia* estudadas apresentaram galactomanoglucanas semelhantes na fração Sobrenadante de Fehling, com cadeia principal constituída de unidades de β -D-Glcp unidas por ligações (1 \rightarrow 3) substituída por várias cadeias laterais de β -D-Galf e unidades de α -D-Manp 2-O-, 4-O-, 6-O- e 2,3-di-O-substituídas. Em *C. furcata* foi detectada a presença de uma α -D-glucana com proporção de ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) de 2:1. Para *Cladia aggregata*, a molécula encontrada nessa fração é estruturalmente diferente, sugerindo a presença de uma galactana. Em estudo com espécies de *Cladina* (IACOMINI *et al.*, 1985), estruturas distintas das estabelecidas neste estudo foram caracterizadas; portanto em conjunto com outras características utilizadas na taxonomia clássica, os polissacarídeos isolados da fração Sobrenadante de Fehling podem ajudar na classificação de espécies dos gêneros *Cladonia* e *Cladia*.

5.3) Galactoglucomananas foram obtidas de todas as espécies investigadas na fração Precipitado de Fehling; estas apresentaram cadeias principais de α -D-Manp unidas por ligações (1 \rightarrow 6), como aquelas comumente encontradas nos polissacarídeos desta fração de diversas espécies de líquens já investigadas. Estas podem ser não substituídas ou substituídas em vários padrões por cadeias laterais de α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-, β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-, β -D-Galf-(1 \rightarrow 2)-, β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)-, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)-, β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- e α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)-, como mono- ou

dissubstituintes na mesma unidade da cadeia lateral. Os padrões de substituição foram típicos para cada espécie liquênica e podem fornecer dados quimiotaxonômicos nesses seres.

5.4) Oligossacarídeos produzidos via acetólise parcial a partir das galactoglucomananas forneceram informações sobre a estrutura fina destas moléculas e estabeleceram semelhanças e diferenças mais específicas entre elas. Os dados mostraram que a glucose é componente do heteropolissacarídeo isolado das espécies investigadas, especialmente naquelas (*Cladonia crispatula*, *C. ibitipocae*, *C. miniata* e *C. substellata*) cujo fragmento α -D-Manp-(1→2)-[β -D-Glcp-(1→4)]- α β -D-Manp foi caracterizado. Essa estrutura é inédita em polissacarídeos isolados de líquens; no entanto não é possível afirmar se este é um fator comum na fração Precipitado de Fehling em espécies previamente investigadas.

5.5) O fragmento α -D-Manp-(1→2)- α β -D-Manp parece uma seqüência comum a todas as galactoglucomananas em estudo. Já a ramificação representada por α -D-Manp-(1→3)- α β -D-Galp foi encontrada apenas em *Cladonia connexa* e *C. substellata*. Além disto, esta estrutura não havia sido previamente descrita em literatura. Em *Cladonia crispatula* e *C. miniata* foi caracterizado o fragmento β -D-Galp-(1→4)- α β -D-Galp, que também representa uma ramificação de seus polímeros. A galactose de β -D-Galp-(1→4)- α β -D-Manp, isolado do polímero de *Cladonia penicillata*, provavelmente representa uma ramificação da cadeia principal composta por unidades de Manp, uma vez que essa parece ser uma seqüência comum em galactoglucomananas já estudadas.

5.6) As duas amostras de *Cladonia furcata* (23007 e 22975), das quais não se tinha certeza se uma era a forma jovem da outra ou se eram espécies distintas, mostraram composição química idêntica nas frações investigadas, embora com rendimentos diferentes; portanto a química dos

