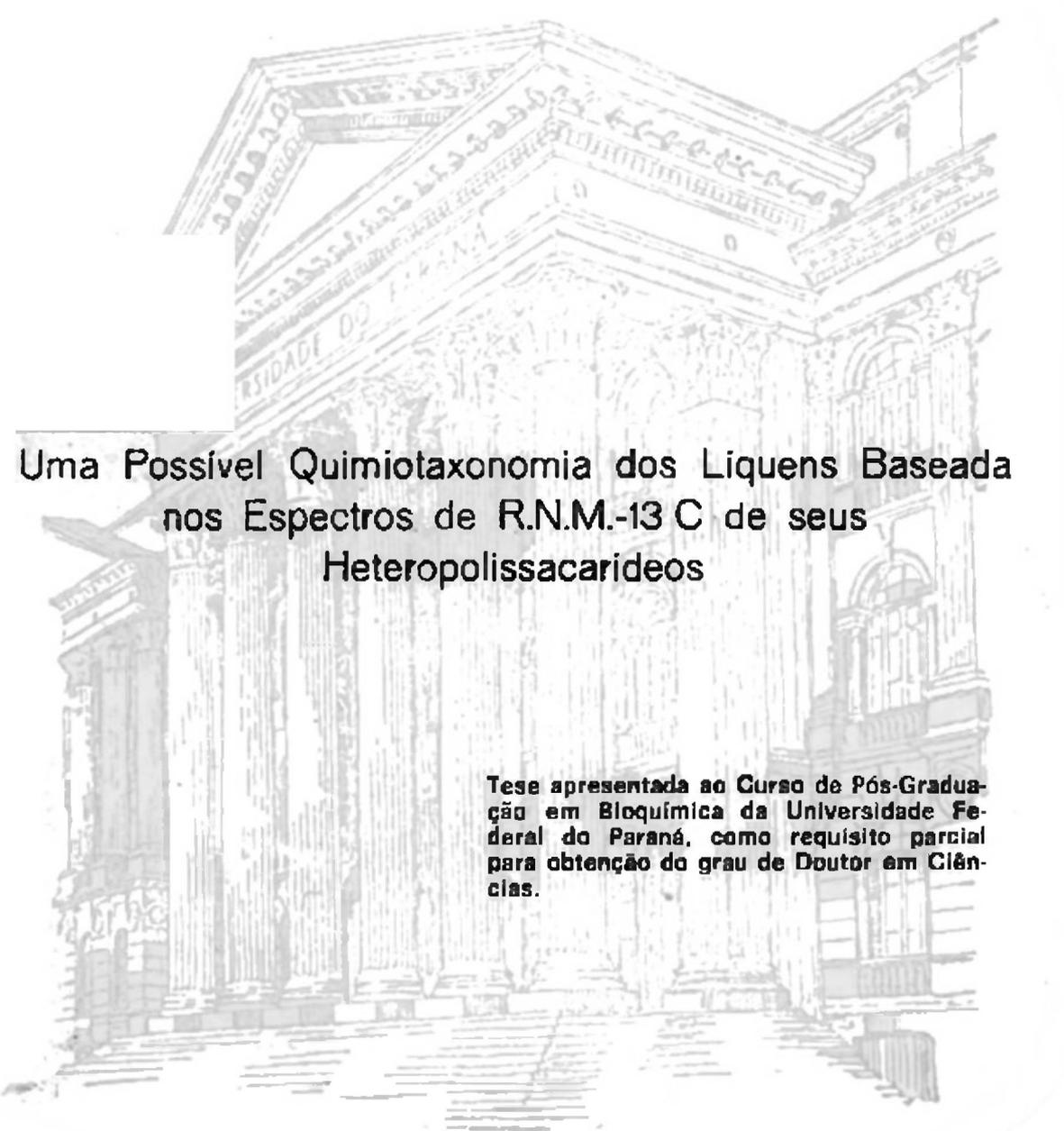


ANTONIO ZENON ANTUNES TEIXEIRA



**Uma Possível Quimiotaxonomia dos Líquens Baseada  
nos Espectros de R.N.M.-13 C de seus  
Heteropolissacarídeos**

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

**CURITIBA  
1993**

ANTONIO ZENON ANTUNES TEIXEIRA

Uma Possível Quimiotaxonomia dos Líquens Baseada  
nos Espectros de R.N.M.-13 C de seus  
Heteropolissacarídeos

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

CURITIBA  
1993

UMA POSSÍVEL QUIMIOTAXONOMIA DOS LÍQUENS BASEADA  
NOS ESPECTROS DE R.N.M.-<sup>13</sup>C DE SEUS HETEROPOLISSACARÍDEOS

por

ANTONIO ZENON ANTUNES TEIXEIRA

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

-----  
Dr. Philip Albert James Gorin

-----  
Dra. Eliane Barreto Bergter

-----  
Dr. Carl Peter von Dietrich

-----  
Dr. Luiz Rodolfo Travassos

-----  
Dra. Fany Reicher

Tese orientada pelos professores

Dr. Philip Albert James Gorin

Dr. Marcello Iacomini

iii

Vive el águila en su nido,  
El tigre vive en la selva,  
El zorro en la cueva ajena,  
Y en su destino inconstante  
Sólo el gaucho vive errante  
Donde la suerte lo lleva

MARTIN FIERRO "IDA Y VUELTA"

Jose Hernandez

## AGRADECIMENTOS

Aos orientadores Dr. Philip Albert James Gorin e Dr. Marcello Iacomini pela oportunidade, confiança e orientação para concretização deste trabalho.

A Neusa Alice Dalcanal pelo apoio, dedicação e confecção dos desenhos desta tese; e a minha filha Ingrid Lorraine pelos momentos agradáveis que nos propiciou.

Aos profs. deste departamento que em algum momento de minha trajetória, auxiliaram com sugestões o desenvolvimento desta tese: Dr. José Hazencleve Duarte, Dr. Marco Aurélio Lacombe Feijó, Dra. Fany Reicher, Dr. João Batista Chaves Corrêa (em memória), Dr. José Domingos Fontana, Dr. Manoel Guimarães, Dr. Aguinaldo J. Nascimento, Dr. Shigehiro Funayama, Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, Dr. Luis Alberto S. Veiga e a Dra. Glaci T. Zancan.

Ao Dr. Benito Casu e Dr. Giangiacomo Torri do Instituto G. Ronzoni, Milão, Itália, pelos espectros de r.n.m.

Agradeço a Dra. Maria de Lourdes Corradi da Silva, Dra. Madalena Baron, pelos líquens *Parmotrema cetratum* e *Stereocaulon ramulosum* respectivamente. Ao Prof. Dr. Lauro Xavier Filho, UFPe, pela coleta da espécie *Cladonia substellata*. A Profa. Izilda Divincenzi do Departamento de Química da UFMS, pela coleta da espécie *Usnea meridionalis*. A profa. Dra. Margalith Galun, Symbiosis Research Laboratory, Department of Botany, Tel-Aviv, pela *Tornabenia intricata*. Ao Prof. Dr. Bruce McCune of Department

of General Science, Oregon State University, Estados Unidos pela coleta da *Evernia prunastri*. E ao Prof. Estefano F. Jablonski, da PUC do Paraná, pela coleta do líquen *Sticta* sp.

Aos colegas de Mestrado Luis Fernando Pereira e Edmundo Carlton Elliot Benites pelo companheirismo.

Aos colegas de Doutorado Generoso Manoel Chagas, Roberto Pontarolo, Marcos Machado pela amizade e sugestões apresentadas.

Ao Doutorando Hidevaldo Bueno Machado pelas valiosas lições de computação que me auxiliaram na digitação da presente tese.

Em especial ao Prof. Dr. Pe. Guido Edgar Wenzel da UNISINOS pelos conselhos, amizade e sugestões realizadas ao meu trabalho quando eramos colegas de Doutorado.

Ao amigo Luis Carlos Lopes Setembrino que desde adolescência soube ficar ao meu lado nas horas boas ou más.

A Marilza Doroti Lamour secretária da pós-graduação pela atenção e paciência e a Tereza Nanci Loppnow, Juliet Pie e Natalio Padilha da Silva, bem como os demais funcionários deste departamento pelo agradável convívio.

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

A Capes e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao meu Pai e a minha mãe.

E agradeço sobretudo ao Criador do Universo.

## SUMÁRIO

	Página
Lista de abreviaturas	x
Lista de tabelas	xii
Lista de figuras	xv
Resumo	xxii
Summary	xxiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Generalidades	2
1.2. Ácidos liquênicos	4
1.3. Constituintes em carboidratos	6
1.3.1. Componentes de baixo peso molecular	6
1.3.2. Polissacarídeos	8
1.3.3. Objetivos	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1. Coleta e classificação dos líquens	18
2.2. Tratamento prévio dos líquens	19
2.3. Métodos analíticos gerais	20
2.3.1. Princípios elementares	20
2.3.2. Métodos cromatográficos	21
2.3.2.1. Cromatografia em fase líquida-gasosa (g.l.c.)	21
2.3.2.2. Cromatografia em fase líquida-gasosa acoplada a espectroscopia de massa (g.l.c.-m.s.)	22
2.3.2.3. Cromatografia em papel (c.p.)	22

2.3.3.	Ressonância nuclear magnética de carbono-13 (r.m.n.- <sup>13</sup> C)	24
2.3.4.	Ressonância nuclear magnética de próton (n.m.r.- <sup>1</sup> H)	24
2.3.5.	Métodos fotocolorimétricos	25
2.3.6.	Isolamento das galactomananas	26
2.3.6.1.	Extração benzeno-etanol	26
2.3.6.2.	Extração metanol-água	26
2.3.6.3.	Extração alcalina	27
2.3.6.4.	Fracionamento dos polissacarídeos resultantes da extração alcalina por congelamento e degelo	27
2.3.6.5.	Fracionamento dos polissacarídeos solúveis em água por precipitação com solução de Fehling	28
2.3.6.6.	Fracionamento dos polissacarídeos purificados pela solução de Fehling, por precipitação com brometo de hexadeciltrimetilamônio (cetavlon)	29
2.4.	Metodologia específica para análise estrutural dos polissacarídeos	30
2.4.1.	Testes de homogeneidade aplicados aos polissacarídeos	30
2.4.1.1.	Eletroforese em fitas de acetato de celulose	30
2.4.1.2.	Eluição em coluna de Sepharose 4B-200 e Sepharose 6B	31
2.5	Hidrólises ácidas	31

2.6.	Redução e acetilação dos produtos resultantes de hidrólise ácida total	33
2.7.	Metilação dos polissacarídeos	34
2.7.1.	Redução dos polissacarídeos per-O-metilados por lítio alumínio deuterado	35
2.8.	Análise dos produtos de hidrólise ácida dos polissacarídeos per-O-metilados, na forma de acetatos de alditóis	36
2.9.	Determinação do consumo de meta-periodato de sódio e produção de ácido fórmico pela glucomanana obtida no líquen <i>T. intricata</i>	37
2.9.1.	Consumo de meta-periodato de sódio	38
2.10.	Degradação de Smith	39
2.11.	Hidrólise ácida parcial da glucomanana de <i>T. intricata</i>	40
2.12.	Acetólise parcial da glucomanana de <i>T. intricata</i> e a preparação de oligossacarídeos	41
2.12.1.	Acetólise parcial	41
2.13.	Trimetilsilanização dos polímeros ácidos degradados	42
3.	RESULTADO E DISCUSSÃO	44
3.1.	Quimiotaxonomia dos líquens baseadas nos heteropolissacarídeos contendo manose	50
3.1.1.	Grupo A	52
3.1.2.	Grupo B	69
3.1.3.	Grupo C	78

3.1.4.	Grupo D	80
3.1.5.	Grupo E	89
3.2.	Caracterização dos ácidos urônicos	104
3.2.1.	Ensaio de homogeneidade dos heteropolissacarí- deos das espécies com açúcares ácidos	106
3.2.2.	Investigação dos ácidos urônicos no polissacarídeo obtido através de precipitação com cetavlon a pH 7.0 da <i>Usnea</i> sp.	111
3.2.3.	Reinvestigação dos polissacarídeos contendo manose de <i>E. prunastri</i> obtidos através de precipitação com cetavlon	114
3.2.4.	Investigação dos heteropolissacarídeos contendo manose de <i>P. araucaria</i>	118
3.2.5.	Investigação dos ácidos urônicos no polissacarídeo de <i>U. meridionalis</i>	120
3.3.	Componentes solúveis no extrato metanol- aquoso de <i>T. intricata</i>	122
3.4.	Estudo estrutural da glucomanana obtida de <i>T. intricata</i>	126
3.4.1.	Ensaio de homogeneidade da glucomanana	127
3.4.2.	Determinação do peso molecular das frações obtidas através da coluna de Sepharose 4B-200	130
	CONCLUSÕES	144
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOH	ácido acético.
alc.	alcalino.
aq.	aquoso.
cetavlon	brometo de hexadeciltrimetilamônio.
g.l.c.	cromatografia em fase líquido gasosa.
g.l.c.-m.s.	cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa.
cm	centímetro.
c.p.	cromatografia em papel.
d.i.	diâmetro interno.
D <sub>2</sub> O	óxido de deutério.
g	grama.
h	hora.
J	constante de acoplamento.
M	molar.
min	minuto.
mM	milimolar.
Me <sub>4</sub> Si	tetrametilsilano.
m/Z	massa por carga.
NaBH <sub>4</sub>	boroidreto de sódio.
NaBD <sub>4</sub>	borodeutério de sódio.
NaIO <sub>4</sub>	meta-periodato de sódio.
p/p	peso por peso (massa por massa).
p.p.m.	partes por milhão.
p/v	peso por volume (massa por volume).

RLac	Tempo de retenção em relação a lactose.
R <sub>MAN</sub>	tempo de retenção em relação a manose.
r.n.m.- <sup>13</sup> C	ressonância nuclear magnética de carbono treze.
r.n.m.- <sup>1</sup> H	ressonância nuclear magnética de próton.
r.p.m.	rotações por minuto.
s	segundos.
Tr	tempo de retenção.
TFA	ácido trifluoroacético.
v/v	volume por volume.
δ (p.p.m.)	delta (partes por milhão).
Gal	galactose
Glc	glucose
Man	manose
GlcA	ácido glucurônico
GalcA	ácido galacturônico

LISTAS DE TABELAS

TABELA	Página	
I	Rendimento e algumas propriedades das frações dos polissacarídeos preparados através dos líquens	49
II	Atribuição de sinais r.n.m.- <sup>13</sup> C de polissacarídeos isolados através do fracionamento por Cetavlon com tampão borato pH 8.5 das espécies <i>P. sulcata</i> , <i>C. islandica</i> e <i>P. cetratum</i>	60
III	Atribuição de sinais r.n.m.- <sup>13</sup> C dos heteropolímeros obtidos de <i>Usnea</i> sp	65
IV	Análises por g.l.c. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da metilação do polissacarídeo obtido por precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato do líquen <i>P. aurata</i>	77
V	Atribuição de sinais de r.n.m.- <sup>13</sup> C de heteropolissacarídeos isolados através de purificação com cetavlon na presença de tampão borato pH 8.5	87

VI	Atribuição de sinais de r.n.m.- <sup>13</sup> C de polissacarídeos isolados através do fracionamento por cetavlon do líquen <i>U. meridionalis</i>	96
VII	Análises por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da metilação do polissacarídeo, obtido com cetavlon pH 8.5 na presença de tampão borato de <i>C. substellata</i>	99
VIII	Comparação das propriedades físico-químicas das galactomananas de cadeia principal formada por $\alpha$ -D-Manp ligação (1→6) e seus substituintes nas cadeias laterais	102
IX	Análises por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes de análises de metilação dos polissacarídeos de <i>Usnea</i> sp.	113
X	Análises por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes de análises de metilação dos polissacarídeos de <i>E. prunastri</i>	117
XI	Análises por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes de análises de metilação dos polissacarídeos de <i>P. araucaria</i>	119

XII	Análises por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes de análises de metilação dos polissacarídeos de <i>U. meridionalis</i>	121
XIII	Análises por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis de fração obtida, pela extração metanol-água 4:1 de <i>T. intricata</i>	124
XIV	Análises por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da metilação da glucomanana de <i>T. intricata</i>	135
XV	Análises por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da metilação da glucomanana de <i>T. intricata</i> parcialmente degradada por ácido	137
XVI	Análises por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes da análise de metilação de glucomanana de <i>T. intricata</i> degradada por $\alpha$ -manosidase	139

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, da galactomanana do líquen <i>P. sulcata</i> , precipitado de Fehling	53
1B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C total do heteropolímero de <i>P. sulcata</i> , cetavlon pH 8.5	53
2A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C a região de C-1, do heteropolímero de <i>C. islandica</i> , precipitado de Fehling	54
2B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C total do heteropolissacarídeo de <i>C. islandica</i> , cetavlon pH 8.5	54
3A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolímero de <i>P. cetratum</i> , precipitado de Fehling	56
3B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>P. cetratum</i> , cetavlon pH 8.5	56
4A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>P. araucaria</i> , precipitado de Fehling	58

4B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolímero de <i>P. araucaria</i> , cetavlon pH 7.0	58
4C	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>P. araucaria</i> , cetavlon pH 7.0	58
5A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C total do heteropolissacarídeo de <i>Usnea</i> sp, precipitado de Fehling	62
5B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolímero de <i>Usnea</i> sp, cetavlon pH 7.0	62
5C	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>Usnea</i> sp, cetavlon pH 8.5	64
6A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolímero de <i>E. prunastri</i> , cetavlon pH 7.0	68
6B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>E. prunastri</i> , pH 8.5	68
7	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C total do heteropolissacarídeo de <i>C. alpestris</i> , cetavlon pH 8.5	71
8	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C total do heteropolímero de <i>C. confusa</i> , cetavlon pH 8.5	71

9A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>S. paschale</i> , precipitado de Fehling	73
9B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolímero de <i>S. paschale</i> , cetavlon pH 8.5	73
10A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>P. aurata</i> , precipitado de Fehling	75
10B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>P. aurata</i> , cetavlon pH 8.5	75
11	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>C. amaurocraea</i> , precipitado de Fehling	79
12	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolímero de <i>S. damaecornis</i> , cetavlon pH 8.5	79
13A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>P. aphthosa</i> , precipitado de Fehling	81
13B	Espectros de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>P. aphthosa</i> , cetavlon pH 8.5	81

14A	Espectros de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolímero de <i>R. usnea</i> , precipitado de Fehling	82
14B	Espectros de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolímero de <i>R. usnea</i> , cetavlon pH 8.5	82
15A	Espectros de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>R. ecklonii</i> , precipitado de Fehling	83
15B	Espectros de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>R. ecklonii</i> , cetavlon pH 8.5	83
16A	Espectros de r.n.m.- <sup>13</sup> C total do heteropolímero de <i>S. ramulosum</i> , precipitado de Fehling	86
16B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C total da galactomanana de <i>S. ramulosum</i> , cetavlon pH 8.5	86
17	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C do heteropolímero de <i>A. muelenbergii</i> , cetavlon pH 8.5	89
18	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>U. pustulata</i> , extração alcalina	91
19	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>U. spodochoa</i> , extração alcalina	91

20	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolímero de <i>N. aurantiaco-ater</i> , precipitado de Fehling	92
21A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C do heteropolímero de <i>T. intricata</i> , precipitado de Fehling	93
21B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolímero de <i>T. intricata</i> , cetavlon pH 8.5	93
22A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C do heteropolímero de <i>U. meridionalis</i> , cetavlon pH 7.0	94
22B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1 do heteropolímero de <i>U. meridionalis</i> , cetavlon pH 8.5	94
23A	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>C. substellata</i> , precipitado de Fehling	97
23B	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da região de C-1, do heteropolissacarídeo de <i>C. substellata</i> , cetavlon pH 8.5	97
24	Cromatograma dos heteropolissacarídeos contendo manose, cetavlon pH 7.0 em coluna de Sepharose 6B de <i>P. araucaria</i> , <i>E. prunastri</i> , <i>U. meridionalis</i> e <i>Usnea</i> sp.	107

25	Cromatograma dos heteropolissacarídeos contendo manose, cetavlon pH 8.5 em coluna de Sepharose 6B de <i>P. araucaria</i> , <i>E. prunastri</i> , <i>U. meridionalis</i> e <i>Usnea</i> sp.	108
26	Cromatograma dos heteropolissacarídeos contendo manose, cetavlon pH 7.0 em coluna de Sepharose 4B-200 de <i>E. prunastri</i> , <i>Usnea</i> sp., <i>U. meridionalis</i> e <i>P. araucaria</i> .	109
27	Cromatograma dos heteropolissacarídeos contendo manose, cetavlon pH 8.5 em coluna de Sepharose 4B-200 de <i>E. prunastri</i> , <i>Usnea</i> sp., <i>U. meridionalis</i> e <i>P. araucaria</i> .	110
28	Espectro de r.n.m. <sup>-1</sup> H do heteropolímero de <i>E. prunastri</i> , cetavlon pH 7.0	116
29	Espectro de r.n.m. <sup>-1</sup> H do heteropolímero de <i>E. prunastri</i> , cetavlon pH 8.5	116
30	Cromatograma da glucomanana de <i>T. intricata</i> , cetavlon pH 8.5 em coluna de Sepharose 6B	128
31	Cromatograma da glucomanana de <i>T. intricata</i> , cetavlon pH 8.5 em coluna de Sepharose 4B-200	129
32	Determinação de peso molecular da glucomanana de <i>T. intricata</i> , cetavlon pH 8.5 em coluna de Sepharose 4B-200	131

33	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da Fração A, obtida através do fracionamento da glucomanana, cetavlon pH 8.5, em coluna de Sepharose 4B-200	132
34	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C da Fração B, obtida através do fracionamento da glucomanana, cetavlon pH 8.5, em coluna de Sepharose 4B-200	133
35	Curva de hidrólise enzimática ( $\alpha$ -manosidase EC 3.2.1.24) da glucomanana de <i>T. intricata</i>	138
36	Espectro de r.n.m.- <sup>13</sup> C do polímero resultante da ação enzimática da enzima $\alpha$ -manosidase (EC 3.2.1.24), na glucomanana de <i>T. intricata</i>	140
37	Espectro de r.n.m.- <sup>1</sup> H região de H-1 do oligossacarídeo $R_{Man} = 0.58$ proveniente da acetólise parcial da glucomanana	143
38	Espectro de r.n.m.- <sup>1</sup> H região de H-1 do oligossacarídeo $R_{Man} = 0.40$ proveniente da acetólise parcial da glucomanana	143

## RESUMO

Foram analisados heteropolissacarídeos contendo manose de 23 diferentes espécies de líquens pertencentes a 13 gêneros, foram obtidos em sua maioria via extração alcalina seguido por precipitação com Fehling e fracionamento com cetavlon. Análise por r.n.m.-<sup>13</sup>C da região de C-1 de seus espectros serve como impressão digital (fingerprints) dos líquens, sugerindo a base de uma possível quimiotaxonomia de líquens. Os espectros foram arranjados dentro de 5 grupos, baseando-se nos principais sinais comuns e portanto com estruturas químicas similares. Como os polissacarídeos são provenientes dos micobiontes de cada líquen, que são os maiores componentes quando comparados com o ficobionte, servem como base para uma quimiotaxonomia.

No fracionamento realizado com cetavlon a pH 7.0 e pH 8.5 na presença de borato, a precipitação ocorreu a pH 7.0 no caso de extrações alcalinas dos 4 líquens, *Usnea* sp., *Usnea meridionalis*, *Parmotrema araucaria* e *Evernia prunastri*. Este resultado já era esperado com o último, o qual tem sido relatado conter ácido galacturônico como componente do polissacarídeo. No espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C de cada preparação, um sinal de ácido carboxílico foi detectado em campo baixo. A metilação de cada polissacarídeo, seguido por redução do produto per-O-metilado com hidreto de lítio alumínio deuterado, apresentou um aumento na produção de alguns alditóis acetatos, os quais foram di-deuterados a

C-6. Os resultados mostram que o ácido urônico é GlcAp, presente como unidades não redutoras terminais e unidades 3-O-substituídas.

As análises dos componentes monossacarídicos de polissacarídeos que continham manose dos vários líquens, observa-se a presença de galactose, glucose e manose, com exceção daquele previamente investigado *Stereocaulon ramulosum*, o qual apresenta uma galactomanana, e aquele de *Tornabenia intricata*, agora investigado, apresentando uma glucomanana. Esta última foi isolada via precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de borato e contendo 7 % de glucose. A preparação consiste de 2 componentes com p.m. de  $0.85 \times 10^5$  e  $1.1 \times 10^5$  e cujos espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  foram idênticos. A glucomanana contém uma cadeia principal de  $\alpha\text{-D-Manp}$  ligado (1 $\rightarrow$ 6) com substituições nas cadeias laterais 2-O- $\alpha\text{-D-Manp}$ , com pequenas quantidades de  $\alpha\text{-D-Glcp}$ ,  $\alpha\text{-D-Glcp}$ (1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha\text{-D-Manp}$ (1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha\text{-D-Manp}$ , e possivelmente  $\alpha\text{-D-Manp}$ (1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha\text{-D-Manp}$ (1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha\text{-D-Manp}$ .

## SUMMARY

Mannose-containing heteropolysaccharides were prepared from 23 different lichens of 13 genera, via alkaline extraction followed by Fehling precipitation and fractionation with Cetavlon. The C-1 regions of their  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectra served as fingerprints of the parent lichen, suggesting a basis of a possible chemotaxonomy of lichens. The spectra were arranged into 5 Groups, based on principal signals in common and therefore similar structural components. As the polysaccharide arises from the mycobiont of each lichen, which is by far the greater component when compared to the phycobiont, the former serves as basis of the chemotaxonomy.

In the fractional precipitation carried out with Cetavlon using a pH of 7.0 and then 8.5 in the presence of borate, precipitation also occurred at pH 7.0 in the case of alkaline extracts from 4 lichens, *Usnea* sp., *Usnea meridionalis*, *Parmotrema araucaria*, and *Evernia prunastri*. This was expected with the latter as a galactomannan containing galacturonic acid has been reported as a component polysaccharide. In the  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectrum of each preparation, a signal of a carboxylic acid was detected at low field. Methylation of each polysaccharide, followed by reduction of the per-O-methylated product with lithium aluminum deuteride, gave rise to eventual production of some O-methylated alditol acetates which were dideuterated at

C-6. Their structures showed that the uronic acid was GlcAp, present as nonreducing end and 3-O-substituted units.

On examination of the monosaccharide components of mannose-containing polysaccharides of the various lichens, all of the preparations were found to contain galactose, glucose, and mannose, with the exceptions of that of previously investigated *Stereocaulon ramulosum*, which was a galactomannan, and that of *Tornabenia intricata*, now investigated, which is a glucomannan. It was isolated via a Cetavlon precipitate, which formed at pH 8.5 in the presence of borate and contained 7% of glucose. The preparation consisted of 2 components with  $M_r$ s of ca.  $0.85 \times 10^5$  and ca.  $1.1 \times 10^5$  and whose  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectra were identical. The overall glucomannan contained a (1 $\rightarrow$ 6)-linked  $\alpha$ -D-Manp main-chain substituted at O-2 mainly with side chains of  $\alpha$ -D-Manp with smaller amounts of  $\alpha$ -D-Glcp,  $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -D-Manp, and possibly  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -D-Manp.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. - GENERALIDADES

O termo líquen foi introduzido na literatura grega no século 300 antes da era Cristã por Theophrastus, primeiramente para descrever o material que crescia nas cascas das oliveiras. Algumas espécies foram exploradas e, no século XVI incluídas nos antigos herbários, as quais apresentavam propriedades medicinais. O botânico francês J.P. de Tournefort (1656-1708) usou o termo "Lichen" como nome genérico (Les Elements de Botanique, 1694), mas foi o italiano Micheli, quem introduziu pela primeira vez uma sistemática ordenada (Nova Plantarum Genera, 1729). Micheli enumerou cerca de 300 espécies dentro de 38 ordens. Deve ser creditado ao sueco Erik Achoriu (1757-1819) a iniciação dos estudos sistemáticos liquênicos. Entretanto o reconhecimento do líquen, como uma associação entre um fungo e uma alga, para formar um talo estável de estrutura característica, foi realizado em 1867 pelo suíço Schwendener (1829-1919). Ele adotou um rígido sistema de classificação, ignorando os caracteres microscópicos. Tal definição do líquen foi adotada numa reunião da Associação Internacional para Liquenologia em 1981 (50).

Os líquens ao serem dissecados e analisados ao microscópio mostram-se formados por dois organismos diferentes, minúsculas algas semelhantes as espécies de vida livre e numerosos filamentos de fungos incolores denominados hifas. Esses dois organismos crescem juntos, resultando na formação de uma nova estrutura vegetal denominada talo

liquênico, o qual não tem nenhuma semelhança com a alga ou o fungo quando cultivados em separados (47).

O talo liquênico o qual resulta da simbiose entre a alga e fungo é constituído em sua maior parte pelas hifas do fungo e pelos filamentos da alga em menor proporção. Este talo pode apresentar-se com uma forma definida podendo ser arbustiva, foliácea ou crustácea. Prolifera sob o solo e frequentemente pelas rochas e caules de árvores. Habitam todas as regiões, inclusive em áreas onde é impossível outro vegetal desenvolver-se. Eles são elementos de grande importância na degradação de rochas devido a secreção de certos ácidos orgânicos, os quais degradam a superfície, se a rocha tratar-se de calcário ocorre uma dissolução maior ou menor desta, no entanto, nas demais a ação é quase totalmente mecânica, devido as expansões e contrações talinas dos líquens (61). A sua reprodução é realizada através de formação de propágulos (sorédios) que são formados por hifas com algumas células de algas (50).

Cada líquen compreende, geralmente uma espécie de fungo e usualmente uma espécie de alga. O fungo desta simbiose, é chamado micobionte, o qual é mais frequentemente um ascomiceto e em alguns casos um ficomiceto, basidiomiceto ou deuteromiceto (16) em associação com um ficobionte, o qual invariavelmente pode ser uma alga verde e/ou verde azulada, sendo *Trebouxia* a alga verde mais comum neste tipo de associação, assim como *Nostoc* e *Scytonema* são as verde azuladas mais encontradas [03]. Há 13.250 espécies de ascomicetos, sendo que 46% destes, são capazes de formar

líquens, consistindo de 2720 gêneros, os quais são em maior número que os 37 gêneros formadores de ficobiontes (50).

A estrutura e composição química não são importantes características em taxonomia em muitos grupos de plantas, mas em líquens é um meio prático e proveitoso para identificar as espécies, pois os líquens produzem substâncias químicas que somente são encontradas neles. É por este motivo que os estudos dos líquens têm, ultimamente, abordado dois aspectos:

- a) Ácidos Liquênicos
- b) Constituintes em Carboidratos

## 1.2. - ÁCIDOS LIQUÊNICOS

Cerca de 1000 trabalhos foram realizados com o objetivo de investigar 209 substâncias químicas em 2.315 espécies de líquens (21). Estes trabalhos incluem estudo do metabolismo secundário e dos os ácidos liquênicos. São utilizados na medicina popular desde a mais remota antiguidade. Pode-se exemplificar a descoberta do naturalista alemão Schweinfurth, que encontrou, no Vale do Nilo, um fragmento liquênico no interior de um vaso, remontando à XVIII dinastia, cerca de 1.700 A.C., o qual foi classificado por J. Muller como pertencente à espécie *Evernia furfuraceae* e possuindo atividades contra o *Staphylococcus aureus*. Vale notar que tal líquen não se encontra atualmente no Egito; foi provavelmente, artigo de importação da Europa ou Ásia (109).

Takai et alii (102), realizaram trabalhos sobre derivados de ácido úsnico encontrados em líquens, como um esforço para encontrar novos agentes antineoplásicos. Ao ácido úsnico, no entanto, tem sido atribuído a propriedade de causar dermatites em trabalhadores das florestas de Columbia Britânica, Canadá (79).

Já existe também grande interesse pela sistemática de líquens e muitas correntes foram formadas, pois por muitos anos a ocorrência de substâncias liquênicas e seu uso na sistemática e taxonomia tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. As reações de cor desenvolvidas por Nylander (22), têm auxiliado no estudo da química de líquens para a distinção de diferentes espécies.

Huneck e Follmann (56), realizaram trabalhos com metabolismo secundário de 73 representantes dos líquens crustáceos da Família de Buelliaceae, os quais foram analisados microquimicamente ou por cromatografia em camada delgada. Encontraram que os constituintes mais característicos são a depsidona atranorina e a depsidona ácido norstictico, e pela primeira vez encontraram nesta família ácido lecanórico, ácido physodalico e ácido pulvínico derivado da lactona do ácido pulvínico. Além disto, as substâncias das Buelliaceae possuem íntima relação com as Physciaceae. Em 1982, Huovinen e Ahti (57), realizaram um estudo dos depsídeos, depsidona e dibenzofuranas em *Cladonia* spp. para explicar a química e o "background" evolucionário dos produtos aromáticos secundários detectados na pesquisa quimiotaxonômica do

gênero, esperando assim improvisar também, a taxonomia que reflete a filogenia o mais natural possível.

O metabolismo secundário de líquens não foi o único caminho para montar uma quimiotaxonomia, o estudo estrutural de glucanas de líquens, bem como seus espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C tem sido sugerido como uma possibilidade para realizar um estudo taxonômico (102,110).

### 1.3. - CONSTITUINTES EM CARBOIDRATOS

Berzelius (11) isolou pela primeira vez, um polissacarídeo através de uma precipitação por resfriamento de um extrato aquoso à quente, do líquen *Cetraria islandica* "Iceland moss", desde então, tem sido encontrado que cada espécie de líquen contém  $\alpha$  e/ou  $\beta$ -glucanas e um heteropolissacarídeo contendo manose (32), sendo estes pesquisados a nível de polímeros de baixo e alto peso molecular.

#### 1.3.1 - COMPONENTES DE BAIXO PESO MOLECULAR

Alguns estudos já foram realizados com componentes de baixo peso molecular em líquens e algumas revisões relacionadas com esse assunto, foram realizadas por C.F. Culberson (20) e Pueyo (91).

Um trabalho laborioso foi realizado por Lindberg et alii (70) que analisaram 60 espécies diferentes de líquens e

verificaram que 55 delas continham arabinitol e que estas são pertencentes a ordem Lecanorales, então Gymnocarpeae sendo que as demais apresentaram volemitol e fazem parte da ordem Verrucariales, que era denominada anteriormente Pyrenocarpeae. Esta pesquisa demonstrou que ocorre uma diferença química entre estes dois grupos, embora haja uma heterogeneidade no grupo Verrucariales. O manitol apresentou-se como um componente de ocorrência generalizada em líquens, bem como arabinitol que parece ser de ocorrência comum em líquens, no entanto, manitol não foi relatado na *Ramalina usnea* (36), e encontrado em pequenas proporções no *Newropogon aurantiaco-ater* (08), igualmente em um líquen basidiomiceto *Cora pavonia* (58), neste último líquen arabinitol não foi detectado.

Além de manitol e arabinitol, eritritol tem sido relatado em espécies de *Rocella* (70). A alga que faz parte desta simbiose é a *Trentepohlia*, e é conhecido que esta alga em vida livre contém eritritol. Como esta espécie de alga é muito comum em líquens é de se supor que eritritol seja um poliol largamente encontrado em líquens (67).

Após alguns anos de estudo, diversos polióis foram encontrados em líquens (08,18,36,58,67,90,104) sendo: glicerol, eritritol, ribitol, arabinitol, manitol, galactitol, sorbitol, volemitol, sifulitol (1-deoxy-D-volemitol), mio-inositol e treitol.

Culberson (20) e Pueyo (89) realizaram revisões com monossacarídeos redutores, os quais são: arabinose, ribose, xilose, lixose, rhamnose, frutose, tagatose, galactose,

manose e glucose, identificados por cromatografia em papel, sendo que Nishikawa et alii (83) analisaram estes monômeros por g.l.c. através de derivados acetilados, trifluoracetilados e trimetilsililados.

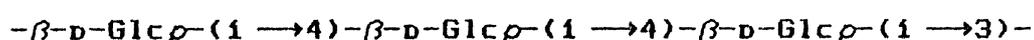
Os oligossacarídeos mais comuns são representados por trealose (1,1- $\alpha$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ -D-glucopiranose), sacarose (1,2- $\alpha$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -D-frutofuranose) (20,70, 88), e umbilicina (2-O- $\beta$ -D-galactofuranosil-D-arabinitol), encontrada por Lindberg et al. em *Umbilicaria pustulata* e em outras espécies de líquens (70). Também foi encontrada em *Actinogyra muehlenbergii* (37) e *Stereocaulon ramulosum* por Baron et al. (06).

Outros oligossacarídeos menos frequentemente encontrados na natureza são peltigerosídeos (3-O- $\beta$ -D-galacto-furanosil-D-manitol) do líquen *Peltigera horizontalis* (71) e lactose (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil- $\alpha$ - $\beta$ -D-glucose) relatado numa *Sticta* sp. (18).

