

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE
RMN E IV E DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA
QUIMIOTAXONOMIA DE LIQUENS**

Glaucia Braz Alcantara*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Neli Kika Honda

***bolsista FAPESP**

São Carlos - SP

2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A347at

Alcantara, Glauca Braz.

Aplicação das técnicas espectroscópicas de RMN e IV e de métodos quimiométricos na quimiotaxonomia de líquens / Glauca Braz Alcantara. -- São Carlos : UFSCar, 2007. 155 f.

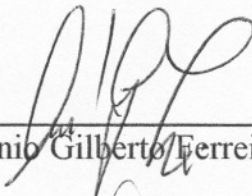
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Ressonância magnética nuclear. 2. RMN HR-MAS. 3. Espectroscopia de infravermelho. 4. Quimiometria. 5. Líquens. 6. Quimiotaxonomia. I. Título.

CDD: 543.0877 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Glaucia Braz Alcantara** realizado em 02 de fevereiro de 2007:*



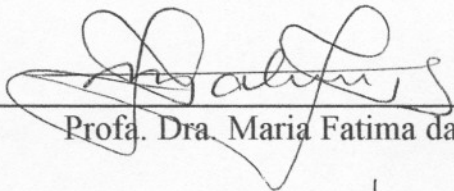
Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira



Profa. Dra. Neli Kika Honda



Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago



Profa. Dra. Maria Fatima das G. F. da Silva



Prof. Dr. Claudio Franciscô Tormena

DEDICO ESTE TRABALHO...

... aos meus pais, Dimas e Inez, por toda a estrutura psicológica que me deram, por todo o amor, apoio, companhia... por serem meu porto.

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha força... Sempre, sempre comigo.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira, pela orientação, ensinamentos transmitidos e pela “liberdade vigiada”, contribuindo muito para o meu crescimento profissional.

À Profa. Dra. Neli Kika Honda, co-orientadora e incentivadora para que a pós-graduação tornasse uma realidade... A quem, cientificamente, sempre pude contar.

À Profa. Dra. Márcia M. C. Ferreira, pelo suporte nos tratamentos quimioterápicos, e em especial, pela boa-vontade em nos socorrer com o programa Pirouette.

Aos amigos do laboratório de RMN: Angela, Cris, Elisangela, Katyuscya, Leila, Luciana, Luciano, Lucinéia, Maiara, Paulo, Valmir, Véio, Vladimir e em especial ao Andersson, pela amizade e colaboração nas inúmeras etapas de aprendizagem.

Aos meus tesouros Vó e Vô, pela grande doçura do olhar dela... pelo espírito de cientista do olhar dele... pelo carinho, muito carinho...

Aos meus tesourinhos, meus irmãos Kênia e Helder, por todo o incentivo e admiração.

Ao Neto que, justamente devido à pós-graduação, entrou na minha vida trazendo mais confiança e amor... fez-se presente apesar da distância.

À Dri, Marcela e em especial a Kari, amigas sul-matogrossenses que fizeram com que a distância da minha família não fosse mais fortemente sentida... E pelos sorrisos, conselhos, escutas.

A todos os professores da minha vida acadêmica, transmissores do conhecimento, desde àqueles da fase escolar inicial, aos da graduação (UFMS) e da pós (UFSCar), em especial àqueles que não se limitaram apenas em serem “professores”...

Às amizades construídas na caminhada “química” e suas mais variadas contribuições... aos amigos da graduação, em especial ao Joãozinho, Magno e Marga; aos amigos do LP2 (UFMS), do LAPE e demais laboratórios da UFSCar.

A todos aqueles que se alegraram com as minhas conquistas e colaboraram, por meio das mais diversas formas, para a realização desse trabalho.

Aos órgãos financiadores: FAPESP, CNPq e Capes.

LISTA DE ABREVIATURAS

CPMG	<i>Carr-Purcell-Meibom-Gill sequence</i>
DMSO-d ₆	Dimetil-sulfóxido deuterado
<i>d</i>	dubleto
<i>ddd</i>	duplo duplo dubleto
<i>dt</i>	duplo tripleto
DOSY	<i>Diffusion Ordered SpectroscopY</i>
D ₂ O	óxido de deutério (água deuterada)
<i>gHSQC</i>	<i>gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>gHMBC</i>	<i>gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<i>gCOSY</i>	<i>gradient COrrrelation SpectroscopY</i>
<i>gNOESY</i>	<i>gradient Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY</i>
HCA	<i>Hierarchical Clusters Analysis</i>
HR-MAS	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>
KNN	<i>K-Nearest Neighbor</i>
<i>lb</i>	<i>line broadening</i> ; parâmetro empregado no ajuste das funções exponencial e Lorentziana-Gaussiana
<i>m</i>	multipleteo
PCA	<i>Principal Components Analysis</i>
<i>q</i>	quadrupleto
<i>quint</i>	quintupleto
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze
<i>s</i>	singleto
<i>sext</i>	sextupleto
<i>sl</i>	singleto largo
SIMCA	<i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
<i>t</i>	tripleto
TMS	tetrametilsilano
TMSP-d ₄	2,2,3,3-d ₄ 3-(trimetilsilil)propionato de sódio