polissacarídeos sugere que sejam amostras da mesma espécie. As duas amostras de *Cladonia salmonea* (29692 e 29828) coletadas na mesma época, porém em locais diferentes, também apresentaram os mesmos resultados nas análises realizadas neste estudo. Estes fatos reforçam a utilização da química de polissacarídeos como auxílio à taxonomia clássica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J. K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. **J. Amer. Chem. Soc.**, Washington, v. 74, n. 19, p. 4970-4971, 1952.
- 2 AGRAWAL, P. K. N.M.R. spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry (Oxf)**, v. 31, n. 10, p. 3307-3330, 1992.
- 3 AHTI, T. Taxonomic studies on reindeer lichens. (*Cladonia*, subgenus *Cladina*). **Ann. Soc. Zool. - bot.fenn. "Vanamo"**, Helsinki, v. 32, n. 1, p. 1-160, 1961.
- 4 AHTI, T. (teuvo.ahiti@helsinki.fi). Re: *Cladonia* species. E-mail para WORANOVICZ, S. M. (sandraw@bio.ufpr.br) [mensagem capturada em 21 abr. 1999a].
- 5 AHTI, T. (teuvo.ahiti@helsinki.fi). Re: Fax. E-mail para WORANOVICZ, S. M. (sandraw@subsede.ufpr.br) [mensagem capturada em 01 jul. 1999b].
- 6 ASPINALL, G. O. General introduction. In: _____. **The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1982a. v. 1, p. 1-18.
- 7 _____. **The polysaccharides**. Orlando FL.: Academic Press, 1982b. v. 2.
- 8 BARON, M. **Isolamento e caracterização de α -D-glucana, laminarana, umbilicina e trealose do líquen *Stereocaulon ramulosum***. Curitiba, 1985. 110 p. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 9 _____. **Estudo comparativo entre carboidratos isolados dos líquens *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Räscher, *Newropogon aurantiaco-ater* e *Actinogyra muehlenbergii***. Curitiba, 1989. 199 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 10 BARON, M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Isolation and identification of a linear (1 \rightarrow 3)-linked β -D-glucan and other carbohydrate components of the lichen *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Räscher. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 177, p. 235-239, 1988.
- 11 _____. Structural studies on a galactomannan isolated from the lichen *Stereocaulon ramulosum*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 53, n. 7, p. 1751-1758, 1989.
- 12 BARON, M.; IACOMINI, M.; FANTA, E. S.; GORIN, P. A. J. Galactomannan, lichenan and isolichenan from the polysaccharide-rich lichen *Newropogon aurantiaco-ater*. **Phytochemistry (Oxf)**, v. 30, n. 9, p. 3125-3126, 1991.
- 13 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.**, Amsterdam, v. 97, p. 147-150, 1981.
- 14 BERZELIUS, J. J. Versuche über die Mischung des Isländischen Moores und Seine Anwendung als Nahrungsmittel. **J. Chem. Phys.**, New York, v. 7, p. 317-353, 1815.

- 15 BHATTACHARJEE, S. S.; GORIN, P. A. J. Identification of di-O-, tri-O- and tetra-O-methylmannoses by gas-liquid chromatography. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 47, n. 7, p. 1207-1215, 1969.
- 16 BOUVENG, H. O.; LINDBERG, B. Hydrolysis of methylated polysaccharides. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 296-298, 1965.
- 17 BRAUNSCHWEILER, L.; ERNST, R. R. Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. **J. Magn. Reson.**, New York, v. 53, n. 3, p. 521-528, 1983.
- 18 BUBRICK, P.; FRENSDORFF, A.; GALUN, M. Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th.Fr. which bind to phycobiont cell walls. Isolation and partial purification of an algal-binding protein. **Symbiosis**, Rehovot, v. 1, n. 1, p. 85-95, 1985.
- 19 BUBRICK, P.; GALUN, M.; FRENSDORFF, A. Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Localization in the intact lichen and cultured mycobiont. **Protoplasma**, Vienna, v. 105, n. 3/4, p. 207-211, 1981.
- 20 CHANDA, N. B.; HIRST, E. L.; MANNERS, D. J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland moss (*Cetraria islandica*). **J. Chem. Soc. (Lond)**, p. 1951-1958, 1957.
- 21 CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 209-217, 1984.
- 22 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.**, Washington, v. 96, n. 26, p. 8081-8087, 1974.
- 23 CORRADI DA SILVA, M. D. L. **Componentes carboidratados do líquen *Sticta damaecornis* (Sw.) Ach.** Curitiba, 1986. 90 p. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 24 _____. **Estudo de alguns carboidratos dos líquens *Sticta* sp. e *Parmotrema cetratum* (Ach.) Hale.** Curitiba, 1992. 157 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 25 CORRADI DA SILVA, M. D. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Unusual carbohydrates from the lichen, *Parmotrema cetratum*. **Phytochemistry (Oxf)**, v. 34, n. 3, p. 715-717, 1993a.
- 26 CORRADI DA SILVA, M. D. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Identification of lactose and D-volemitol in the lichen *Sticta damaecornis*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 62, n. 1, p. 9-11, 1990.
- 27 CORRADI DA SILVA, M. D. L.; IACOMINI, M.; JABLONSKI, E.; GORIN, P. A. J. Carbohydrate, glycopeptide and protein components of the lichen *Sticta* sp. and effect of storage. **Phytochemistry (Oxf)**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 547-552, 1993b.