### 1.3.2 - POLISSACARÍDEOS

Após o estudo realizado por Berzelius na *Cetraria islandica* em 1815 (11), Meyer & Gürtler (75), em 1947, realizaram estudos detalhados desta espécie para determinação da estrutura fina de polissacarídeos líquênicos, e isolaram da *C. islandica* um polissacarídeo pelo mesmo procedimento de Berzelius, o qual era formado por uma  $\beta$ -D-glucana linear contendo ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 4),

na proporção molar de 1:3 denominado de "lichénine". Análises posteriores para uma melhor elucidação da estrutura foram realizadas por Chanda et alii (14) e Peat et alii (87), que concluíram ser um polissacarídeo estruturalmente constituído por uma sequência de celotrioses, que indicam duas ligações consecutivas (1→4), alternada por uma ligação (1→3) isolada; porém, ocasionalmente, quatro monômeros consecutivos apresentavam-se unidos por ligações (1→4), sendo então sugerida a estrutura I como predominante:

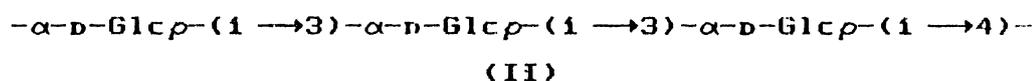


(I)

Realizando um trabalho paralelo sobre *C. islandica* Meyer & Gürtler (76), em 1947, isolaram um polissacarídeo do sobrenadante aquoso frio, o qual foi denominado "isolichénine", fornecendo por hidrólise ácida glucose como produto principal e traços de manose e galactose. Após 10 anos Chanda et alii (14) utilizando os mesmos procedimentos de extração aquosa, isolaram um polímero semelhante, que ao ser submetido a solução de Fehling, apresentou apenas unidades de D-glucose. Os resultados de polarimetria, oxidação com periodato e os dados de metilação demonstraram que este polissacarídeo é de configuração alfa com ligação (1→3) e (1→4), numa relação molar de 60:40 (89).

Gorin & Iacomini (36), em 1984, utilizando os recursos de espectroscopia de r.n.m.-<sup>13</sup>C ao analisar os

polissacarídeos de *C. islandica* e *R. usnea*, obtiveram em ambas, isoliquenanas, espectros com sinais para C-3 ( $\delta$  82,1 e 81,9) e C-4 ( $\delta$  79,3) substituídos, numa relação molar de 66:34. Este recurso nunca foi empregado anteriormente para análises químicas de carboidratos, sugerindo uma estrutura com duas ligações consecutivas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3), alternada por uma ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) isolada (estrutura II), apesar de uma outra estrutura com seqüência alternada de ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) também ocorresse ao longo do polissacarídeo.



A maioria das glucanas de líquens com micobiontes ascomicetos, possuem estruturas análogas com aquelas de liquenana e isoliquenanas, mas, com ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 4) em diferentes proporções (32). Casos extremos são aqueles de amilose, contendo somente ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), encontrados em muitos líquens (40, 77) e uma glucana com ligações exclusivas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) isolada do líquen *Stereocaulom ramulosum* (06). Pustulana, uma glucana com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) tem sido encontrada em muitos líquens, o primeiro dos quais foi *Umbilicaria pustulata* (69).

Iacomini et alii (58), estudando o líquen *Cora pavonia* cujo micobionte é basidiomiceto, caracterizaram uma  $\beta$ -D-glucana ramificada com ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) e uma xilomanana. Tais estruturas são típicas de basidiomicetos e diferem dos componentes polissacarídicos de líquens

ascomicetos que contêm glucanas lineares e galactomananas.

Com o desenvolvimento da espectroscopia de r.n.m.-<sup>13</sup>C, o estudo estrutural dos polissacarídeos, bem como de outros componentes, passou a aproveitar esse poderoso recurso. Yokota et alii, em 1978 (110), valendo-se da espectrometria de r.n.m.-<sup>13</sup>C puderam determinar as proporções relativas das ligações existentes em D-glucanas isoladas de seis espécies de líquens, demonstrando que a *Parmelia caperata* continha uma α-D-glucana com ligações (1→3) e (1→4), numa relação molar 1:1, enquanto que uma outra espécie, a *Cetraria richardsonii*, apresentava uma β-D-glucana e uma α-D-glucana com ligações (1→3) e (1→4), nas proporções relativas de 3:7 e 3:2, respectivamente. A acrosocyphana, obtida do *Acrosocyphus sphaerophoroides*, era uma α-D-glucana com ligações (1→3) e (1→4), numa relação 2:3 e que continha também 6% de ligações (1→6). Um polímero idêntico à acrosocyphana, foi também encontrado no *Sphaerophorus globosus*, também da mesma família. Utilizando-se análise por r.n.m.-<sup>13</sup>C concluiu-se que o polissacarídeo isolado de *Pilophoron acicularis* era idêntico ao do *Stereocaulon japonicum*, que mostrou serem quimiotaxonomicamente relacionados aos líquens.

Um estudo de quimiotaxonômica de líquens foi realizado por Takahashi et alii (102) quando, em 1981, estudaram os polissacarídeos de seis espécies *Stereocaulon* obtidos por extração aquosa à quente, purificados por congelamento e finalmente fracionados por coluna de DEAE-celulose. De posse destes resultados os referidos

pesquisadores as dividiram em dois grupos; de acordo com a solubilidade de seus polissacarídeos em água: um grupo constituído por *St. japonicum*, *St. sorediiferum* e *St. exutum*, contendo  $\alpha$ -glucanas com ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 4) na proporção de 3:1, característica de uma isoliquenana solúvel em água; outros grupos constituídos por *St. vesuvianum*, *St. tomentosum* e *St. intermedium*, caracterizados pela presença predominante de uma  $\beta$ -heteroglicana, contendo D-manose, D-galactose e D-glucose. Esses resultados forneceram uma importante orientação para futuras investigações quimiotaxonômicas dos líquens da família Stereocaulaceae. Entretanto, Baron et alii (06), em 1988, trabalhando com o líquen *St. ramulosum*, obtiveram uma  $\beta$ -D-glucana apresentando apenas ligações (1 $\rightarrow$ 3), o que diferencia daquelas espécies estudadas por Takahashi et alii (102).

Iacomini et alii (59), em 1985, empregando os modernos recursos para análise de carboidratos, estudaram três espécies de líquens do gênero *Cladonia* como a *C. confusa*, *C. amaurocraea* e *C. alpestris*. Pelo estudo comparativo dos resultados obtidos, os autores concluíram que há similaridade entre a *C. alpestris* e a *C. confusa*, especialmente quanto à forma de crescimento; apesar do habitat diferente, cada uma contém traços de nigerana insolúvel em água, formada por ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 4) na proporção de 1:1. Nigerana também foi isolada de outras espécies de *Cladonia* spp. por Nishikawa et alii (84). O líquen forneceu D-galacto-D-mananas quase puras isoladas

via complexo insolúvel com cobre, formado com solução de Fehling. Eles não são idênticos, mas são relacionados com as cadeias principais de  $\alpha$ -D-manopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)-substituídas em diferentes posições por grupos  $\beta$ -D-galactopiranosil e  $\alpha$ -D-manopiranosil. O polissacarídeo da *C. alpestris* contém unidades consecutivas de  $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2), 0-4 substituídas por  $\beta$ -D-galactofuranose.

A *C. confusa* apresentou uma galactomanana com unidades de galactose, piranosídicas e furanosídicas. Igualmente foi isolada da *C. amaurocraea* uma  $\beta$ -D-glucana, com um rendimento significativo, bem como uma D-galacto-D-manana, na forma de complexo cúprico insolúvel. A primeira foi identificada como pustulana, insolúvel em água, o que permitiu sua separação da galactomanana, a qual continha uma estrutura semelhante aquela da *C. alpestris* e *C. confusa*, mas que, de acordo com o espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C, mostrou diferenças.

#### 1.4. - JUSTIFICATIVAS

Através de estudos realizados previamente com alguns líquens neste departamento (36,59), observaram que espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C dos heteropolissacarídeos, principalmente isolados via complexo insolúvel de cobre, foram diferentes, sugerindo que suas estruturas são típicas dos líquens e que os espectros podem ser usados em estudo quimiotaxonômico. Tal método foi usado com estudos de leveduras por Gorin e Spencer (34), que similarmente isolaram polissacarídeos de manose e examinaram seus espectros de r.n.m.-<sup>1</sup>H. A grande variedade de espectros foram proveitosos em promover uma nova quimiotaxonômia de leveduras e em ajuda para suas identificações em sistemas ecológicos.

1- Sendo assim, procurou-se analisar um maior número possível de heteropolissacarídeos contendo manose através de r.n.m.-<sup>13</sup>C, visando realizar um estudo comparativo abrangendo muitas espécies diferentes.

2- Outros estudos com heteropolímeros foram realizados (06,08,32,36,37,59,65,78,104) sendo que muitas destas espécies já estudadas, foram reanalisadas e seus resultados serão discutidos neste trabalho, entretanto, nos casos que ocorreu falta de material seus dados de literatura foram aproveitados e citados visando um maior enriquecimento deste trabalho.

3- Será dado ênfase a estrutura da *T. intricata*, a qual apresentou resultados inéditos.

4- Procuraremos esclarecer, qual unidade de açúcar

ácido que faz parte da composição dos heteropolímeros, já que, a galactomanana de *Evernia prunastri* mostrou conter ácido galacturônico (78), visto que este componente não é comum em polissacarídeos de fungos. de carboidrato em fungos, o polissacarídeo será reestudado juntamente com outras espécies.

5- As espécies de líquens as quais pretendemos discutir neste trabalho são as seguintes:

Ordem - Lecanorales

Família - Parmeliaceae

Gênero e Espécie - *Parmelia sulcata*, *Cetraria islandica*, *Parmotrema araucaria* e *Parmotrema cetratum*.

Família - Umbilicariaceae

Gênero e Espécie - *Actinogyra muehlenbergii*, *Umbilicaria pustulata*<sup>Δ</sup> e *Umbilicaria spodochroa*<sup>Δ</sup>.

Família - Usneaceae

Gênero e Espécie - *Evernia prunastri*, *Ramalina ecklonii*, *Ramalina usnea*, *Usnea sp.*, *Usnea meridionalis* e *Newropogon aurantiaco-ater*<sup>Δ</sup>.

Família - Cladoniaceae

Gênero e Espécie - *Cladonia alpestris*, *Cladonia confusa*, *Cladonia substellata* e *Cladonia amaurocraea*<sup>Δ</sup>.

Ordem - Lecideales

Família - Stereocaulaceae

Gênero e Espécie - *Stereocaulon ramulosum* e  
*Stereocaulon paschale*.

Ordem - Cyanophilales

Família - Stictaceae

Gênero e Espécie - *Pseudocyphellaria aurata* e  
*Sticta* sp.<sup>Δ</sup>

Família - Peltigeraceae

Gênero e Espécie - *Peltigera aphthosa*.

Ordem - Caloplacales

Família - Physciaceae

Gênero e Espécie - *Tornabenia intricata*.

Δ Dados referentes a estas espécies foram obtidos através de outros autores na literatura.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

## 2.1. - COLETA E CLASSIFICAÇÃO

Os líquens estudados num total de 18 espécies, referentes a 13 gêneros, todos pertencentes a Classe dos Ascolíquens, Subclasse: Gymnocarpeae, foram coletados em diversas regiões do mundo, assim como do Brasil. O líquen *Tornabenia intricata* Trevis da Ordem Caloplacales e Família Physciaceae (29), foi coletado dos carvalhos da Galileia em Israel, pela Profa. Margalith Galun, Symbiosis Research Laboratory, Department of Botany, Tel-Aviv. *Evernia prunastri* (L.) Ach., (74), foi obtido no estado Norte-Americano do Oregon, em convênio com o Prof. Bruce McCune, esta espécie é da Ordem Lecanorales e pertence a Família das Usneaceae. A espécie *Usnea meridionalis* Zahlb da mesma Ordem e Família que a *E. prunastri*, foi coletada no Município de Aquidauana, no Estado do Mato Grosso do Sul e cedida pela Profa. Izilda Divincenzi do Departamento de Química da UFMS e a *Cladonia substellata* Vain, da Ordem Lecanorales e da Família das Cladoniaceae fora gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Lauro Xavier Filho da U.F.Pe. e tal espécie fora coletada no interior do Estado de Pernambuco. Na região metropolitana de Curitiba foram coletados as espécies *Parmotrema araucaria* da Ordem Lecanorales da Família Parmeliaceae e *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. & Flot da Ordem Lecanorales e Família Usneaceae. Os demais líquens encontravam-se disponíveis no laboratório. Sendo que as espécies da Ordem Lecanorales são as seguintes: *Cladonia alpestris* (L.) Rabenh e *Cladonia confusa* pertencendo a mesma

Família que a *C. substellata*; *Ramalina usnea* e *Usnea* sp., ambas agrupadas na Família Usneaceae. Os líquens *Cetraria islandica*, *Parmotrema sulcata* T. Tayl. (Tura). e *Parmotrema cetratum* (Ach.) Hale da Família Parmeliaceae e a *Actinogyra muehlenbergii* é da Família Umbilicariaceae. As espécies da Ordem Cyanophilales são *Peltigera aphthosa* da Família Peltigeraceae, *Pseudocyphellaria aurata* da Família Stictaceae. Os líquens da Ordem Lecideales são *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Rausch e *Stereocaulon paschale* (L.) Hoffm, ambos pertencentes a Família das Stereocaulaceae.

A classificação e sistemática dos líquens foram confirmadas através de amostras ao Departamento de História Natural, Montevideo - Uruguai, na colaboração do Professor Hector S. Osório, assim como ao National Museum of Natural History - Smithsonian Institution - Washington - USA, na colaboração do Dr. Mason E. Hale já falecido.

## 2.2. - TRATAMENTO PRÉVIO DOS LÍQUENS

As espécies obtidas no estado natural, foram submetidas a um processo de limpeza para retirada de contaminantes como pequenos ramos, cascas de árvores e outros líquens, após o que foram então lavados cuidadosamente em água corrente e secos à temperatura ambiente. Finalmente, foram pulverizados em moinho Wiley sob malha de 20 mesh, fornecendo os líquens na forma de pó seco.

## 2.3. - MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

### 2.3.1. - PRINCÍPIOS ELEMENTARES

A concentração das soluções aquosas polissacarídicas e oligossacarídicas, bem como os produtos de hidrólise parcial ou total, foi realizada sob baixa pressão, em evaporador rotatório modelo Fisatom-802, à 50°C.

As soluções e reagentes utilizados nos experimentos, todos de grau de pureza PA foram fabricados pelas indústrias químicas Reagen, Merck, Sigma e Aldrich.

A liofilização das soluções contendo carboidratos foram efetuadas em aparelho Virtis, modelo 10-145 MR-BA.

As rotações óticas específicas foram determinadas em polarímetro "Perkin Elmer", modelo 141, à 25°C, usando solução aquosa a 0,2% ou solução aquosa de hidróxido de sódio a 1% para os carboidratos insolúveis.

As medidas de pH foram realizadas em aparelho "Ionalyzer" modelo 399, na temperatura ambiente. E os ensaios que necessitavam de menor precisão, utilizava-se papel indicador universal.

A remoção de material inorgânico de soluções foi realizada pelo uso de resinas trocadoras de íons com resina catiônica (Dowex 50W x 8 ou Dowex 50W x 12 - forma  $H^+$ ) e/ou com resina aniônica (Dowex 2 x 8 - forma  $HCO_3^-$ ) sob agitação magnética e posterior filtração por papel ou algodão.

Os polissacarídeos foram precipitados com aproximadamente a uma parte de solução aquosa de polissacarídeo para

quatro a seis partes de etanol.

### 2.3.2. - MÉTODOS CROMATÓGRAFICOS

#### 2.3.2.1. - CROMATOGRAFIA EM FASE LIQUIDA-GASOSA (G.L.C.)

As cromatografias líquida-gasosa foram realizadas em coluna convencional, utilizando-se o cromatógrafo "VARIAN" modelo 2440, com detector de ionização de chama, usando nitrogênio como gás de arraste (40 ml/min). As temperaturas de operação do injetor e do detector eram, 220°C e 240°C respectivamente e coluna de aço inoxidável (200 x 0,15 cm d.i.) revestidas com as seguintes fases:

a) OV-225 a 3% (p/p) sobre Gas Chrom Q de 100-200 mesh (72). A temperatura da coluna (isotérmica) foi de 190°C para acetatos de alditóis e de 170°C para os acetatos de alditóis parcialmente metilados.

b) ECNSS a 3% (p/p) sobre Gas Chrom Q de 100-120 mesh (94). A coluna foi operada com temperatura isotérmica de 185°C para os acetatos de alditóis e 160°C para os acetatos de alditóis parcialmente metilados.

As amostras foram identificadas pelos tempos de retenção de padrões. Os picos de acetatos de alditóis parcialmente metilados foram determinados em relação ao tempo de retenção do 1,4-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil D-glucitol.

Os acetatos de alditóis provenientes de hidrólise de polissacarídeos e oligossacarídeos foram identificados pelos

tempos de retenção de uma mistura equiponderal de acetatos de alditóis contendo glicerol, eritritol, ramnitol, arabinitol, xilitol, manitol, galactitol, glucitol e mio-inositol.

A composição molar de cada componente analisado por g.l.c. foi calculado segundo o método de triangulação e de corte e pesagem. (92,96).

#### 2.3.2.2. - CROMATOGRAFIA EM FASE LIQUIDA-GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (G.L.C.-M.S.)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás "VARIAN", modelo 3300 acoplado a um espectrômetro de massa da marca FINNIGAN MAT munido com ITS-40. Três colunas capilares de 30 m de comprimento com 0,25 mm de diâmetro interno de OV-225, DB-210 e Durowax-4 foram utilizadas para as análises de acetatos de alditóis parcialmente metilados e acetatos de alditóis. O gás de arraste foi hélio ultra puro, com um fluxo de 2 ml/min.

O equipamento foi programado com temperatura inicial da coluna 50°C durante 1 min, seguindo-se, após este tempo, um gradiente de 40°C/min até alcançar 220°C, mantendo-se isotérmica até o final da análise.

#### 2.3.2.3. - CROMATOGRAFIA EM PAPEL (c.p.)

Nas análises cromatográficas qualitativas em papel utilizou-se papel Whatman nº 1 e papel Whatman nº 3 nas

preparativas. As técnicas utilizadas foram as ascendentes e descendentes, com o seguinte sistema de solventes:

- A) Benzeno:n-butanol:piridina:água (1:5:3:3 v/v, fase superior) (55).
- B) n-Butanol:etanol:água (2:1:1 v/v) (36,55).
- C) Acetato de etila:ácido acético glacial:ácido fórmico:água (18:3:1:4 v/v) (99).
- D) Acetato de etila:ácido acético glacial:água (3:1:1 v/v) (100).

A revelação de carboidratos foi realizada com nitrato de prata alcalino utilizando o método de imersão (105), nitrato de prata amoniacal como reveladores universais (86), e cloridrato de *p*-anisidina em n-butanol (54) para açúcares redutores.

A migração cromatográfica dos produtos de degradação de Smith dos heteropolissacarídeos contendo manose isolado por extração alcalina foram relacionado a D-manose ( $R_{Man}$ ) - técnica ascendente, solvente A, enquanto que a migração dos componentes extraídos com a mistura de solvente metanol-água 4:1 foi relacionada à D-galactose ( $R_{Gal}$ ) - técnica descendente, solvente B, 72 horas.

A migração cromatográfica dos produtos resultantes de acetólise parcial dos heteropolímeros contendo manose isolados através de extração alcalina foram relacionados à migração da D-manose ( $R_{Man}$ ) - técnica descendente, solvente B, 72 horas.

A migração dos produtos contendo ácido urônico obtidos por extração alcalina foi relacionada à migração da lactose

(R<sub>LAC</sub>) técnica descendente, solventes C e D.

### 2.3.3. - RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DE CARBONO-13 (r.n.m.-<sup>13</sup>C)

Os espectros de ressonância nuclear magnética de carbono-13 foram obtidos pelo uso dos espectrômetros BRUKER AM-360WB e CPX-300, incorporados ao transformador de Fourier. Os polissacarídeos solúveis em água foram examinados em D<sub>2</sub>O, enquanto que os insolúveis foram examinados com soluções D<sub>2</sub>O contendo NaOD a 2%. Essas soluções (2 ml) foram colocadas em tubo de 200 mm de comprimento e 10 mm de diâmetro e mantidas a 33°C, para serem analisadas no espectrômetro, cujos deslocamentos químicos foram por fim corrigidos para temperatura de 70°C (+ 0.6 p.p.m.) (38).

Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  (p.p.m.) relativos à ressonância do Me<sub>4</sub>Si como padrão externo ( $\delta=0$ ) foram determinados em experimento separado.

### 2.3.4. - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (r.n.m.-<sup>1</sup>H)

Os espectros foram obtidos pelo uso dos espectrômetros Bruker AM-360WB e CPX-300, incorporado ao transformador de Fourier, em 360 e 300 MHz respectivamente em relação ao núcleo de <sup>1</sup>H; posteriormente colocadas em tubos de 200 x 10 mm d.i. e mantidas a 33°C para serem analisadas no

espectrômetro.

Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  (p.p.m.) relativos à ressonância do  $\text{Me}_4\text{Si}$  externa ( $\delta=0$ ) determinada em experimento separado.

### 2.3.5. - MÉTODOS FOTOCOLORIMÉTRICOS

As determinações quantitativas de carboidratos totais foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico, descrito por Dubois et alii (26). O padrão utilizado como referência foi uma solução de D-galactose numa concentração de 40  $\mu\text{g/ml}$ , sendo que o complexo colorido resultante da conjugação do hidróximetilfurfural com o fenol, foi analisado a 490 nm.

Os açúcares redutores foram dosados pelo método de Somogyi-Nelson, (81,97,98) utilizando como referência uma solução padrão de D-glucose (40  $\mu\text{g/ml}$ ). A absorbância foi lida a 535 nm.

Proteínas foram dosadas segundo o método de Lowry et alii (73) a 640 nm.

O fósforo total foi determinado nas cinzas obtidas pelo tratamento de uma amostra do polissacarídeo com ácido sulfúrico e ácido nítrico concentrados, em banho de areia (160°C durante 3 horas), segundo as técnicas preconizadas por Chen e colaboradores (15) e Bartlett (09).

### 2.3.6 - ISOLAMENTO DAS GALACTOMANANAS

Os líquens em geral foram submetidos aos mesmos processos de extração, com a exceção do líquen *Tornabenia intricata* que sofreu uma extração com metanol-água, tendo a finalidade de analisar os oligossacarídeos desta espécie.

#### 2.3.6.1. - EXTRAÇÃO BENZENO-ETANOL

Os líquens previamente secos, limpos e moídos foram deslipidificados com o solvente benzeno-etanol (9:1, v/v, - 1,00 l), durante 4 horas, sob refluxo. O material filtrado em algodão, à quente, o extrato foi guardado e o líquen residual seco em estufa a 50°C para ser submetido ao próximo processo de extração.

#### 2.3.6.2. - EXTRAÇÃO METANOL-ÁGUA

O resíduo liquênico da *T. intricata* oriundo da extração benzeno-etanol foi submetido a uma mistura extratora metanol-água (4:1, v/v - 0,5 l), num intervalo de 4 horas, sob refluxo, e filtrado por algodão ainda à quente.

O extrato foi concentrado em rotavapor até pequeno volume e então deionizado pelas resinas Dowex 50 x 8 (forma  $H^+$ ) e Dowex 2 x 8 (forma  $HCO_3^-$ ) para a dessalificação, posteriormente concentrado a pequeno volume e liofilizado. Uma alíquota desta fração foi hidrolisada com TFA 1 M por 12 horas a 100°C e submetida a c.p. e posteriormente reduzido

com boroidreto de sódio segundo metodologia desenvolvida por Wolfrom & Thompson (107), acetilado (106) e analisado por g.l.c. O resíduo da extração metanol-água sofreu extração com alcali à quente como os demais líquens.

#### 2.3.6.3. - EXTRAÇÃO ALCALINA

Os resíduos líquênicos resultantes das extrações com benzeno-etanol e metanol-água, no caso de *T. intricata*, foram tratados com solução aquosa de hidróxido de potássio a 2%, a 100°C, durante uma hora, sob refluxo e na presença de uma alíquota de  $\text{NaBH}_4$ . Logo após, filtrou-se ainda à quente e o resíduo foi submetido a uma segunda extração nas mesmas condições, em seguida resfriado em cuba de gelo e neutralizado com ácido acético concentrado e os polissacarídeos foram precipitados em excesso de etanol e finalmente separados por centrifugação (3.000 rpm, 20 min). O precipitado formado foi solubilizado em água e liofilizado.

Os resíduos líquênicos após as extrações, foi descartado.

#### 2.3.6.4. - FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS RESULTANTES DA EXTRAÇÃO ALCALINA POR CONGELAMENTO E DEGELO

Os precipitados das extrações alcalinas foram solubilizados em água (0.5 l), e a seguir submetidas ao

processo de congelamento e posterior degelo realizado à temperatura ambiente, ocorrendo a formação de um precipitado insolúvel em água fria, o qual foi separado dos componentes solúveis por centrifugação (10.000 rpm, 10 min, 4°C) segundo Gorin & Iacomini (36). Esta operação de gelo e degelo foi realizada na fase insolúvel, até que o sobrenadante não mais apresenta polissacarídeo solúvel na solução detectável pela reação de fenol-sulfúrico.

A fase solúvel resultante do fracionamento gelo/degelo foi concentrada e submetida ao processo de purificação por precipitação em solução de Fehling (64).

#### 2.3.6.5. - FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS EM ÁGUA POR PRECIPITAÇÃO COM SOLUÇÃO DE FEHLING

A solução contendo os polissacarídeos solúveis em água foi adicionado igual volume de solução de Fehling e deixado em repouso durante uma noite à 4°C. O precipitado foi separado por centrifugação (10.000 rpm, 10 min, 4°C), e o sobrenadante de Fehling foi descartado. O complexo cuprico, foi lavado sucessivamente com solução de KOH a 2% e metanol (3 vezes cada), sendo centrifugado após cada operação. Em seguida o complexo foi decomposto, por agitação, numa suspensão aquosa de resina catiônica, durante 30 min, logo após foi filtrado e liofilizado.

2.3.6.6. - FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS PURIFICADOS PELA SOLUÇÃO DE FEHLING, POR PRECIPITAÇÃO COM BROMETO DE HEXADECILTRIMETILAMÔNIO (CETAVLON)

Com a finalidade de obter galactomananas com um maior grau de pureza, o precipitado resultante do fracionamento pela solução de Fehling (500 mg), foi submetido ao processo de fracionamento por cetavlon, como descrito por Scott (93) e por Duarte & Jones (25).

Em pH 7,0 ocorreu a formação de precipitado em alguns líquens, o qual foi decomposto com solução de NaCl 4 M e posteriormente precipitado em etanol, tal processo foi repetido por 3 vezes, sendo que logo em seguida foi dialisado em água corrente por 48 horas.

O sobrenadante resultante de pH 7,0, foi tratado com igual volume de solução com tampão borato a 3%, pH 8,5, observando a formação imediata de um precipitado na forma de complexo polissacarídico boratado com base quarternária. Esta fração foi descomplexada com solução de ácido acético 2 M. A solução resultante foi finalmente tratada com excesso de etanol formando novo precipitado, tal operação foi repetida por 3 vezes, sendo que logo após, o polissacarídeo foi dialisado por 48 horas.

Ao sobrenadante da precipitação em pH 8,5 foi adicionado solução de NaOH a 40%, elevando-se até pH 12.0 e como não ocorreu a formação de precipitado, foi neutralizado em banho de gelo com ácido acético 2 M, concentrado a pequeno volume e adicionado em excesso de

etanol não ocorrendo precipitação.

## 2.4. - METODOLOGIA ESPECÍFICA PARA ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

### 2.4.1. - TESTES DE HOMOGENEIDADE APLICADOS AOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos obtidos de líquens que apresentaram resultados inesperados foram analisados com maiores minúcias em relação a suas estruturas, entre estas espécies encontram-se *T. intricata*, *E. prunastri*, *U. meridionalis*, *Usnea* sp. e *P. araucaria*. Nestas espécies foram realizadas ensaios de homogeneidade visando um estudo de maior profundidade.

#### 2.4.1.1. - ELETROFORESE EM FITAS DE ACETATO DE CELULOSE

Uma amostra de 10 mg de polissacarídeo, após coloração com Azul de Procion M-36 (Cia. Imperial de Indústrias Químicas do Brasil) segundo o método preconizado por Dudman & Bishop (27), foi realizada em fitas de acetato de celulose (2 X 12,5 cm) na presença de tampão borato 0,2 M, pH 9.2, utilizando-se um aparelho Fanem 250-350 v, 7 mA/10 minutos, com câmara de imersão da Chemetron.

#### 2.4.1.2. - GEL PERMEACÃO EM COLUNA DE SEPHAROSE 4B-200 E SEPHAROSE 6B

Amostras de polissacarídeos (10 mg de galactomanana ou glucomanana) foram dissolvidas em 1ml de solução aquosa de NaCl 0,5 M e aplicadas em coluna de Sepharose 4B-200 (40 X 2,4 cm). As eluições foram realizadas com solução aquosa de NaCl 0,5 M.

A coluna de Sepharose 6B (99 X 0,9 cm) foi eluída com uma solução aquosa de NaCl 0,2%, e as frações foram coletadas utilizando o coletor de frações KLD BROMMA (7000 Ultrorac fraction collector), e o açúcar total foi determinado pelo método de Dubois et alii (26).

As colunas foram pré-calibradas com varios azuis de Dextran.

#### 2.5. - HIDRÓLISES ÁCIDAS

As hidrólises ácidas foram subdivididas em dois grupos: totais e parciais.

a) As hidrólises totais foram realizadas em tubos hermeticamente fechados da marca Kimax ou em ampolas de vidro em estufas à temperatura de 100°C, com os seguintes ácidos e seus tempos de hidrólise.

- Ácido sulfúrico 0,5 M por 12 horas.

- Método de Saeman (02) realizado com pré-tratamento com ácido sulfúrico a 72%, durante 1 hora em banho de gelo, após este período de tempo, diluído para 4,9% (0,5 M) e

assim permanecendo por 12 horas a 100°C.

- Metanólise (MeOH/HCl 5%) sob refluxo durante 3 horas, logo após resfriado e neutralizado com carbonato de prata e hidrolisado novamente com ácido sulfúrico 0,5 M por 12 horas.

- Ácido trifluoracético (TFA) 2,0 M em tubos de hidrólise por 8 horas, seguido de metanol/HCl 5% em ampolas seladas.

b) Hidrólise parcial, foi realizada em tubos de vidro da marca Kimax, utilizando-se ácido sulfúrico pH 2,0 durante 18 horas a 100°C.

c) Remoção dos ácidos após as hidrólises

O TFA foi removido por concentração à secura ou evaporação espontânea em vidro relógio num período de 24 horas.

O  $H_2SO_4$  foi eliminado sob a forma de um sal insolúvel por centrifugação seguido por filtração, após neutralização com carbonato de bário.

O HCl embora seja um gás volátil, foi removido através da neutralização com carbonato de prata e posterior filtração com lã de vidro, pois tratava-se de material parcialmente metilado.

## 2.6. - REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DOS PRODUTOS RESULTANTES DE HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

A mistura de monossacarídeos obtidos das hidrólises totais foram reduzidas com boroidreto de sódio, segundo Wolfrom & Thompson (107) à temperatura ambiente, pH 9.0, e por um período de 12 horas. Logo após este tempo, o excesso de boroidreto de sódio foi neutralizado com ácido acético 1 M e posteriormente a solução foi tratada com resina Dowex 50 X 8 (forma  $H^+$ ), que converteu o sal borato de sódio ainda existente, em ácido livre. Seguindo por filtração e concentração à secura e o ácido bórico remanescente foi eliminado, na forma de éster volátil borato de metila, por co-destilação com metanol.

Os alditóis formados, foram submetidos a acetilação pela técnica desenvolvida por Wolfrom & Thompson (106) que consiste de uma mistura de anidrido acético-piridina, na proporção de 1:1 (v/v, 1,0 ml de cada), a 100°C por uma hora ou à temperatura ambiente por 12 horas. Após decorrido este período, o processo de acetilação foi interrompido por adição de gelo ou água gelada ao sistema reagente e os alditóis acetilados extraídos com clorofórmio. A piridina resultante foi eliminada do meio por sucessivos tratamentos com solução aquosa de sulfato de cobre a 2% e em seguida a fração clorofórmica foi lavada com água destilada para eliminação total do cobre remanescente. Após a evaporação do clorofórmio, os acetatos de alditóis obtidos foram

analisados por g.l.c., nas condições já descritas.

## 2.7. - METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos (30 - 50 mg) foram reduzidos por boroidreto de sódio durante 12 horas, à temperatura ambiente, seguido por neutralização com ácido acético 2 M em banho de gelo e levado a diálise contra água corrente num intervalo de 24 horas. Após este período, as frações não dialisáveis foram concentradas à secura e os produtos solubilizados em 10 ml de solução aquosa de hidróxido de sódio 33% sob agitação magnética. Logo após submetidos a metilação, segundo processo descrito por Haworth (52): Hirst & Percival (53). As soluções de polissacarídeos já dissolvidos em 10 ml de solução aquosa de NaOH a 33%, foram feitas 10 adições de (0,5 ml) de sulfato de dimetila, em intervalos de 20 min sob forte agitação magnética à temperatura ambiente; este processo foi repetido por mais dois dias consecutivos.

A reação de metilação foi interrompido pelo aquecimento a 100°C, durante 30 min com a finalidade de decompor o excesso de sulfato de dimetila. Após o resfriamento a 0 - 2°C, os polissacarídeos foram neutralizados com ácido acético 2 M, seguido por diálise em água corrente por 48 horas e contra água destilada durante 24 horas. Após as diálises os polissacarídeos parcialmente metilados foram liofilizados e submetidos ao tratamento descrito por Purdie e modificado por Kuhn et alii (66). Os

polissacarídeos liofilizados foram dissolvidos em 2 ml de dimetilformamida e em seguida adicionou-se 2 ml de iodeto de metila e 1 g de óxido de prata a cada 24 horas. No decorrer de três dias, o sistema de reação foi mantido sob agitação constante, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Decorridos estas 72 horas, o processo foi interrompido pelo acréscimo de diclorometano e a mistura foi filtrada e posteriormente evaporada até a secura. Análises dos polissacarídeos permetilados através de infra vermelho, indicaram ausência da banda de absorção característica dos grupos hidroxílicos na faixa dos  $3400 \text{ cm}^{-1}$ . Os polissacarídeos totalmente metilados, foram convertidos em acetatos de alditóis parcialmente metilados como será descrito.

#### 2.7.1. - CARBOXI-REDUÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PER-O-METILADOS

O polissacarídeo per-O-metilado (5 mg) foi dissolvido em tetra-hidrofurano seco (0.5 ml) e lítio alumínio deuterado (2 mg). Adicionado após 3 horas, o reagente foi decomposto com excesso de acetato de etila, seguido por ácido acético. A mistura foi diluída com excesso de diclorometano, o material insolúvel foi removido e a solução evaporado até a secura.

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

Uma fração de cada polissacarídeo metilado foi submetida a uma pré-hidrólise com metanol/HCl a 3% sob refluxo a 100°C durante 3 horas, resfriado e o reagente foi neutralizado com carbonato de prata e após filtração com metanol, concentrado à temperatura ambiente, até a secura. A seguir o material foi transferido para um tubo de hidrólise Kimax e adicionado ácido sulfúrico 0,5 M (2 ml) este sistema foi mantido por 12 horas em estufa a 100°C. O ácido sulfúrico foi eliminado com carbonato de bário, e o filtrado límpido foi deionizado por meio de resina Dowex 50W X 8 (forma H<sup>+</sup>). Após filtração, a solução resultante foi evaporada a um pequeno volume e tratada com boroidreto de sódio deuterado, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Findo esse tempo, os íons sódicos foram removidos por tratamento com resina Dowex 50W X 8 (forma H<sup>+</sup>) e o ácido bórico formado no processo, foi eliminado na forma de borato de metila, por sucessivas co-destilações com metanol.

A acetilação dos alditóis parcialmente metilados foi realizado por método convencional, com anidrido acético e piridina na relação de 1:1. Os produtos, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados, foram extraídos com clorofórmio e analisados por g.l.c./m.s. em coluna capilar revestida com OV-225, conforme descrito em métodos

analíticos gerais.

O polissacarídeo completamente metilado do líquen *T. intricata* além da hidrólise por metanol/HCl também foi analisado através da hidrólise de Saeman segundo Adams (02) por adição de solução aquosa de ácido sulfúrico a 72%, durante 1 hora em banho de gelo, com agitação periódica. Após este tempo diluído para 4,9% (0,5 M) e assim permanecendo em estufa a 100°C por 12 horas. Decorrido este período o excesso de ácido sulfúrico foi decomposto por adição de carbonato de bário, seguido por redução com boroidreto de sódio e acetilação com piridina e anidrido acético 1:1.

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram extraídos com clorofórmio e analisados por g.l.c./m.s. em coluna capilar de OV-225, conforme descrito anteriormente.

## 2.9 - DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE META-PERIODATO DE SÓDIO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO PELA GLUCOMANANA OBTIDA NO LÍQUEN *T. intricata*

Uma alíquota de ( 50 mg) da glucomanana obtida através da reação de cetavlon pH 8.5, do líquen *T. intricata*, foi dissolvida em ( 10 ml) de água destilada e oxidada com solução de meta-periodato de sódio 0.1 M (10 ml), durante 96 horas, em balão protegido contra a luz e mantido a uma temperatura próxima de 20°C, conforme prescreve Hay et alii (52) e Dyer (24).

### 2.9.1 - CONSUMO DE META-PERIODATO DE SÓDIO

No decorrer da oxidação, alíquotas de (1 ml) das misturas em reação foram retiradas para determinação do consumo de periodato. As titulações foram realizadas com solução padronizada de tiossulfato de sódio 0.1 M, em meio fortemente ácido, usando como indicador gotas de solução aquosa de amido a 1% (p/v).