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: Famílias, gêneros e espécimes das amostras de líquens analisadas.....	25
TABELA 4.1: Classificação de amostras desconhecidas através da análise de RMN HR-MAS de ¹ H.....	53
TABELA 4.2: Atribuições dos sinais de RMN da substância atranorina (1) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	57
FIGURA 4.3: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido divaricático (2) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	58
TABELA 4.4: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido colensóico (3) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	69
TABELA 4.5: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido norcolensóico (4) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	70
TABELA 4.6: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido caperático (5) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	76
TABELA 4.7: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido criptoclorofoico (6) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	78
TABELA 4.8: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido α-alectorônico (7) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	85
TABELA 4.9: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido salazínico (8) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	94
TABELA 4.10: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido girofórico (9) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	94
TABELA 4.11: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido úsnico (10) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	96
TABELA 4.12: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido protocetrário (11) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	103

TABELA 4.13: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido protoliquesterínico (12) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	109
TABELA 4.14: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido lecanórico (13) (DMSO-d ₆ , DRX400 Bruker 9,4 T).....	117
TABELA 4.15: Classificação de amostras desconhecidas através da análise de RMN em solução.....	128
TABELA 4.16: Classificação de amostras desconhecidas através da análise de IV.....	139

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1:	Exemplos de líquens com diferentes estruturas morfológicas: crostosos (a), foliosos (b) e fruticosos (c).....	3
FIGURA 1.2:	Esquema ilustrativo do giro do rotor no ângulo mágico (sonda HR-MAS).....	10
FIGURA 1.3:	Espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos com e sem giro no ângulo mágico, para comparação do ganho de resolução.....	11
FIGURA 1.4:	Seqüência de pulsos CPMG empregada na análise de RMN HR-MAS.....	12
FIGURA 1.5:	Seqüência de pulsos ZGCPPR empregada na análise de RMN em solução.....	13
FIGURA 1.6:	Esquema ilustrativo da Quimiometria como área interdisciplinar entre a química, matemática e estatística (FERREIRA, 2006).....	14
FIGURA 1.7:	Esquema ilustrativo do tratamento quimiométrico empregado no presente estudo.....	15
FIGURA 1.8:	Aplicação de derivadas sobre uma curva A : primeira derivada (B) e segunda derivada (C).	18
FIGURA 1.9:	Descrição de uma banana em perspectivas baseadas três componentes principais (PC1, PC2 e PC3).....	19
FIGURA 3.1:	Acessórios empregados para a sonda HR-MAS.....	27
FIGURA 3.2:	Esquema de preparo da amostra para a técnica HR-MAS...	27
FIGURA 4.1:	Cromatografia em camada delgada dos extratos de líquens e dos padrões das substâncias comumente encontradas (1: Pmes , 2: Pdel , 3: Ptinc , 4: Pcor , 5: Pbrev , 6: Pdil , 7: Hypot , 8: Canop , 9: Dirin , 10: Hspec , 11: Pyx , A: atranorina, B: ácido lecanórico, C: ácido protocetrário, D: ácido úsnico, E: ácido salazínico, F: ácido	

	fumarprotocetrário, G: atranorina + ácido caperático, H: atranorina + ácido divaricático, I: atranorina + ácidos caperático e estífico).....	33
FIGURA 4.2:	Comparação entre espectros de RMN HR-MAS de ^1H (DRX400 Bruker 9,4 T) obtidos com e sem a seqüência de pulsos CPMG, ambos com pré-saturação do sinal do HOD.....	35
FIGURA 4.3:	Esquema ilustrativo de um espectro de RMN HR-MAS de ^1H (DRX400 Bruker 9,4 T) de uma amostra de líquen, com sinais somente na região de 3,1 a 4,0 ppm.....	36
FIGURA 4.4:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Dirin (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	36
FIGURA 4.5:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Hspec (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	37
FIGURA 4.6:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Pyx (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	37
FIGURA 4.7:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Hypot (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	38
FIGURA 4.8:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Canop (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	38
FIGURA 4.9:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Pbrev (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	39
FIGURA 4.10:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Pcor (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	39
FIGURA 4.11:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Pdel (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	40
FIGURA 4.12:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Pdil (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	40
FIGURA 4.13:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Pmes (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	41