- 28 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.
- 29 _____. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 113-125, 1972.
- 30 CZECZUGA, B.; BUBRICK, P. Investigation of carotenoids in lichens. IX. Carotenoids in lichens from Israel. **Isr. J. Bot.**, Jerusalem, v. 35, n. 1, p. 41-46, 1986.
- 31 CZECZUGA, B.; SKULT, H. Carotenoids in lichens of Southern Finland. **Ann. Bot. Fenn.**, Helsinki, v. 25, n. 3, p. 229-232, 1988.
- 32 CZECZUGA, B.; XAVIER-FILHO, L. Investigations on carotenoids in lichens. VII. Some lichens from Brazil. **Rev. Brasil. Biol.**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1/2, p. 243-246, 1987.
- 33 CZECZUGA, B.; STENROOS, S.; CHRISTENSEN, S. N.; AHTI, T. Variability of carotenoid composition in some species of the lichen genera *Cladonia* and *Cladina*. **Ann. Bot. Fenn.**, Helsinki, v. 28, n. 2, p. 123-130, 1991.
- 34 DOMENECH, J.; BARASOAIN, I.; PRIETO, A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; BERNABÉ, M.; LEAL, J. A. An antigenic water-soluble glucogalactomannan extracted from cell walls of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paelomyces farinosus*. **Microbiology (Wash. D. C.)**, v. 142, p. 3497-3503, 1996.
- 35 DRAKE, B. Some polyglucides of lichens, particularly lichenin and newly discovered pustulin. **Biochem. Z.**, Berlin, v. 313, n. 5/6, p. 388-399, 1943.
- 36 DUARTE, J. H.; JONES, J. K. N. Some studies on the galactans from the albumen glands of the snail, *Strophocheilus oblongus*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 327-335, 1971.
- 37 DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- 38 DYER, J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. **Methods Biochem. Anal.**, New York, v. 3, p. 112-149, 1956.
- 39 ELIX, J. A. Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH III, T. H. **Lichen biology**. Cambridge: University Press, 1996. p. 155-180.
- 40 FLEMING, M.; MANNERS, D. J. A comparison of the fine-structure of lichenin and barley glucan. **Biochem. J.**, London, v. 100, n. 1, p. 4P-5P, 1966a.
- 41 _____. The fine structure of isolichenin. **Biochem. J.**, London, v. 100, n. 2, p. 24P, 1966b.
- 42 FRIEBOLIN, H. **Basic one- and two- dimensional nmr spectroscopy**. 2. ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1993.