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

$$X = \frac{(B-A) \times \text{volume total da solução oxidante} \times M \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 162}{2 \times \text{ml de alíquota titulada} \times \text{g de amostra oxidada} \times 1000}$$

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

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

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

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

162 = Peso molecular da hexose anidra, por unidade no polímero.

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

tempo zero.

### 2.9.2. - PRODUÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO

Ao final da oxidação com meta-periodato, alíquotas de 1 ml foram retiradas e tituladas com solução padronizada de hidróxido de sódio 0.01 M, usando-se como indicador gotas de solução aquosa de fenolftaleína a 1%.

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

$$Y = \frac{(A - B) \times \text{volume total da solução oxidante} \times M \text{ NaOH} \times 162}{\text{ml da alíquota titulada} \times \text{g de amostra oxidada} \times 1000}$$

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

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

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

M NaOH = Molaridade da solução de NaOH x fator de correção.

### 2.10. - DEGRADAÇÃO TIPO SMITH (1,4,49,60) DOS POLISSACARÍDEOS

Algumas espécies de líquen sofreram degradação tipo Smith. As amostras de polissacarídeos (5-10 mg) foram oxidadas com m-periodato de sódio 0,05 M (25-50 ml), em ausência de luz e temperatura à 49C, durante 96 horas. As reações foram interrompidas, adicionando leve excesso de etileno glicol aos meios reacionantes. Após decorrido 1

hora de reação, os produtos foram dialisados em água corrente por 24 horas. As amostras foram, então, reduzidas com boroidreto de sódio, tal reação se processou num intervalo de tempo de 12 horas. Após este período o excesso de  $\text{NaBH}_4$  foi decomposto pela adição de solução aquosa de  $\text{AcOH}$  2 M até pH 6, a temperatura de 0-20°C, e as soluções foram dialisadas em água corrente por 48 horas. Concentradas à secura e submetidas à hidrólise com solução aquosa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M (2 ml), durante 12 horas, a 100°C. Concluídas as hidrólises o ácido sulfúrico foi removido pela adição de carbonato de bário, seguido por centrifugação e deionização com resina catiônica. Os materiais hidrolisados foram então reduzidos com  $\text{NaBH}_4$ , por 2 horas, à temperatura ambiente, tratados com resina catiônica e o ácido bórico resultante eliminado por co-destilação com metanol.

Os alditóis assim obtidos foram acetilados com anidrido acético e piridina (1:1) e os acetatos de alditóis resultantes foram extraídos com clorofórmio e analisados por cromatografia líquida gasosa acoplada ao espectrometro de massa, em coluna capilar OV-225.

## 2.11. - HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA GLUCOMANANA DE *T. intricata*

A uma amostra de glucomanana da *T. intricata* (100 mg) adicionou-se (10 ml) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,16 M e o sistema foi então mantido em estufa a 100°C por 18 horas. (45). Após decorrido este período, a solução foi neutralizada com carbonato de

bário e filtrada, seguida por deionização com resina catiônica e novamente filtrado, concentrada a pequeno volume e submetida à precipitação em excesso de etanol. O precipitado foi separado por centrifugação (3.000 rpm, 20 minutos), logo após, solubilizado em água destilada e dialisado em água corrente por 24 horas. Após este período, foi concentrado a pequeno volume e liofilizado. A amostra resultante foi dividida em 2 frações: Uma fração deste material sofreu os processos de metilação, pelo método desenvolvido por Haworth (51) e Kuhn et alii (66), e a outra fração foi utilizada para rotação específica e r.n.m.-<sup>1</sup>H.

## 2.12. - ACETÓLISE PARCIAL DA GLUCOMANANA DE *T. intricata* E A PREPARAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

### 2.12.1. - ACETÓLISE PARCIAL

Uma alíquota (50 mg) de glucomanana foi adicionada em uma mistura de ácido acético glacial (0,4 ml), anidrido acético (0,4 ml) e ácido sulfúrico concentrado (0,04 ml). Durante a reação, a mistura foi mantida à temperatura ambiente e após 3 dias (72 horas), foi processada, de acordo com os seguintes passos:

-Gelo foi adicionado a reação para interromper o processo de acetólise. Logo após levado para geladeira e mantido até que todo o gelo se liquefez.

-Os carboidratos na forma de acetatos de alditóis

foram extraídos com clorofórmio (6 ml) e a fração clorofórmica foi lavada com mais água destilada, em seguida, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão. Após evaporação do solvente, a mistura foi liofilizada.

Os carboidratos acetilados foram dissolvidos numa mistura de clorofórmio e metanol 2:1 (5 ml) e desacetilado pela adição de solução metanólica de metóxido de sódio (5 ml). Com agitação manual e seguido por repouso de uma hora, à temperatura ambiente, em seguida foi adicionado ácido acético glacial para neutralização do meio alcalino e a solução neutralizada foi evaporada até a secura. O resíduo no balão de evaporação foi então dissolvido em água, deionizado com mistura de resinas catiônica e aniônica na proporção de 3:1 e liofilizado.

### 2.13. - TRIMETILSILANIZAÇÃO DOS POLÍMEROS ÁCIDOS DEGRADADOS

Devido a presença de ácido urônico com substituição em 3-O, conforme (Tabela IX a XII) , procurou-se confirmar tais resultados, realizou-se uma degradação de Smith em 50 mg do material obtido através da precipitação com cetavlon a pH 7.0. O produto resultante da degradação de Smith, sofreu um processo de metanólise com MeOH/HCl à 5%, por um período de 12 horas, decorrido este tempo, o material foi concentrado em rotavapor e posteriormente liofilizado com a finalidade de eliminar o

HCl.

A trimetilsilanização foi realizada segundo a técnica de Sweeley et alii (101) e as amostras silanizadas foram analisadas através de uma coluna capilar de Durowax-4 (30 m x 0.248 mm), acoplado a espectro de massa, com temperatura inicial de 50°C durante 1 min., seguido por um gradiente de temperatura de 50°C/min., até atingir o patamar de 220°C permanecendo constante nesta temperatura.

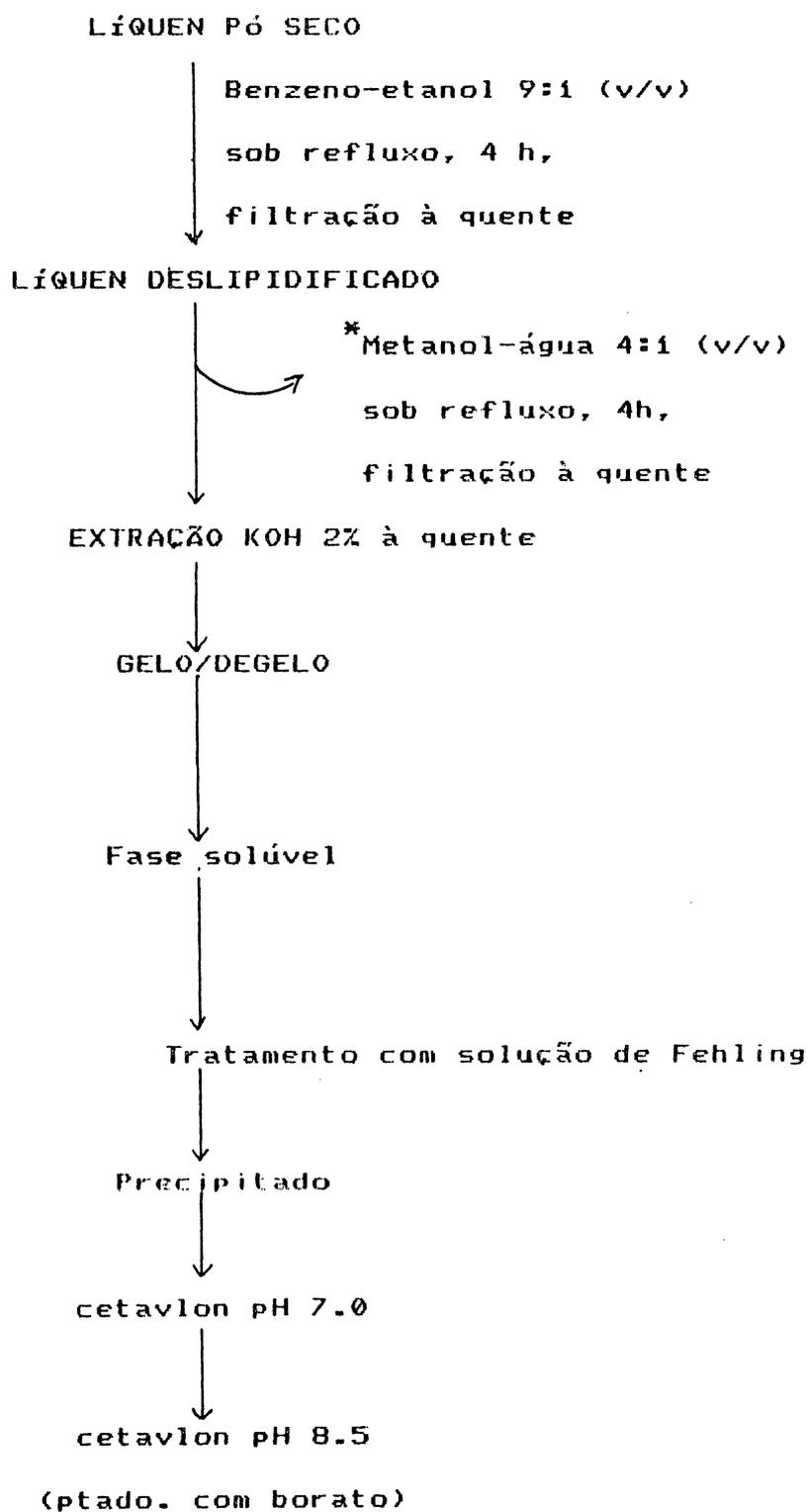
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As dezoito espécies de líquens, ascomicetos, disponíveis no laboratório, foram coletadas em regiões com condições climáticas e geográficas distintas, as quais foram objeto de um estudo de seus componentes carboidratados. Foi dado ênfase a um estudo comparativo das galactomananas utilizando principalmente a espectroscopia ressonância nuclear magnética de  $^{13}\text{C}$ . Mais 5 espécies já estudadas foram compiladas da literatura.

Cada líquen seco, e moído a pó sofreu o processo de extração exposto no Esquema I. Em geral, a remoção do material apolar e carboidratos de baixo peso molecular foi efetuada com benzeno-etanol e metanol aquoso respectivamente. Posteriormente os polissacarídeos foram extraídos através de uma solução aquosa de hidróxido de potássio à quente.

Os polissacarídeos foram fracionados por solubilização em água e a solução submetida a um processo de congelamento seguido por degelo a temperatura ambiente. O material insolúvel foi removido e a fase solúvel foi tratada com a solução de Fehling que forneceu um precipitado polissacarídico complexado com cobre, que foi descomplexado, purificado e posteriormente fracionado com a técnica de cetavlon. Somente no caso de uma *Usnea* sp. (37), *Usnea meridionalis*, *Parmotrema araucaria* e *Evernia prunastri* (78) foram observados precipitados em pH 7.0 na presença de cetavlon, sugerindo desta forma a presença de ácidos urônicos, o qual foi confirmado por r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , nos líquens estudados pela presença do sinal a  $\delta$  178.2 referentes aos

## ESQUEMA I



\* Processo realizado na *T. intricata*.

grupos carboxil.

Na Tabela I (p. 49), estão incluídos dados concernentes ao rendimento de polissacarídeos, após extração e diferentes tipos de purificação e sua composição monossacarídica. Alguns dados não estão completos devido a falta do líquen original, o qual foi coletado no Canadá, ou polissacarídeos insuficientes para realizar as análises.

Podemos observar pequenas diferenças na composição monossacarídica dos polissacarídeos precipitados com Fehling e aqueles obtidos pelo fracionamento com cetavlon. Geralmente os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C dos produtos de cada preparação são semelhantes, mostrando estruturas idênticas (Figs. 1A e 1B; p. 53). No entanto, em certos casos, pequenas diferenças podem ser notadas (Figs. 2A e 2B; p. 54).

Em termos dos componentes monossacarídicos, manose, galactose e glucose foram apresentadas duas exceções. Nenhuma unidade de glucose foi observada na galactomanana de *Stereocaulon ramulosum* (07) precipitado com cetavlon pH 8.5 na presença de tampão borato e as de galactose foram ausentes da glucomanana que foi encontrada na *Tornabenia intricata* (104).

Devido a composição dos monossacarídeos do líquen *Tornabenia intricata*, os quais não são citados na literatura, procurou-se elucidar a estrutura deste polímero, composto de manose e glucose, assim como identificar o açúcar ácido presente no precipitado em pH 7.0 dos líquens *Usnea* sp., *Usnea meridionalis*, *Parmotrema araucaria* e

*Evernia prunastri*. A última já foi examinada (78) e foi relatado conter ácido galacturônico. Desde que ácido galacturônico não foi encontrado na literatura em fungos, uma reinvestigação foi realizada para esclarecer este impasse.

Os maiores rendimentos alcançados através da extração alcalina foram obtidos nas espécies *Cetraria islandica* (55%), *Ramalina ecklonii* (54%), *Actinogyra muehlenbergii* (52%) e *Usnea* sp. (51%). A *R. ecklonii* apresentou o maior rendimento no precipitado de Fehling (24%) e também no fracionamento por cetavlon em pH 8.5 na presença de borato (16%). Os polímeros obtidos via precipitação de Fehling geralmente tem uma composição monossacarídica similar para aquele obtido via precipitação com cetavlon, mas os rendimentos do precipitado de Fehling são superiores.

TABELA I. RENDIMENTO E ALGUMAS PROPRIEDADES DAS FRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS LÍQUENS

Líquen <sup>+</sup>	% rendimento <sup>o</sup> to extração com KOH	Rendimento % <sup>o</sup> e relação man: gal:glc. Ptdo. de Fehling	Rendimento % <sup>o</sup> , (α) <sup>25</sup> <sub>D</sub> <sup>*</sup> e relação man:gal:glc <sup>#</sup>
<i>C. alpestris</i> (59)	-	2.4, 49:28:23	2.0, +46°, 57:31:12
<i>C. confusa</i> (59)	10.4	4.8, 48:45:7	3.1, +55°, 42:51:7
<i>C. substellata</i>	19.2	4.5, 42:43:15	3.4, +54°, 33:49:18
<i>R. usnea</i> (36)	38.0	1.3, 37:42:21	1.1, +81°, 38:44:18
<i>Usnea</i> sp. (37)	50.0	15.4	5.0, +115°, 31:47:21 <sup>#</sup> 2.8, +94°, 35:61:4
<i>E. prunastri</i> (78)	43.9	12.5, 53:42:5	4.5, +109°, 49:42:9 <sup>#</sup> 5.2, +102°, 51:44:5
<i>R. ecklonii</i> (77)	54.0	23.7, 33:46:21	16.3, +81°, 36:50:14
<i>U. meridionalis</i>	32.2	14.3, 38:38:26	10.8, +79°, 35:42:23 <sup>#</sup> 0.9, +101°, 52:35:13
<i>P. sulcata</i> (37)	38.5	7.3, -	2.1, +89°, 42:44:12
<i>C. islandica</i> (36)	55.1	2.1, 43:44:13	1.6, +87°, 47:46:7
<i>P. cetratum</i>	46.6	12.2, 38:51:11	9.6, +90°, 46:45:9
<i>P. araucaria</i>	26.4	6.0, 39:45:16	1.0, +98°, 50:44:6 <sup>#</sup> 3.6, +98°, 49:44:7
<i>St. paschale</i> (37)	21.8	6.7, 48:41:11	4.8, +55°, 52:36:12
<i>St. ramulosum</i> (07)	33.6	14.5, 41:49:10	9.0, +73°, 57:43:0
<i>P. aurata</i>	19.6	6.2, 65:24:11	6.1, +46°, 61:30:9
<i>P. apthosa</i> (37)	-	-	- +61°, 40:45:15
<i>A. muelhlenbergii</i> (37)	52.0	0.5, -	0.4, +20°, 58:37:5
<i>T. intricata</i> (104)	22.9	8.9, 90:00:10	6.4, +74°, 93:0:7

+*Cladonia amaurocraea* (59) e *Letharia vulpina* (37) foram investigada previamente em nosso laboratório, mas não estão incluídas devido a falta de material.

\* Precipitado a pH 8.5 na presença de borato.

# Precipitado a pH 7.0.

o Rendimento calculado com base no peso original total do líquen.

PORTE I - 3.1 - QUIMIOTAXONOMIA DOS LÍQUENS BASEADA NOS  
HETEROPOLISSACARÍDEOS CONTENDO MANOSE

Os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C de  $\alpha$ - e  $\beta$ -glucanas lineares de líquens tem sido sugerido como uma maneira para realizar taxonomia química. (110). Contudo, o número relativamente pequeno de possíveis estruturas químicas é um fator limitante. Uma taxonomia de maior confiança poderia ser realizada através das análises obtidas a partir de espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C de heteropolissacarídeos de líquens contendo manose. Estes são geralmente compostos de uma cadeia principal com ligações (1 $\rightarrow$ 6)  $\alpha$ -D-Man $\rho$ , substituída com uma variedade de cadeias laterais contendo unidades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -D-Gal $\rho$ ,  $\alpha$ - e  $\beta$ -D-Gal $f$ , e  $\alpha$ -D-Man $\rho$  (Tabela VIII; p. 102). Uma outra variedade estrutural é oferecida pela possível presença de unidades D-Glc $\rho$  no polímero. Tais diferenças estruturais entre heteropolissacarídeos de diferentes líquens forneceria uma grande variedade de espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C.

Foram realizados os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C dos heteropolissacarídeos preparados através dos fracionamentos com solução de Fehling e cetavlon, para cada espécie de líquen. Pode ser visto nas figuras que o espectro é típico de cada líquen. Entretanto, existe grande similaridade entre os espectros obtidos através dos heteropolissacarídeos, os quais podem ser arranjados dentro de grupos de micobiontes relacionados em seus principais sinais de C-1, os quais indicam fatores estruturais similares. Por exemplo, temos um grupo formado pela *Parmotrema sulcata* (Fig. 1B; p. 53), *Cetraria islandica* (Fig. 2B; p. 54), *P. cetratum* (Fig. 3B; p. 56) e *P.*

*araucaria* (Fig. 4A; p. 58) em um outro grupo relacionando *Peltigera aphthosa* (Fig. 13B; p. 81), *Ramalina ecklonii* (Fig. 15B; p.83), *Ramalina usnea* (Fig. 14B; p. 82) e *Stereocaulon ramulosum* (Fig. 16B; p. 86). No entanto, após analisarmos 23 espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C de polissacarídeos contendo manose de espécies diferentes, pertencentes a 13 gêneros, tais espectros foram distribuídos em 5 grupos e serão discutidos neste trabalho. Porém estes heteropolissacarídeos são originários dos micobiontes, em virtude de seu alto rendimento, eles podem ser contaminados por aqueles dos fitobiontes, os quais possuem um menor rendimento, e que dariam pequenos sinais em r.n.m.-<sup>13</sup>C.

### 3.1.1. GRUPO A

Este grupo é formado principalmente pelos líquens da Família das Parmeliaceae com as espécies *Parmotrema sulcata*, *Cetraria islandica*, *Parmotrema araucaria* e *Parmotrema cetratum*. Reune os espectros com sinais comuns a  $\delta$  99.5, 101.8, 102.8 e 104.6, também foi agrupado as espécies *Usnea* sp., *E. prunastris* pertencente a Família Usneaceae os quais apresentaram similaridades com este grupo. Seus espectros são discutidos a seguir:

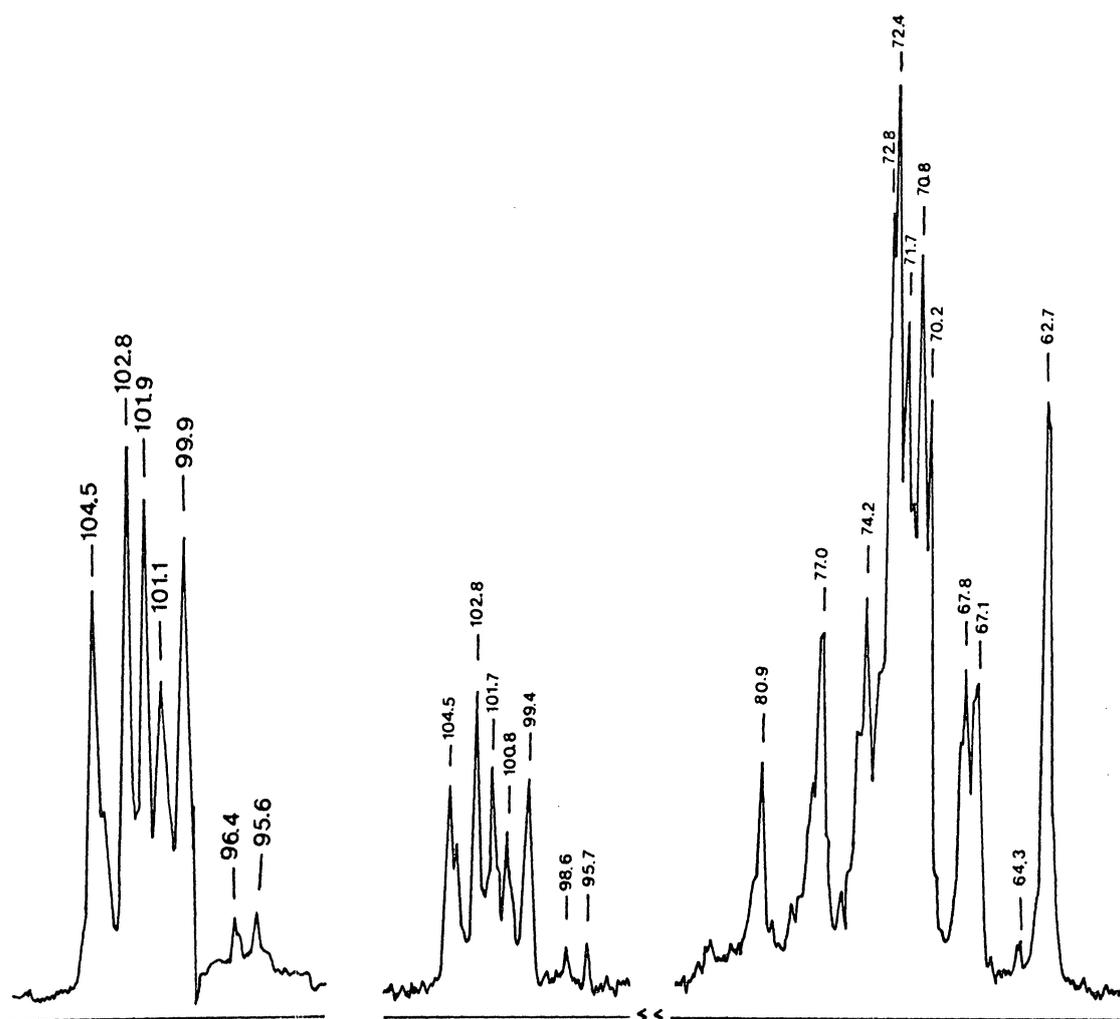


Figura 1A

Figura 1B

Figuras 1A e 1B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  da região de C-1 dos heteropolissacarídeos do líquen *Parmotrema sulcata*, obtidos respectivamente por precipitação em solução de Fehling e o espectro total de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  obtido através da precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela II; p. 60.

Analisando os espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  da região de C-1 do precipitado de Fehling e posterior fracionamento

com cetavlon do líquen *Parmotrema sulcata* (Fig. 1A e 1B), nenhuma diferença significativa é notada nestes espectros, entretanto apresentaram grande similaridade com aqueles da *Cetraria islandica* (Fig. 2A) exceto para a presença de um sinal adicional a  $\delta$  101.1, sinal que aparece na *C. islandica* quando fracionado com cetavlon a  $\delta$  101.0 (Fig. 2B), também mostrou pequenos sinais de unidades de  $\beta$ -Galf (38,41), incluindo aquele para C-1 em  $\delta$  109.6 (41,85).

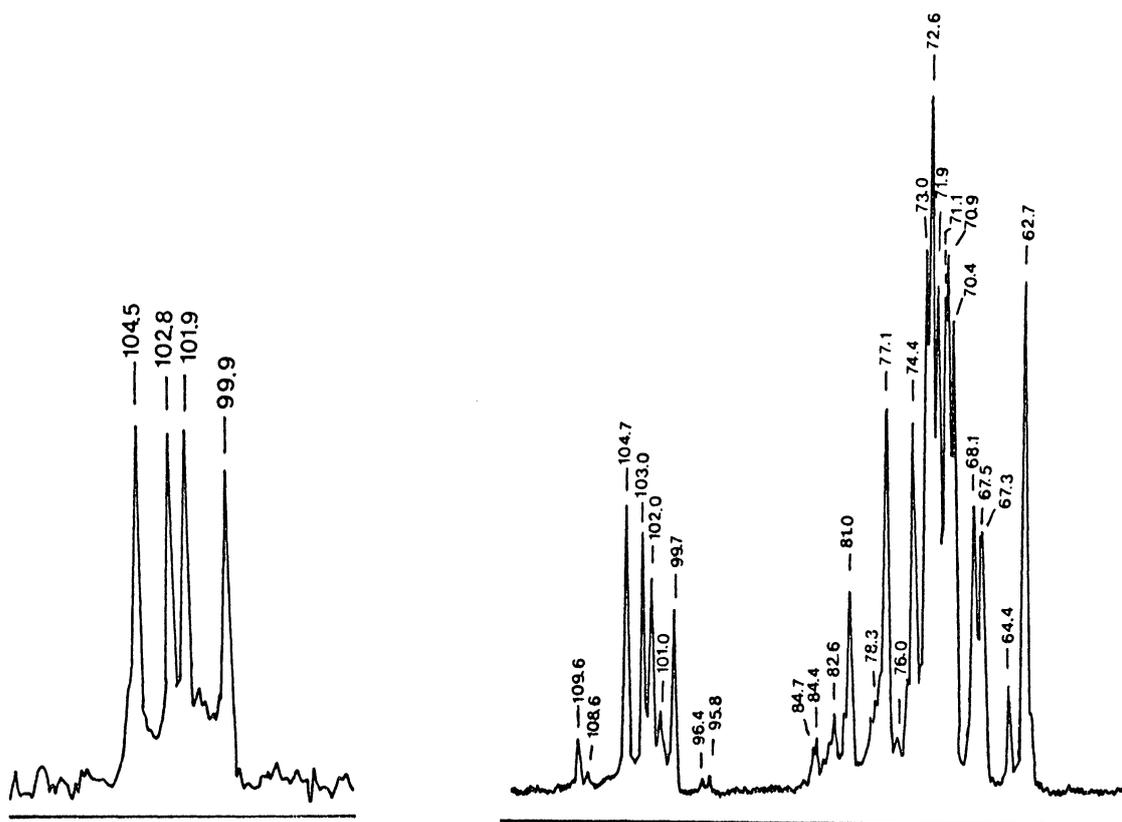


Figura 2A

Figura 2B

Figuras 2A e 2B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  da região de C-1 dos heteropolissacarídeos de *Cetraria islandica*, obtidas respectivamente por precipitação em solução de Fehling e o espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  obtido através da precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela II; p.60.

Nestes espectros foram evidenciados sinais intensos  $\delta$  104.5 (41,48) característico de unidades de  $\beta$ -Galp ligadas (1 $\rightarrow$ 4) a  $\alpha$ -Manp, (43) juntamente com seu sinal para C-5 em  $\delta$  77.0 e  $\delta$  77.1 (41). O sinal para C-1 a  $\delta$  102.8 sugere grupos  $\beta$ -D-Galp ligados (1 $\rightarrow$ 2) a uma cadeia principal com ligações (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Manp, assim como ocorre na D-galacto-D-mananas de *Saccharomyces octosporus* (39).

Uma certa similaridade também foi observada no fracionamento por cetavlon, na qual *P. sulcata* apresentou uma relação molar de 42:44:12 de Man:Gal:Glc e a *C. islandica* 47:46:7 respectivamente. Tal semelhança é comprovada pelos resultados de metilação (37,36) que mostram como principais componentes para *P. sulcata*, grupos terminais não redutores de Galp (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal, 34%) e unidades de Manp 6-O- (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man, 24%) e 2,4,6-tri-O- (3-Me-Man, 16%) substituídas. Sendo que para a *C. islandica* os valores correspondentes foram 36,19 e 15% respectivamente.

A acetólise parcial realizada no heteropolímero de *P. sulcata*, resultou na obtenção de 2-O- $\alpha$ -D-Manp-D-Man e 2-O- $\alpha$ -D-Galp-D-Man (37), e na *C. islandica* obteve-se 2-O- $\alpha$ -D-Galp-D-Man (36).

Comparando com os resultados mostrados na Tabela I, resultados obtidos com o líquen *Parmotrema cetratum* e comparando-os com *P. sulcata* e *C. islandica*, nota-se uma semelhança quando comparadas as proporções dos diferentes monossacarídeos do precipitado em solução de cetavlon a pH 8.5 com razão Man:Gal:Glc de 46:45:9, e uma rotação

específica de  $[\alpha]_D^{25} + 90^{\circ}$ , com as duas espécies analisadas acima. Estas semelhanças se intensificam a medida que comparamos a região de C-1 dos espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  da fração insolúvel no complexo cúprico e a fração obtida em pH 8,5 com tampão borato do cetavlon (Figs. 3A e 3B).

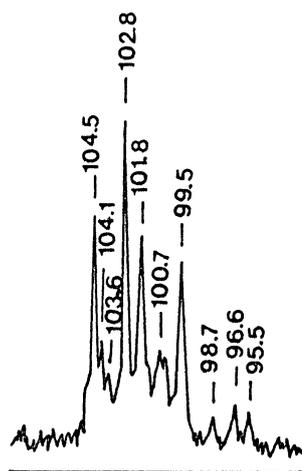


Figura 3A

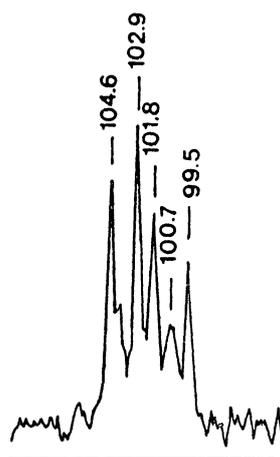


Figura 3B

Figuras 3A e 3B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , região de C-1, dos heteropolissacarídeos de *Parmotrema cetratum*, obtidos respectivamente por precipitação em solução de Fehling e precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a  $70^{\circ}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela II; p. 60.

Em tais espectros são evidenciado pelo sinal a  $\delta$  104.5 (40,48), que indicam unidades de  $\beta$ -Galp ligadas (1 $\rightarrow$ 4) a cadeia principal(41). O sinal 102.8 aponta grupos  $\alpha$ -D-Galp substituintes em O-2 de uma cadeia principal com ligações (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Manp. Os dados de metilação deste

heteropolímero (17) apresentaram como componentes principais, grupos terminais não redutores de Manp (4%), Glcp (5%) e Galp (41%), unidades Glcp 3-O-substituídas (4%) e Galp 2-O-substituídas (2%), além de unidades Manp 2-O- (1%), 6-O- (22%), 2,4-di-O- (1%), 4,6-di-O- (6%), 2,6-di-O- (5%) e 2,4,6-tri-O-substituídas (10%). E os dissacarídeos obtidos através da acetólise parcial, foram os 2-O- $\alpha$ -D-Galp-D-Man e 4-O- $\beta$ -D-Galp-D-Man (17), os quais comprovam a estrutura do polímero discutida anteriormente.

A *Parmotrema araucaria* apresentou baixos rendimentos de heteropolissacarídeo de 1% a pH 7.0 e de 3,6% a pH 8.5, quando fracionado com cetavlon, e cada preparação apresentou uma rotação específica de  $[\alpha]_D^{25} +98^{\circ}$ . Também, não foram encontradas diferenças significativas entre as proporções de Man:Gal:Glc, onde o polissacarídeo a pH 7.0 tem uma relação de 50:44:6 enquanto que em pH 8.5 apresenta 49:44:7 respectivamente (Tabela I; p. 49). Estes resultados quando comparados com o líquen *P. cetratum*, apresentam alguma similaridade, principalmente com as frações obtidas no pH 8.5 da reação com cetavlon.

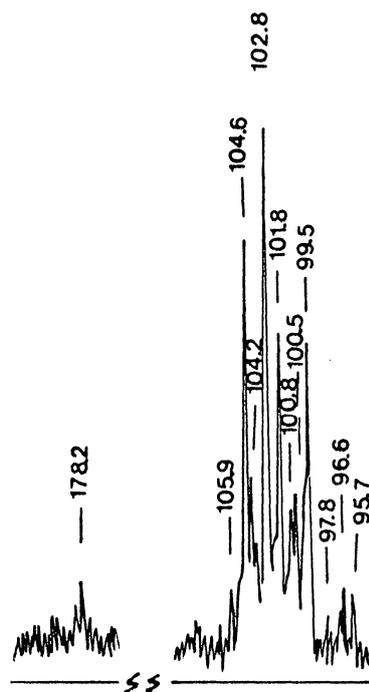


Figura 4A

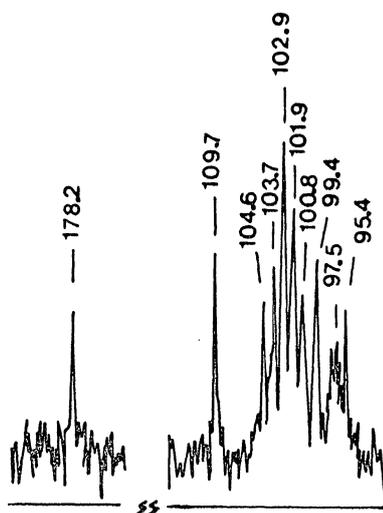


Figura 4B

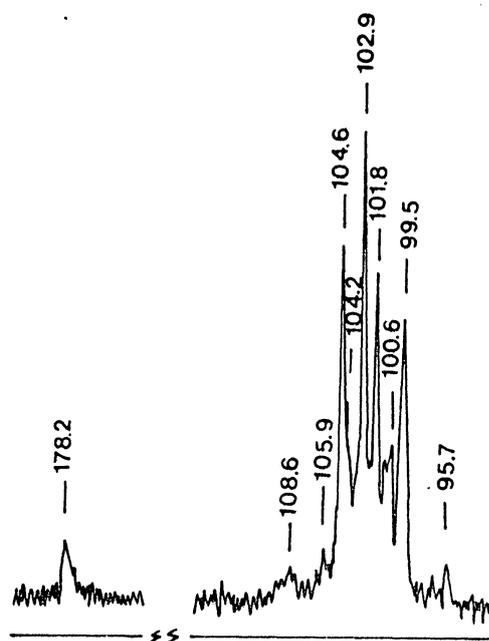


Figura 4C

Figuras 4A, 4B E 4C -- Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , região de C-1, dos heteropolissacarídeos de *Parmotrema araucaria*, obtidos respectivamente por precipitação com solução de Fehling e precipitação com cetavlon a pH 7.0 e pH 8.5 em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela II; p. 60.

Realizando uma análise comparativa entre os espectros r.n.m.-<sup>13</sup>C, região de C-1 do precipitado de Fehling (Fig. 4A; p. 58) e da região de C-1 dos outros dois espectros dos polissacarídeos precipitados em pH 7.0 (Fig. 4B; p. 58) e pH 8.5 (Fig. 4C) com cetavlon, observou-se poucas diferenças nos sinais em termos de seus deslocamentos químicos, exceto a aparência de uma sinal a  $\delta$  109.7 ( $\beta$ -Galp) em Figura 4A.

Os sinais da região de C-1 mais acentuados são  $\delta$  104.6 e 102.9 indicando  $\beta$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 4) e  $\alpha$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 2) ligados respectivamente a cadeia principal de (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Manp. O espectro apresenta dois sinais menores que os dois anteriores a  $\delta$  100.6 e 101.8 referentes as unidades da cadeia principal não substituídos e 2,4-di-O-substituídos, respectivamente. Ainda temos um sinal da cadeia principal a  $\delta$  99.5 que indica substituição das cadeias laterais em O-2. Convém ressaltar que o sinal  $\delta$  178.2, está presente em todos os espectros e que a reação de cetavlon não foi eficiente no fracionamento das moléculas contendo os grupos carboxílicos.

Os valores apontados na região de C-1 demonstram a existência de uma grande similaridade entre os polímeros de *P. araucaria* e *P. cetratum* e as duas outras espécies pertencentes a Família das Parmeliaceae que são a *P. sulcata* e *C. islandica* (36,37).

Tabela II - Atribuição de sinais r.n.m.-<sup>13</sup>C de polissacarídeos isolados através do fracionamento por cetavlon com tampão borato pH 8,5 das espécies *P. sulcata*, *C. islandica*, *P. cetratum* e *P. araucaria*.