FIGURA 4.14:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra Ptinc (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.....	41
FIGURA 4.15:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC na sonda HR-MAS (DRX400 Bruker 9,4 T), de uma amostra de líquen intacto.....	42
FIGURA 4.16:	Espectro de RMN HR-MAS de ^1H de uma amostra de líquen com atribuições dos polióis arabinitol e manitol.....	43
FIGURA 4.17:	Visualização de todos os espectros de RMN HR-MAS empregados na análise quimiométrica.....	44
FIGURA 4.18:	Gráfico de HCA de todas as amostras de líquens (análise de RMN HR-MAS) com índice de similaridade 0,217.....	45
FIGURA 4.19:	Gráfico de <i>scores</i> de todas as amostras de líquens estudadas – análise de RMN HR-MAS (PC1 x PC2, 21,7 e 12,8%, respectivamente).....	46
FIGURA 4.20:	Curva de variância <i>versus</i> componentes principais, extraída da análise de PCA de todas as amostras de líquens estudadas – análise de RMN HR-MAS.....	47
FIGURA 4.21:	Espectros de RMN de ^1H , (a) HR-MAS e (b) em solução, após a aplicação da primeira derivada.....	48
FIGURA 4.22:	Gráfico de <i>scores</i> das amostras de líquens da família Physciaceae – análise de RMN HR-MAS de ^1H (PC1 x PC2, 35,8 e 18,6%, respectivamente).....	49
FIGURA 4.23:	Gráfico de <i>scores</i> das amostras de líquens da família Parmeliaceae – análise de RMN HR-MAS de ^1H (PC1 x PC2, 24,9 e 13,7%, respectivamente).....	50
FIGURA 4.24:	Gráfico de <i>scores</i> das amostras de líquens do gênero <i>Parmotrema</i> – análise de RMN HR-MAS de ^1H (PC1 x PC2, 27,7 e 14,3%, respectivamente).....	51
FIGURA 4.25:	Gráfico mostrando o poder discriminante dos sinais de RMN HR-MAS de ^1H – material intacto, com destaque às	

	regiões mais relevantes na análise quimiométrica: a) δ 3,20-3,30; b) δ 3,65-3,70; c) δ 3,85-4,00.....	52
FIGURA 4.26:	Gráfico mostrando os erros do modelo de predição de amostras intactas (RMN HR-MAS de ^1H) em função do número de vizinhos empregados na análise por KNN.....	53
FIGURA 4.27:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Dirin (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	56
FIGURA 4.28:	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra Dirin com atribuições do ácido divaricático (2) em destaque – análise de RMN em solução.....	59
FIGURA 4.29:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Dirin – ampliação 1.....	60
FIGURA 4.30:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Dirin – ampliação 2.....	60
FIGURA 4.31:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Dirin – ampliação 3.....	61
FIGURA 4.32:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Dirin – ampliação 1.....	61
FIGURA 4.33:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Dirin – ampliação 2.....	62
FIGURA 4.34:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Dirin – ampliação 3.....	62
FIGURA 4.35:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Hspec (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	63

FIGURA 4.36:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Hspec	64
FIGURA 4.37:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Hspec	64
FIGURA 4.38:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Pyx (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	65
FIGURA 4.39:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC, da amostra Pyx	65
FIGURA 4.40:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pyx	66
FIGURA 4.41:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Hypot (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	68
FIGURA 4.42:	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra Hypot com atribuições dos ácidos colensóico (3) e norcolensóico (4) em destaque – análise de RMN em solução.....	71
FIGURA 4.43:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Hypot – ampliação 1.....	72
FIGURA 4.44:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Hypot – ampliação 2.....	72
FIGURA 4.45:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Hypot – ampliação 1.....	73
FIGURA 4.46:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Hypot – ampliação 2.....	73

FIGURA 4.47:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Hypot – ampliação 3.....	74
FIGURA 4.48:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Hypot – ampliação 4.....	74
Espectro 4.49:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Canop (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	75
FIGURA 4.50:	Espectro <i>g</i> NOESY (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra Canop com irradiações em δ 2,59 (a) e δ 2,97 (b) – análise de RMN em solução.....	77
FIGURA 4.51:	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra Canop com atribuições dos ácidos caperático (5) e criptoclorofoico (6) em destaque – análise de RMN em solução.....	79
FIGURA 4.52:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Canop – ampliação 1.....	80
FIGURA 4.53:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC, da amostra Canop – ampliação 2.....	80
FIGURA 4.54:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Canop – ampliação 3.....	81
FIGURA 4.55:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Canop – ampliação 1.....	81
FIGURA 4.56:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Canop – ampliação 2.....	82