- 43 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**, Tokyo, v. 59, n. 5, p. 421-432, 1968.
- 44 GAILLARD, B. D. E. Use of unneutralized hydrolysates in paper chromatography of sugars. **Nature (Lond)**, v. 171, n. 4365, p. 1160, 1953.
- 45 GIBBONS, R. A. Polydispersity. **Nature (Lond)**, v. 200, n. 4907, p. 665-666, 1963.
- 46 GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; LEAL, J. A. Chemical composition and characterization of a galactomannoglucan from *Gliocladium viride* wall material. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 331-336, 1990.
- 47 GORIN, P. A. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 38, p. 13-104, 1981.
- 48 _____. Deuterium isotope effect on shifts of ^{13}C magnetic resonance signals of sugars: signal assignment studies. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 52, n. 3, p. 458-461, 1974.
- 49 _____. Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 51, n. 14, p. 2375-2383, 1973.
- 50 GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 128, n. 1, p. 119-132, 1984.
- 51 _____. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 253-267, 1985.
- 52 GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Assignment of carbon-13 signals in nuclear magnetic resonance spectra of D-galactopyrano- α -D-mannopyranans from yeasts. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 283-287, 1982.
- 53 _____. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 53, n. 8, p. 1212-1223, 1975.
- 54 GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T. ^{13}C magnetic resonance and structural studies on the mannose-containing polysaccharides of some *Pichia* and *Hansenula* spp. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 18, n. 11, p. 1709-1715, 1972.
- 55 _____. Proton magnetic resonance spectroscopy - an aid in identification and chemotaxonomy of yeasts. **Adv. Appl. Microbiol.**, San Diego, v. 13, p. 25-89, 1970.
- 56 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.

- 57 GORIN, P. A. J.; BARRETO-BERGTER, E. M.; CRUZ, F. S. Chemical structure of D-galacto-D-mannan component of *Trypanosoma cruzi*: C-13 N.M.R. shift dependence of D-galactose to D-mannose linkage. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 177-188, 1981.
- 58 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.**, Ottawa, v. 46, n. 13, p. 2305-2309, 1968.
- 59 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.**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 235-238, 1982.
- 60 GORIN, P. A. J.; BARON, M.; SILVA, M. L. C.; TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciênc. Cultura (São Paulo)**, v. 45, n. 1, p. 27-36, 1993.
- 61 GORSHKOVA, R. P.; NAZARENKO, E. L.; ZUBKOV, V. A.; STEPANENKO, L. S.; ISAKOV, W. Structural study of polysaccharides from *Cetraria cucullata* and *Cetraria islandica*. **Bioorg. Khim.**, Moscow, v. 23, n. 2, p. 134-138, 1997.
- 62 GRANICHSTÄDTEN, H.; PERCIVAL, E. G. V. The polysaccharides of Iceland moss (*Cetraria islandica*). Part I. Preliminary study of the hemicelluloses. **J. Chem. Soc. (Lond)**, p. 54-58, 1943.
- 63 HALE, M. E. **How to know the lichens**. 2 ed. Iowa: Brown Company Publishers, 1979.
- 64 HALE, M. E. **The biology of lichens**. Baltimore: Edward Arnold, 1983.
- 65 HALL, L. D.; JOHNSON, L. F. Chemical studies by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: some chemical shift dependencies of oxygenated derivatives. **J. Chem. Soc. D Chem. Commun.**, Cambridge, p. 509-510, 1969.
- 66 HAUAN, E.; KJØLBERG, O. Studies on the polysaccharides of lichens. I. The structure of a water-soluble polysaccharide in *Stereocaulon paschale* (L.) Fr. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 25, n. 7, p. 2622-2628, 1971.
- 67 HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J. **The lichen-forming fungi**. Glasgow: McCorquodale, 1984.
- 68 HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. **J. Chem. Soc. (Lond)**, v. 107, p. 8-16, 1915.
- 69 HAWORTH, W. N.; HIRST, E. L.; ISHERWOOD, F. A. Degradation of methylated inulin to hexamethyl difructosan. **J. Chem. Soc. (Lond)**, p. 782-791, 1937.
- 70 HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 357-361, 1965.
- 71 HELLERQVIST, C. G.; LINDBERG, B.; SAMUELSSON, K. Methylation analysis of pustulan. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 22, n. 8, p. 2736-2737, 1968.