LIQUENS

Polímeros valores em  $\delta$  p.p.m. Atribuição de sinais<sup>a</sup>

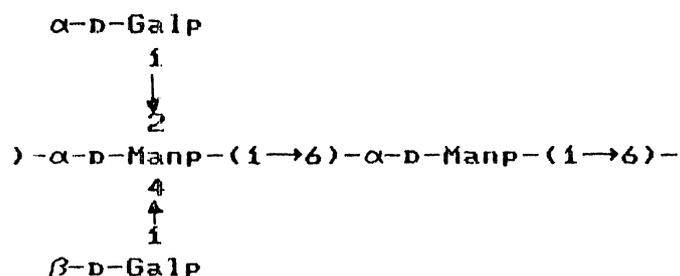
<i>P. sul-</i>	<i>C. is-</i>	<i>P. ce-</i>	<i>P. arau-</i>	
<i>cata</i>	<i>landica</i>	<i>tratum</i>	<i>caria</i>	
				178.2 C-6 grupo COOH
	109.6			C-1.β-Galp
104.5	104.7	104.6	104.6	C-1.β-Galp-1→4-α-Manp
102.8	103.0	102.9	102.8	C-1.α-Galp-1→2-α-Manp
101.7	102.0	101.8	101.8	C-1.α-Manp 2,4,6-subst.
100.8	101.0	100.7	100.8	C-1.α-Manp 6-subst.
99.4	99.7	99.5	99.5	C-1.α-Manp 2,6-subst.
				84.2 C-3.GlcA 3-subst.(?)
77.0	77.1	77.1	-	C-5.β-Galp
67.8	67.5	67.9	67.9	C-6.α-Manp 6-subst.
67.1	67.3	67.3	67.2	C-6.α-Manp 6-subst.
62.7	62.7	62.7	62.7	C-6.α-Manp e β-Galp. não subst.

<sup>a</sup>- Unidades de α-D-Manp são da cadeia principal (1→6)-substituído.

Os sinais atribuídos na Tabela II foram obtidos através dos resultados de metilação encontrados na literatura (37,36), e de acetólise parcial da *C. islandica*

(36) e *P. sulcata* (37), *P. cetratum* (17) e os ensaios realizados nos heteropolissacarídeos do líquen *P. araucaria*.

Tais resultados, somados com a alta rotação específica,  $[\alpha]_D^{25} +89^{\circ}$  para o heteropolímero de *P. sulcata* e  $[\alpha]_D^{25} +87^{\circ}$  para aquele de *C. islandica*, nos leva a concluir que eles compartilham uma estrutura principal semelhante como proposta na estrutura 1 (32,37). Não levando em conta que o heteropolímero de *P. araucaria* contém unidades de ácido urônico.



ESTRUTURA 1

Em 1984, Gorin & Iacomini (37) obtiveram um heteropolissacarídeo contendo manose através da extração alcalina e precipitação com solução de Fehling da *Usnea* sp. Tal material apresentou uma razão 43:42:14 de Man:Gal:Glc respectivamente (37), semelhante a encontrada neste trabalho pelo fracionamento por Fehling (Tabelas I; p. 49).

Através da reação com cetavlon realizada no heteropolímero obtidas através da precipitação com Fehling da *Usnea* sp., foram obtidos duas frações uma em pH 7.0 e outra em pH 8.5. A primeira forneceu um heteropolímero com um rendimento de 5% e com uma alta rotação específica  $[\alpha]_D^{25} +115^{\circ}$ , e a segunda apresentou um rendimento de 2.8% e

uma rotação específica de  $[\alpha]_{D}^{25} +194^{\circ}$ , tais diferenças são devidas a uma proporção mais alta de unidades de  $\alpha$ -D-Galp na primeira fração. O precipitado, na ausência de tampão borato, apresentou 21% de glucose e uma razão entre Man:Gal de 33:47, já o precipitado a pH 8.5 com tampão borato, tem uma baixa proporção de glucose 4% e a razão de 35:61 de Man:Gal.

Os espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , na região C-1, do precipitado de Fehling da *Usnea* sp. (Fig. 5A), dos precipitados de cetavlon a pH 7.0 (Fig. 5B; p. 64) e a pH 8.5 (Fig. 5C; p. 63) apresentam diferenças significativas.

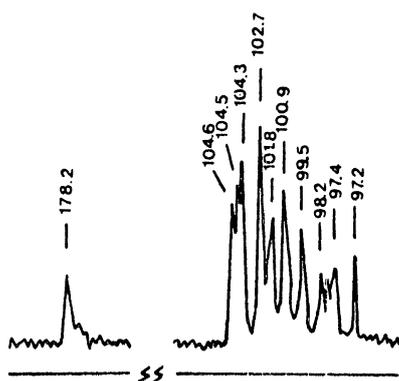


Figura 5A

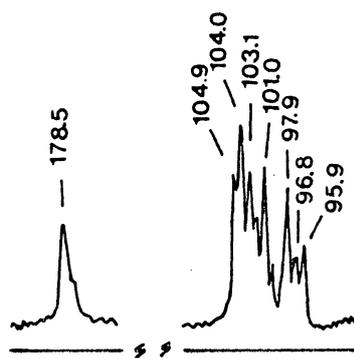


Figura 5B

Figura 5A e 5B - Espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  do heteropolissacarídeo da *Usnea* sp. obtido através da precipitação com solução de Fehling e cetavlon a pH 7.0 em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70  $^{\circ}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela III; p. 65.

A figura 5A apresenta o espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C da fração precipitada em solução de Fehling, o qual mostra um sinal em campo baixo a  $\delta$  178.2, que refere-se aos grupos carboxílicos; a região de C-1 apresenta 9 sinais, entre os quais se ressaltam três picos a  $\delta$  104.6,  $\delta$  104.5 e  $\delta$  104.3, o primeiro sinal refere-se a unidades não redutoras  $\beta$ -D-Galp ligadas (1 $\rightarrow$ 4) a  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 6) da cadeia principal. Os demais sinais a  $\delta$  104.5 e  $\delta$  104.3 não foram realizadas atribuições devido a falta de padrões. O sinal a  $\delta$  102.7, não pode ser identificado pelo mesmo motivo, no entanto, o  $\delta$  101.8 corresponde ao C-1 das unidades internas de manose 2,4-substituído por cadeias laterais. Outros sinais a  $\delta$  100.9 e 99.5 correspondem respectivamente a unidades  $\alpha$ -D-Manp não substituídos e 2-substituídos. Em campo mais alto observa-se uma ressonância a  $\delta$  77.1 indicativo de C-5 de  $\beta$ -D-Galp.

O espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C, região de C-1 do precipitado a pH 7.0 (Fig. 5B) obtido da solução de cetavlon, apresenta um sinal intenso a  $\delta$  178.5 correspondente a grupos carboxílicos. Os grupos de  $\beta$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Manp são apontados pelo sinal  $\delta$  104.9, enquanto a  $\delta$  101.0 é provavelmente devido as unidades de (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Manp da cadeia principal.

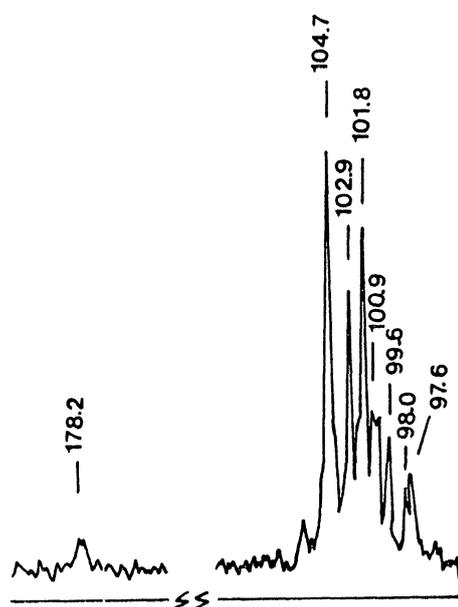


Figura 5C - Espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , região de C-1 do heteropolissacaídeo da *Usnea* sp, obtida através da precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela III; p. 65.

A Figura 5C mostra um espectro da região de C-1 do heteropolímero da *Usnea* sp. com menos complexidade que os dois outros espectros apresentados (Figs. 5A e 5B; p. 62). Ainda há contaminação de grupos carboxílicos indicados pelo sinal  $\delta$  178.2. Na região de C-1, surge um sinal acentuado a  $\delta$  104.7 referindo-se a unidades não redutoras de  $\beta$ -D-Galp ligados (1 $\rightarrow$ 4) a cadeia principal  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 6) substituído, e o sinal a  $\delta$  102.9 corresponde ao C-1 dos grupos  $\alpha$ -D-Galp ligados (1 $\rightarrow$ 2) (36). Um outro sinal intenso está presente a  $\delta$  101.8 indicando unidades de  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 6), 2,4-di-O substituídos e unidades de manose não substituídas e 2-O-substituídos fornecendo respectivamente pequenos sinais a  $\delta$  100.9 e 99.6.

Tabela - III - Atribuição de sinais r.n.m.-<sup>13</sup>C dos heteropolímeros obtidas da *Usnea* sp.

Frações e sinais $\delta$ p.p.m.		Atribuição de sinais <sup>a</sup>	
Ptado de Fehling	Cetavlon		
	pH 7.0	pH 8.5	
178.2	178.2	178.2	C-6. grupo COOH
104.6	104.9	104.7	C-1. $\beta$ -Galp 1 $\rightarrow$ 4 $\alpha$ -Manp
102.7	-	102.9	C-1. $\alpha$ -Galp 1 $\rightarrow$ 2 $\alpha$ -Manp
101.8	-	101.8	C-1. $\alpha$ -Manp 2,4-subst.
100.9	101.0	100.9	C-1. $\alpha$ -Manp não subst.
99.5	-	99.6	C-1. $\alpha$ -Manp 2-subst.
98.2	-	98.0	C-1. Hex-O-P?
-	97.9	-	C-1. Hex-O-P?
97.4	-	97.6	C-1. Hex-O-P?
97.2	-	-	C-1. Hex-O-P?
84.7	84.5	-	C-3. GlcA 3-subst.?
78.6	-	-	C-4. Galp 4-subst.
77.1	-	77.2	C-5. $\beta$ -Galp.

<sup>a</sup>- As unidades de  $\alpha$ -Manp são componentes da cadeia principal 1 $\rightarrow$ 6 ligada.

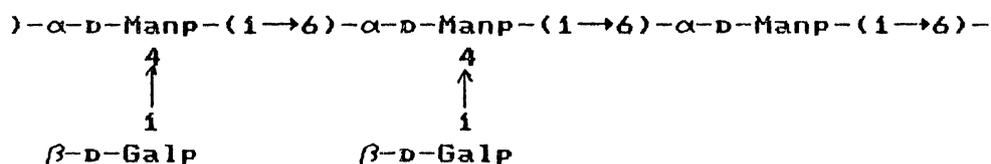
A Tabela III, nos mostra que o polímero obtido no precipitado de Fehling é composto por dois polissacarídeos, os quais apresentam sinais diferentes em C-1. Analisando diretamente os espectros (Figs. 5B e 5C p. 62 e 64), observamos também, diferenças nas intensidades dos sinais. Vale ressaltar que o heteropolímero obtido a pH 8.5 da *Usnea* sp., ainda encontra-se contaminado com aquele que compõe a estrutura obtida a pH 7.0, já que em pH 8.5 do cetavlon

ainda é obtido 4% de glucose. Estas diferenças são comprovadas, através dos dados de metilação (Tabela IX; p. 113). A estrutura do precipitado da *Usnea* sp., pH 8.5 do cetavlon, forneceu os seguintes acetatos de alditóis parcialmente metilados 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glc (10.0%), 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal (31.0%), 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Man (9.0%), 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man (14.0%), 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Glc (11.0%), 3,4-Me<sub>2</sub>-Man (17.0%) e 3-0-Me-Man (6.0%) e o polissacarídeo da *Usnea* sp precipitado a pH 7.0 na solução de cetavlon produziu os seguintes acetatos de alditóis parcialmente metilados. 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glc (8.0%), 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal (28.0%), 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Man (11.0%), 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Gal (4.0%), 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man (19.0%), 2,6-Me<sub>2</sub>-Gal (4.0%), 4,6-Me<sub>2</sub>-Glc (2.0%), 2,3-Me<sub>2</sub>-Man (13.0%), 3,4-Me<sub>2</sub>-Man (3.0%), 2-0-Me-Man (3%) e 3-0-Me-Man (6.0%).

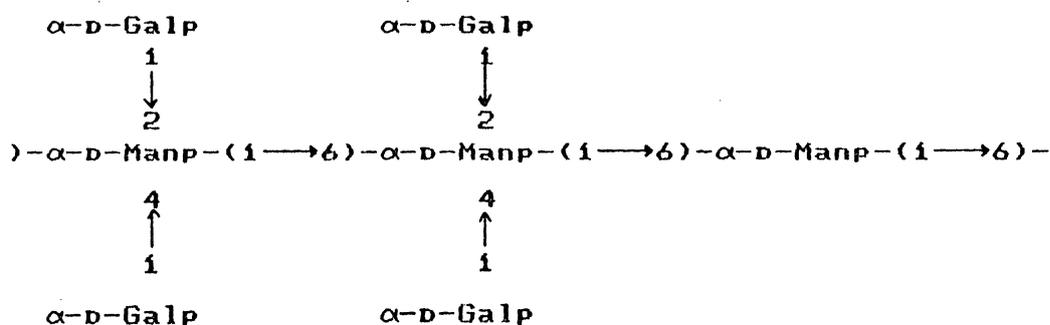
Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos pela degradação de Smith, da espécie *Usnea* sp. na qual o polímero que precipitou a pH 8.5 com tampão borato (cetavlon), produziu 78.5% de glicerol, 16.5% de eritritol, 1.0% de treitol e 4.0% de manitol. O polissacarídeo que precipitou em pH 7.0 liberou 62.5% de glicerol, 12.0% de eritritol, 10.5% de treitol e 15% de manitol.

Em face dos resultados apresentados acima, podemos afirmar que o polissacarídeo da fração 8.5 do cetavlon possui uma estrutura em grande parte semelhante a estrutura 2 e compartilha em menor intensidade com a estrutura 3. O polímero a pH 7.0, possui uma estrutura principal, constituída por unidades  $\alpha$  D-Manp com ligações (1 $\rightarrow$ 6),

apresentando ramificações de grupos  $\beta$ -D-Galp ligado a cadeia principal por ligações (1 $\rightarrow$ 4). Uma estrutura mais concreta, deverá ser proposta com resultados de acetólise parcial destes polissacarídeos, não realizada por falta de amostra.



ESTRUTURA 2



ESTRUTURA 3

A espécie *Evernia prunastri* apresentou resultados semelhantes tanto no precipitado a pH 7.0 (Fig. 6A; p. 68), quanto no precipitado a pH 8.5 na presença de borato (Fig. 6B; p. 68). Os rendimentos foram 4.5% e 5.2% respectivamente, e as rotações específicas apresentaram-se altas para ambos os polímeros de  $[\alpha]_D^{25} +109^{\circ}$  e  $+102^{\circ}$ . As respectivas relações de Man:Gal:Glc foram 49:42:9 e 51:44:5.

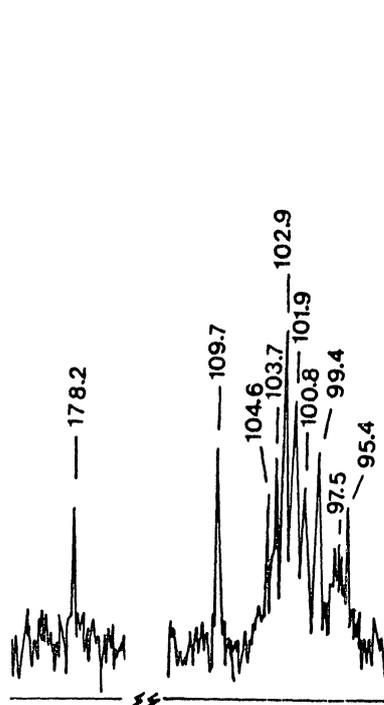


Figura 6A

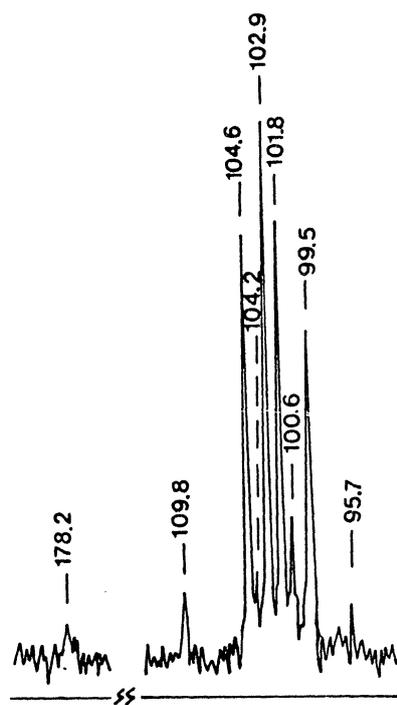


Figura 6B

Figura 6A e 6B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  da região de C-1 dos heteropolímeros de *Evernia prunastri*, obtidos respectivamente por precipitação com cetavlon a pH 7.0 e na presença de tampão borato a pH 8.5, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

O espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , região de C-1, dos heteropolissacarídeos obtidos a partir do pH 7.0 e pH 8.5 do cetavlon de *E. prunastri*, apresentam algumas diferenças na intensidade de alguns picos, entre eles, temos o sinal a  $\delta$  109.8 correspondendo as unidades de  $\beta$ -D-Galf ligadas (1 $\rightarrow$ 4) a  $\alpha$ -Manp, que é mais acentuado no produto de pH 7.0, que, apresentou 5.0% de 2,3,5,6-Me<sub>4</sub>Gal (tabela X; p. 117), o mesmo acontece com o sinal  $\delta$  178.2 que se apresenta maior a

pH 7.0 e corresponde neste caso a grupos carboxílicos enquanto o mesmo está ausente em pH 8.5.

No geral, a região de C-1 de ambos os espectros apresenta um sinal mais saliente a  $\delta$  102.9 indicando grupos de extremidades não redutoras de  $\alpha$ -D-Galp ligados por (1 $\rightarrow$ 2) na cadeia principal de  $\alpha$ -D-Manp com ligações (1 $\rightarrow$ 6), seguido por um sinal com intensidade bem menor no caso do polímero precipitado a pH 7.0,  $\delta$  104.6 apontando unidades terminais não redutoras  $\beta$ -D-Galp ligadas (1 $\rightarrow$ 4). Ainda na região de C-1 temos um sinal a  $\delta$  103.7, indicando unidades terminais não redutoras ligadas a (1 $\rightarrow$ 2) a  $\alpha$ -D-Manp.

### 3.1.2. Grupo B

Este grupo é baseado nas espécies que apresentam em seus espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C sinais proeminentes a  $\delta$  103.7 e 104.9, os quais surgem das cadeias laterais respectivamente de estruturas  $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 2) e  $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) ligadas as unidades de  $\alpha$ -Manp (1 $\rightarrow$ 6) substituídas da cadeia principal. Sendo que os polissacarídeos de *Cladonia alpestris* e *Cladonia confusa* ambos pertencendo a Família das Cladoniaceae possuem este perfil na região de C-1 de seus espectros, igualmente a espécie *Stereocaulon paschale* que faz parte da Família Stereocaulaceae e também a espécie *Pseudocyphellaria aurata* a qual está classificada na Família Stictaceae.

Através da Tabela I, observa-se que a *C. alpestris* e a *C. confusa* apresentam rendimentos e rotações específicas

de 2.0%,  $[\alpha]_{D}^{25} +46^{\circ}$  e 3.1%,  $[\alpha]_{D}^{25} +55^{\circ}$  respectivamente. As relações de Man:Gal:Glc das frações obtidas através da purificação com cetavlon, não apresentaram coincidência significativa para estas duas espécies. No caso de *C. alpestris*, da qual, temos somente o espectro do cetavlon a pH 8,5, tal polissacarídeo possui uma razão Man:Gal:Glc de 57:31:12 respectivamente (Tabela I) e seu espectro (Fig 7; p. 71), apresenta um grande sinal a  $\delta$  103.7 indicando unidades de extremidades não redutoras de  $\alpha$ -D-Manp ligadas (1 $\rightarrow$ 2) a  $\alpha$ -D-Manp (59), e o sinal a  $\delta$  104.9 relacionado as unidades de  $\beta$ -D-Galp (41) ligadas (1 $\rightarrow$ 4) a  $\alpha$ -D-Manp. Foi detectado um pequeno sinal em campo baixo a  $\delta$  109.6 que indica a presença de  $\beta$ -D-Galp (84,39), e seu sinal correspondente a C-6 em campo alto a  $\delta$  64.8. Ainda temos a presença de um pequeno sinal  $\delta$  102.4 indicando a presença de unidades internas de C-1 de  $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2), (46). Os sinais de  $\delta$  100.9 e 99.8 referem-se as unidades da cadeia principal de  $\alpha$ -Manp (1 $\rightarrow$ 6) que são não substituídas e substituídas em O-2 por cadeias laterais (46).

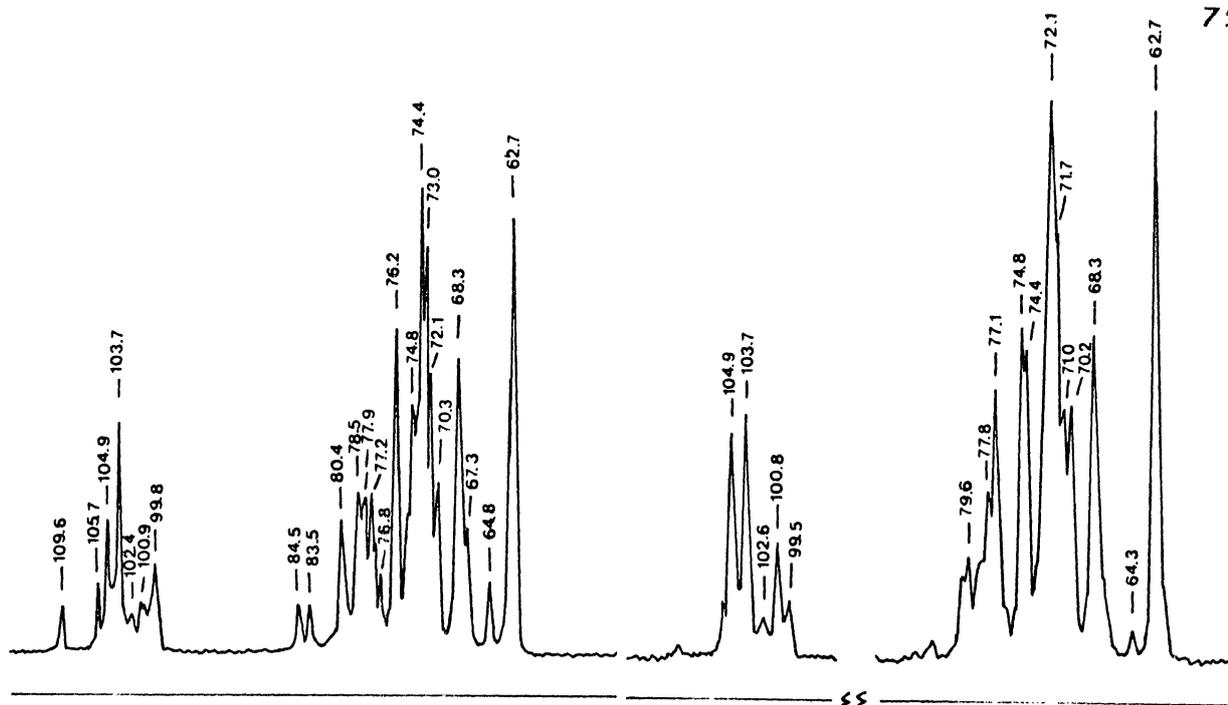


Figura 7

Figura 8

Figuras 7 e 8 - Os espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  dos heteropolissacarídeos de *Cladonia alpestris* e *Cladonia confusa* respectivamente, ambos obtidos através da precipitação com cetavlon na presença de tampão borato a pH 8.5, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

Comparando os espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  do complexo insolúvel em solução de Fehling e do obtido por precipitação com borato a pH 8.5 na solução de cetavlon, de *C. confusa*, não se observa diferenças significativas. A Figura 8 pertencente a *C. confusa*, apresenta dois fortes sinais na região de C-1 a  $\delta$  104.9 e  $\delta$  103.7, o primeiro refere-se a grupos  $\beta$ -D-Galp ligado (1 $\rightarrow$ 4) na cadeia principal de  $\alpha$ -D-Manp 6-O-substituída (40,48), e o segundo está relacionado com as extremidades não redutoras de  $\alpha$ -D-Manp ligado (1 $\rightarrow$ 2) (59). Tais conclusões estão de acordo com os resultados de análise de metilação, realizado pelo grupo de

Iacomini (59) que encontrou 23% de 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal e 28% de 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man. Há ainda, na região de C-1 três outros sinais em menor proporção,  $\delta$  102.6 sugerindo unidades de  $\alpha$ -D-Galp ligadas em 0-2,  $\delta$  100.8 referente aos grupos de  $\alpha$ -D-Manp substituídos em 0-6 (cadeia principal) e finalmente o  $\delta$  99.5 relacionado a substituição 2,6 de cadeia principal que fecha com a formação de 10% de 3,4-Me<sub>2</sub>-Man.

*Stereocaulon paschale* pertencendo a Família Stereocaulaceae, apresentou um rendimento de heteropolímero de 4.8%, obtido no fracionamento com cetavlon na presença do tampão borato pH 8.5, apresenta uma rotação específica de  $[\alpha]_D^{25} +55^{\circ}$ , que é semelhante a rotação apresentada pela *C. confusa*.

A hidrólise ácida do polissacarídeo de *St. paschale*, forneceu uma relação de Man:Gal:Glc de 52:36:12, semelhante a obtido pelo polímero de *C. alpestris* isolado da mesma maneira.

Os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C dos polissacarídeos de *St. paschale* não apresentam diferenças quando se compara a C-1 do precipitado em Fehling (Fig. 9A; p. 73) e o espectro do precipitado obtido com cetavlon na presença de tampão borato pH 8.5 (Fig. 9B; p. 73). No entanto, seu espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C apresenta na região de C-1, sinais com proporções diferentes das encontradas em outras espécies, o sinal a  $\delta$  104.8 em grande proporção aos demais sinais de C-1 indica extremidades não redutoras de  $\beta$ -D-Gal ligadas (1 $\rightarrow$ 4) a cadeia principal, enquanto  $\delta$  103.8 refere-se unidades terminais não redutoras de  $\alpha$ -D-Manp (59), e as de

$\alpha$ -D-Manp internas 2-O-substituídas são apontados pelo sinal a  $\delta$  102.2. O sinal a 100.6 refere-se as unidades da cadeia principal de  $\alpha$ -D-Manp 6-O-substituídas os outros que aparecem em 101.9 e 99.8 que mostram a presença de 2,4- e 2-O-substituição por cadeias laterais respectivamente (46).

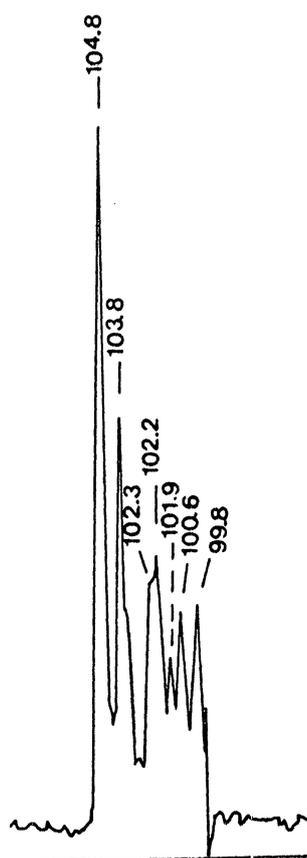


Figura 9A

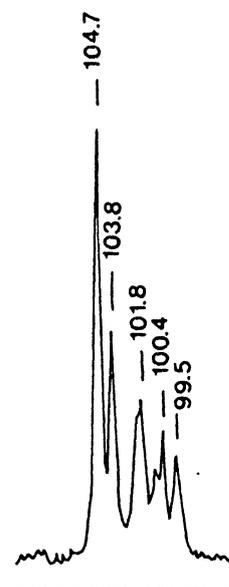


Figura 9B

Figuras 9A e 9B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , região de C-1 dos heteropolímeros de *Stereocaulon paschale*, obtidos respectivamente através da precipitação com Fehling e precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

Os sinais de C-1 como já foi explicado, indicam uma estrutura diferente devido a proporção de sinais, entretanto estes sinais são comuns para as espécies analisadas até o momento, e com os dados obtidos de r.n.m.-<sup>13</sup>C, podemos concluir que este polímero é ramificado apresentando na sua cadeia principal ligações  $\alpha$ -D-Manp-(1→6) e em suas ramificações unidades de  $\beta$ -D-Galp-(1→4), e grupos  $\alpha$ -D-Manp-(1→2). Com os dados de análises de metilação extraídos da literatura (37), foi obtido do heteropolissacarídeo os seguintes acetatos de alditóis parcialmente metilados: 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man (20%), 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal (35%), 3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man (5%), 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Glc (3%), 2,3-Me<sub>2</sub>-Man (15%), 3,4-Me<sub>2</sub>-Man (7%) e 3-Me-Man (15%).

Agora, com estes dados, podemos afirmar que o polissacarídeo de *St. paschale* possui uma estrutura singular em relação aos demais líquens, pois apresenta unidades di-substituída como aquela apresentada na estrutura 1; p. 61, mas também faltando unidades adjacentes como na estrutura 2; p.67, podendo também ocorrer a estrutura 4.



O heteropolissacarídeo de *Pseudocyphellaria aurata*, apresentou uma proporção de Man:Gal:Glc no precipitado de cetavlon a pH 8.5 de 61:30:09, e uma rotação

específica  $[\alpha]_D^{25} +46^{\circ}$ , muito semelhante aos resultados obtidos para a *C. alpestris* (Tabela I). A *P. aurata* apresenta um rendimento final de galactomananas de 6.1% e a *C. alpestris* 2.0%.

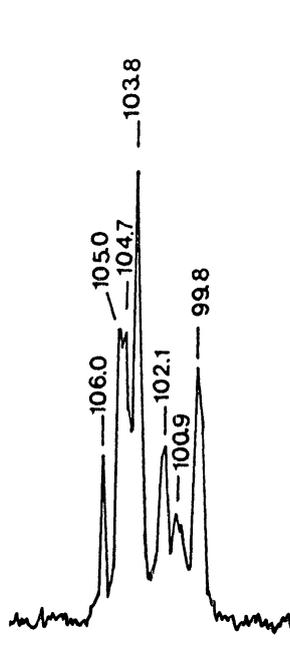


Figura 10A

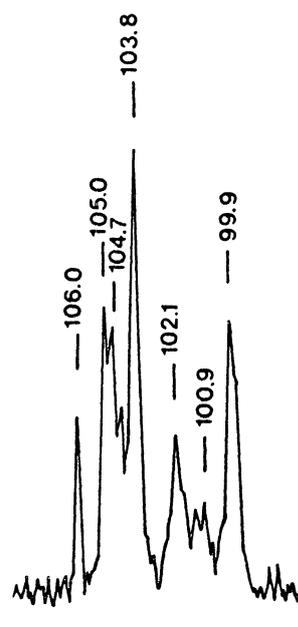


Figura 10B

Figuras 10A e 10B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , região de C-1, dos heteropolímeros de *Pseudocyphellaria aurata*, obtidos respectivamente através do precipitado de Fehling e precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70  $^{\circ}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

Os espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , região de C-1 obtidos do precipitado de Fehling (Fig. 10A) de *P. aurata* e também pelo fracionamento do cetavlon na presença de tampão borato

a pH 8.5 (Fig. 10B), são típicos dos líquens já estudados, como também não apresentam diferenças significativas entre os polímeros precipitados por Fehling e cetavlon. Ambos os espectros são marcados pela atenção que desperta a região de C-1, que apresenta um sinal intenso em  $\delta$  103.8 correspondente as extremidades não redutoras de  $\alpha$ -D-Man<sub>p</sub> ligadas por (1→2) à cadeia principal de  $\alpha$ -D-Man<sub>p</sub>-(1→6) (59). Este sinal condiz com o alto percentual de manose encontrado no heteropolímero precipitado por Fehling de 65% e no precipitado a pH 8.5 do cetavlon de 61% (Tabela I) e, igualmente com 16% de 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man apresentado na Tabela IV. A presença de 3,6-Me<sub>2</sub>-Man (16%) é consistente com 2,4-di-O-substituição, provavelmente nas cadeias laterais e apresentando uma estrutura fora do comum para polissacarídeo de líquens. O sinal em campo baixo a  $\delta$  106.0 indica unidades de  $\beta$ -D-Galf (45), sinal semelhante foram encontrados somente nos componentes de *R. usnea* e *R. ecklonii* (Tabela V).

TABELA IV - ANÁLISES POR G.L.C. DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO OBTIDO POR PRECIPITAÇÃO COM CETAVLON A pH 8.5 NA PRESENÇA DE TAMPÃO BORATO DO LÍQUEN *P. aurata*

Acetatos de alditóis	Tr <sup>a</sup>	% da área dos picos de g.l.c. <sup>b</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.992	16
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.000	2
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.047	28
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1.242	2
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1.270	3
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	1.283	7
3,6-Me <sub>2</sub> -Glc	1.666	4
3,6-Me <sub>2</sub> -Man	1.688	16
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.782	15
3-O-Me-Man	2.161	7

a) Tempo de retenção relativo a 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.

b) G.l.c. realizada em coluna de OV- 225.

A presença de unidades de  $\beta$ -D-Galp na cadeia lateral com ligação (1 $\rightarrow$ 4) é indicada pelo sinal em  $\delta$  104.7 (40,48), correspondendo a 28% de 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal. Os sinais a  $\delta$  100.9 e 99.9 podem ser assinalados a unidades não substituídas e 2-O-substituídas respectivamente na cadeia principal (46), o último sendo relacionado com 15% dos

fragmentos 3,4-Me<sub>2</sub>-Man. O sinal a  $\delta$  102.1 não surge das unidades internas de Manp 2-O-substituídas e é provavelmente relacionado as unidades de Manp 2,4 di-substituídas das cadeias laterais.

### 3.1.3. GRUPO C

O espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C do heteropolímero isolado via complexo insolúvel de cobre do líquen *Cladonia amaurocraea* obtido da literatura (59), (Fig.11; p. 79) não apresenta similaridades com os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C do grupo A e as demais espécies de *Cladonia* citadas neste trabalho. Em tal espectro há a ocorrência de dois sinais preponderantes na região de C-1,  $\delta$  104.9 assinalando unidades de extremidades não redutoras de  $\beta$ -D-Galp ligadas (1 $\rightarrow$ 4) a  $\alpha$ -D-Manp 6-O-substituído (41) e o sinal a  $\delta$  102.3 indicando unidades internas da cadeia lateral de  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2) que é consistente com os dados de metilação (59). Em campo mais baixo, há um pequeno sinal  $\delta$  109.7 relacionado com as unidades de  $\beta$ -D-Galf (45).

No entanto, tal polímero apresentou semelhanças com a espécie *Sticta damaecornis* (Sw.) Ach investigada por Corradi e Silva et alii (18) (Fig. 12; p. 79), pertencente a Família Stictaceae, o qual apresentou um espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C, região de C-1 com fortes sinais em  $\delta$  104.6 de  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4) e 102.2 de  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2) - $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2). Há outros sinais característicos de heteropolissacarídeos contendo manose a  $\delta$  103.7 indicando

unidades terminais não redutoras  $\alpha$ -D-Manp (59) e 100.6 e 99.5 que estão relacionados, respectivamente a unidades de Manp 6-O e 2,6-di-O-substituídos (46).

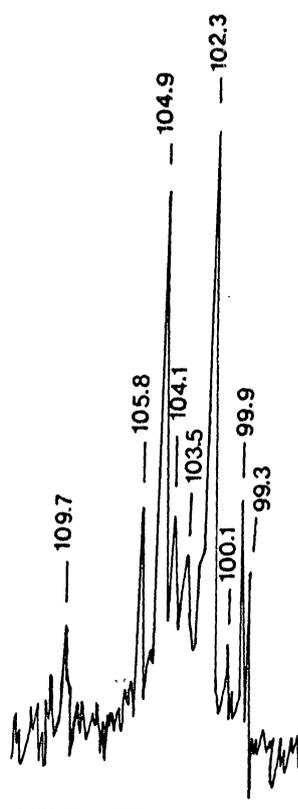


Figura 11

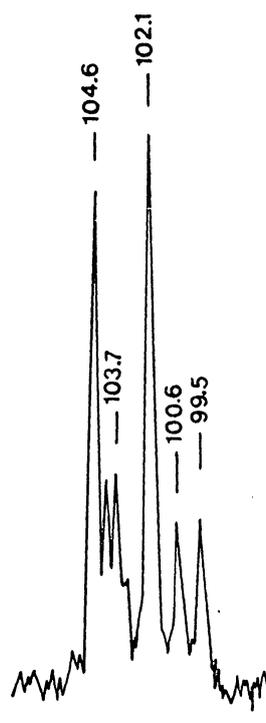


Figura 12

Figuras 11 e 12 - Espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  da região de C-1 dos heteropolissacarídeos de *Cladonia amaurocraea*, obtido através da precipitação com Fehling e o espectro da região de C-1 do polímero do líquen *Sticta damaecornis*, obtido através da precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  P.P.M.

### 3.1.4. Grupo D

Este grupo formado pela *Peltigera aphthosa* da família Peltigeraceae, *Ramalina usnea* e *Ramalina ecklonii* da família Usneaceae e *Stereocaulon ramulosum* pertencente a família Stereocaulaceae.

Os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C, região de C-1 da *P. aphthosa* (Fig.13A e 13B; p. 81) e *R. usnea* (Fig.14A e 14B; p. 82), não se modificaram quando comparados os precipitados de Fehling com aqueles obtidos por cetavlon, contudo estas duas espécies de líquens apresentaram uma certa similaridade a primeira vista. Os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C de ambos contêm proeminentes sinais de C-1 a  $\delta$  104.8 e 101.9, entretanto a *R. usnea* forneceu um sinal a  $\delta$  106.4 provavelmente unidades de  $\beta$ -D-Galf substituintes em O-3 de uma cadeia principal com ligações (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Manp (36).