FIGURA 4.57:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Canop – ampliação 3.....	82
FIGURA 4.58:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Canop – ampliação 4.....	83
FIGURA 4.59:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Pbrev (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	84
FIGURA 4.60:	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra Pbrev com atribuições do ácido α -alectorrônico (7) em destaque – análise de RMN em solução.....	87
FIGURA 4.61:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC, da amostra Pbrev – ampliação 1.....	88
FIGURA 4.62:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC, da amostra Pbrev – ampliação 2.....	88
FIGURA 4.63:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC, da amostra Pbrev – ampliação 1.....	89
FIGURA 4.64:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC, da amostra Pbrev – ampliação 2.....	89
FIGURA 4.65:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC, da amostra Pbrev – ampliação 3.....	90
FIGURA 4.66:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Pcor (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	91
FIGURA 4.67:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pcor	91

FIGURA 4.68:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC, da amostra Pcor	92
FIGURA 4.69:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Pdel (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	93
FIGURA 4.70:	Espectro de RMN de ^{13}C da amostra Pdel (material em solução) com atribuições do ácido girofórico (9) em destaque.....	96
FIGURA 4.71:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdel – ampliação 1.....	97
FIGURA 4.72:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdel – ampliação 2.....	98
FIGURA 4.73:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdel – ampliação 3.....	98
FIGURA 4.74:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdel – ampliação 1.....	99
FIGURA 4.75:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdel – ampliação 2.....	99
FIGURA 4.76:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdel – ampliação 3.....	100
FIGURA 4.77:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdel – ampliação 4.....	100
FIGURA 4.78:	Espectro de RMN de DOSY (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra Pdel , a qual contém uma mistura dos ácidos girofórico (9), salazínico (8) e úsnico (10).....	102

FIGURA 4.79:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Pdil (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	103
FIGURA 4.80:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdil – ampliação 1.....	104
FIGURA 4.81:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdil – ampliação 2.....	105
FIGURA 4.82:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdil – ampliação 3.....	105
FIGURA 4.83:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdil – ampliação 1.....	106
FIGURA 4.84:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdil – ampliação 2.....	106
FIGURA 4.85:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdil – ampliação 3.....	107
FIGURA 4.86:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Pdil – ampliação 4.....	107
FIGURA 4.87:	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra Pdil com atribuições do ácido protocetrárico (11) em destaque – análise de RMN em solução.....	108
FIGURA 4.88:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Pmes (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	109
FIGURA 4.89:	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra Pmes com atribuições do ácido	

	protoliqueterínico (12) em destaque – análise de RMN em solução.....	110
FIGURA 4.90:	Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gCOSY, da amostra Pmes	111
FIGURA 4.91:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC, da amostra Pmes – ampliação 1.....	111
FIGURA 4.92:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC, da amostra Pmes – ampliação 2.....	112
FIGURA 4.93:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra Pmes – ampliação 1.....	112
FIGURA 4.94:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra Pmes – ampliação 2.....	113
FIGURA 4.95:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra Pmes – ampliação 3.....	113
FIGURA 4.96:	Sinal de RMN de ^1H do H-3 do ácido protoliqueterínico (12), isolado da amostra Pmes , obtido experimentalmente.....	114
FIGURA 4.97:	Sinal de RMN de ^1H do H-3 do ácido protoliqueterínico (12), isolado da amostra Pmes , calculado através do programa de simulação FOMSC3.....	115
FIGURA 4.98:	Sinal de RMN de ^1H do H-4 do ácido protoliqueterínico (12), isolado da amostra Pmes , obtido experimentalmente.....	115
FIGURA 4.99:	Sinal de RMN de ^1H do H-4 do ácido protoliqueterínico (12), isolado da amostra Pmes , calculado através do programa de simulação FOMSC3.....	116