- 72 HIRST, E. L.; PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 287-296, 1965.
- 73 HONDA, N. L.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 110-125, 1998.
- 74 HOUGH, L.; JONES, J. K. N. Chromatography on paper. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 1, p. 21-31, 1962.
- 75 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. (Lond)**, p. 1702-1706, 1950.
- 76 HOUGH, L.; JONES, J. V. S.; WUSTEMAN, P. On the automated analysis of neutral monosaccharides in glycoproteins and polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 9-17, 1972.
- 77 HOWE, M. L.; BARRETT, J. T. Studies on a hemagglutinin from the lichen *Parmelia michauxiana*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 215, n. 1, p. 97-104, 1970.
- 78 HRANISAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC, M.; MILJKOVIC-STOJANOVIC, J.; DIMITRIJEVIC, R.; MICOVIC, V. M. An alkali-soluble polysaccharide from the oak lichen *Cetraria islandica* (L.) Ach. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 291-295, 1980.
- 79 HUNECK, S. Lichen substances. In: REINHOLD, L.; LIWSCHITZ, Y. **Progress in phytochemistry**. New York: Interscience, 1968. v. 1, p. 223-346.
- 80 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.**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 237-251, 1985.
- 81 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.**, Amsterdam, v. 176, n. 1, p. 117-126, 1988.
- 82 IACOMINI, M.; ZANIN, S. M. W.; FONTANA, J. D.; HOGGE, L.; GORIN, P. A. J. Isolation and characterization of β -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 55-65, 1987.
- 83 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.**, Tokyo, v. 45, n. 6, p. 1373-1380, 1981.
- 84 JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **J. Chem. Soc. D Chem. Commun.**, London. v. 8, p. 1-70, 1976.

- 85 JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 10. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1991.
- 86 JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 36-38, 1965.
- 87 KARRER, J.; JOOS, B. Polysaccharide. XXX. Zur Kenntnis des Isolichenins. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chim.**, Berlin, v. 141, p. 311-315, 1924.
- 88 KJØLBERG, O.; KVERNHEIM, A. L. Studies on the polysaccharides of lichens. III. The structure of alkali-soluble polysaccharides in *Umbilicaria pustulata* (L.) Hoffm. and *Umbilicaria spodothroa* (Ach.) Hoffm. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 43, n. 3, p. 280-285, 1989.
- 89 KOHAMA, T.; FUJIMOTO, M.; KUNINAKA, A.; YOSHINO, H. Structure of malonogalactan, an acidic polysaccharide of *Penicillium citrinum*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 38, n. 1, p. 127-134-127, 1974.
- 90 KRÄMER, P.; WINCIERZ, U.; GRÜBLER, G.; TSCHAKERT, J.; VOELTER, W.; MAYER, H. Rational approach to fractionation, isolation, and characterization of polysaccharides from the lichen *Cetraria islandica*. **Arzneim.-Forsch./Drug Res.**, Aulendorf, v. 45 (I), n. 6, p. 726-731, 1995.
- 91 LEAL, J. A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M. Differences in cell wall polysaccharides of several species of *Eupenicillium*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 108, n. 3, p. 341-346, 1993.
- 92 LEAL, J. A.; GUERRERO, C.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M. Chemical and structural similarities in wall polysaccharides of some *Penicillium*, *Eupenicillium* and *Aspergillus* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 165-168, 1992.
- 93 LEAL, J. A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; DOMENECH, J.; AHRAZEM, O.; BERNABÉ, M. Possible chemotypes from cell wall polysaccharides, as an aid in the systematics of *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **Mycol. Res.**, Cambridge, v. 101, n. 10, p. 1259-1264, 1997.
- 94 LEE, Y.-C.; BALLOU, C. E. Preparation of mannobiose, mannotriose, and a new mannotetraose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan. **Biochemistry**, Washington, v. 4, n. 2, p. 257-264, 1965.
- 95 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.**, Washington, v. 80, n. 22, p. 6098-6105, 1958.
- 96 LIAAEN-JENSEN, S. Studies on algal carotenoids. **Pure Appl. Chem.**, Oxford, v. 61, p. 369-372, 1989.
- 97 LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 28, p. 178-195, 1972.