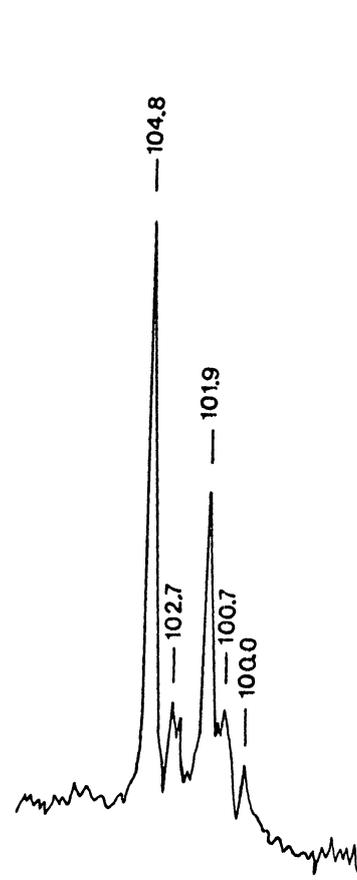


Figura 13A

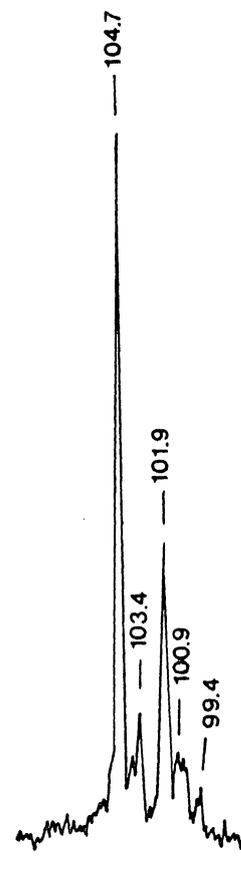


Figura 13B

Figuras 13A e 13B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  da região de C-1 dos heteropolissacarídeos de *Peltigera aphthosa*, obtidos através da precipitação de Fehling e precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato respectivamente, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela V; p. 87.

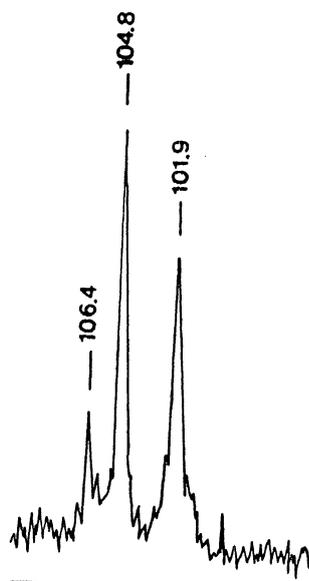


Figura 14A

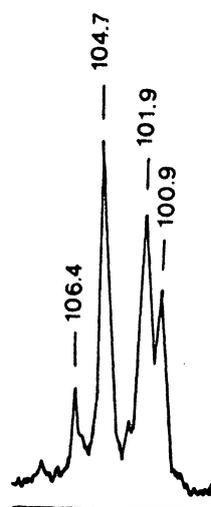


Figura 14B

Figuras 14A e 14B - Espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C, região de C-1 dos heteropolissacarídeos de *Ramalina usnea*, obtidos respectivamente através da precipitação com Fehling e precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério (D<sub>2</sub>O) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela V; p. 87.

Outras similaridades foram encontradas nas proporções de Man, Gal e Glc obtidas do fracionamento de cetavlon (Tabela I), na qual *P. aphthosa* apresenta uma razão de 40:45:15 e uma rotação específica de +61<sup>o</sup> e a *R. usnea* com razões correspondentes de 38:44:18 e uma rotação específica de +81<sup>o</sup>.

As análises de metilação (37) revelaram para a *P. aphthosa* 42% de unidades terminais não redutoras de Galp e

8% de unidades terminais não redutoras de Manp e unidades de Manp substituída em 0-6 (11%), 0-4,6 (24%), e 0-2,4,6 (5%), enquanto a *R. usnea* (36) apresentou valores de 40,2,19,37 e 0% respectivamente.

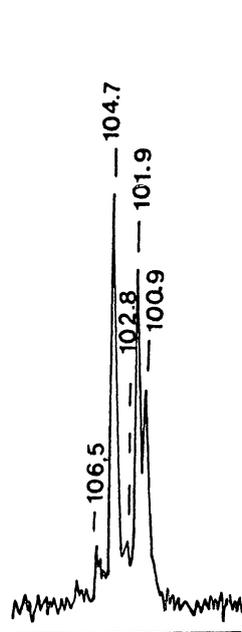


Figura 15A

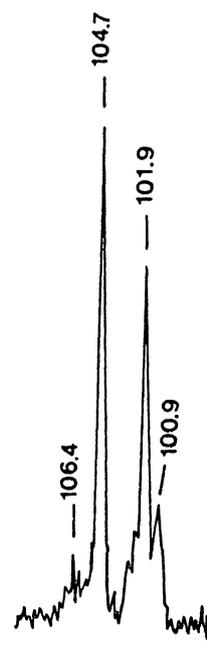


Figura 15B

Figuras 15A e 15B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , da região de C-1 dos heteropolissacarídeos de *Ramalina ecklonii*, obtidas respectivamente por precipitação de Fehling e precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela V; p. 87.

O polímero obtido pela precipitação de Fehling (Fig. 15A) e posterior fracionamento com cetavlon (Fig. 15B) do líquen *Ramalina ecklonii* quando analisado a região de C-1 dos espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , demonstrou resultados similares

aos encontrados para heteropolissacarídeos da *R. usnea* (36) e *P. aphthosa* (37). O espectro de *R. ecklonii* apresenta dois sinais  $\delta$  104.7 e 101.8 para C-1, o sinal em campo baixo, oriundo dos grupos  $\beta$ -D-Galp ligados por (1 $\rightarrow$ 4) aos resíduos de uma cadeia principal  $\alpha$ -D-Manp 6-O-substituído (40,48), enquanto que o sinal em campo mais alto corresponde aos resíduos da cadeia principal não substituídos. A ocorrência de um sinal a  $\delta$  101.9, que provavelmente refere-se ao C-1 das unidades da cadeia principal substituídas em 0-2,4 (46).

Analisando os polissacarídeos de *P. aphthosa*, *R. usnea* e *R. ecklonii* (Tabela I; p. 49), foi observado que a rotação específica  $[\alpha]_D^{25} +81^{\circ}$  do polímero de *R. ecklonii*, é igual ao de *R. usnea* e a relação Man:Gal:Glc do precipitado de cetavlon 36:50:14 é semelhante aos resultados obtidos com *P. aphthosa* e *R. usnea*. Vale ainda ressaltar que o rendimento total do heteropolímero da *R. ecklonii* do fracionamento pelo cetavlon foi de 16.3%, sendo o rendimento mais alto encontrado no processo de extração de polissacarídeos contendo manose em líquens.(77).

As análises de metilação do heteropolímero de *R. ecklonii* (77) forneceu alditóis acetatos parcialmente O-metilados, cujas estruturas correspondem a unidades terminais não redutoras de Galp (41%) e Manp (2%) e unidades de 6-O (20%), 4,6-di-(24,5%), e Manp 2,4,6-tri-O-substituídas (8,5%).

Os resultados obtidos na acetólise parcial para o heteropolímero de *R. ecklonii* (77) indicaram principalmente

unidades terminais não redutoras de Galp e unidades de Manp substituídas em 0-2 (77), enquanto tal análise na *P. aphthosa* (37), indicou unidades terminais não redutoras de  $\alpha$ -D-Manp e unidades de Manp substituída em 0-2.

O *Stereocaulon ramulosum* forneceu uma galactomanana quando precipitado com tampão borato a pH 8,5 na reação do cetavlon (07), fornecendo uma relação entre Man:Gal de 57:43 e rotação específica de  $[\alpha]_D^{25} +73^{\circ}$ . Entretanto, o precipitado de Fehling desta espécie apresentou 10% de Glc, alterando a relação de Man:Gal para 41:49.

Na análise do espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  do precipitado de Fehling (Fig. 16A; p. 86) e pH 8,5 do cetavlon (Fig. 16B; p. 86), não encontrou-se diferenças acentuadas na região de C-1. Em ambos os espectros, há um forte sinal a  $\delta$  104.7 indicando unidades de  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Manp (41), enquanto o sinal a  $\delta$  103.8 é característico de extremidades não redutoras de  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 6) (59). O sinal a  $\delta$  101.8 pertencentes aos resíduos 2,4-di-substituídos da cadeia principal  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 6), mas os sinais a  $\delta$  100.4 e 103.4 não foram identificados devido a falta de padrões.

Na região de C-2 a C-6, observa-se algumas diferenças, o precipitado de Fehling (Fig. 16A; p. 86), apresenta um sinal intenso a  $\delta$  75.4 e  $\delta$  74.8 e pequenos sinais em campo mais baixo  $\delta$  82.9 e  $\delta$  81.2. Estes sinais, provavelmente são provenientes de uma glucana linear ou outro polissacarídeo contendo glucose, o qual foi descartado

no fracionamento por cetavlon.

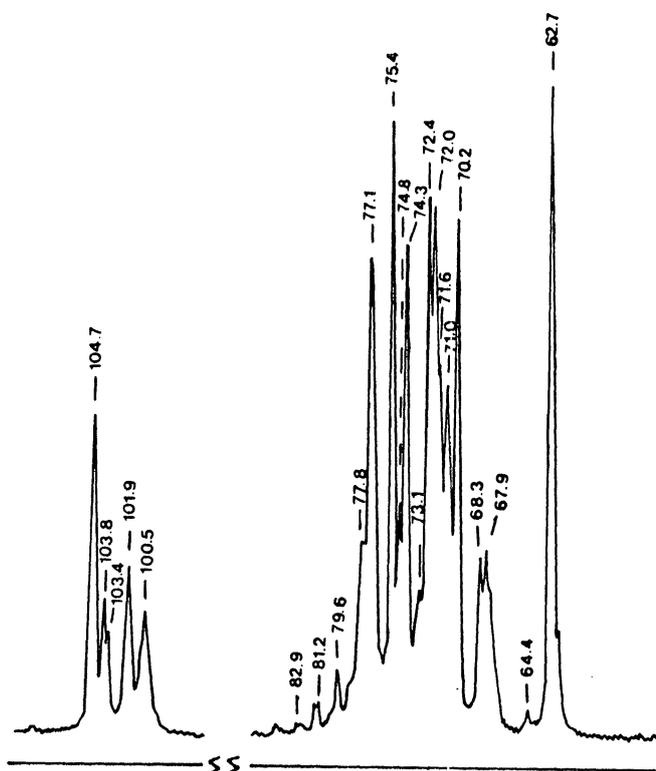


Figura 16A

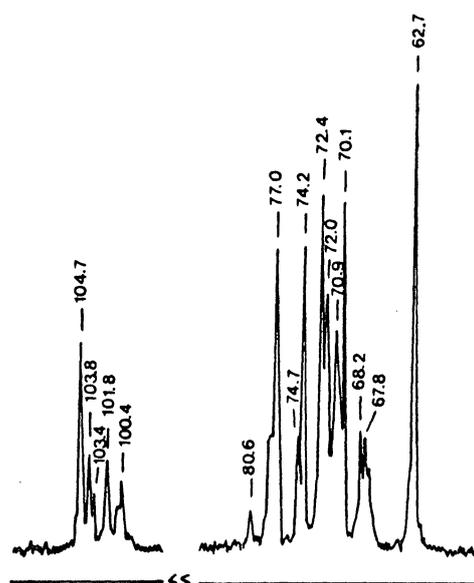


Figura 16B

Figuras 16A e 16B - Os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C da região de C-1, dos heteropolímeros do líquen *Stereocaulon ramulosum*, obtidos respectivamente por precipitação com solução de Fehling e precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério (D<sub>2</sub>O) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela V; p. 87.

Análise de metilação (Ø7) demonstrou extremidades não redutoras de Manp (14%) e de Galp (41%) e unidades de Manp substituídas em 2-O (1%) e 6-O (8%), e outros não

identificados que são 4,6-di-O (17%) e 2,6-di-O-substituídas (2%). Apresentou também, unidades de Man $\rho$  substituídas 3,4,6-tri-O (2%) e 2,4,6-tri-O (11%).

A reação de acetólise parcial realizada no polissacarídeo de *St. ramulosum* além dos monossacarídeos liberados, manose e galactose, produziu di- e trissacarídeos de acordo com c.p. Tais oligossacarídeos foram analisados através de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  e r.n.m.- $^1\text{H}$  e auxiliados pela técnica de metilação, comprovando serem  $\alpha\text{-D-Man}\rho\text{-}(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}$ ,  $\beta\text{-D-Gal}\rho\text{-}(1\rightarrow4)$  a  $\alpha\text{-D-Man}$  da cadeia principal a qual é substituída em O-2 por unidade de Man. (07).

Tabela V - Atribuição de sinais r.n.m.- $^{13}\text{C}$  de heteropolissacarídeos isolados através de purificação com cetavlon na presença de tampão borato pH 8.5

#### LÍQUENS

Polímeros e sinais típicos,  $\delta$  p.p.m. Atribuição de sinais<sup>a</sup>

<i>P. aph- hosa</i>	<i>R. us- nea</i>	<i>R. eck- lonii</i>	<i>St. ra- mulosum</i>	
-	106.4	106.4	-	C-1. $\beta$ -Gal f
104.7	104.7	104.7	104.7	C-1. $\beta$ -Gal $\rho$ -1 $\rightarrow$ 4- $\alpha$ -Man $\rho$
-	-	-	103.8	C-1.term. $\alpha$ -D-Man $\rho$ -1 $\rightarrow$ 2
101.9	101.9	101.8	101.8	C-1. $\alpha$ -Man $\rho$ 2,4,6-subst.
100.9	100.9	100.9	-	C-1. $\alpha$ -Man $\rho$ 6-subst.
99.4	-	-	-	C-1. $\alpha$ -Man $\rho$ 2,6-subst.
77.1	77.2	77.1	77.0	C-5. $\beta$ -Gal $\rho$
67.6	67.7	67.6	67.8	C-6. $\alpha$ -Man $\rho$ 6-subst.
-	64.4	64.3	-	C-6.term. $\beta$ -Gal f
62.7	62.7	62.7	62.7	C-6.term. $\alpha$ -Man $\rho$ e $\beta$ -Gal $\rho$

a) Unidades de  $\alpha\text{-D-Man}\rho$  são da cadeia principal (1 $\rightarrow$ 6)-substituído.

Realizando-se uma análise sumária destas quatro espécies através dos sinais, principalmente de C-1 na Tabela V, os quais foram confirmados pelos dados obtidos através dos processos de metilação e de acetólise parcial encontrados na literatura (07,37,77).

Há uma grande similaridade entre os sinais dos polissacarídeos dos líquens *R. usnea* e *R. ecklonii*, ambos possuem na estrutura uma cadeia principal de unidades  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 6) com extremidades não redutoras de  $\beta$ -D-Galp ligadas por (1 $\rightarrow$ 4) e, no entanto, observando os dados de metilação (36) concluimos que o heteropolissacarídeo da *R. usnea* (estrutura 2; p. 67) não apresenta unidades dissubstituídas na cadeia principal, tal fato ocorre na *P. aphthosa*, *R. ecklonii* e *St. ramulosum*. E a *R. ecklonii* na sua cadeia principal apresenta ligações de unidades  $\alpha$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 2) (estrutura 3; p. 67), diferindo das espécies *R. usnea*, *St. ramulosum* e *P. aphthosa*.

Os heteropolissacarídeos das espécies *P. aphthosa* e *St. ramulosum* apresentam na região de C-1 dos seus espectros similaridades apenas na intensidade dos dois grandes sinais a  $\delta$  104.7 e  $\delta$  101.9, ambos possuem uma certa analogia quanto aos dados de metilação e igualmente seus resultados de acetólise parcial forneceram 2-O- $\alpha$ -D-Manp-D-Man, e o *St. ramulosum* forneceu também 4-O- $\beta$ -D-Galp-D-Man. Em face de tais resultados somos levados a aceitar que estas duas espécies, compartilham em grande parte uma estrutura principal comum (estrutura 1; p. 61).

## 3.1.5. GRUPO E

O líquen *Actinogyra muehlenbergii* apresenta 0.4% de rendimento final do precipitado de Fehling (Tabela I; p. 49), em comparação com 18 polímeros extraídos e purificados é o menor rendimento encontrado, com exceção do líquen *Letharia vulpina* o qual não formou precipitado. Outra singularidade encontrado na Tabela I em relação a *A. muehlenbergii* é a baixa rotação específica de  $[\alpha]_D^{25} +20^{\circ}$  e a presença de Man:Gal:Glc com uma razão de 58:37:5.

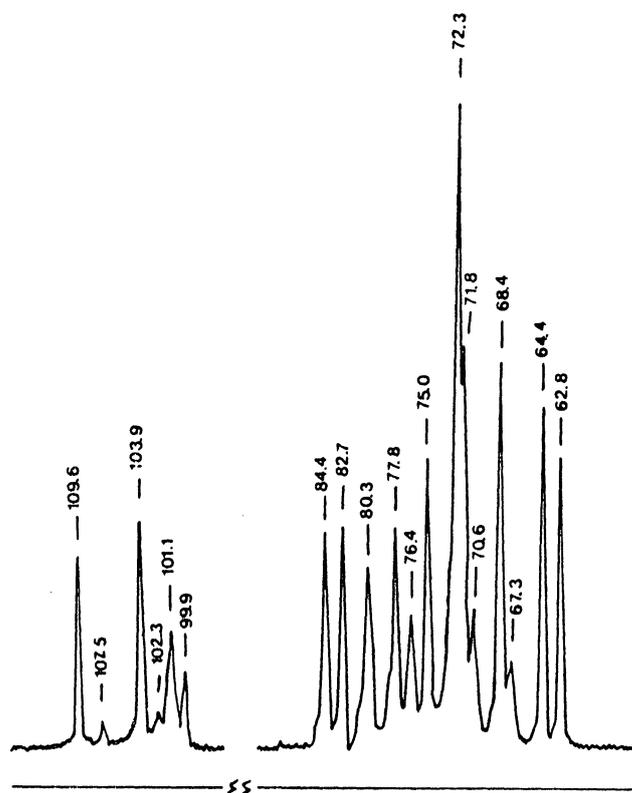
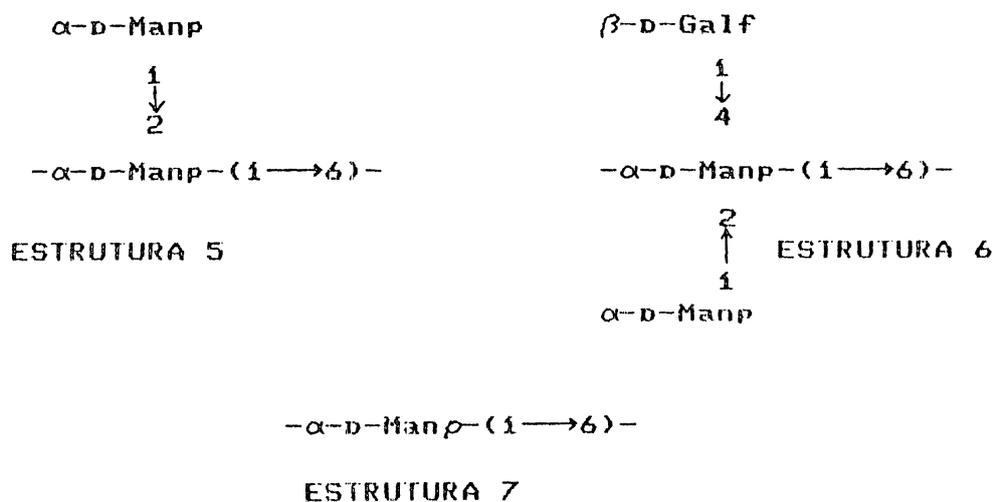


Figura 17 - Espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  do heteropolímero de *Actinogyra muehlenbergii*, obtido através do fracionamento por cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a  $70^{\circ}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  P.P.M.

Analisando o espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  do polissacarídeo obtido através do fracionamento com cetavlon na presença de tampão borato pH 8,5 do líquen *A. muehlenbergii* (Fig 17), de imediato encontra-se uma explicação para a baixa rotação específica, já que se encontra em campo baixo um sinal  $\delta$  109.6 relacionado com unidades terminais não redutoras de  $\beta$ -D-Galf ligadas (1 $\rightarrow$ 4) na cadeia principal de  $\alpha$ -D-Manp 6-O-substituído (38,83). Outro sinal que se destaca é  $\delta$  103.9 correspondente a extremidades não redutoras de  $\alpha$ -D-Manp ligadas (1 $\rightarrow$ 2) a cadeia principal (59). Além destes sinais há a presença de um pequeno sinal a  $\delta$  102.3 referente a unidades internas de  $\alpha$ -D-Manp ligada (1 $\rightarrow$ 2). Os outros dois sinais de C-1 são respectivamente  $\delta$  101.1 e 99.9 indicando unidades da cadeia principal de manose não substituídas e com substituição em O-2 (46).



Gorin & Iacomini (37) ao trabalharem com a *A. muehlenbergii*, obtiveram do precipitado de Fehling um heteropolímero, o qual forneceu os seguintes derivados

metilados; 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man (33%), 2,3,5,6-Me<sub>4</sub>-Gal (18%), 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal (2%), 3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man (8%), 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Man (7%), 2,3-Me<sub>2</sub>-Man (3%), 3,4-Me<sub>2</sub>-Man (15%) e 3-Me-Man (15%). Extrapolando tais dados para o polímero obtido pela purificação cetavlon a pH 8,5, podemos admitir que as estruturas 5, 6 e 7 são as formas principalmente encontradas neste heteropolímero.

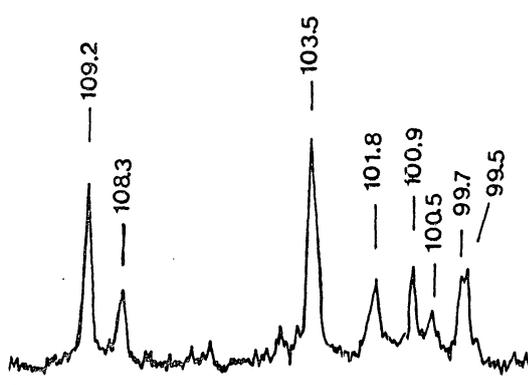


Figura 18

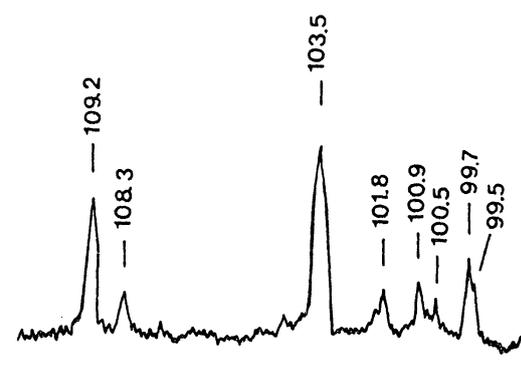


Figura 19

Figuras 18 e 19 - Espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C da região de C-1 respectivamente dos líquens *Umbilicaria pustulata* e *Umbilicaria spodochroa*, obtido através da extração alcalina, em óxido de deutério (D<sub>2</sub>O) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

Há uma íntima semelhança entre espectros dos polissacarídeos de *Actinogyra muehlenbergii* (Fig. 17; p. 89) e, *U. pustulata* (Fig. 18) e, *U. spodochroa* (Fig. 19) (65) os sinais comuns são δ 99.9, 100.9, 103.5 e 109.2. *Actinogyra* Schol. é considerada ser sinônimo com *Umbilicaria* Hoffm. (23).

O heteropolímero obtido através da precipitação

com solução de Fehling de *Newropogon aurantiaco-ater* (08), apresentou no espectro de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ , da região de C-1 (Fig. 20), sinais distintos das demais espécies analisadas, com um sinal a  $\delta$  102.8 indicando unidades terminais não redutores de  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Manp}$ . Também são evidenciados sinais a  $\delta$  101.0 e 99.7 correspondendo respectivamente a unidades da cadeia principal de  $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{6)}$  não substituídas e substituídas. Um outro sinal  $\delta$  98.0 não foi identificado.

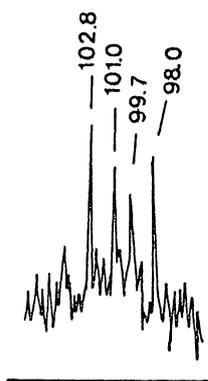


Figura 20 - Espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  região de C-1, do heteropolímero de *Newropogon aurantiaco-ater*, obtido por precipitação de Fehling, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo  $\text{NaOD}$  a 2%, a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

O *Tornabenia intricata*, apresentou no precipitado de cetavlon a pH 8.5 com tampão borato, um rendimento de 6.4% de polissacarídeo e uma rotação específica de  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +74^{\circ}$ , e no entanto, o polímero não apresentou Gal, nem no precipitado de Fehling bem como no precipitado com cetavlon a pH 8.5. Este polímero apresentou uma relação Man:Glc de 93:7 a pH 8.5, tal resultado foi surpreendente, pois até o momento não foi citado na literatura a presença de uma glucomanana em líquens.

O espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  e a estrutura detalhada do precipitado de cetavlon será discutida em capítulo separado. O precipitado de Fehling (Fig.21A) e do pH 8.5 do cetavlon, região de C-1 (Fig. 21B) não apresentam diferenças.

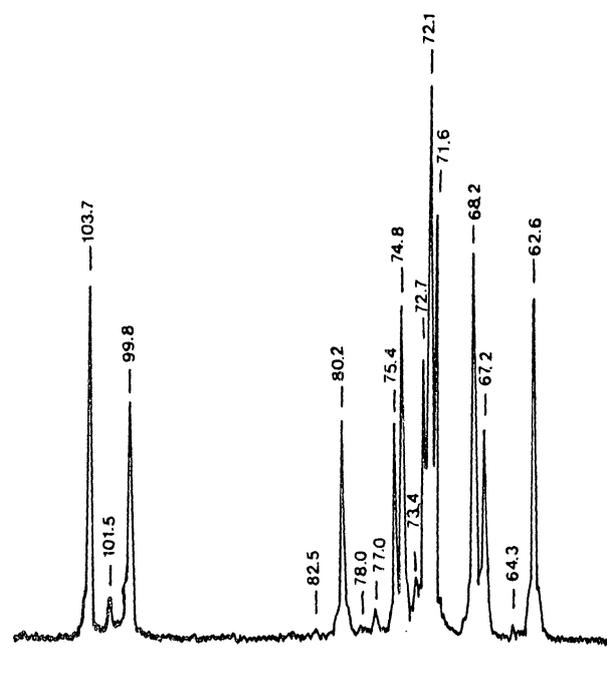


Figura 21A

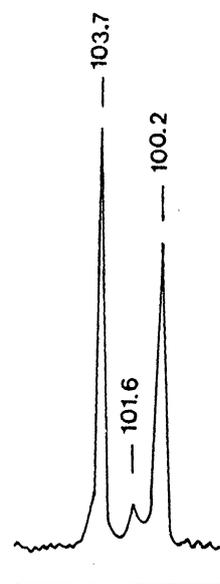


Figura 21B

Figuras 21A e 21B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  da glucomanana de *Tornabenia intricata*, obtido respectivamente por precipitação de Fehling e o da região de C-1, por precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos são em  $\delta$  p.p.m.

O líquen *Usnea meridionalis* apresentou um alto rendimento de heteropolímeros quando fracionado com cetavlon a pH 7.0 (10.8%), uma rotação específica de  $[\alpha]_D^{15} +79^{\circ}$  e uma relação Man:Gal:Glc de 35:42:23, que são diferentes para o polímero precipitado com borato a pH 8.5 (cetavlon) que forneceu um rendimento baixo de 0.9%, rotação específica de  $[\alpha]_D^{25} +101^{\circ}$  e uma proporção de Man:Gal:Glc de 52:35:13.

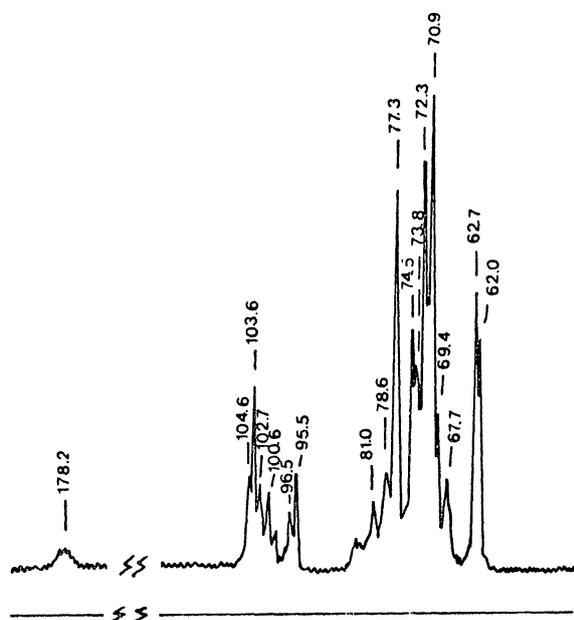


Figura 22A

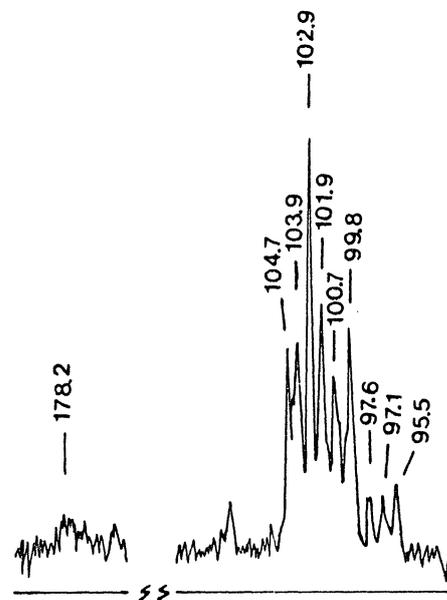


Figura 22B

Figuras 22A e 22B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  dos heteropolímeros de *Usnea meridionalis*, obtidas respectivamente por precipitação com cetavlon a pH 7.0 e pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m. Atribuições dos sinais ver Tabela VI; p. 96.

As análises de r.n.m.-<sup>13</sup>C realizadas nos polímeros obtidos através do fracionamento com cetavlon, de *U. meridionalis*, produziram dois espectros com diferenças significativas entre o polissacarídeo de pH 7.0 (Fig. 22A) e o polissacarídeo de pH 8.5 precipitado com tampão borato (Fig. 22B).

O heteropolímero resultante da precipitação em pH 8.5 do cetavlon apresentou no espectro um grande sinal a  $\delta$  102.9 referente a unidades não redutoras terminais de  $\alpha$ -D-Galp ligadas (1 $\rightarrow$ 2) a cadeia principal  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6). Tal sinal encontra-se no polímero obtido a pH 7.0 com menor intensidade, outro fator de diferença entre estes espectros é um sinal a  $\delta$  101.9 referente a C-1 das unidades da cadeia principal substituídos em O- 2,4. Também no espectro do precipitado a pH 8.5 há um sinal 109.5 indicando unidades de  $\beta$ -D-Galf ligadas (1 $\rightarrow$ 4). Analisando mais detalhadamente a região de campo baixo de ambos os espectros, nota-se que o fracionamento de cetavlon não foi suficientemente eficaz na precipitação dos polissacarídeo contendo grupos carboxílicos.

Tabela - VI - Atribuição de sinais r.n.m-<sup>13</sup>C de polissacarídeos isolados através do fracionamento por cetavlon do líquen *U. meridionalis*

Fracionamento com cetavlon, valo- res em $\delta$ p.p.m.		Atribuição de sinais <sup>a</sup>
pH 7.0	pH 8.5	
178.2	178.2	C-6. grupo COOH
104.6	104.7	C-1. term. $\beta$ -Galp 1 $\rightarrow$ 4 $\alpha$ -Manp
103.6	103.9	C-1. term. $\alpha$ -Manp 1 $\rightarrow$ 2 $\alpha$ -Manp
102.7	102.9	C-1. term. $\alpha$ -Galp 1 $\rightarrow$ 2 $\alpha$ -Manp
-	101.9	C-1. $\alpha$ -Manp 2,4,6-subst.
100.6	100.7	C-1. $\alpha$ -Manp 6-subst.
-	99.8	C-1. $\alpha$ -Manp 2,6 subst.
-	97.6	C-1. Hex-O-P?
96.5	-	C-1. Hex-O-P?
95.5	95.5	C-1. Hex-O-P?
-	84.3	C-3. GlcA 3-subst.?

a) Unidades de  $\alpha$ -D-Manp são da cadeia principal (1 $\rightarrow$ 6)-substituída.

A Tabela VI apresenta os sinais de C-1 e suas atribuições em conjunto com a Tabela XII; p. 121, a qual apresenta os dados de metilação do precipitado em cetavlon pH 7.0 e pH 8.5. Observando estes conjuntos de dados, notamos que o polímero precipitado a pH 7.0 com a solução de cetavlon, é um polissacarídeo constituído por uma estrutura bastante complexa, o contrário do que se observa com os dados do precipitado de pH 8.5, tais estruturas serão

discutidas no estudo dos ácidos urônicos.

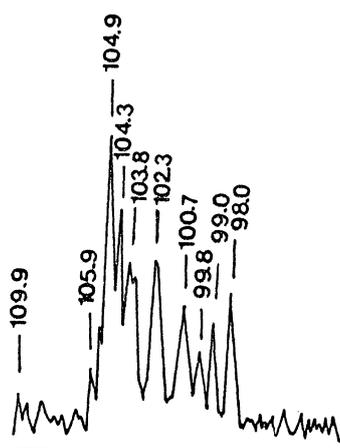


Figura 23A

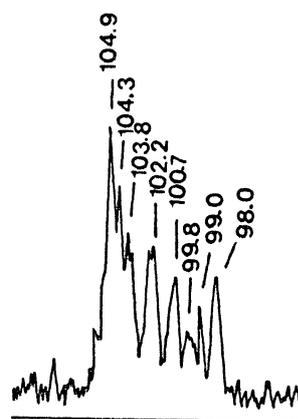


Figura 23B

Figuras 23A e 23B - Espectros de r.n.m.- $^{13}\text{C}$ , região de C-1, dos heteropolímeros de *Cladonia substellata*, obtidos respectivamente por precipitação de Fehling e precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) contendo NaOD a 2%, a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  p.p.m.

Os heteropolímeros de *C. substellata* apresentam em seus espectros (Figs. 23A e 23B) uma diversidade de sinais na região de C-1, indicando possuir um estrutura complexa. O sinal a  $\delta$  104.9 mostra uma pequena predominância em relação aos demais sinais de C-1, e está relacionado as unidades  $\beta$ -D-Galp, referentes a 39% de 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal

(Tabela VII; p. 99) um outro sinal  $\delta$  104.3 é possível que se refira a extremidades não redutoras de Glc, também ligadas (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Manp a cadeia principal. Tal polissacarídeo possui uma razão de Man:Gal:Glu de 33:49:18 ou este sinal poderia indicar as unidades de  $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2);, no entanto os dados de metilação apresentaram 5% de 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glc; também não podemos descartar a hipótese que haja contaminação por outro polímero, já que neste polissacarídeo não foram realizados testes de homogeneidade. Portanto, tal polímero requer um estudo químico mais aprofundado.

Além destes dois sinais, apresentou outro em  $\delta$  103.8 relacionado com grupos de extremidades não redutores de  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp (59). Aquele apresentado em  $\delta$  102.3 provavelmente refere-se as unidades internas da mesma estrutura. Os sinais a  $\delta$  101.9 e 99.8 correspondem as unidades de cadeia principal a 2,4- e 2-O-substituídas respectivamente (46), e estão relacionados com os fragmentos de 3,4-Me<sub>2</sub>-Man (6%) e 3-Me-Man (12%) que apareceram na análises de metilação (Tabela VII).

O heteropolímero *C. substellata*, apresenta espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C distinto em relação as demais espécies de *Cladonia*, os sinais apresentam intensidades diferentes das demais espécies analisadas e apontam para uma cadeia principal de  $\alpha$ -D-Manp com ligações (1 $\rightarrow$ 6), semelhante aos demais líquens, assim como unidades laterais de  $\beta$ -D-Galp e  $\alpha$ -D-Manp.

TABELA VII - ANÁLISES POR G.L.C.- M.S. DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO, OBTIDO POR PRECIPITAÇÃO COM CETAVLON pH 8.5 NA PRESENÇA DE TAMPÃO BORATO DE *C. substellata*

Acetatos de alditóis	Tr <sup>a</sup>	% dos picos por área <sup>b</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.993	12
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.000	5
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.042	39
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1.189	9
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1.236	1
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Gal	1.393	1
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	1.453	2
3,4-Me <sub>2</sub> -Glc	1.661	4
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.685	6
2,4-Me <sub>2</sub> -Gal	1.757	2
3,4-Me <sub>2</sub> -Gal	1.778	3
3-O-Me-Man	2.172	12
3-O-Me-Hex	2.491	4

a) Tempo de retenção relativo a 1,4-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.

b) G.l.c. realizada em coluna de capilar de OV-225.