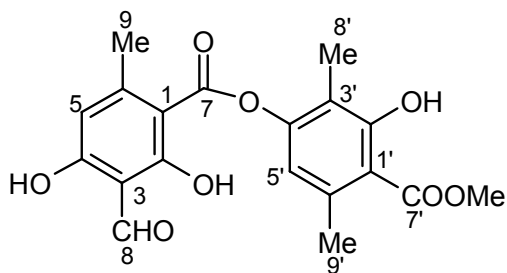
FIGURA 4.100:	Espectro de RMN de ^1H da amostra Ptinc (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.....	117
FIGURA 4.101:	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra Ptinc com atribuições do ácido lecanórico (13) em destaque – análise de RMN em solução.....	118
FIGURA 4.102:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Ptinc – ampliação 1.....	119
FIGURA 4.103:	Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Ptinc – ampliação 2.....	119
FIGURA 4.104:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Ptinc – ampliação 1.....	120
FIGURA 4.105:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Ptinc – ampliação 2.....	120
FIGURA 4.106:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Ptinc – ampliação 3.....	121
FIGURA 4.107:	Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra Ptinc – ampliação 4.....	121
FIGURA 4.108:	Visualização de todos os espectros de RMN dos extratos (análise de RMN em solução) empregados na análise quimiométrica.....	122
FIGURA 4.109:	Gráfico de scores de todas as amostras de líquens – análise RMN em solução (PC1 x PC2, 10,7 e 8,7%, respectivamente) – família Physciaceae destacada nas elipses em vermelho.....	123

FIGURA 4.110:	Gráfico de <i>scores</i> das amostras de líquens da família Physciaceae – análise de RMN em solução (PC1 x PC2, 36,1 e 33,2%, respectivamente).....	124
FIGURA 4.111:	Gráfico de <i>scores</i> das amostras de líquens da família Parmeliaceae – análise de RMN em solução (PC1 x PC2, 24,1 e 11,8%, respectivamente).....	125
FIGURA 4.112:	Gráfico de <i>scores</i> das amostras de líquens do gênero <i>Parmotrema</i> – análise de RMN em solução (PC1 x PC4, 28,4 e 14,5%, respectivamente).....	126
FIGURA 4.113:	Gráfico mostrando o poder discriminante dos sinais de RMN das amostras em solução, com destaque às regiões mais relevantes na análise quimiométrica: a) metoxilas (δ 3,6-4,0); b) hidrogênios metilênicos ($\sim\delta$ 4,8); c) aromáticos (δ 6,0-7,5) e d) hidrogênios carbinólicos, aldeídicos e carboxílicos quelados (δ 10,0-10,8).....	127
FIGURA 4.114:	Gráfico mostrando os erros do modelo de predição de amostras em solução (RMN em solução) em função do número de vizinhos empregados na análise por KNN.....	128
FIGURA 4.115:	Espectros de infravermelho das amostras de líquens, região de 4000-400 cm^{-1} : a) Dirin ; b) Hspec ; c) Pyx ; d) Hypot ; e) Canop ; f) Pbrev ; g) Pcor e h) Pdel	131
FIGURA 4.116:	Espectros de infravermelho das amostras de líquens, região de 4000-400 cm^{-1} : i) Pdil ; j) Pmes ; k) Ptinc	132
FIGURA 4.117:	Visualização de todos os espectros na região do IV que, após a exclusão da região sombreada (A), foram empregados na análise quimiométrica (B).....	133
FIGURA 4.118:	Gráfico de <i>scores</i> de todas as amostras de líquens analisadas por IV (PC1 x PC2, 23,9 e 16,8%, respectivamente) – família Physciaceae destacada nas elipses em vermelho.....	134

FIGURA 4.119:	Gráfico de <i>scores</i> das amostras de líquens da família <i>Physciaceae</i> analisadas por IV (PC1 x PC2, 56,9 e 28,3%, respectivamente).....	135
FIGURA 4.120:	Gráfico de <i>scores</i> das amostras de líquens da família <i>Parmeliaceae</i> analisadas por IV (PC1 x PC3, 28,8 e 17,1%, respectivamente).....	136
FIGURA 4.121:	Gráfico de <i>scores</i> das amostras de líquens do gênero <i>Parmotrema</i> analisadas por IV (PC1 x PC2, 31,9 e 24,6%, respectivamente).....	137
FIGURA 4.122:	Gráfico mostrando o poder discriminante das absorções de IV, com destaque às regiões mais relevantes na análise quimiométrica: a) 1300-1100 cm^{-1} e b) $\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$	138
FIGURA 4.123:	Gráfico mostrando os erros do modelo de predição de amostras intactas (análise por IV) em função do número de vizinhos empregados na análise por KNN.....	139
FIGURA 4.124	Gráfico de <i>scores</i> (A) e <i>loadings</i> (B) de todas as amostras de líquens avaliadas com as técnicas de RMN e IV, comparativamente (PC1 x PC2, 21,6 e 18,1%, respectivamente).....	142
FIGURA 4.125:	Gráfico de <i>scores</i> (A) e <i>loadings</i> (B) das amostras da família <i>Physciaceae</i> avaliadas com as técnicas de RMN e IV, comparativamente (PC1 x PC2, 64,9 e 31,0%, respectivamente).....	143
FIGURA 4.126:	Gráfico de <i>scores</i> (A) e <i>loadings</i> (B) das amostras da família <i>Parmeliaceae</i> avaliadas com as técnicas de RMN e IV, comparativamente (PC1 x PC3, 25,8 e 17,4%, respectivamente).....	144
FIGURA 4.127:	Gráfico de <i>scores</i> (A) e <i>loadings</i> (B) das amostras do gênero <i>Parmotrema</i> avaliadas com as técnicas de RMN e IV, comparativamente (PC1 x PC2, 31,3 e 29,9%, respectivamente).....	145