- 98 LINDBERG, B.; McPHERSON, J. Studies on the chemistry of lichens. VI. The structure of pustulan. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 8, n. 6, p. 985-988, 1954.
- 99 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.**, Copenhagen, v. 7, n. 4, p. 591-595, 1953.
- 100 LÖNNGREN, J.; PILOTTI, A. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates. II. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 25, n. 3, p. 1144-1145, 1971.
- 101 MACHADO, M. J.; GORIN, P. A. J.; TORRI, G.; IACOMINI, M. The occurrence of glycolipids in the lichen *Ramalina celastri*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 2, p. 523-526, 1994.
- 102 MARCELLI, Marcelo P. [para] Marcello Iacomini. São Paulo (21 jan. 1994a). 1 carta em 2 folhas.
- 103 MARCELLI, Marcelo P. [para] Marcello Iacomini. São Paulo (18 abr. 1994b). 1 carta em 1 folha.
- 104 MARCELLI, Marcelo P. [para] Marcello Iacomini. São Paulo (8 jan. 1996). 1 fax em 1 folha.
- 105 MEYER, K. H.; GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXI. La constitution de la lichénine. **Helv. Chim. Acta.**, Basel, v. 30, n. 3, p. 751-761, 1947a.
- 106 _____. Recherches sur l'amidon. XXXII. L'isolichénine. **Helv. Chim. Acta.**, Basel, v. 30, n. 3, p. 761-765, 1947b.
- 107 MICENO, A. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Galactomannan and isolichenan components of the carbohydrate-rich lichen *Romalina ecklonii* (Spreng.) Mey. & Flot. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 55, n. 5, p. 1391-1392, 1991.
- 108 MICOVIC, V. M., HRANISAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC, M.; MILJKOVIC-STOJANOVIC, J. Structural study of polysaccharides from the oak lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 525-533, 1969.
- 109 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. (Tokyo)**, v. 21, n. 5, p. 1014-1019, 1973.
- 110 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. (Tokyo)**, v. 17, n. 9, p. 1910-1916, 1969.
- 111 NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. IV. Antitumor active *O*-acetylated pustulan-type glucans from the lichens of *Umbilicaria* species. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 18, n. 7, p. 1431-1434, 1970.

- 112 NISHIKAWA, Y.; OHKI, K.; TAKAHASHI, K.; KURANO, 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. (Tokyo)**, v. 22, n. 11, p. 2692-2702, 1974.
- 113 OGAWA, T.; YAMAMOTO, H. Synthesis of linear D-mannotetraose and D-mannohexaose, partial structures of the cell-surface D-mannan of *Candida albicans* and *Candida utilis*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 104, n. 2, p. 271-283, 1982.
- 114 OGURA, M.; KOHAMA, T.; FUJIMOTO, M.; KUNINARA, A.; YOSHINO, H., SUGIYAMA, H. Structure of malonogalactan: carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of malonogalactan. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 38, n. 12, p. 2563-2564, 1974.
- 115 PEAT, S.; WHELAN, W. J.; ROBERTS, J. G. The structure of lichenin. **J. Chem. Soc. (Lond)**, p. 3916-3925, 1957.
- 116 PEAT, S.; WHELAN, W. J.; TURVEY, J. R.; MORGAN, K. The structure of isolichenin. **J. Chem. Soc. (Lond)**, p. 623-629, 1961.
- 117 PEREZ-URRIA, E.; RODRIGUEZ, M.; VICENTE, C. Algal partner regulates fungal urease in the lichen *Evernia prunastri* by producing a protein which inhibits urease synthesis. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v. 13, n. 6, p. 665-672, 1989.
- 118 PERLIN, A. S.; SUZUKI, S. The structure of lichenin: selective enzymolysis studies. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 40, n. 1, p. 50-56, 1962.
- 119 PETIT, P. Phytolectins from the nitrogen-fixing lichen *Peltigera horizontalis*: the binding pattern of primary protein extract. **New Phytol.**, London, v. 91, n. 4, p. 705-710, 1982.
- 120 PETIT, P.; LALLEMANT, R.; SAVOYE, D. Purified phytolectin from the lichen *Peltigera canina* var *canina* which binds to the phycobiont cell walls and its use as cytochemical marker *in situ*. **New Phytol.**, London, v. 94, n. 1, p. 103-110, 1983.
- 121 PLANELLES, V.; LEGAZ, E. Purification and some properties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid. **Plant Sci. (Limerick)**, v. 51, n. 1, p. 9-16, 1987.
- 122 POELT, J. Classification. In: AHMADJIAN, V.; HALE, M. E. **The lichens**. New York: Academic Press, 1973. p. 599-632.
- 123 PUEYO, G. Constituants glucidiques dans les lichens. I. Polyalcools. Revue bibliographique. **Ann. Fals. Exp. Chim.**, Paris, v. 73, n. 787, p. 331-337, 1980a.
- 124 _____. Constituants glucidiques dans les lichens. II. Oses. Revue bibliographique. **Ann. Fals. Exp. Chim.**, Paris, v. 73, n. 789, p. 509-513, 1980b.
- 125 _____. Constituants glucidiques dans les lichens. III. Osides. Revue bibliographique. **Ann. Fals. Exp. Chim.**, Paris, v. 74, n. 797, p. 343-347, 1981.