A Tabela VIII, apresenta uma comparação das propriedades físico-químicas dos heteropolissacarídeos contendo manose, que são formados por uma cadeia principal de  $\alpha$ -D-Manp ligação (1 $\rightarrow$ 6), cujas unidades não são substituídas ou substituídas com uma variedade de cadeias

laterais. Isto incluem monosubstituição em 0-2 de  $\alpha$ -D-Manp ( $\delta$  103.7) ou  $\alpha$ -D-Galp ( $\delta$  102.3), e em 0-4 por  $\beta$ -D-Galp ( $\delta$  104.7) e as vezes com disubstituição ocorrendo em 0-2 e 0-4 por  $\alpha$ -D-Galp e  $\beta$ -D-Galp, ou  $\alpha$ -D-Manp e  $\beta$ -D-Galp respectivamente. Há casos, que algumas unidades de Manp com ligação (1 $\rightarrow$ 2) foram encontradas com  $\beta$ -D-Galp substituintes em 0-4, *A. muehlenbergii*, *U. pustulata* e *U. spodochroa*. Muitas destas estruturas são similares para aquelas que ocorrem em polissacarídeos contendo manose proveniente da parede celular de leveduras (33).

Na Tabela VIII as espécies foram agrupadas segundo suas similaridades com os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C de seus heteropolissacarídeos contendo manose, onde é observado semelhanças entre gêneros diferentes como no grupo A, onde as espécies *P. cetratum*, *P. sulcata*, *P. araucaria* e *C. islandica* pertencendo a Família da Parmeliaceae apresentam sinais em comum a  $\delta$  99.5, 101.8, 102.8 e 104.6, provenientes das cadeias laterais substituídas ou disubstituídas em 0-2 e 0-4 com  $\alpha$ -Galp ( $\delta$  102.8) e  $\beta$ -Galp (104.6). O sinal a  $\delta$  99.5 referente as unidades 2,6-di-O-substituídas  $\alpha$ -Manp. Estas ressonâncias são compartilhadas pelos polímeros de *Usnea* sp. e *E. prunastri* ambos da Família Usneaceae.

Os polímeros *C. alpestris* e a *C. confusa* apresentaram similaridades em relação aos sinais acentuados a  $\delta$  103.7 e 104.9, os quais estão relacionados com as cadeias laterais  $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 2) e  $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) ligados a cadeia principal  $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 6), isto também ocorre nos espectros dos polissacarídeos de *St. paschale* e

*P. aurata*, tais espécies citadas pertencem as Famílias Cladoniaceae, Stereocaulaceae e Stictaceae respectivamente.

O grupo C formado por uma Stictaceae, *Sticta* sp. e uma Cladoniaceae, *C. amaurocraea* apresentam sinais a  $\delta$  102.3 e 104.7 diferentes do grupo A, os sinais surgem de unidades das cadeias laterais  $\alpha$ -Galp e  $\beta$ -Galp ligados respectivamente (1 $\rightarrow$ 2) e (1 $\rightarrow$ 4) a cadeia principal de unidades  $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 6).

Grandes similaridades ocorrem entre as espécies que compõem o grupo D, o qual envolve *P. aphthosa* uma Peltigeraceae da Ordem Cyanophilales, e da Ordem Lecanorales temos a Família Usneaceae representada pelas espécies *R. usnea* e *R. ecklonii* e a Família Stereocaulaceae com *St. ramulosum*. Proeminentes sinais a  $\delta$  101.8 e 104.7 foram observados nestas espécies, e essas ressonâncias surgem das cadeias laterais das unidades 2,4-di-substituídos  $\alpha$ -Manp e unidades de  $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) da cadeia principal com ligações  $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 6).

O grupo E formado por espécies da mesma Família, que apresentam uma íntima relação entre os espectros na região de C-1 e os polissacarídeos de *A. muehlenbergii*, *U. pustulata* e *U. spodochoea* com sinais comuns a  $\delta$  99.9, 101.1, 107.5 e 109.6.

Os polissacarídeos de *N. aurantiaco-ater*, *T. intricata*, *U. meridionalis* e *C. substellata* apresentaram resultados diferentes em termos de r.n.m.-<sup>13</sup>C e portanto de estrutura e não ocorrendo similaridade com os demais grupos.

Tabela VIII. Comparação dos heteropolissacarídeos contendo manose da cadeia principal formada por  $\alpha$ -D-Manp ligação (1 $\rightarrow$ 6) e seus substituintes nas cadeias laterais.

Líquen	Rendimento da extração alcalino.	% Rendimento; proporção de man, gal, glc no cetavlon.	$[\alpha]_D$	Estrutura da cadeia lateral
<b>GRUPO A</b>				
<i>Parmotrema sulcata</i> (37)	38.5	2.1 42:44:12	+89 <sup>0</sup>	$\alpha$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 2) <sup>b</sup> $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) <sup>b</sup>
<i>Cetraria islandica</i> (36)	55.1	1.6 47:46:7	+87 <sup>0</sup>	$\alpha$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 2) <sup>b</sup> $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) <sup>b</sup>
<i>P. cetratum</i> (17)	46.6	9.6 46:45:9	+90 <sup>0</sup>	$\alpha$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 2) <sup>b</sup> $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) <sup>b</sup>
<i>P. araucaria</i>	26.4	1.0 50:44:6	+98 <sup>0</sup>	-
		3.6 49:44:7	+98 <sup>0</sup>	-
<i>Usnea sp.</i> (37)	50.8	5.0 33:47:21	+115 <sup>0</sup>	$\alpha$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 2) <sup>c</sup>
		2.8 35:61:4	+94 <sup>0</sup>	-
<i>Evernia prunastri</i> (78)	43.9	4.5 49:42:9	+109 <sup>0</sup>	-
		5.2 51:44:5	+102 <sup>0</sup>	-
<b>GRUPO B</b>				
<i>C. alpestris</i> (59)	-	2.4 57:31:12	+46 <sup>0</sup>	$\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 2) <sup>c</sup> $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) <sup>b</sup> $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 2) <sup>b</sup> $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 6) <sup>d</sup>
<i>Cladonia confusa</i> (59)	3.1	4.8 42:51:7	+55 <sup>0</sup>	$\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 2) <sup>c</sup> $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) <sup>b</sup> $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 2) <sup>b</sup>
<i>St. paschale</i> (37)	21.8	4.8 52:36:12	+55 <sup>0</sup>	$\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) <sup>c</sup> $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) <sup>b</sup> $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 2) <sup>b</sup>
<i>Pseudocyphellaria aurata</i>	19.6	6.1 61:30:19	+46 <sup>0</sup>	-
<b>GRUPO C</b>				
<i>Sticta sp.</i> <sup>Δ</sup> (19)	23.0	1.8 63:21:16.	+69 <sup>0</sup>	$\beta$ -Glc p-(1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Manp
<i>Cladonia amaurocraea</i> <sup>g</sup>				

## GRUPO D

<i>Peltigera</i> <i>aphthosa</i> (37)	-	-	+61 <sup>o</sup>	$\beta$ -Galp-(1→4) <sup>c</sup> $\alpha$ -Manp-(1→2) <sup>b</sup> $\beta$ -Galp-(1→4) <sup>b</sup>
<i>Ramalina</i> <i>usnea</i> (36)	38.0	1.1	+81 <sup>o</sup>	$\beta$ -Galp-(1→4) <sup>c</sup>
<i>R. ecklonii</i> (77)	54.0	16.3	+81 <sup>o</sup>	$\beta$ -Galp-(1→4) <sup>c</sup> $\beta$ -Galp-(1→4) <sup>b</sup> ? $\beta$ -Galp-(1→2) <sup>b</sup>
<i>Stereocaulon</i> <i>ramulosum</i> (07)	33.6	9.0	+73 <sup>o</sup>	$\alpha$ -Manp-(1→2) <sup>b</sup> $\beta$ -Galp-(1→4) <sup>b</sup> $\beta$ -Galp-(1→4) <sup>c</sup>

## GRUPO E

<i>Actinogyra</i> <i>muehlenbergii</i> (37)	52.0	0.4	+20 <sup>o</sup>	$\beta$ -Galp-(1→4) <sup>o</sup> $\alpha$ -Manp-(1→2) <sup>c</sup>
<i>Umbilicaria</i> <i>pustulata</i> <sup>Δ</sup> (65)	-	-	-	$\alpha$ -Manp-(1→2) $\alpha$ -Manp-(1→3) Glc p-(1→3) $\beta$ -Galp-(1→?)
<i>U. spodochroa</i> <sup>Δ</sup> (65)	-	-	-	$\alpha$ -Manp-(1→2) $\alpha$ -Manp-(1→3) Glc p-(1→3) $\beta$ -Galp-(1→?)

## OUTROS

<i>Newropogon</i> <i>aurantiaco-</i> <i>ater</i> <sup>Δ</sup> (08)	51.2 <sup>f</sup>	1.2	+76 <sup>o</sup>	$\alpha$ -Galp-(1→2) $\alpha$ -Manp-(1→2)
<i>Tornabenia</i> <i>intricata</i> (104)	22.9	6.4	+74 <sup>o</sup>	$\alpha$ -Manp-(1→2) <sup>c</sup> $\alpha$ -Glc p-(1→2)
<i>U. meridionalis</i>	32.2	10.8	+79 <sup>o</sup>	-
		35:42:23		
		0.9	+101 <sup>o</sup>	-
		52:35:13		
<i>C. substollata</i>	19.2	3.4	+54 <sup>o</sup>	-
		33:49:18		

<sup>a</sup>Sinais de r.n.m.-<sup>13</sup>C e estrutura:  $\delta$  109.5,  $\beta$ -Galp-(1→6);  $\delta$  104.7,  $\beta$ -Galp-(1→4) e  $\beta$ -Glc p-(1→4);  $\delta$  103.7,  $\alpha$ -Manp-(1→2);  $\delta$  102.3,  $\alpha$ -Galp-(1→2);  $\delta$  101.6  $\alpha$ -Glc p-(1→2);  $\delta$  102.2,  $\alpha$ -Manp-(1→2)- $\alpha$ -Manp-(1→2),  $\delta$  101.0, Cadeia principal não substituída  $\alpha$ -D-Manp ligação (1→6); <sup>b</sup> $\delta$  99.9, pertence a cadeia principal, disubstituído em 2,6. <sup>c</sup>Como disubstituintes sobre as mesmas unidades de  $\alpha$ -D-Manp. <sup>d</sup>Como monosubstituintes sobre  $\alpha$ -D-Manp. <sup>e</sup>Ligação 0-6 terminal ou 2-O-substituído de unidades de Manp. <sup>f</sup>Ligação 0-6 de unidades  $\alpha$ -D-Manp, ligação em torno de (1→2) a cadeia principal. <sup>g</sup>Obtido por extração aquosa. <sup>h</sup>Δ Líquens e dados obtidos da literatura. <sup>i</sup>Dados insuficientes.

PARTE II - 3.2. - CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS URÔNICOS NOS HETEROPOLISSACARÍDEOS CONTENDO MANOSE PRECIPITADOS A pH 7.0 NA SOLUÇÃO DE CETAVLON DA *Usnea* sp., *P. araucaria*, *U. meridionalis* E UMA REINVESTIGAÇÃO DOS POLÍMEROS OBTIDOS DA *E. prunastri*

Dentre os heteropolissacarídeos de líquens analisados, via extração alcalina e posterior purificação com solução de Fehling seguido por fracionamento com cetavlon, 4 espécies apresentaram um precipitado a pH 7.0, indicando a presença de um grupo ácido. Entretanto, tal resultado já era esperado com o polímero da espécie *Evernia prunastri*, a qual foi descrito na literatura como uma galactomanana contendo unidades de ácido galacturônico (78).

No entanto, o ácido galacturônico não é esperado como componente dos polissacarídeos de micobiontes, e sim o ácido glucurônico, o qual é encontrado em heteropolissacarídeos de fungos (32). Também foi proposto (78) que a galactomanana ácida da *E. prunastri* era composta por uma cadeia principal altamente ramificada formada por ligações (1→2) e (1→6) de unidades de manose com cadeias laterais de  $\alpha$ -Manp,  $\beta$ -Galp e GalpA. A presença de unidades de Manf 2,6-di-O-substituído na cadeia principal foi baseada em análise de metilação que forneceu 3,5-di-O-metil-manose. Contudo provou-se que era na verdade um isômero 2,4 (12,80), correspondente as unidades de Manp 3,6-di-O-substituídas. E finalmente, a existência de unidades  $\beta$ -D-Galp, foi demonstrada baseado nos dados de espectro de infra-vermelho, não eliminando porém a possibilidade daqueles com  $\alpha$ -configuração. O polímero apresentou uma alta rotação específica de  $+120^\circ$  (Tabela I, p.49). Procurou-se caracterizar novamente os ácidos urônicos desta espécie, bem como das outras três espécies (Tabela I) cujos polissacarídeos foram obtidos em pH 7.0.

### 3.2.1. - ENSAIOS DE HOMOGENEIDADE DOS HETEROPOLIS- SACARÍDEOS COM COMPONENTES ÁCIDOS

Os heteropolímeros obtidos através do fracionamento por cetavlon a pH 7.0 e pH 8.5 na presença de tampão borato dos líquens *Usnea meridionalis*, *Usnea sp.*, *Parmotrema araucaria* e *Evernia prunastri*, foram submetidos a eletroforese em acetato de celulose com tampão borato a pH 9.0, revelando a presença de somente uma banda. Sendo assim, as amostras analisadas podem ser consideradas homogêneas por este ensaio.

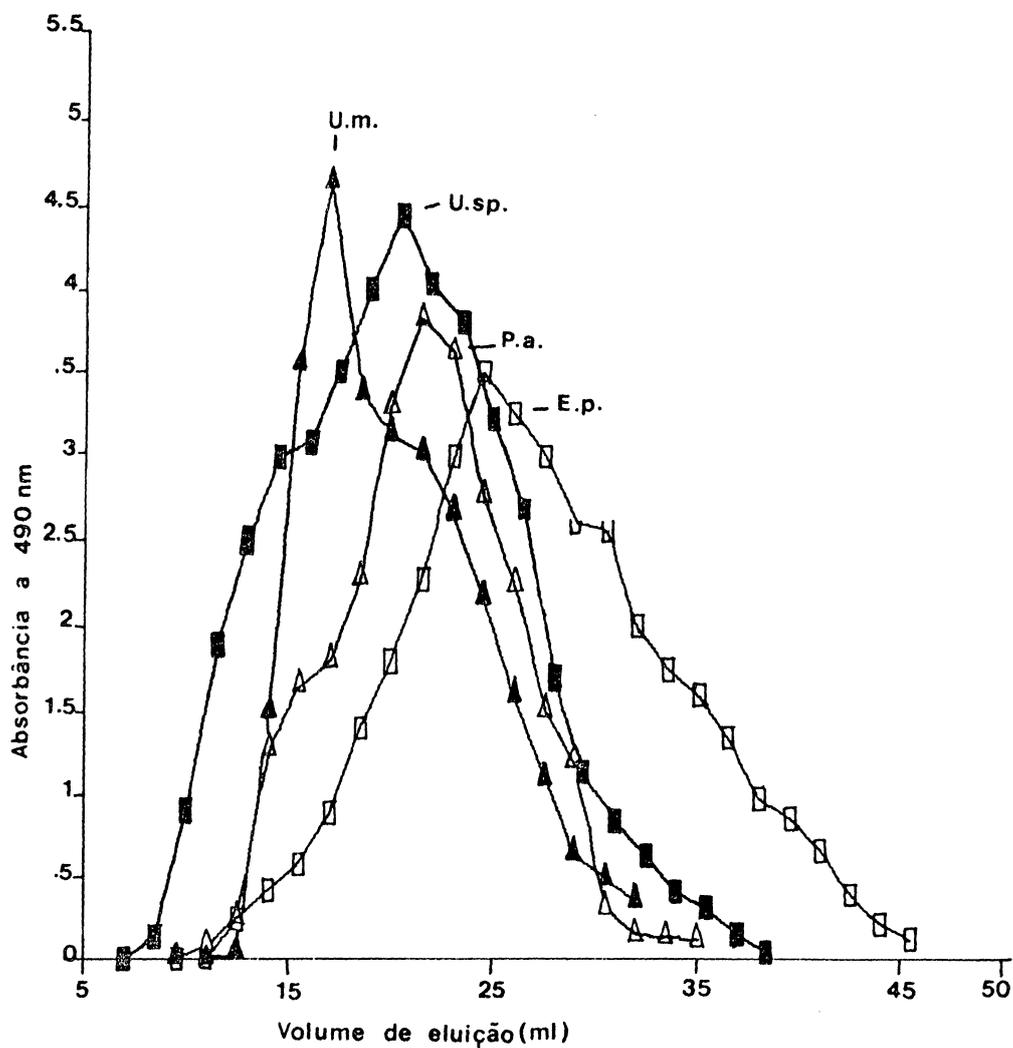


Figura 24 - Cromatograma dos heteropolissacarídeos contendo manose, obtidos através da precipitação por cetavlon a pH 7.0, em coluna de Sepharose 6B.  $\Delta$  *Parmotrema araucaria* (P.a.);  $\square$  *Evernia prunastri* (E.p.);  $\blacktriangle$  *Usnea meridionalis* (U.m.);  $\blacksquare$  *Usnea sp.* (U.sp.) Volume morto (azul de dextrana): 25 ml.

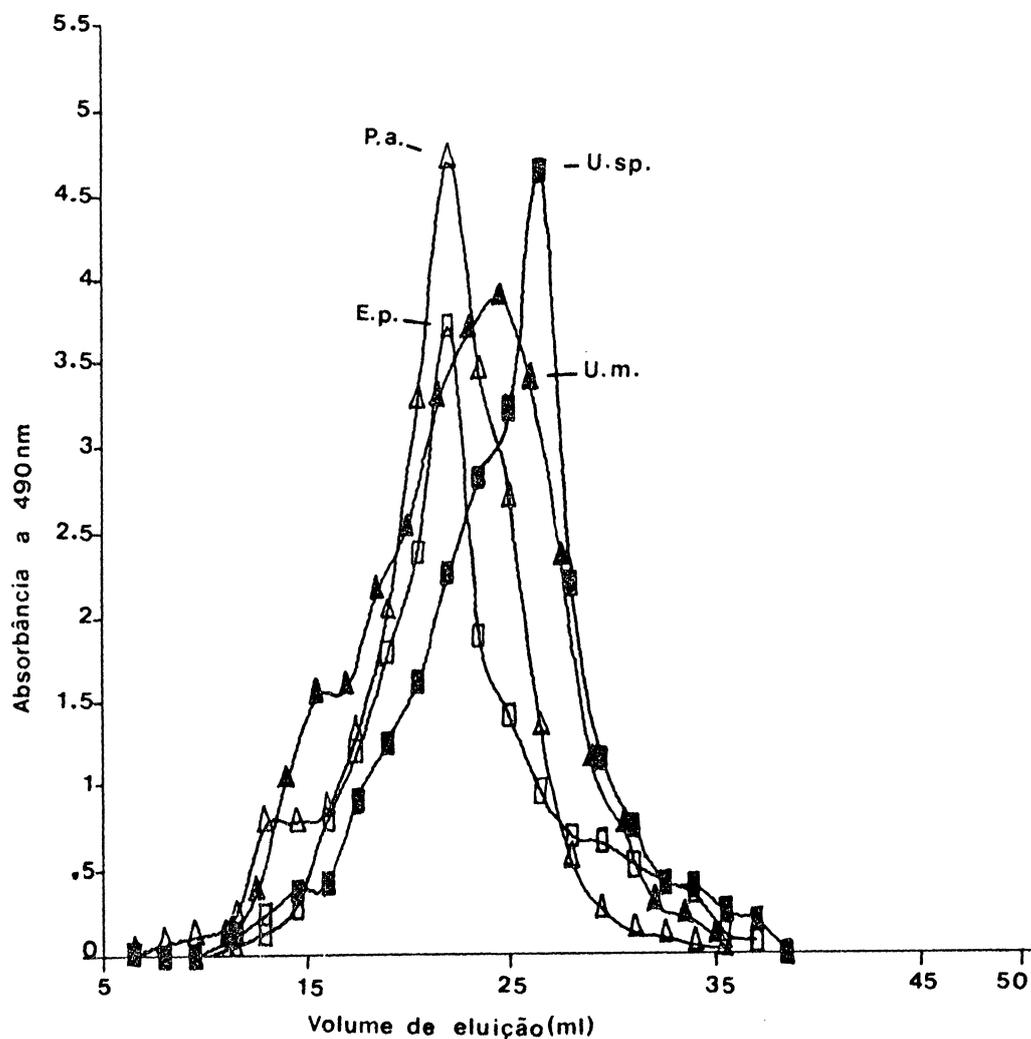


Figura 25 - Cromatograma dos heteropolissacarídeos contendo manose, obtidos por precipitação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em coluna de Sepharose 6B.  $\Delta$  *Parmotrema araucaria* (P.a.);  $\square$  *Evernia prunastri* (E.p.);  $\blacktriangle$  *Usnea meridionalis* (U.m.);  $\blacksquare$  *Usnea sp.* (U.sp.). Volume morto (azul de dextrana): 25 ml.

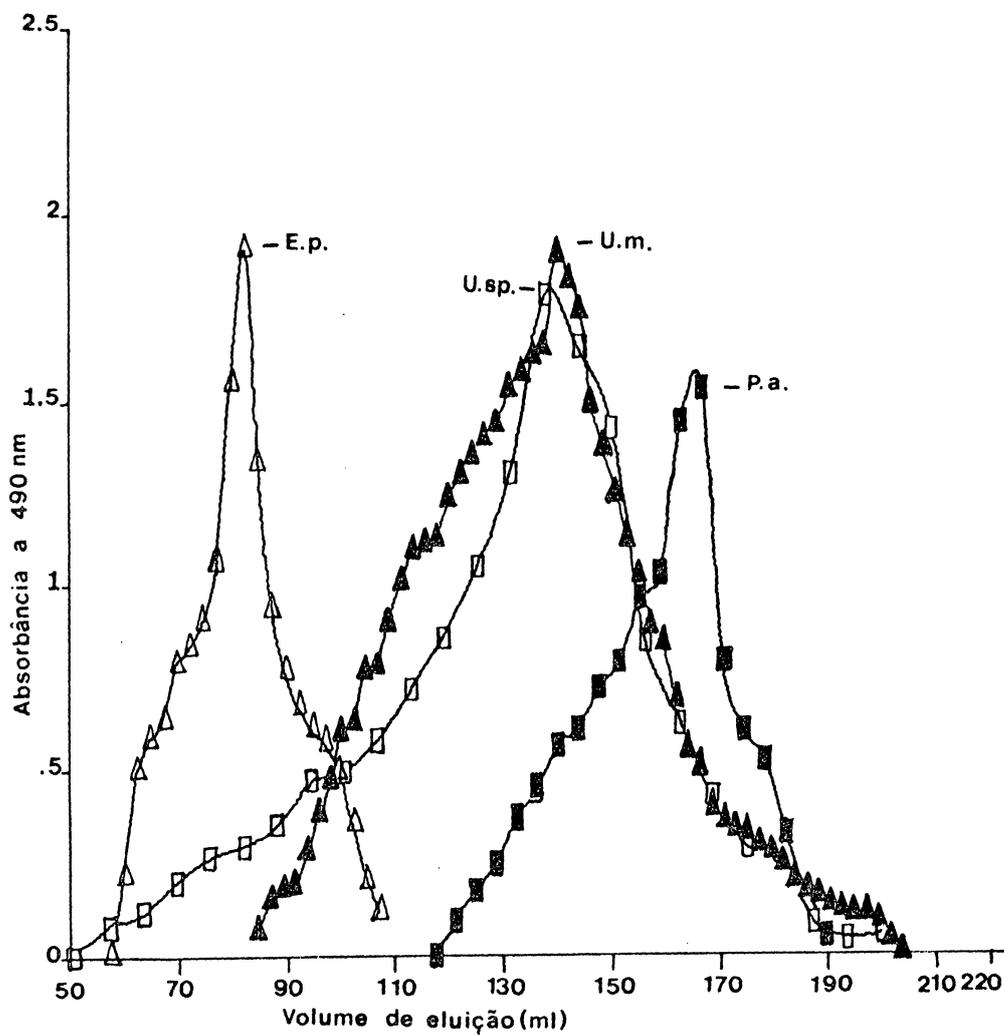


Figura 26 - Cromatograma dos heteropolímeros contendo manose, obtidos por precipitação com cetavlon a pH 7.0, em coluna de Sepharose 4B-200.  $\Delta$  *Evernia prunastri* (E.p.);  $\square$  *Usnea* sp. (U.sp.);  $\blacktriangle$  *Usnea meridionalis* (U.m.);  $\blacksquare$  *Parmotrema araucaria* (P.a.). Volume morto (azul de dextrana): 66 ml.

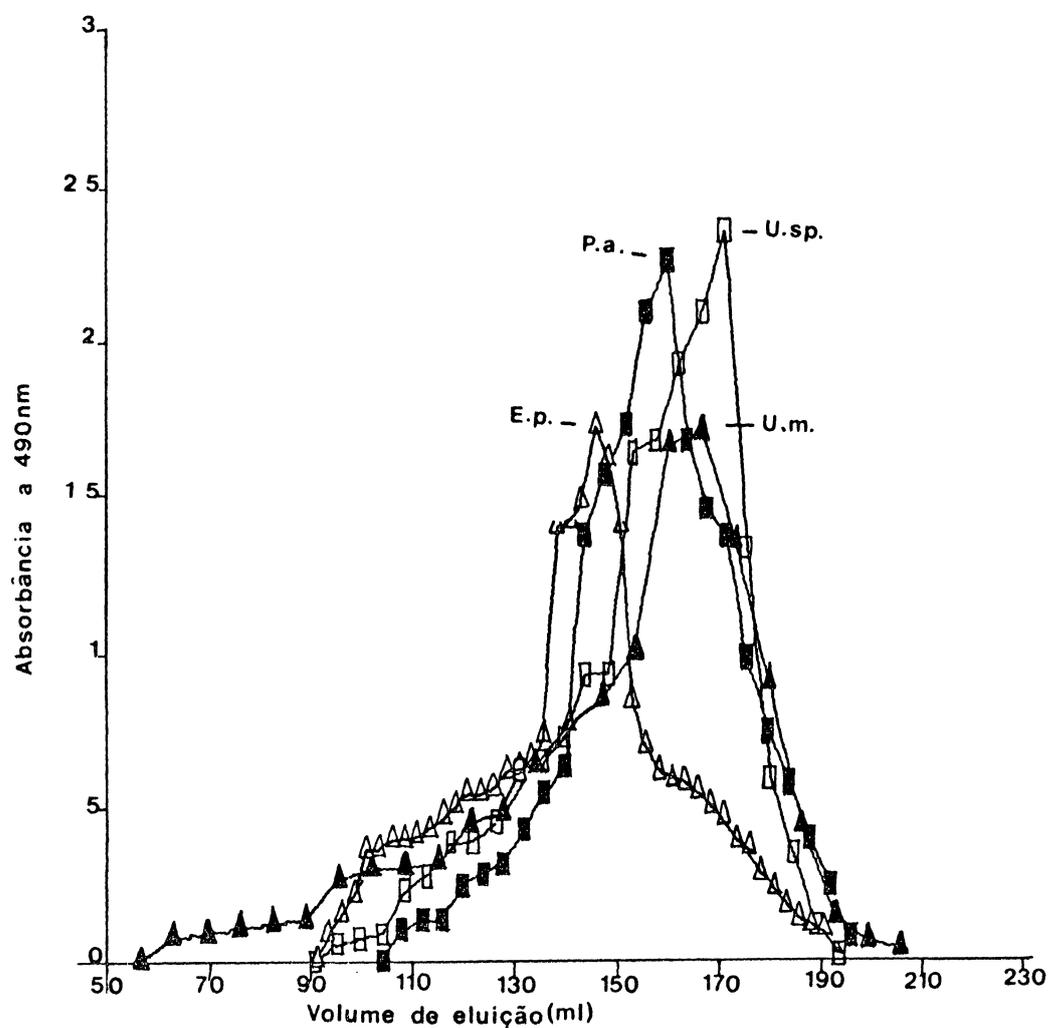


Figura 27 - Cromatograma dos heteropolímeros contendo manose, obtidos através de fracionamento por cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em coluna de Sepharose 4B-200.  $\Delta$  *Evernia prunastri* (E.p.);  $\square$  *Usnea* sp. (U.sp.);  $\blacktriangle$  *Usnea meridionalis* (U.m.);  $\blacksquare$  *Parmotrema araucaria* (P.a.). Volume morto (azul de dextrana): 66 ml.

O estudo da homogeneidade química destes polissacarídeos foi realizada através de filtrações em géis de Sepharose 6B (Figs. 24 e 25; p. 107 e 108) e de Sepharose 4B-200 (Figs. 26 e 27; p. 109 e 110) que apresentaram picos com uma relativa simetria indicando homogeneidade, no entanto, convém ressaltar que no gel Sepharose 4B-200 (Figs. 26 e 27) o polímero da *E. prunastris* pH 7.0 eluiu mais rapidamente que o polissacarídeo precipitado a pH 8.5, demonstrando ter o primeiro um maior peso molecular, além do mais, os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C das espécies contendo unidades de ácido urônico em seus heteropolissacarídeos, indicam uma possível heterogenicidade, devido a presença de sinais distintos, mas contendo os mesmos sinais em diferentes proporções observado nas Figuras 4B e 4C; 5B e 5C; 6A e 6B e finalmente 22A e 22B. Deste modo, apesar de termos a indicação pela espectroscopia de r.n.m.-<sup>13</sup>C que ocorre um pequeno grau de polidispersidade (30), os mesmos foram submetidos a análises químicas e físico-químicas com a finalidade de se caracterizar os ácidos urônicos, principalmente em relação a espécie *Evernia prunastri*.

### 3.2.2. - INVESTIGAÇÃO DOS ÁCIDOS URÔNICOS NO POLISSACARÍDEO OBTIDO ATRAVÉS DE CETAVLON pH 7.0 *Usnea* sp.

O polissacarídeo precipitado a pH 7.0 na reação de cetavlon da espécie *Usnea* sp., cujos dados de r.n.m.-<sup>13</sup>C e de metilação foram discutidos no capítulo anterior,

apresentam uma concentração de 8.4% de ácidos urônicos (13), contendo 0.05 g% de proteína (73).

Através de análises por g.l.c.-m.s. dos derivados de trimetilsil metanolizados (101), caracterizou-se as unidades de ácido urônico como ácido glucurônico. Para confirmar tal resultado, o polissacarídeo completamente metilado, foi submetido a tratamento com hidreto de lítio alumínio, que reduziu os grupos de  $-CO_2Me$  das unidades de ácido urônico *O*-metiladas a  $-CD_2OH$ . O produto foi metanolizado com metanol-HCl, seguido por hidrólise com  $H_2SO_4$  aquoso.

Após redução do hidrolizado com boroidreto de sódio deuterado e conseqüente acetilação com piridina e anidrido acético, a análise por g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (Tabela IX; p.113), mostrou os novos derivados, de  $2,3,4-Me_3-Glc$  (4.5%) e  $2,4-Me_2-Glc$  (2.6%) ambos di-deuterados em C-6, com fragmentos de impacto de elétrons típicos e tempos de retenção iguais aos derivados de Glc e diferentes dos isômeros correspondentes a Man e Gal. Evidência da presença de 2 núcleos de deutério em C-6 foi fornecida pelos fragmentos resultantes de impacto de elétrons a  $m/z$  131 (grande) e 191 (pequeno), formados como no Esquema 2. Portanto, GlcAp é presente no polímero como unidades não redutoras e 3-*O*-substituídas.

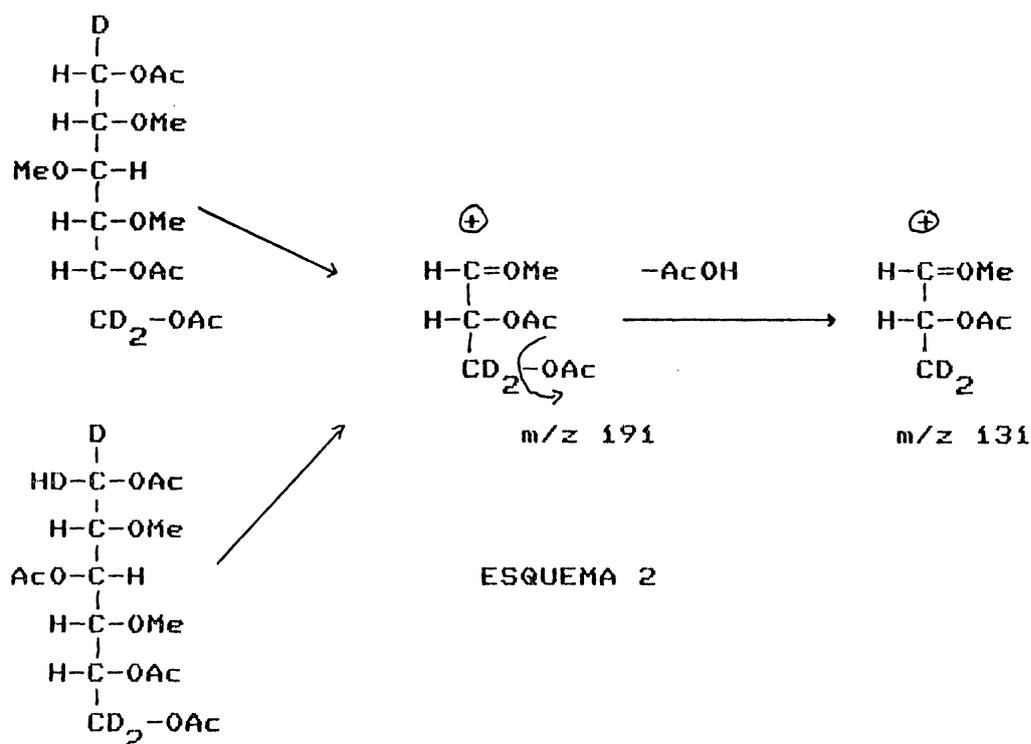
TABELA IX - G.L.C.-M.S. DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DE ANÁLISES DE METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Usnea* sp.

Acetatos alditóis	Tr <sup>a</sup>	Áreas % dos picos obtidos de por fracionamento com cetavlon <sup>b</sup>		
		pH 7.0	pH 8.5	pH 7.0 <sup>c</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.984	-	2	2
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.000	8	10	7
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.042	28	31	33
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1.203	11	9	-
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.245	2	-	-
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.273	4	-	-
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1.211	-	-	3
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1.286	19	14	13
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	1.291	-	11	6
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	1.480	4	-	-
4,6-Me <sub>2</sub> -Glc	1.547	2	-	-
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	1.625	13	-	13
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	1.693	-	-	5
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.715	3	17	15
2-Me-Man	1.975	3	-	-
3-Me-Man	2.227	3	6	3

a) Tempo de retenção relativo a 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.

b) G.l.c. realizada com coluna de OV-225.

c) Polissacarídeo metilado e reduzido com LiAlD<sub>4</sub>.



### 3.2.3. - REINVESTIGAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS CONTENDO MANOSE DE *E. prunastri* OBTIDOS ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO COM CETAVLON.

Os polissacarídeos da *E. prunastri*, precipitados a pH 7.0 na reação com o cetavlon e pH 8.5 na presença de tampão borato, foram preliminarmente analisados por seus espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C. A fração obtida a pH 7.0 apresentou sinais significativos a  $\delta$  109.7 (C-1;  $\beta$ -Gal $f$ ),  $\delta$  178.2 (C-6; CO<sub>2</sub>H), e a  $\delta$  95.4 e 97.5 (C-1; C-P-O) (42) (Fig.6A p. 68) e a fração obtida a pH 8.5 com tampão borato, ressonância a  $\delta$  102.9 (C-1;  $\alpha$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Man $p$ ) (36) e um sinal significativo a  $\delta$  99.5 correspondendo a (C-1; 2-O-subst. (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Man $p$  da cadeia principal) (39) (Fig. 6B p. 68).

A fração pH 7.0 de cetavlon foi isolada com um

rendimento de 4.5% e rotação específica de  $[\alpha]_D^{20} +109^\circ$ , uma razão de Man:Gal:Glc de 49:42:9 (Tabela I). Apresentando 5.1% de ácido urônico, 3.4% de fósforo e uma baixa concentração de proteína (0.02 g%). Os espectro de r.n.m.- $^1\text{H}$  (Fig. 28) contendo sinais em campo baixo a  $\delta$  5.63 e 5.69 (CH-P-O), tem uma certa similaridade com aquelas obtidas de O fosfomananas de *Hansenula capsulata* (34). Análise de g.l.c.-m.s. dos trimetilsilil metanolizados (101), caracterizou o ácido urônico como ácido glucurônico.

As análises de metilação realizadas com g.l.c.-m.s. dos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados, indicaram a presença de unidades terminais não redutoras de Glcp (6%), Galf (5%), Galp (20%), e 3-O (9%), 6-O (29%), 2,6 di-O- (9%), e 2,4,6-tri-O-substituídos (5%) de Manp (Tabela X). Os polissacarídeos per-O-metilados foram reduzidos com hidreto de lítio alumínio deuterado e os produtos convertidos para acetatos de alditóis -O-metilados. Foram detectados 2,3,4-tri-O- e 2,4-di-O-metil-glucitol- $^2\text{H}_6$  (Tabela X), ambos dando características de deutério, contendo picos a m/z 191 e 131, mostrando a presença de unidades terminais não redutoras e 3-O-substituídas de GlcpA (ver Esquema 2 p. 114).