LISTA DE SUBSTÂNCIAS

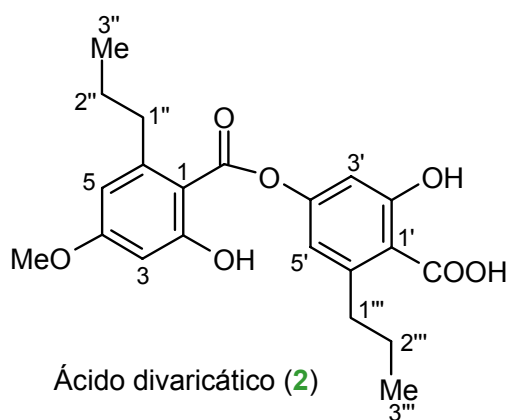
Substância 1:
Atranorina



56

Atranorina (1)

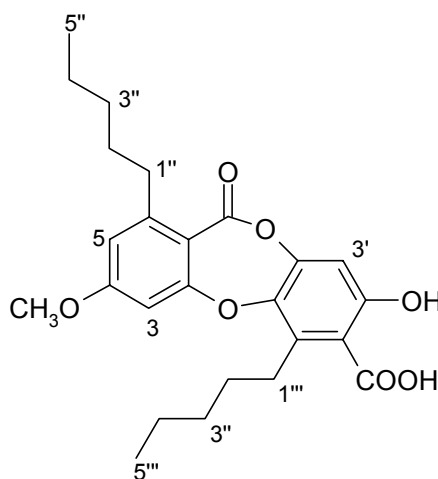
Substância 2:
Ácido divaricático



56

Ácido divaricático (2)

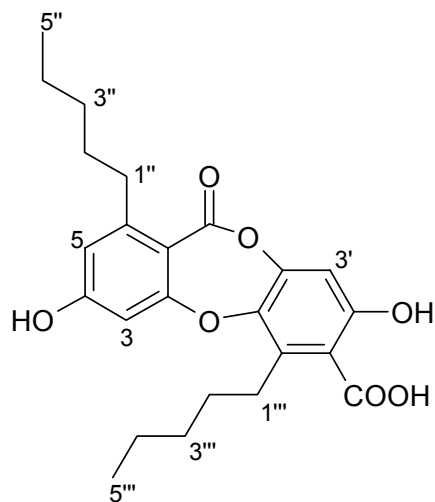
Substância 3:
Ácido colensóico



67

Ácido colensóico (3)

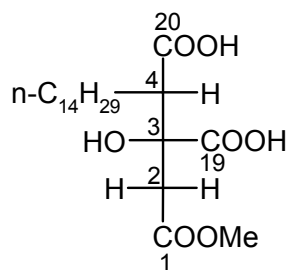
Substância 4:
Ácido norcolensóico



67

Ácido norcolensóico (4)

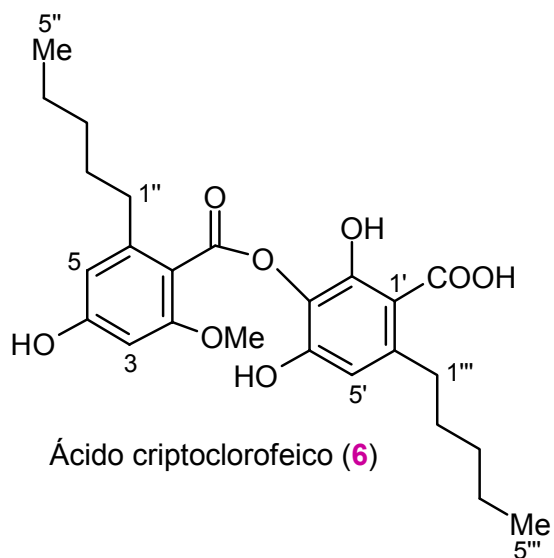
Substância 5:
Ácido caperático



75

Ácido caperático (5)