- 126 RODERIC, C. Lichens. In: _____. **Symbiotic fungi**. London: John Wiley & Sons, 1977. p. 226-253.
- 127 SASSAKI, G. L.; MACHADO, M. J.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Glycosyldiacylglycerolipids from the lichen *Dictyonema glabratum*. **J. Nat. Prod.**, Downers Grove, v. 62, n. 6, p. 844-847, 1999.
- 128 SAWARDEKER, J. S.; SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 37, n. 12, p. 1602-1604, 1965.
- 129 SCOTT, J. E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 38-44, 1965.
- 130 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. (Tokyo)**, v. 16, n. 8, p. 1639-1641, 1968.
- 131 SONE, Y.; ISODA-JOHMURA, M.; MISAKI, A. Isolation and chemical characterization of polysaccharides from Iwatake, *Gyrophora esculenta* Miyoshi. **Biosci. Biotech. Biochem.**, Tokyo, v. 60, n. 2, p. 213-215, 1996.
- 132 STENROOS, S.; FERRARO, L. I.; AHTI, T. Lichens Lecanorales: Cladoniaceae. **Flora Criptogámica de Tierra del Fuego**, Buenos Aires, v. 8, n. 7, p. 1-111, 1992.
- 133 SWINSON, T. D. V.; KROG, H. **Macrolichens of East Africa**. London: British Museum, 1988.
- 134 TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S. Polysaccharides of lichen symbionts. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 27, n. 1, p. 238-241, 1979.
- 135 TAKAHASHI, K.; KON, T.; YOKOTA, I.; SHIBATA, S. Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of Stereocaulaceous lichens. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 166-173, 1981.
- 136 TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S.; INOMATA, M.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. VI. Antitumor active polysaccharides of lichens of Stictaceae. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 22, n. 2, p. 404-408, 1974.
- 137 TAKEDA, T.; NISHIKAWA, Y.; SHIBATA, S. A new α -glucan from the lichen *Parmelia caperata* (L.) Ach. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 18, n. 5, p. 1074-1075, 1970.
- 138 TAKEDA, T.; FUNATSU, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. V. Antitumor active polysaccharides of lichens of *Evernia*, *Acroscyphus* and *Alectoria* spp. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 20, n. 11, p. 2445-2449, 1972.
- 139 TEIXEIRA, A. Z. A. Uma possível quimiotaxonomia dos líquens baseada nos espectros de R.N.M.-¹³C de seus heteropolissacarídeos. Curitiba, 1993. 162 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