A fração precipitada a pH 8.5 na presença de tampão borato, apresentou um rendimento de 5.2% e rotação específica de  $[\alpha]_D^{20} +102^\circ$ , contendo Man:Gal:Glc numa razão de 51:44:5 (Tabela I), com 2.1% de fósforo e nenhuma proteína. Seus espectros de r.n.m.- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , com sinais a  $\delta$  5.63 e 5.69 (Fig. 29) e a  $\delta$  95.4 e 97.5 (Fig. 68), correspondendo a

1-fosforodiéster. Análises de metilação apontaram principalmente unidades terminais não redutoras de Galp (33%) e 6-O (36%), 2,6-di-O (16%), e 2,4,6-tri-O-substituído (9%) de Manp (Tabela X).

A acetólise parcial da fração original, obtida via precipitação com Fehling, apresentou principalmente manose e galactose (c.p.), e um componente com  $R_{GAL}$  0.74 que apresentou cor amarela com hidrocloreto de *p*-anisidina e, no entanto, reagiu fracamente com nitrato de prata. Outros componentes foram detectados com os 2 reveladores com  $R_{GAL}$  0.57 e  $R_{LAC}$  0.08, 0.35, 0.46 e 0.66 e os últimos 4 apresentaram cor vermelha com hidrocloreto de *p*-anisidina parecendo conter ácido urônico.

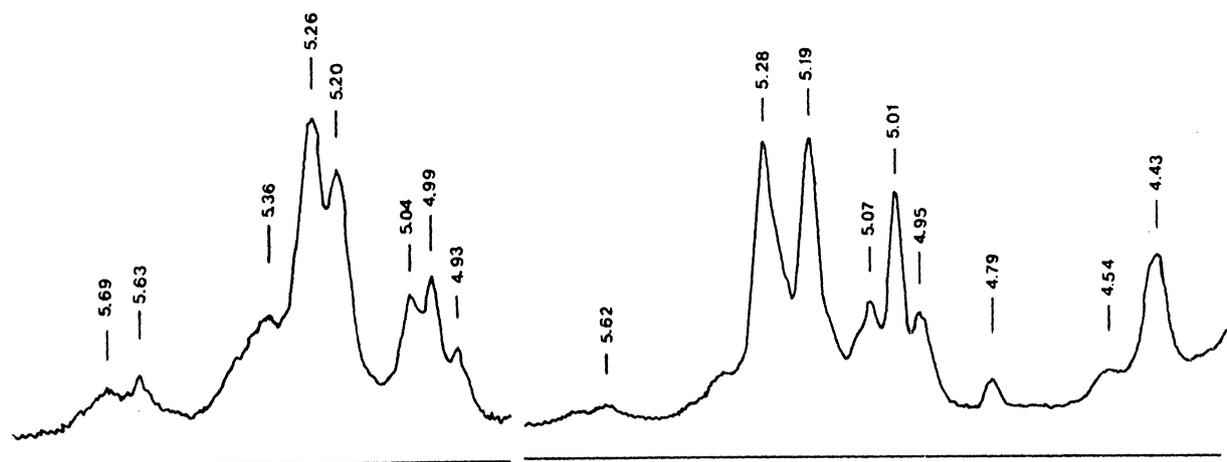


Figura 28

Figura 29

Figuras 28 e 29 - Espectros de r.n.m.-<sup>1</sup>H dos polímeros da *E. prunastris*, obtidos através da precipitação com cetavlon a pH 7.0 e pH 8.5 com tampão borato respectivamente.

TABELA X - ANÁLISES POR G.L.C.-M.S. DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DE METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *E. prunastri*

Acetato de alditóis	Tr <sup>a</sup>	Áreas % dos picos obtidos por fracionamento com cetavlon <sup>b</sup>		
		pH 7.0	pH 7.0 <sup>c</sup>	pH 8.5
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.992	1	3	1
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.000	6	4	-
2,3,5,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.022	5	-	-
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.039	20	32	33
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1.203	9	-	1
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.247	2	-	-
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.265	4	-	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1.274	30	33	36
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	1.288	-	3	-
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	1.479	1	-	-
4,6-Me <sub>2</sub> -Glc	1.547	2	-	-
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	1.635	1	-	3
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	1.698	-	3	-
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.721	9	10	17
2,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.736	5	3	-
3-Me-Man	2.233	5	09	9

a) Tempo de retenção relativo a 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glicitol.

b) G.l.c. realizada com coluna OV-225.

c) Polissacarídeo metilado e reduzido com LiAlD<sub>4</sub>.

### 3.2.4. - INVESTIGAÇÃO DOS HETEROPOLISSACARÍDEOS CONTENDO MANOSE DE *P. araucaria*

O polissacarídeo de *P. araucaria*, obtido por fracionamento com cetavlon a pH 7.0, cujo espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C apresenta na (Fig. 4B p. 58) na região do C-1 um intenso sinal a  $\delta$  102.9 indicando  $\alpha$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 2) e um outro menos intenso  $\delta$  109.7 referente a  $\beta$ -Galp (1 $\rightarrow$ 6) ligado a cadeia principal, sendo que o sinal  $\delta$  102.9 não foi confirmado pelos resultados de metilação, provavelmente tenha sido decomposto durante derivatização dos metilados e um intenso sinal a  $\delta$  178.2 (C-6; CO<sub>2</sub>H) Este polímero apresenta um conteúdo de ácido urônico de 8.4% (13), com pequeno conteúdo de proteína de 0.05 g% (73). Os resultados de redução dos grupos carboxil com trimetilsil metanolizados indicaram ácido glucurônico (101).

Análises de metilação foram realizados nos heteropolímeros de *P. araucaria* preparados através da precipitação com cetavlon a pH 7.0 e 8.5. Pode ser observado em Tabelas XI que a metilação e redução dos derivados per-O-metilados forneceram fragmentos provenientes de ácido glucurônico, foram detectados como derivados 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Glc-6d<sub>2</sub> e 2,4-Me<sub>2</sub>-Glc-6d<sub>2</sub>, cujos rendimentos foram 5.1% e 2.3%.

Análises de metilação dos polímeros, da fração pH 7.0 e pH 8.5 da *P. araucaria* (Tabela XI; p. 110) indicaram uma relação com os sinais de r.n.m.-<sup>13</sup>C, o sinal  $\delta$  102.9 de  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp, encontra sustentação na formação

de 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>Gal (29.0%) para pH 7.0 e (40.0%) para o polímero de pH 8.5, e o 3,4-Me<sub>2</sub>Man (20.0% e 23.0%) respectivamente para os precipitados de pH 7.0 e pH 8.5 do cetavlon e os resíduos de 3-O-Me-Man explicam o sinal  $\delta$  104.5 correspondente a estrutura  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Manp.

TABELA XI - ANÁLISES POR G.L.C.-M.S. DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DE METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Parmotrema araucaria*

Acetatos de alditóis	Tr <sup>a</sup>	Áreas % dos picos obtidos por fracionamento com cetavlon <sup>b</sup>		
		pH 7.0	pH 8.5	pH 7.0 <sup>c</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.000	7	4	3
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.044	29	40	35
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.276	7	5	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1.290	25	23	28
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	1.300	-	-	5
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	1.696	-	-	2
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.720	20	23	22
2,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.736	3	-	-
3,4-Me <sub>2</sub> -Gal	1.881	3	-	-
3-Me-Man	2.228	6	5	5

a) Tempo de retenção relativo a 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.

b) G.l.c. realizada com coluna de OV-225.

c) Polissacarídeo metilado e reduzido com LiAlH<sub>4</sub>.

Os polissacarídeos das frações de pH 7.0 e 8.5, apresentaram 0.05 g% como já dito anteriormente e 0.04 g% de proteína respectivamente. A realização de uma degradação de Smith, visando um maior entendimento estrutural destes heteropolímeros e a fração de pH 7.0 resultou na liberação de 95.0% de glicerol, 0.8% de eritritol, 0.5% de treitol, 3.0% de manitol e 0.7% de glucitol. No entanto, o resultado deste ensaio para a fração de pH 8.5 não diferiu muito, apresentando 92.0% de glicerol, 2.0% de eritritol, 2.5% de treitol e 3.5% de manitol.

### 3.2.5. - INVESTIGAÇÃO DOS ÁCIDOS URÔNICOS *U. meridionalis*

O polissacarídeo obtido por fracionamento com cetavlon a pH 7.0, apresentando em seu espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C (Fig. 22A p. 94) um pequeno sinal  $\delta$  178.2 (C-6; CO<sub>2</sub>H) e outros que são  $\delta$  104.6  $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4), 103.6  $\alpha$ -Manp-(1 $\rightarrow$ 2) e 102.7  $\alpha$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 2) ligados a cadeia principal com 9% de ácido urônico (13) e uma pequena quantidade de proteína 0.01 g% (73). Os resultados obtidos através de redução dos grupos carboxil com trimetilsilil metanolisados indicaram ácido glucurônico.

Análises de metilação realizados nos heteropolímeros a pH 7.0 e pH 8.5. Os quais pode ser observados na Tabela XII que a metilação e redução dos derivados per-O-metilados fragmentos provenientes de ácido glucurônico, onde foram detectados como derivados 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Glc-6d<sub>2</sub> e 2,4-Me<sub>2</sub>-Glc-6d<sub>2</sub>, cujos rendimentos foram 2.0% e 3.0% respectivamente.

TABELA XII - ANÁLISES POR G.L.C.-M.S. DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DE METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *U. meridionalis*.

Acetatos de alditóis	Tr <sup>a</sup>	Áreas % dos picos obtidos por fracionamento com cetavlon <sup>b</sup>		
		pH 7.0	pH 8.5	pH 7.0 <sup>c</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.990	11	2	13
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.000	-	4	2
2,3,5,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.016	1	3	-
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.045	23	30	25
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1.205	-	-	1
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1.207	8	-	-
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.253	3	-	-
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.277	6	-	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1.290	11	32	26
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	1.298	1	-	2
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Gal	1.415	3	3	-
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	1.479	2	-	-
2,6-Me <sub>2</sub> -Glc	1.512	2	-	-
4,6-Me <sub>2</sub> -Glc	1.550	2	-	6
3,6-Me <sub>2</sub> -Man	1.566	1	2	-
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	1.635	7	7	17
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	1.691	1	-	-
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	1.697	-	-	3
3,4-Me <sub>2</sub> -Glc	1.718	3	8	3
2,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.736	1	1	-
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	1.768	2	-	-
2,4-Me <sub>2</sub> -Gal	1.825	1	-	-
2-O-Me-Hex	1.976	4	3	-
3-Me-Man	2.243	7	5	2

a) Tempo de retenção relativo a 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.

b) G.l.c. realizada com coluna de OV-225.

c) Polissacarídeo metilado e reduzido com LiAlD<sub>4</sub>.

PARTE III - 3.3. - COMPONENTES SOLÚVEIS NO EXTRATO METANOL-  
AGUOSO DE *Tornabenia intricata*

O resíduo liquênico (17,1 g) proveniente da extração benzeno-etanol, etapa que removeu 7,5% dos componentes apolares, como graxas, gorduras, ácidos liquênicos e compostos carotenóides, foi tratado com metanol contendo 20% de água (v/v), sob refluxo, visando a extração de constituintes carboidratados de baixo peso molecular. O extrato metanólico aquoso resultante, após deionização e liofilização, forneceu 3,9% de material.

Este extrato solubilizado em água (Fração A), por c.p. (sistema - B) apresentou principalmente arabinitol ( $R_{GAL}$  1.18), xilitol ( $R_{GAL}$  1.3) e três outros componentes ( $R_{GAL}$  0.87, 0.57 e 0.34), todos revelados por  $AgNO_3$  e pela visualização com cloridrato de *p*-anisidina apresentaram teste negativo para açúcar redutor.

TABELA XIII - ANÁLISE POR G.L.C.-M.S.<sup>a</sup> DOS ACETATOS DE ALDITÓIS DE FRAÇÃO A OBTIDA, PELA EXTRAÇÃO METANOL-ÁGUA 4:1 DE *Tornabenia intricata*

Alditol	Tr <sup>b</sup>	Acetatos de alditóis de várias frações		
		I <sup>c</sup>	II <sup>d</sup>	III <sup>e</sup>
Glicerol	0.46	2	2	7
Ribitol	0.89	31	30	19
Arabinitol	0.91	52	53	23
Xilitol	1.0	14	14	9
Manitol	1.37	1	1	16
Galactitol	1.43	-	-	17
Glucitol	1.56	-	-	9

a) Coluna DB-210 acoplada ao espectrômetro de massa.

b) Tempo de retenção em relação ao do xilitol pentaacetato.

c) Fração A reduzida com NaBH<sub>4</sub> e acetilada

d) Fração A acetilada

e) Fração A Hidrolisada, reduzida e acetilada

Os compostos de carboidratos de baixo peso molecular, tem sido isolado de várias espécies de líquens, Lindberg et alii (70) trabalhando com 60 espécies diferentes encontraram manitol em todas as espécies investigadas assim como arabinitol em 90% delas.

A Tabela XIII apresenta os resultados obtidos com a extração metanol-água da *T. intricata*, os quais estão parcialmente de acordo com o relatado por Gorin & Iacomini (38), que ao analisar a extração metanol-aquoso de seis espécies de líquens, encontraram arabinitol e manitol com predominância do pentitol, assim como os resultados obtidos por Iacomini et alii (59) no estudo de 3 espécies do gênero *Cladonia*.

Baron et alii (06) investigaram o extrato metanol-aquoso de *Stereocaulon ramulosum* e encontraram arabinitol e manitol como os principais componentes.

Estas análises nos levam a refletir que o arabinitol assim como manitol são componentes de baixo peso molecular característicos de líquens, entretanto na *T. intricata* há também a ocorrência de xilitol e ribitol.

Fração A quando hidrolisada, reduzida e acetilada forneceu derivados de acetatos de manitol (16%), galactitol (17%) e glucitol (9%), mais do que foram apresentados na fração A, que é consistente com a presença de oligossacarídeos.

PARTE IV - 3.4. - ESTUDO ESTRUTURAL DA GLUCOMANANA DE  
*Tornabenia intricata*

### 3.4.1. - ENSAIOS DE HOMOGÊNICIDADE DA GLUCOMANANA

O polímero obtido através do fracionamento de cetavlon, na presença de tampão borato a pH 8.5 de 7. *intricata*, foi submetido a eletroforese em acetato de celulose com tampão borato a pH 9.0, revelando a presença de somente uma banda. Quando tal polímero foi eluído em coluna de Sepharose 6B demonstrou somente um pico (Fig. 30; p.128). No entanto, este polissacarídeo ao ser eluído em coluna de Sepharose 4B-200 apresentou dois picos como observado na (Fig. 31; p. 129).

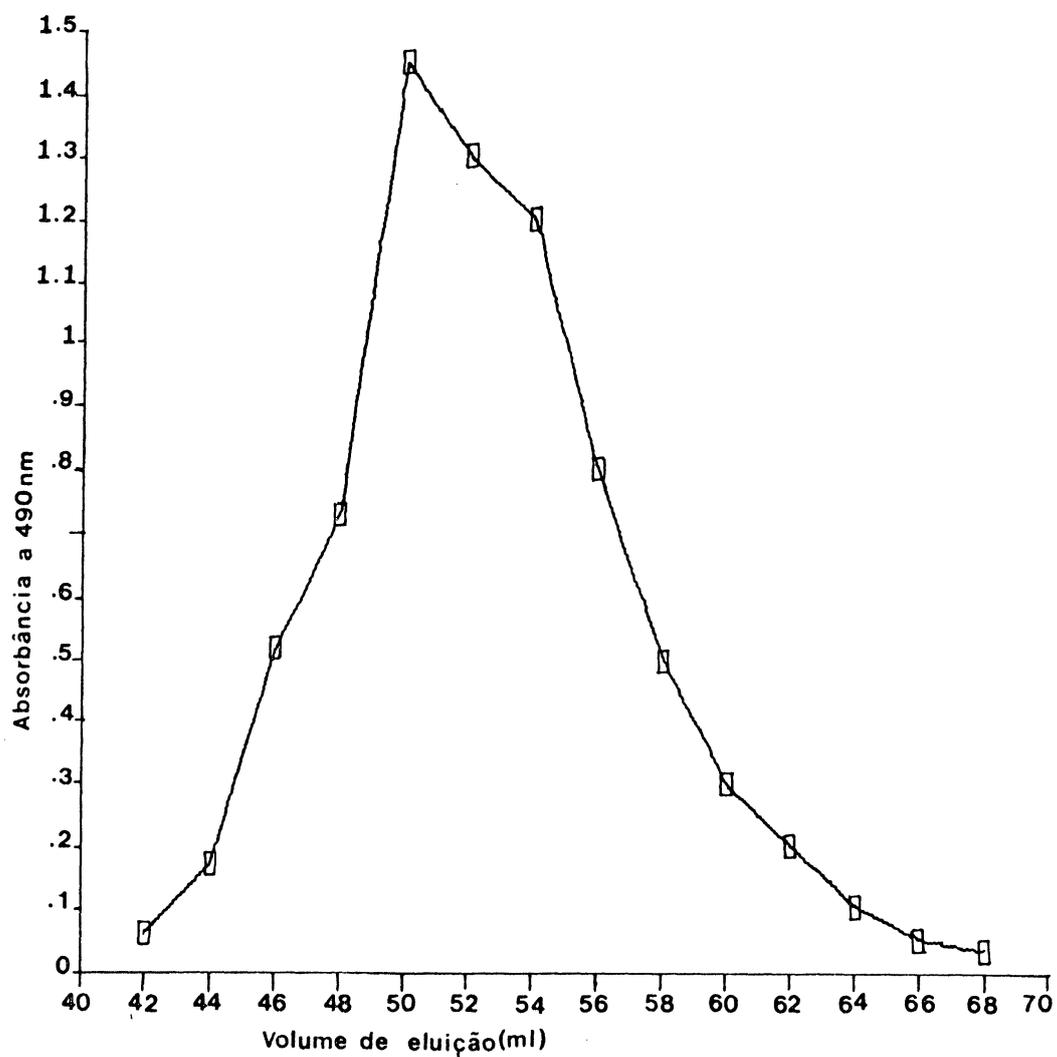


Figura 30 - Cromatograma de eluição da glucomanana da espécie *T. intricata*, obtido através da precipitação por cetavlon a pH 8.5, na presença de tampão borato, em coluna de Sepharose 6B. Volume morto (azul de dextrana): 25 ml.

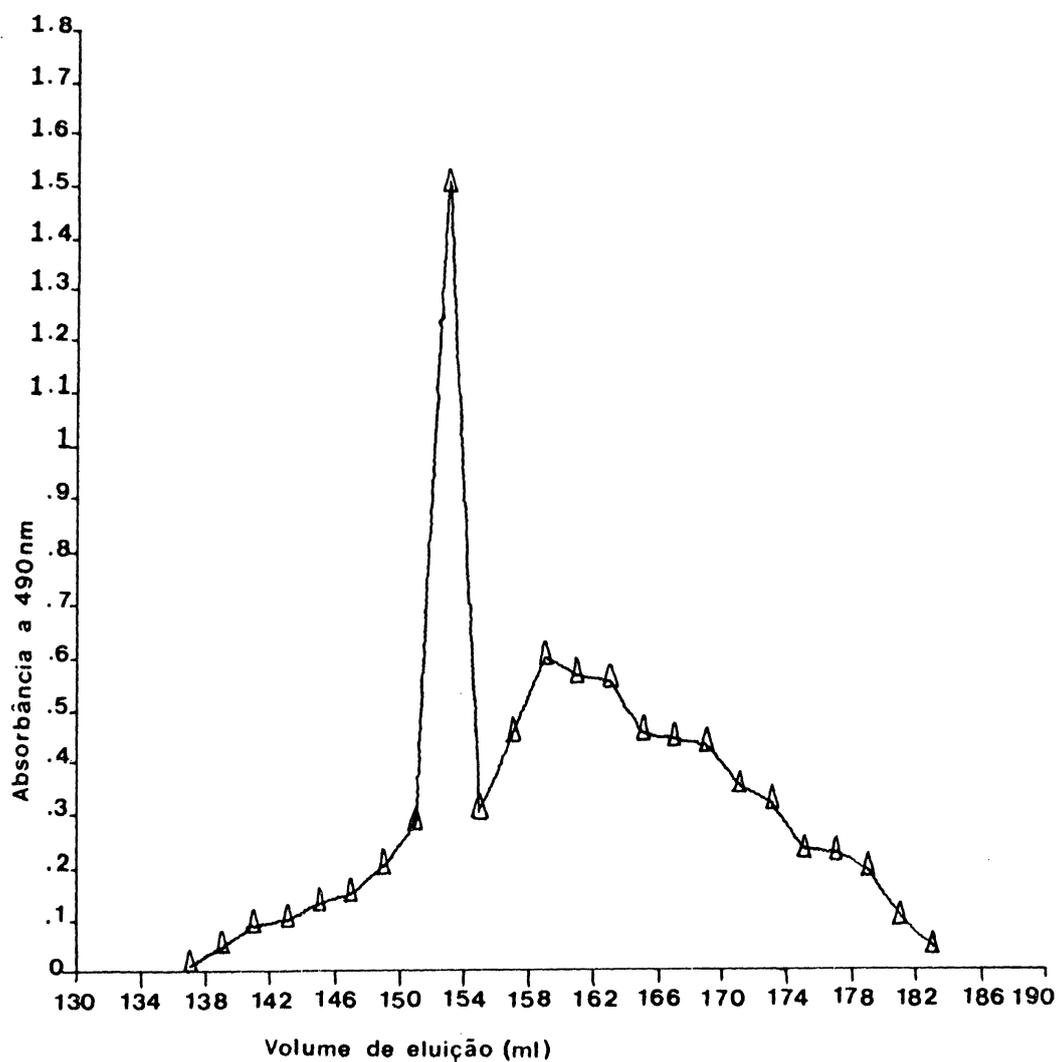


Figura 31 - Cromatograma de eluição da glucomanana da espécie *T. intricata*, obtido através da precipitação por cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, em coluna de Sepharose 4B-200. Volume morto (azul de dextrana): 66 ml.

### 3.4.2. - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DAS FRAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DA COLUNA DE SEPHAROSE 4B-200

O tempo de retenção na coluna gel de Sepharose 4B-200, é proporcional ao volume de eluição, sendo assim, foi realizado uma curva logaritmica em relação ao tempo de retenção ( $t_R$ ) de dextrans com o p.m. de 487.000, 266.000 e 81.600, tendo por objetivo de conhecer o peso molecular das frações de *T. intricata* obtidas através da coluna gel de Sepharose 4B-200. O resultado deste experimento pode ser visto através da (Fig. 32; p. 131) o qual indica que as duas frações possuem um peso molecular de 115.000 (Fração A) e 85.000 (Fração B), a Fração A apresentou um rendimento de 48% possuindo uma rotação específica de  $[\alpha]_D^{25} +56^{\circ}$  e a Fração B foi isolada com rendimento de 79% e uma rotação específica de  $[\alpha]_D^{25} +56^{\circ}$ .

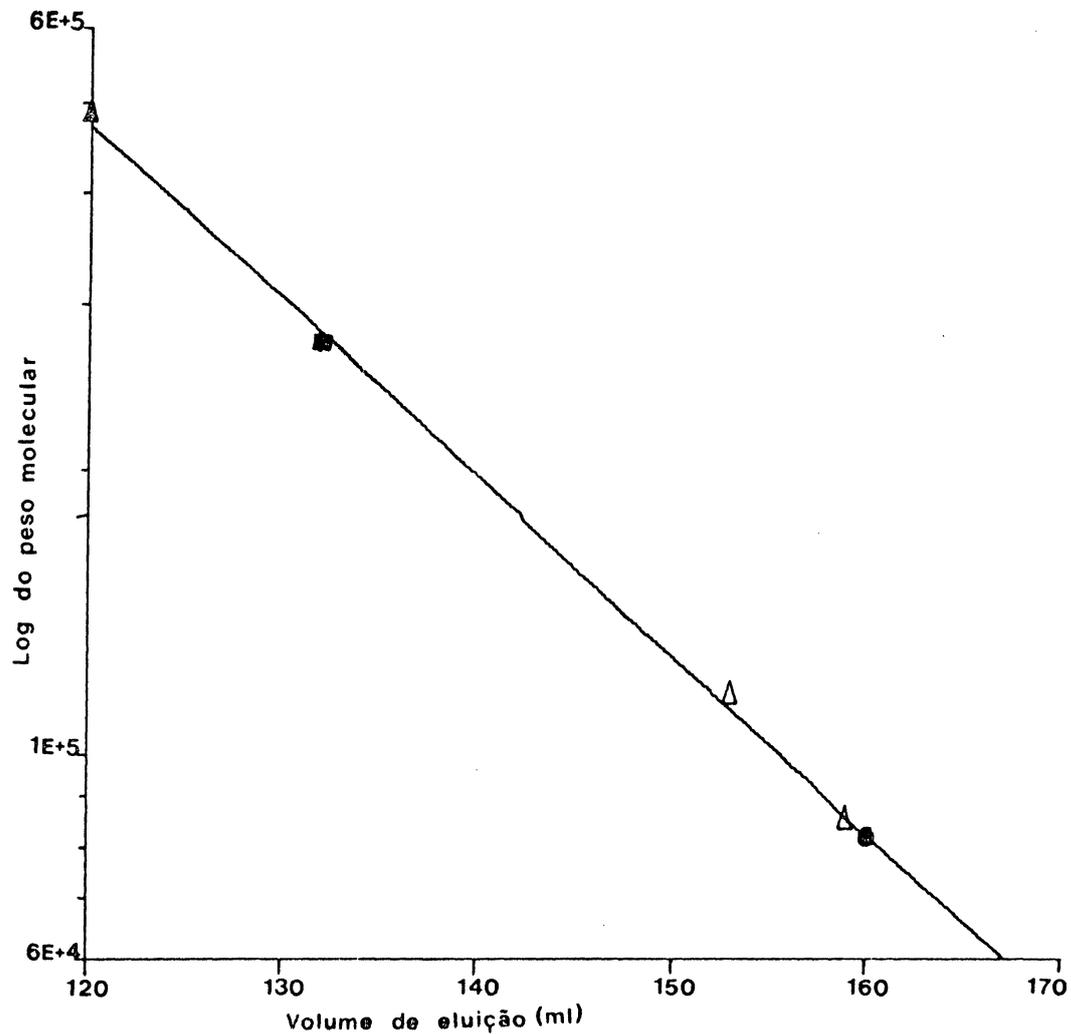


Figura 32 - Determinação do peso Molecular dos componentes da glucomanana obtida através de cetavlon a pH 8.5 em coluna de Sepharose 4B-200, em comparação com o tempo de retenção de azul de dextranas com os seguintes pesos moleculares: ▲ 487.000, ■ 266.000 e ● 81.600.

Análises dos acetatos de alditóis dos hidrolisados destas frações forneceram uma razão Man:Glc de 91.5:8.5 para a Fração A e 94.5:5.5 para a Fração B. Os espectros de r.n.m.  $^{13}\text{C}$  de ambas frações (Fig 33 e 34) foram idênticos aos da glucomanana original, mas com pequenos sinais adicionais a  $\delta$  78.9, 80.7, 104.4, 104.7 e outros, indicando vazamento da coluna. Tal fato, também é indicado pelo rendimento superior a 100% para as frações combinadas e as rotações específicas inferiores a da glucomanana original que é de  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +74^{\circ}$  (Tabela I; p. 49).

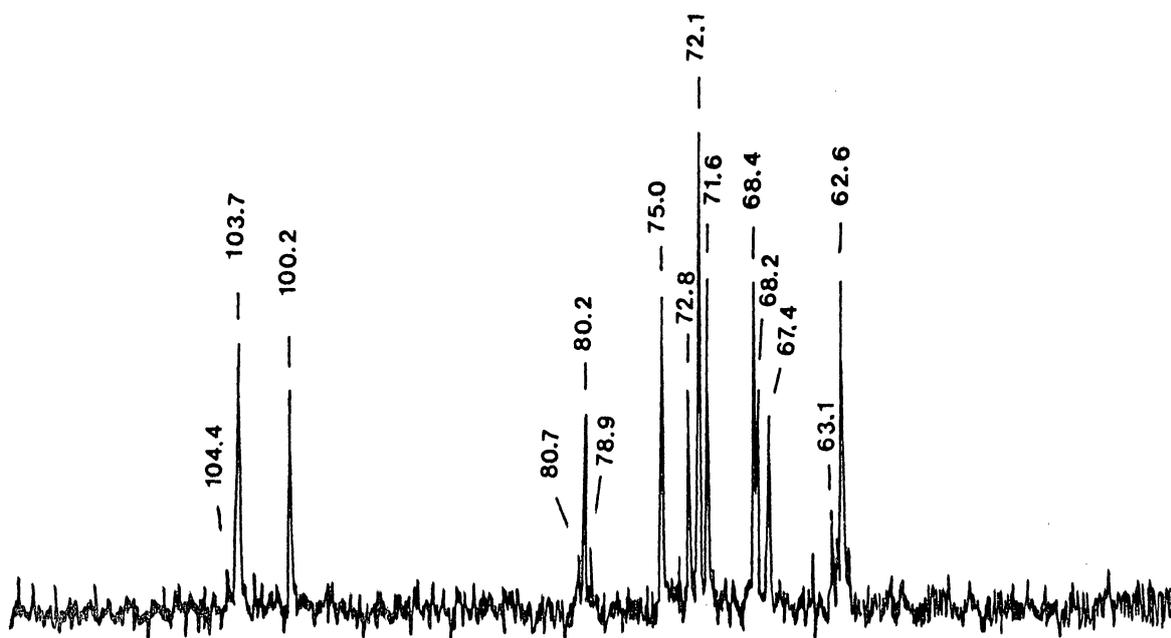


Figura 33 - Espectro de r.n.m.  $^{13}\text{C}$  da Fração A, obtida através do fracionamento da glucomanana, cetavlon pH 8.5, em coluna de Sepharose 4B-200.

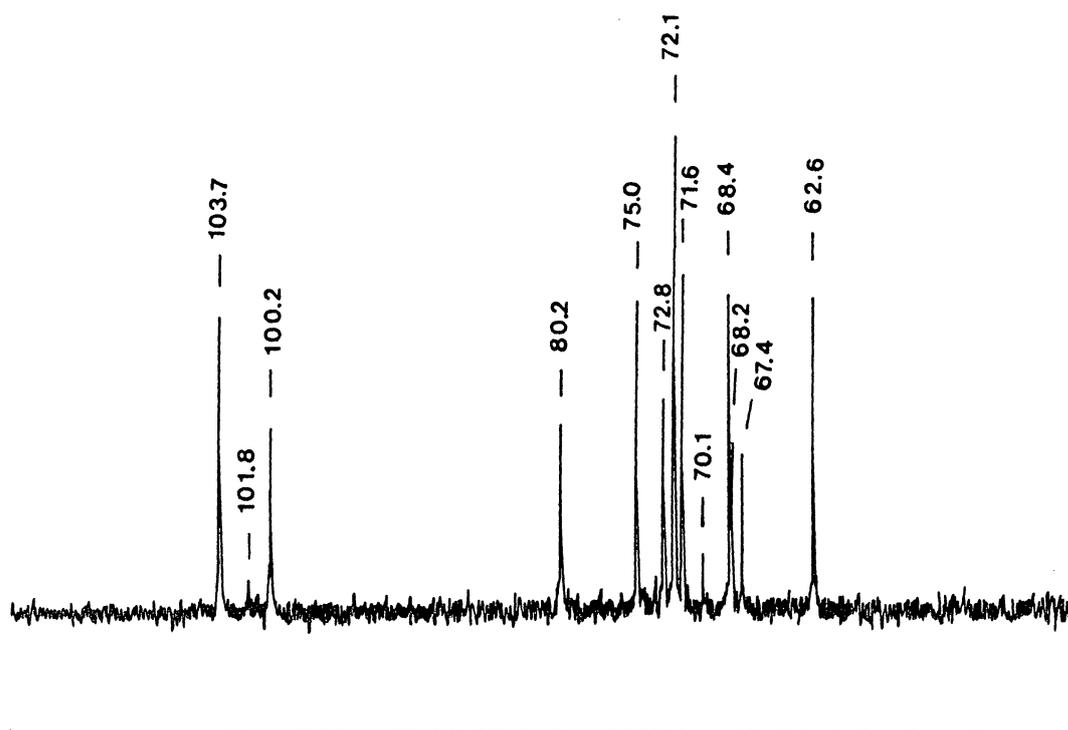


Figura 34 - Espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  da Fração B, obtida através do fracionamento da glucomanana, cetavlon pH 8.5, em coluna de Sepharose 4B-200.

As moléculas deste polímero apresentaram a mesma mobilidade eletroforética, a mesma composição química e estrutura de acordo com os dados de r.n.m-<sup>13</sup>C. Entretanto, apresentou uma variável, duas frações, com peso moleculares distintos, eluidas em Sepharose 4B-200. Embora, quimicamente homogêneo, a glucomanana pode ser polidispersa em termos de peso molecular, até nos componentes da segunda fração que foi eluida apenas gradualmente (30).

O polímero obtido através da purificação com cetavlon a pH 8.5 na presença de tampão borato, contendo 0,08 g% de proteína (73), foi submetido a análises de metilação (51,66) e posteriormente pré-hidrolisados pelo método de Seaman (02) e MeOH-HCl, seguido por hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M a 100°C. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados resultantes de ambas hidrólises foram idênticos, no entanto, com proporções diferentes, demonstrado na Tabela XIV.

TABELA XIV - ANÁLISES POR G.L.C.-M.S. DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA METILAÇÃO DA GLUCOMANANA DE *T. intricata*<sup>a</sup>

Acetatos de alditóis	Tr <sup>b</sup>	% da área de cada pico	
		de Seaman	Metanólise
Pré-tratamento hidrolítico			
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.992	53	47
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.000	4	5
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1.173	1	-
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1.189	0.5	1
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1.283	5	2
3,6-Me <sub>2</sub> -Man	1.355	23	12
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.699	12	31
3-Me-Man	2.191	1.5	2

a) G.l.c. realizada em coluna de OV-225.

b) Tempo de retenção relativo a 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.

A Tabela XIV compara as proporções entre os dois métodos de pré-hidrólise da glucomanana metilada, demonstrando que há uma diferença significativa entre as proporções dos fragmentos obtidos pela pré-hidrólise de Seaman e aquela hidrólise realizada a partir de MeOH-HCl à 3%. Tais diferenças, provavelmente ocorram devido ao tratamento de Seaman consistir em hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% (p/p) por 1 hora em banho de gelo, resultando na degradação

preferencial de fragmentos formados por di-O-metil, principalmente o 3,4-Me<sub>2</sub>-Man, que apresentou uma drástica diminuição em seu percentual de 31 a 12%.

Com a finalidade de se definir mais exatamente a estrutura de glucomanana, realizou-se outros ensaios quantitativos e encontrou-se os seguintes dados através da reação de periodato de sódio: 1.4 moles do reagente foram consumidos, acompanhados pela produção de 0.54 mol de ácido fórmico/unidade de açúcar. A degradação de Smith, deste polímero seguido por redução com boroidreto de sódio, hidrólise total, e redução com boroidreto de sódio e acetilação forneceu glicerol e manitol com uma razão molar de 47:7 (g.l.c.-m.s.).

Informações relacionadas com a estrutura da glucomanana foram fornecidas pelos ensaios da hidrólise ácida parcial (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.16 M, 18 horas, 100°C) e a degradação enzimática pela ação da enzima α-D-manosidase de "jack bean" (62,68).

A hidrólise ácida parcial da glucomanana, após neutralização do material e adição de etanol (5:1), resultou num sobrenadante etanólico com manose e glucose, numa relação molar de 98:2 e um precipitado etanólico contendo uma razão de 96:4 de manose e glucose, sendo que o precipitado forneceu um rendimento de 25%.

A análise de metilação (Tabela XV) do polissacarídeo parcialmente degradado, demonstrou unidades terminais não redutoras de Manp (28%) e Glcp (4%), e unidades de Manp 6-O (52%) e 2,6-di-O-substituídas (16%).

Tais resultados são consistentes com a alta proporção de resíduos de Man $\rho$  com ligações (1 $\rightarrow$ 6) na cadeia principal.

TABELA XV ANÁLISES POR G.L.C.-M.S. DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA METILAÇÃO DA GLUCOMANANA DE *T. intricata* PARCIALMENTE DEGRADADA POR ÁCIDO<sup>a</sup>

Acetatos de alditóis	Tr <sup>b</sup>	% área de pico
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.992	28
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.000	4
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1.302	52
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.759	16

a) G.l.c. realizada em coluna de OV-225.

b) Tempo de retenção de cada fragmento relativo ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.

A degradação enzimática obtida de 3 mg da enzima  $\alpha$ -D-manosidase, tendo como substrato 50 mg de polissacarídeo originado do fracionamento com cetavlon a pH 8.5 com tampão borato, foi monitorado, através da produção de açúcar redutor pelo método de Somogyi-Nelson até atingir o platô máximo de 35% de enzimólise (Fig. 35). Após decorridas 11 horas de incubação a pH 4.5 e a 25°C, a mistura reativa foi neutralizada e a inativação da enzima foi realizada por aquecimento da solução a 100°C por 15 min. O polissacarídeo residual foi precipitado com excesso de etanol, sendo que o

sobrenadante apresentou apenas monômeros de manose. O precipitado foi isolado em rendimento de 66%, e apresentou uma razão de 82:18 de Man:Glc.

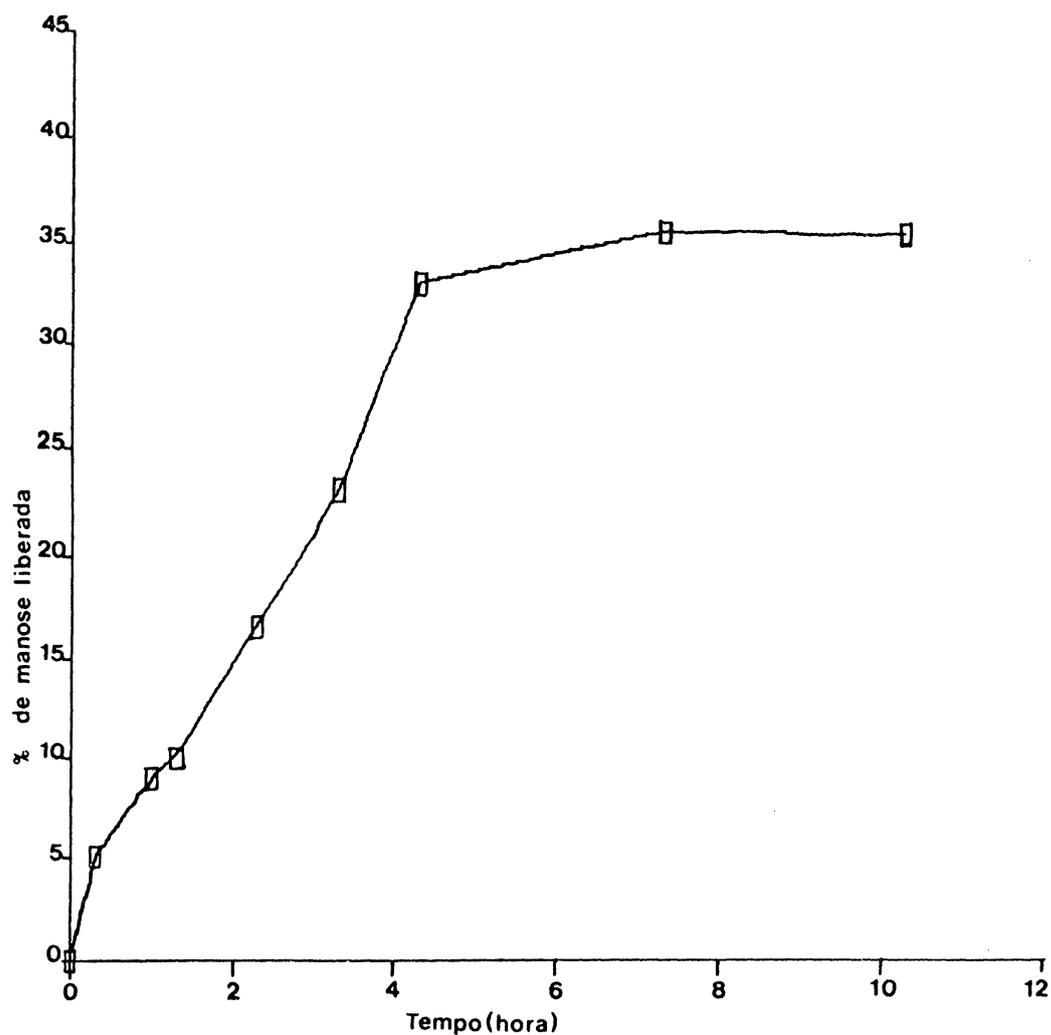


Figura 35 - Curva de hidrólise enzimática ( $\alpha$ -manosidase EC 3.2.1.24) da glucomanana de *T. intricata*

A análise de metilação (Tabela XVI) da glucomanana degradada enzimaticamente demonstrou unidades terminais não redutoras de Manp (23%) e Glcp (9%), e unidades de Manp 6-O (37%) e 2,6-di-O-substituídos (31%), indicando remoção incompleta das cadeias laterais devido a presença de unidades resistentes de Glcp.

TABELA XVI ANÁLISES POR G.L.C.-M.S.<sup>a</sup> DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS RESULTANTES DA METILAÇÃO DE GLUCOMANANA DE *T. intricata* DEGRADADA POR  $\alpha$ -MANOSIDASE

Acetatos de alditóis	Tr <sup>b</sup>	% área de pico
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.992	23
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.000	9
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	1.277	37
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	1.342	31

a) G.l.c. realizada em coluna de DB-210.

b) Tempo de retenção de cada fragmento relativo ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.

O espectro de r.n.m.-<sup>13</sup>C (Fig. 36) do produto resistente a ação enzimática apresentou sinais a  $\delta$  103.7 correspondendo a C-1 das unidades terminais não redutoras de  $\alpha$ -D-Manp (ver 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man, 23%; Tabela XV), 100.1 referente as unidades de Manp 2,6-di-O-substituídas (ver 3,4-Me<sub>2</sub>-Man, 31%) e  $\delta$  80.1 assinalado a C-2 das mesmas

unidades. Um grande sinal aparece a  $\delta$  101.1 indicando C-1 unidades 6-O-substituídas de Man $\rho$  (ver 2,3,4-Me $_3$ -Man, 37%). O desaparecimento do sinal a  $\delta$  77.0 indica que a unidade responsável para substituição em O-4 foi  $\alpha$ -D-Man $\rho$  (ver 3,6-Me $_2$ -Man, 31 %; Tabela XIV, p. 135). Esta unidade foi também removida pela ação da hidrólise ácida parcial.

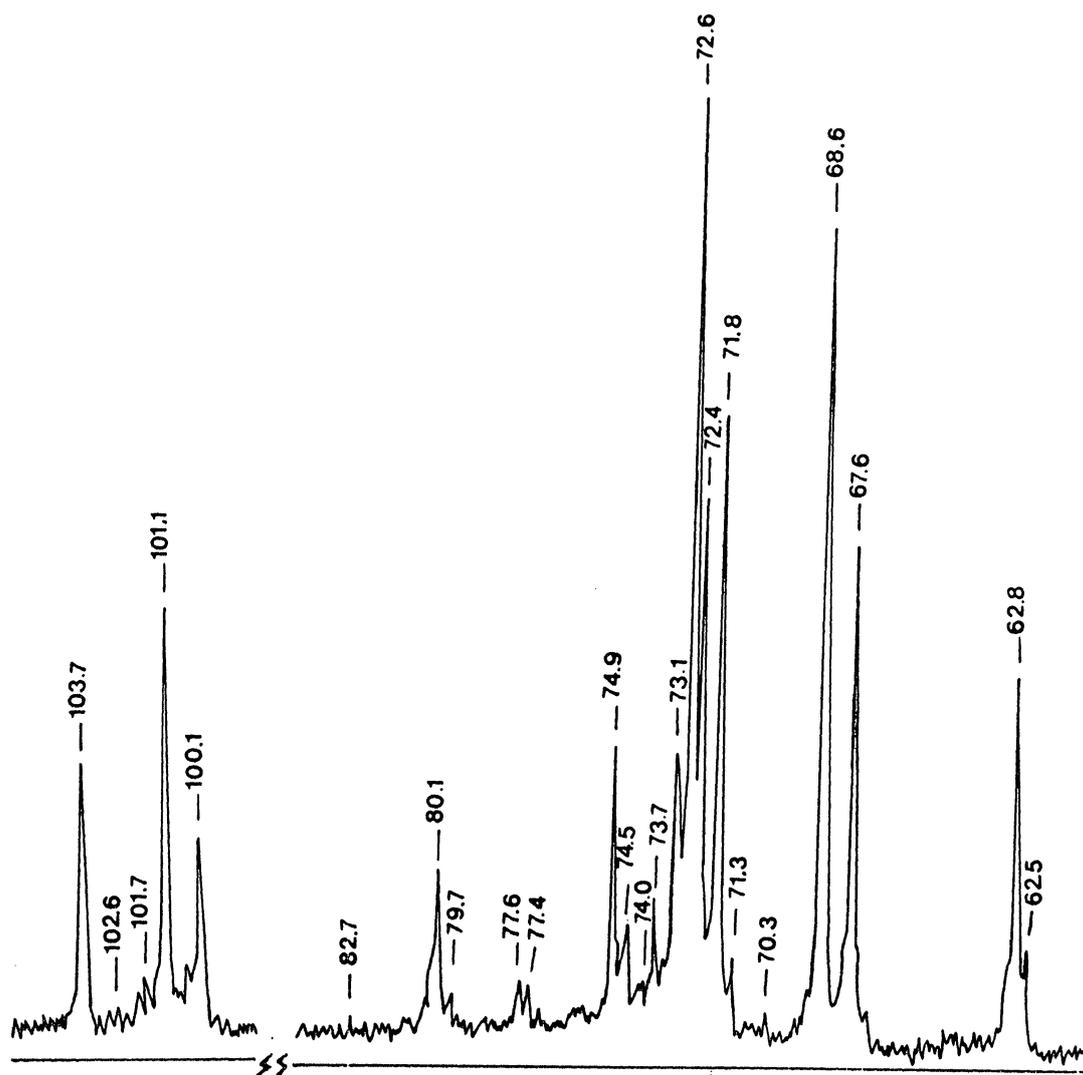


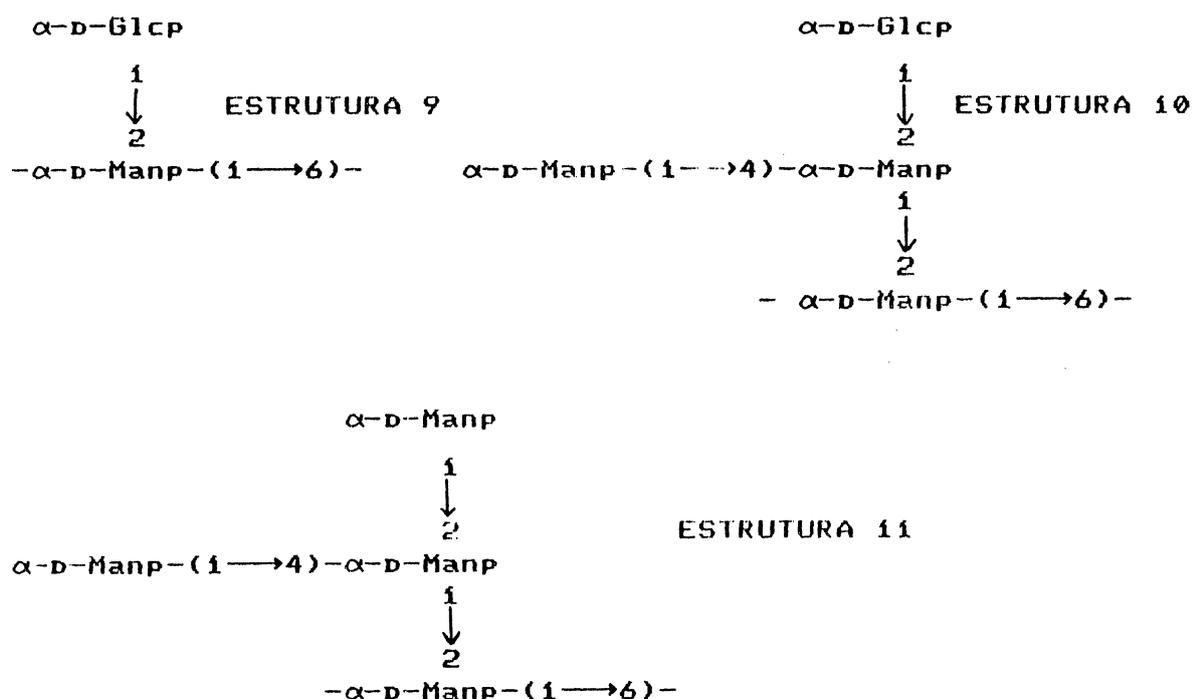
Figura 36 - Espectro de r.n.m.- $^{13}\text{C}$  do polímero resultante da ação enzimática da enzima  $\alpha$ -manosidase (EC 3.2.1.24), na glucomanana de *T. intricata*.

Com o objetivo de determinar a estruturas das cadeias laterais de glucomanana, resolveu-se realizar uma acetólise parcial, a qual hidrolisa as ligações (1→6) de Man $\rho$  da cadeia principal preferencialmente, resultando na produção de oligossacarídeos, proveniente das cadeias laterais.

Após a desacetilação do produto, a realização de c.p. descendente (solvente B) e visualização por nitrato de prata amoniacal, demonstrou uma mistura de manose, composto de um dissacarídeo com mobilidade cromatográfica semelhante ao do padrão  $\alpha$ -D-Man $\rho$ -(1→2)- $\alpha$ -D-Man ( $R_{Man} = 0.58$ ), e trissacarídeo com mobilidade semelhante ao do padrão  $\alpha$ -D-manotriose unido por ligações (1→2), ( $R_{Man} = 0.40$ ).

O fracionamento desta mistura foi realizado por c.p. preparativa em papel Whatman n<sup>o</sup> 3<sup>1</sup> (solvente B). A primeira fração com  $R_{Man} = 0.58$  apresentou manose e glucose numa relação molar de 94.5:5.5, e seu espectro de r.n.m.-<sup>1</sup>H apresentou sinais de uma mistura de  $\alpha$ -D-Man $\rho$ -(1→2)-D-Man (H-1:  $\delta$  5.30, J 1.7 Hz; H-1':  $\delta$  4.97, J 2.2 Hz) (37), com pequenos sinais de  $\alpha$ -D-Glc $\rho$ -(1→2)-D-Man (H-1:  $\delta$  5.39; H-1':  $\delta$  5.08); (43). Um sinal a  $\delta$  5.26 provavelmente originou-se de H-1' de  $\alpha$ -D-Man $\rho$ -(1→2)- $\alpha$ -D-Man $\rho$ -(1→2)-D-Man (43), (Fig. 37). A outra fração apresentou Man:Glc com uma relação molar de 87.5:12.5 e seu espectro de r.n.m.-<sup>1</sup>H correspondeu ao de  $\alpha$ -D-Glc $\rho$ -(1→2)- $\alpha$ -D-Man $\rho$ -(1→2)-D-Man (44), (H-1'',  $\delta$  5.08; H-1',  $\delta$  5.00; H-1,  $\delta$  5.34), apresentando impurezas não identificadas com sinais a  $\delta$  5.02 e 5.10, (Fig. 38).

Em função dos dados analíticos, os componentes estruturais propostos para a glucomanana de *T. intricata* são uma cadeia principal  $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{6)}$  com cadeias laterais de principalmente  $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)}$  (estrutura 5; p. 90), e  $\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{2)}$  (estrutura 9),  $\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{2)-}[\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{4)]-\alpha\text{-D-Manp}$  (estrutura 10), e possivelmente  $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}[\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{4)]-\alpha\text{-D-Manp}$  (estrutura 11).



As estruturas 9 e 10 foram previamente encontradas na glucomanana da parede celular da levedura *Ceratocystis brunnea* (44).

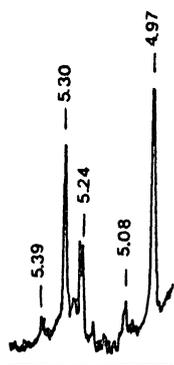


Figura 37

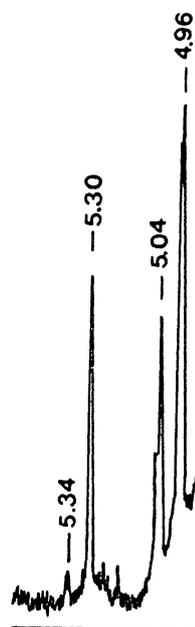


Figura 38

Figuras 37 e 38 - Espectros de r.n.m.-<sup>1</sup>H região de H-1 dos oligossacarídeos  $R_{\text{Man}} = 0.58$  e  $0.40$  provenientes da acetólise parcial realizada na glucomanana de *T. intricata*.

## CONCLUSÕES

1. Dezoito espécies de líquens foram extraídos com solução aquosa de hidróxido de potássio à quente e os polissacarídeos liberados e fracionados por precipitação com solução de Fehling, seguido por precipitação fracionada com cetavlon a pH 7.0 e pH 8.5 na presença de borato, acrescido de cinco espécies descritas na literatura somando vinte e três espécies de 13 gêneros diferentes as quais comparamos por r.n.m.-<sup>13</sup>C.
2. Os precipitados a pH 8.5 apresentaram unidades de galactose, manose e glucose, exceto no caso previamente estudado de *Sterocaulon ramulosum*, o qual contém uma galactomanana e por último a *Tornabenia intricata*, a qual apresentou uma glucomanana. Aparentemente, todos os polissacarídeos contendo manose contêm uma cadeia principal de  $\alpha$ -D-Manp-(1→6).
3. As regiões de C-1 dos espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C dos heteropolissacarídeos contendo manose foram típicas de líquens, sugerindo que poderiam ser usadas como impressão digital numa possível base de quimiotaxonômica.
4. Poucas diferenças ocorrem entre os espectros de C-1 dos precipitados de Fehling e aqueles formados através cetavlon a pH 8.5 na presença de borato.
5. Os líquens foram divididos em 5 grupos, baseados nos sinais principais da regiões de C-1 dos espectros, os quais representam os componentes químicos principais das estruturas explicadas acima. Estes são:

Grupo A. Os sinais de C-1 estão presentes a  $\delta$  99.5, 101.8, 102.8 e 104.6 - *Parmotrema sulcata*, *Parmotrema cetratum*, *Parmotrema araucaria*, *Cetraria islandica*, *Usnea sp.* e *Evernia prunastri*.

Grupo B. As ressonâncias similares de C-1 foram observados a  $\delta$  103.7 e 104.9 - *Cladonia alpestri*, *Cladonia confusa*, *Stereocaulon paschale* e *Pseudocyphellaria aurata*.

Grupo C. Os sinais de C-1 estão observados em  $\delta$  102.3 e 104.7 - *Cladonia amaurocraea* e *Sticta sp.*

Grupo D. Sinais comuns de C-1 foram observados a  $\delta$  101.8 e 104.7 - *Peltigera aphthosa*, *Ramalina usnea*, *Ramalina ecklonii* e *Stereocaulon ramulosum*.

Grupo E. Sinais de C-1 estavam presentes em  $\delta$  99.9, 101.1, 103.9 e 109.6, os apresentados em  $\delta$  103.9 e 109.6 sendo maiores - *Actinogyra muehlenbergii*, *Umbilicaria pustulata* e *Umbilicaria spodochroa*.

Espectros de C-1 de polissacarídeos contendo manose de *Newropogon aurantiaco-ater*, *Tornabenia intricata*, *Usnea meridionalis* e *Cladonia substellata* não podem ser ainda classificados em nenhum Grupo.

6. O rendimento relativamente alto dos polissacarídeos contendo manose indicam que são provenientes do micobionte os quais são preponderantes nesta simbiose.

7. Ocorrem semelhanças entre os espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C, região C-1, de polissacarídeos de líquens do mesmo gênero e também de gêneros diferentes.

8. Na precipitação dos polissacarídeos contendo manose de *Parmotrema araucaria*, *Usnea meridionalis*, *Usnea sp.*, e

*Evernia prunastri* ocorreram em pH 7.0 assim como a pH 8.5, na presença de borato, na reação de cetavlon.

9. Cada polissacarídeo precipitado a pH 7.0 apresentou sinais de r.n.m.-<sup>13</sup>C em campo baixo de cerca de  $\delta$  178, correspondendo ao grupo -CO<sub>2</sub>H, esperado na *E. prunastri* o qual foi relatado conter unidades de ácido galacturônico.

10. No entanto, os polissacarídeos ácidos contém unidades terminais não redutoras e 3-O-substituídas de GlcAp.

11. A *Tornabentia intricata* apresenta uma glucomanana com uma razão molar de 93:7 de Man:Glc, e consiste de 2 componentes com peso molecular de cerca de  $0.85 \times 10^5$  e  $1.1 \times 10^5$  e seus espectros de r.n.m.-<sup>13</sup>C foram idênticos. A cadeia principal apresenta-se formada por unidades de  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6), com cadeias laterais principalmete de  $\alpha$ -D-Manp ligadas (1 $\rightarrow$ 2) e com pequenas quantidades de  $\alpha$ -D-Glcp, e as estruturas ramificadas de  $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -D-Manp, e possivelmente  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -D-Manp.

12. A presença de cadeias laterais contendo Glcp não permitiu a remoção completa de todas as cadeias laterais pela ação de  $\alpha$ -manosidase.

13. *T. intricata* foi o primeiro líquen encontrado que apresenta polissacarídeos contendo manose com ligações químicas as unidades de Glc. Desde então, foi caracterizado como um componente da galactoglucomanana no caso de *Sticta* sp.

14. A glucomanana de *T. intricata* é estruturalmente similar aquela da levedura *Ceratocystis brunnea*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J.K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v. 74, p. 4970-4971, 1952.
2. ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. *Methods Carbohydr. Chem.*, New York, v.5, p. 269-276, 1965.
3. AHMADJIAN, V. ; HALE, M.E. *The Lichens*. London: Academic Press, 1973.
4. ANDERSON, D.M.W.; GREENWOOD, C.T.; HIRST, E. L. Physicochemical studies on starches. Part. II. The oxidation of starches by potassium metaperiodate. *J. Chem. Soc. (Lond)*, London, p. 225-231, 1955.
5. ARTURSON, G.; GRANATH, K. Dextrans as test molecules in studies of the functional ultrastructure of biological membranes. Molecular weight distribution analysis by gel chromatography. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 37, p. 309-322, 1972.
6. BARON, M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Isolation and identification of a linear (1→3)-linked  $\beta$ -D-glucan and other carbohydrate components of the lichens *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Rausch. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 177, p. 235-239, 1988.
7. BARON, M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structural studies on a galactomannan isolated from the lichen *Stereocaulon ramulosum*. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 53, p. 1751-1758, 1989.

8. BARON, M.; IACOMINI, M.; FANTA, E.S.; GORIN, P.A.J. Galactomannan, lichenan, and isolichenan from the polysaccharide-rich lichen *Newropogon aurantiacater*. *Phytochemistry (Oxf)*, Oxford, v. 30, p. 3125-3126, 1991.
9. BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 234, p. 466-468, 1959.
10. BATHGATE, G.N. An automated gel filtration system for determining the molecular weight of polysaccharides. *J. Chromatog.*, Amsterdam, v. 47, p. 92-96, 1970.
11. BERZELIUS, J.J. Versuch uber die mischung des islndischen mooses und seine anwendung als nahrungsmittel. *J. Chem. Phys.*, New York, v. 7, p. 317-352, 1815.
12. 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, p. 1207-1215, 1969.
13. BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, Duluth, v. 54, p. 481-489, 1973.
14. CHANDA, N.B.; HIRST, E.L.; MANNERS, D.J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland moss (*Cetraria islandica*). *J. Chem. Soc. (Lond)*, London, p. 1951-1958, 1957.

15. CHEN, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, Washington, v. 28, p. 4199-4200, 1965.
16. COOKE, R. In: *The Biology of Symbiotic Fungi*. London: John Wiley & Son, 1977. p. 226-256.
17. CORRADI DA SILVA, M.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Unusual carbohydrates of the lichen *Parmotrema cetratum*. *Phytochemistry*. Aceitada a publicação.
18. CORRADI DA SILVA, M.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, p. 9-11, 1990.
19. CORRADI DA SILVA, M.L.; IACOMINI, M.; JABLONSKI, E.; GORIN, P.A.J. Carbohydrate, glycopeptide and protein components of the lichen *Sticta* sp.; effect of storage. *Phytochemistry*. Aceitada a publicação.
20. CULBERSON, C.F. Chemical guide to lichen products. In: ----- *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*. North Carolina, The University of North Carolina Press, NC, 1969.
21. CULBERSON, W.L.; CULBERSON, C.F. A phylogenetic view of chemical evolution in the lichens. *Bryologist*, Texas, v. 73, p. 1-31, 1970.
22. DAHL, E. On the use lichen chemistry in lichen systematics. *Rev. Bryol. Lichenol.*, Paris, v. 24, p. 119-134, 1952.
23. DAHL, E.; KROG, H. *Macrolichens*. Oslo: Universitetsforlaget, 1973.

24. DYER, J.R. Periodate oxidations in biochemical analysis. *Meth. Biochem. Anal.*, v. 3 p. 112-149, 1956.
25. DUARTE, J.H.; JONES, J.K.N. Some structural studies on the galactan from the albumen glands of the snail, *Strophocheilus oblongus*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 16, p. 327-335, 1971.
26. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.
27. DUDMAN, W.F.; BISHOP, C.T. Electrophoresis of dyed polysaccharides on cellulose acetate. *Can. J. Chem.*, Ottawa, v. 46, p. 3079-3084, 1968.
28. GAILLARD, D.E.B. Use of unneutralized hydrolysates in paper chromatography of sugars. *Nature (Lond)*, London, v. 171, p. 1160, 1953.
29. GALUN, M. *The Lichens of Israel*, Tel-Aviv: The Israel Academy of Science and Humanities, 1970.
30. GIBBONS, R.A. Polydispersity. *Nature (Lond)*, London, v. 200, p. 665-666, 1963.
31. GORIN, P.A.J. The position of phosphate groups in the phosphomannan of *Hansenula capsulata*, as determined by carbon-13 magnetic resonance spectroscopy. *Can. J. Chem.*, Ottawa, v. 51, p. 2105-2109, 1973.

32. GORIN, P.A.J.; BARON, M.; IACOMINI, M. Storage Products of Lichens. In: GALUN, M.(ed.) *CRC Handbook of Lichenology*. Florida: CRC Press, 1988. v. 3, p. 9-23.
33. GORIN, P.A.J.; BARRETO-BERGTER, E. The Chemistry of Polysaccharides of Fungi and Lichens. In: *Molecular Biology*. New York: Academic Press, 1983. v. 2: The Polysaccharides. p. 366-409.
34. GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.F.T. Proton magnetic resonance spectroscopy - an aid in identification and chemotaxonomy of yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.*, San Diego, v. 13, p. 25-89, 1970.
35. GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.F.T. <sup>13</sup>C magnetic resonance and structural studies on the mannose-containing polysaccharides of some *Pichia* and *Hansenula* spp. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 18, p. 1709-1715, 1972.
36. GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 128, p. 119-132, 1984.
37. GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 142, p. 253-267, 1985.
38. GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, San Diego, v. 38, p. 13-104, 1981.

39. GORIN, P.A.J. Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. *Can. J. Chem.*, Ottawa, v. 51, p. 2375-2383, 1973.
40. GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Assignment of carbon-13 signals in nuclear magnetic resonance spectra of D-galactopyrano- $\alpha$ -D-mannopyranans from yeasts. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 105, p. 283-287, 1982.
41. GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Can. J. Chem.*, Ottawa, v. 53, p. 1212-1223, 1975.
42. GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Structure of a phosphomannan, as determined by the effect of lanthanide ions on its carbon-13 magnetic resonance spectrum. *Can. J. Chem.*, Ottawa, v. 52, p. 3070-3076, 1974.
43. 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, p. 2305-2309, 1968.
44. GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.F.T. Structures of the L-rhamno-D-mannan from *Ceratocystis ulmi* and the D-gluco-D-mannan from *Ceratocystis brunnea*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 13, p. 339-349, 1970.

45. GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.F.T.; EVELEIGH, D.E. Enzymic degradation of yeast cell-wall mannans and galactomannans to polymeric fragments containing  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-linked D-mannopyranose residues. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 11, p. 387-398, 1969.
46. GORIN, P.A.J.; SPENCER, J.F.T.; MAGUS, J. Comparison of proton magnetic resonance spectra of cell wall mannans and galactomannans of selected yeasts with their chemical structures. *Can. J. Chem.*, Ottawa, v. 47, p. 3569-3576, 1969.
47. HALE, M.E. *How to Know the Lichens*. 2. ed. Washington: Smithsonian Institution; 1979.
48. HALL, L.D.; JOHNSON, L.F. Chemical studies by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy: some chemical shift dependencies of oxygenated derivatives. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, Cambridge, p. 509-510, 1969.
49. HAMILTON, J.K.; SMITH, F. Reduction of the products of periodate oxidation of carbohydrates. II. A new method for the end group assay of amylopectin. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v. 78, p. 5907-5912, 1956.
50. HAWKSWORTH, D.L.; HILL, D.J. *The lichen forming fungi*. New York: Chapman & Hall, 1984.
51. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. *J. Chem. Soc. (Lond)*, London, v. 107, p. 8-16, 1915.

52. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. *Methods Carbohydr. Chem.*, New York, v. 5 p. 357-360, 1965.
53. 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.
54. HOUGH, L.; JONES, J.K.N.; WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugar 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)*, London, p. 1702-1706, 1950.
55. HOUGH, L.; JONES, J.K.N. Chromatography on paper. *Methods Carbohydr. Chem.*, New York, v. 1, p. 21-31, 1962.
56. HUNECK, V.S.; FOLLMANN, G. On the phytochemistry and chemotaxonomy of the *Buelliaceae*. *Biochem. Physiol. Pflanz (BPP)*, Jena, v. 161, p.191-214, 1970.
57. HUOVINEN, K.; AHTI, T. Biosequential patterns for the formation of depsides, depsidones and dibenzofurans in the genus *Cladonia* (lichen-forming ascomycetes). *Ann. Bot. Fenn.*, Helsinki, v. 19, p. 225-234, 1982.

58. IACOMINI, M.; ZANIN, S.W.; FONTANA, J.D. Isolation and characterization of  $\beta$ -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 168, p. 55-56, 1987.
59. 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, p. 237-251, 1985.
60. 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, p. 1373-1380, 1981.
61. JOLY, A.B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 2: ed. São Paulo: Cia. Ed. Nacional - EDUSP, 1975. p. 100-106.
62. JONES, G.H.; BALLOU, C.E. Studies on the structure of yeast mannan. I - Purification and some properties of an  $\alpha$ -mannosidase from an *Arthrobacter* species. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 244, p. 1043-1051, 1969.
63. JONES, G.H.; BALLOU, C.E. Studies on the structure of yeast mannan. III - Modes of action of the *Arthrobacter*  $\alpha$ -mannosidase on yeast mannan. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 244, p. 1052-59, 1969.

64. JONES, J.K.N.; STOODLEY, R.J. Fractionation using copper complexes. *Methods Carbohydr. Chem.*, New York, v. 5, p. 36-38, 1965.
65. KJØLBERG, O.; KVERNHEIM, A.L. Studies on the polysaccharides. III. The structure of alkali-soluble polysaccharides in *Umbilicaria pustulata* (L.) Hoffm. and *Umbilicaria spodochoa* (Ach.) Hoffm. *Acta Chem. Scand.*, Copenhagen, v. 43, p. 280-285, 1989.
66. KUHN, R.; TRISCHMANN, M.; LOW, I. Zur permethylierung von zuckern und glikosiden. *Angew. Chem Int. Ed. Engl.*, Weinheim, v. 67, p. 32, 1955.
67. LEWIS, D.H.; SMITH, D.C. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytol.*, Cambridge, v. 66, p. 143-184, 1967.
68. LI, YU-TEH. Studies on the glycosidases in jack bean meal. I - Isolation and properties of  $\alpha$ -mannosidase. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 242, p. 5474-80, 1967.
69. LINDBERG, B.; MacPHERSON, J. Studies on the chemistry of lichens. *Acta Chem. Scand.*, Copenhagen, v. 8, p. 985-988, 1954.
70. 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, p. 591-595, 1953.

71. LINDBERG, B.; SILVANDER, B.; WACHTMEISTER, C.A. Studies on the chemistry of lichens. 19. Mannitol glycosides in *Peltigera* species. *Acta Chem. Scand.*, Copenhagen, v. 18, p. 213-216, 1964.
72. LONNGREN, J.; PILOTTI, A. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates. II. *Acta Chem. Scand.*, Copenhagen, v. 25, p. 1144-1145, 1971.
73. LOWRY, O.L.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.
74. McCUNE, B. Annual branching in the lichen *Evernia prunastri* in Oregon. *Bryologist.*, Texas, v. 93, p. 32-36, 1990.
75. MEYER, K.H.; GÜRTLER, P. Reserches sur l'amidon. XXXI. La constitution de la lichénine. *Helv. Chim. Acta*, Basel, v. 30, p. 751-761, 1947.
76. MEYER, K.H.; GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXII. L'isolichénine. *Helv. Chim. Acta*, Basel, v. 30, p. 761-765, 1947.
77. MICENO, A.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Galactomannan and isolichenan components of the carbohydrate rich lichen *Ramalina ecklonii* (Spreng) Mey. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 55, p. 1391-1392, 1991.

78. MICOVIC, V.M.; HRANISAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC, M.; MILIKOVIC-STOJANOVIC. Structural study of polysaccharides from the oak lichen *Evernia prunastri*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 10, p. 525-533, 1969.
79. MITCHELL, M.D.; ARMITAGE, J.S. Dermatitis venenata from lichens. *Arch. Environ. Health*, Washington, v. 11, p. 701-709, 1965.
80. MURTY, V.L.N.; SIDDIQUI, I.R. Toluene-p-sulphonylation of methyl 6-O-trityl- $\alpha$ -D-mannopyranoside: Synthesis of 2,4-di-O-methyl-D-mannose. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 10, p. 477-480, 1969.
81. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 153, p. 375-380, 1944.
82. NEUMULLER, G.; VASSEUR, E. The influence of pH on the periodate oxidation of carbohydrates. *Ark. Kemi.*, Stockholm, v. 5, p. 235-245, 1969.
83. NISHIKAWA, Y.; MICHISHITA, K.; AND 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, p. 1014-1019, 1973.
84. NISHIKAWA, Y.; OHKI, K.; TAKAHASHI, K.; KURONO, G.; FUKUOKA, F.; EMORI, M. Studies on the water soluble constituents of lichens of *Lasallia*, *Usnea* and *Cladonia* spp., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, v. 22, p. 2692-2702, 1974.

85. OGURA, M.; KOHAMA, T.; FUJIMOTO, M.; KUNINAKA, A.; YOSHINO, H.; SUGYAMA, H. Structure of malonogalactan: carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of malonogalactan. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 38, p. 2563-2564, 1974.
86. PARTRIDGE, S.M. Filter-paper partition chromatography of sugars. 1. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. *Biochem. J.*, London, v. 42, p. 238-250, 1948.
87. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; ROBERTS, J.G. The structure of lichenin. *J. Chem. Soc. (Lond)*, London, p. 3916-3924, 1957.
88. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; TURVEY, J.R.; MORGAN, K. The structure of isolichenin. *J. Chem. Soc. (Lond)*, London, p. 623-629, 1961.
89. PUEYO, G. Constituants glucidiques dans les lichens. III - Osides. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, Paris, v. 74, p. 343-347, 1981.
90. PUEYO, G. Constituants glucidiques dans les lichens. II - Oses. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, Paris, v. 73, p. 509-513, 1980.
91. PUEYO, G. Constituants glucidiques dans les lichens. I - Polyalcools. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, Paris, v. 73, p. 331-337.

92. 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, p. 1602-1604, 1965.
93. SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. *Methods Carbohydr. Chem.*, New York, v. 5, p. 38-44, 1965.
94. SHARKEY, A.G. Jr., FRIEDEL, R.A., LANGER, S.H. Mass spectra of trimethylsilyl derivatives. *Anal. Chem.*, Washington, v. 38, p. 770-776, 1957.
95. SLODKI, M.E. Structure of *Hansenula capsulata* NRRL Y-1842 phosphomannan. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v. 69, p. 96-102, 1963.
96. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. New York: John Wiley & Sons, 1974. p. 431-444.
97. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 160, p. 61-68, 1945.
98. SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 195, p. 19-23, 1952.
99. STODDART, R.W.; BARRET, A.J.; NORTHCOTE, D.H. Pectic polysaccharides of growing plant tissues. *Tetrahedron Suppl.*, Oxford, v. 7, p.233-240, 1966.
100. STOFFYN, P.J.; JEANLOZ, R.W. Identification of amino sugars by paper chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.*, Duluth, v. 52, p.373-379, 1954.

101. SWEeley, C.C.; BENTLEY, R.; MAKITA, M.; WELLS W.W.  
Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl  
derivates of sugar and related substances. *J. Am.  
Chem. Soc.*, Washington, v. 85, p. 2497-2507, 1963.
102. TAKAHASHI, K.; KON, T.; YOKOTA, I.; SHIBATA, S.  
Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of  
lichens. Polysaccharides of Stereocaulaceous  
lichens. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 89, p.  
166-173, 1981.
103. TAKAI, M.; UEHARA, Y.; BEISLER. Usnic acid derivatives  
as potential antineoplastic agents. *J. Med. Chem.*,  
Washington, v. 22, p. 1380-1384, 1979.
104. TEIXEIRA, A.Z.A.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J. Mannose-  
containing heteropolysaccharides of lichens: an  
unusual glucomannan from *Tornabenia intricata*.  
*Phytochemistry (Oxf)*, Oxford, v. 31, p. 3467-3470.  
1992.
105. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detect-  
ion of sugars on paper chromatograms. *Nature (Lond)*,  
London, v. 166, p. 444, 1950.
106. WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. *Methods*  
*Carbohydr. Chem.*, New York, v. 2, p. 211-215, 1963.
107. WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium  
borohydride. *Methods Carbohydr. Chem.*, New York, v.  
2, p. 65-67, 1963.

108. XAVIER, F.L.; KOLAKOWSKA, A.; VICENTE, C. Carotenoid composition of *Caloplaca regalis* (Vain.) Zahlbr. (Lichenes) and of penguin faeces at King George Island (Antarctica). *Pol. Polar Res.*, Warsaw, v. 7, p. 289-294, 1986.
109. XAVIER, F.L.; RIZZINI, C.T. *Manual de Liquenologia Brasileira*, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 1976.
110. YOKOTA, I.; SHIBATA, S.; SAITO, H. A  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 69, p. 252-258, 1979.