- 140 TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. An unusual glucomannan from *Tornabenia intricata*. **Phytochemistry (Oxf)**, v. 31, n. 10, p. 3467-3470, 1992.
- 141 _____. Chemotypes of mannose-containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 266, n. 2, p. 309-314, 1995.
- 142 TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M.; McCUNE, B.; GORIN, P. A. J. Heteropolysaccharides of the lichen *Evernia prunastri*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 264, n. 1, p. 63-71, 1994.
- 143 THE SPECIAL biology of lichens. Disponível: <http://www.lichen.com/biology.html> Acesso em 01 abr. 1999.
- 144 TOENNIES, G.; KOLB, J. J. Techniques and reagents for paper chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 23, n. 6, p. 823-826, 1951.
- 145 TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature (Lond)**, v. 166, n. 4219, p. 444-445, 1950.
- 146 VALADON, L. R. G. Carotenoids as additional taxonomic characters in fungi: a review. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, Cambridge, v. 67, p. 1-15, 1976.
- 147 WEBER, A.; WETTERN, M. Some remarks on the usefulness of algal carotenoids as chemotaxonomic markers. In: CZYGAN, F. **Pigments in plants**. Stuttgart: Gustav Fischer, 1980. p. 104-116.
- 148 WHISTLER, R. L.; BUSHWAY, A. A.; SINGH, P. P.; NAKAHARA, W.; TOKUZEN, R. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 32, p. 235-275, 1976.
- 149 WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 2, p. 211-215, 1963a.
- 150 _____. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 2, p. 65-67, 1963b.
- 151 WORANOVICZ, S. M. **Estudo comparativo de heteropolissacarídeos isolados dos líquens *Cladonia signata* (Eschw.) Vainio, *Cladonia furcata* (Hudson) Schrader e *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.** Curitiba, 1995. 109 p. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 152 WORANOVICZ, S. M.; PINTO, B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. **Phytochemistry (Oxf)**, v. 51, n. 3, p. 395-402, 1999.
- 153 WORANOVICZ, S. M.; GORIN, P. A. J.; MARCELLI, M. P.; TORRI, G.; IACOMINI, M. Structural studies on the galactomannans of lichens of the genus *Cladonia*. **Lichenologist (Oxf)**, v. 29, n. 5, p. 471-481, 1997.

- 154 WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; AHTI, T.; SASSAKI, G. L.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. Chemotyping studies on the glucans of lichens of the genus *Cladonia*. **Phytochemistry (Oxf)**, 1999. No prelo.
- 155 XAVIER FILHO, L.; RIZZINI, C. T. **Manual de liquenologia brasileiro**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1976. 431 p.
- 156 YOKOTA, I.; SHIBATA, S. A polysaccharide of the lichen *Stereocaulon japonicum*. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 26, n. 9, p. 2668-2670, 1978.
- 157 YOKOTA, I.; SHIBATA, S.; SAITÔ, H. A ¹³C-n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 69, p. 252-268, 1979.
- 158 ZÄHRINGER, U.; KNIREL, Y. A.; LINDNER, B.; HELBIG, J. H.; SONESSON, A.; MARRE, R.; RIETSCHEL, E.T. Bacterial endotoxins. Lipopolysaccharides from genes to therapy. In: LEVIN, J.; ALVING, C.R.; MUNFORD, R. S.; REDL H. **Progress in Clinical and Biological Research**. New York: Wiley and Liss, v. 392, 1995. p. 113-139.

ANEXO I

ARTIGOS PUBLICADOS:

WORANOVICZ, S. M.; GORIN, P. A. J.; MARCELLI, M. P.; TORRI, G. and IACOMINI, M.

Structural studies on the galactomannans of lichens of the genus *Cladonia*. **Lichenologist**, v. 29, n.5, p. 471-481, 1997.

WORANOVICZ, S. M.; PINTO, B. M.; GORIN, P. A. J. and IACOMINI, M. Novel structures

in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 51, n. 3, p. 395-402, 1999.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; P. A. J. GORIN; AHTI, T.; SASSAKI, G. L.; TISCHER,

C. A. and IACOMINI, M. Chemotyping studies on the glucans of lichens of the genus *Cladonia*. **Phytochemistry**, 1999. No prelo.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, P. L.; MARCELLI, M. P.

and IACOMINI, M. Galactomannoglucans of lichenized fungi of *Cladonia* spp.: significance as chemotypes. Enviado à **FEMS Microbiology Letters**, em agosto de 1999.