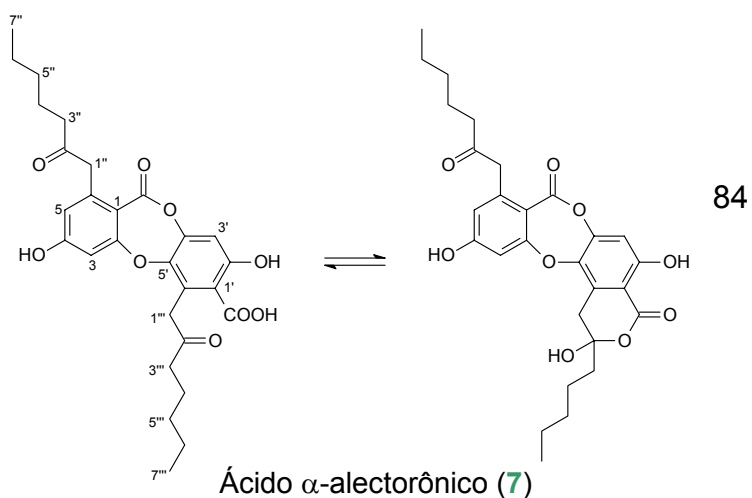
Substância 6:
Ácido criptocloroфеico



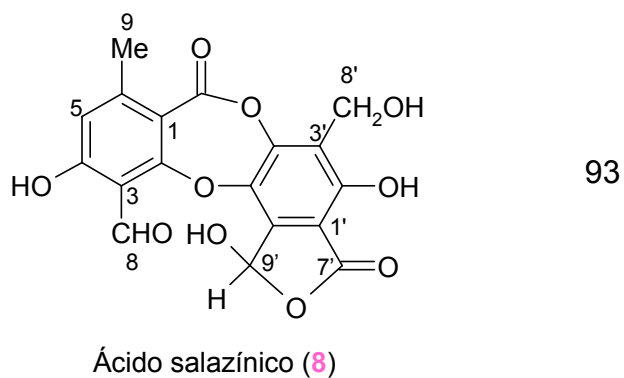
75

Ácido criptocloroфеico (6)

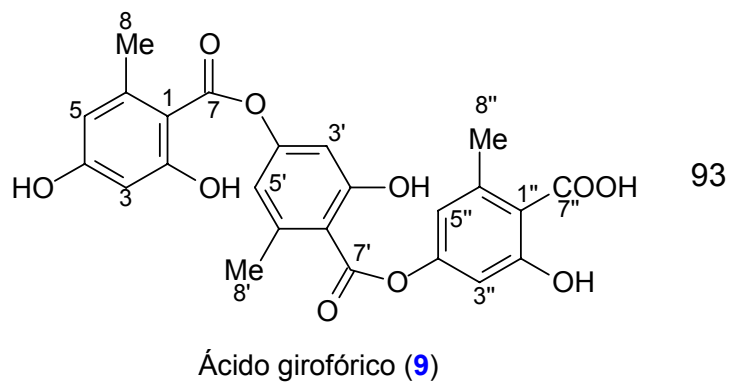
Substância 7:
Ácido α -alectorônico



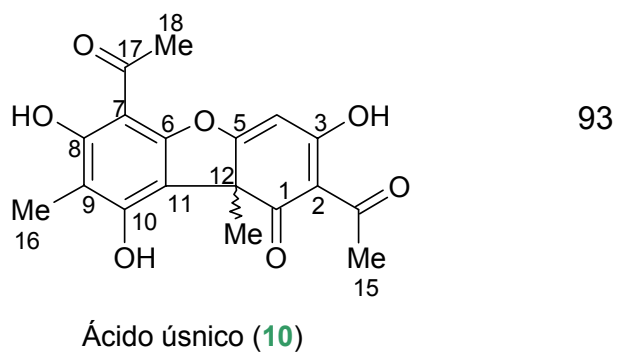
Substância 8:
Ácido salazínico



Substância 9:
Ácido girofórico

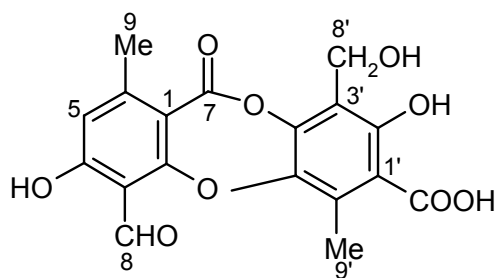


Substância 10:
Ácido úsnico



Substância 11:

Ácido protocetrário

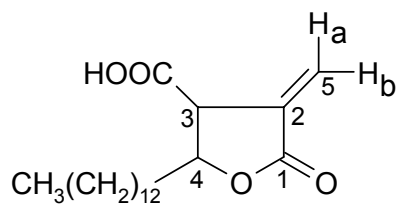


103

Ácido protocetrário (**11**)

Substância 12:

Ácido protoliquesterínico

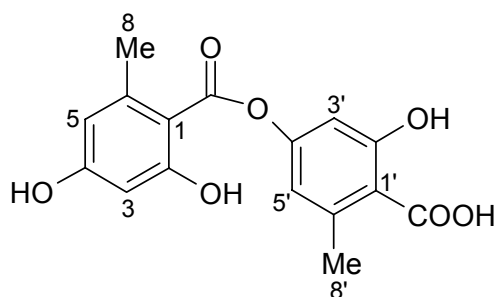


109

Ácido protoliquesterínico (**12**)

Substância 13:

Ácido lecanórico



116

Ácido lecanórico (**13**)

RESUMO

APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE RMN E IV E DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA QUIMIOTAXONOMIA DE LIQUENS. O presente trabalho descreve a análise quimiotaxonômica de líquens, a partir da utilização das técnicas espectroscópicas de RMN, HR-MAS e em solução, e IV aliadas aos métodos quimiométricos. As análises foram efetuadas empregando-se um conjunto de onze espécies de líquens, distribuídas em duas famílias e seis gêneros. Os espectros de RMN HR-MAS, obtidos a partir do material vegetal intacto, apresentou, juntamente com a quimiometria, a discriminação entre as famílias, gêneros e espécies e ainda um percentual de classificação muito satisfatório (70,8%). As substâncias analisadas compreendem a classe dos carboidratos de baixa massa molecular, os polióis. As análises de RMN em solução, correspondentes aos extratos brutos, apresentaram a discriminação de gêneros e espécies e a classificação foi excelente (88,9%). Nessa análise, a qual os metabólitos secundários de líquens são avaliados, foi realizada a identificação em mistura de algumas substâncias. A análise por espectroscopia na região do infravermelho (IV), obtidas também a partir do material intacto foi destacada pelo seu excelente poder de classificação de amostras (100% de predições corretas), com discriminação entre os gêneros e espécies. A aplicação comparativa dessas técnicas espectroscópicas corrobora os resultados obtidos separadamente, e aponta para uma grande potencialidade do IV em análises quimiotaxonômicas de líquens, dado a sua rapidez e baixo custo, embora as técnicas de RMN sejam muito atrativas quando se deseja uma análise minuciosa do perfil espectral.

ABSTRACT

APPLICATION OF THE NMR AND IR SPECTROSCOPIC TECHNIQUES AND CHEMOMETRICS METHODS IN LICHENS CHEMOTAXONOMY. This present work describes the chemotaxonomic analysis of lichens through the utilization of NMR spectroscopic techniques, HR-MAS and NMR in solution, and IR allied with chemometrics methods. This analysis were carried out with eleven species set of lichens divided in two families and six genera. The HR-MAS NMR spectra together the chemometric, obtained from intact vegetal material, present the discrimination between the families, genera and species and the classification percentage was much satisfactory (70,8%). The analyzed substances include the carbohydrates class of low molecular-weight, the polyols. The NMR in solution analysis, corresponding to crude extracts, present the discrimination between genera and species and the classification was excellent (88,9%). In this analysis, where the secondary metabolites of lichens are evaluated, was realized the identification of some substances in mixture. The analysis by infrared spectroscopy (IR), also obtained from intact material, was detached by the excellent power of samples classification (100% of correct prediction), with discrimination between genera and species. The comparative application of this techniques confirm the results obtained separately, and point for a great potentiality of IR in chemotaxonomic analysis of lichens, due its quickness and low price, however the NMR techniques are more attractive when desire the circumstantial analysis of spectral profile.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Os Líquens.....	2
1.2 – A técnica HR-MAS.....	7
1.2.1 – Princípios da técnica HR-MAS.....	7
1.2.2 – Efeitos relacionados à RMN de amostras heterogêneas.....	8
1.2.2.1 – Interação Dipolar.....	8
1.2.2.2 – Deslocamento Químico Anisotrópico.....	9
1.2.2.3 – Diferença de Susceptibilidade Magnética.....	9
1.2.3 – O Giro no Ângulo Mágico.....	9
1.2.4 – As seqüências de pulsos empregadas nas análises de RMN.....	11
1.2.4.1 – Seqüência CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill).....	11
1.2.4.1 – Seqüência ZGCPPR (composite pulse presaturation).....	12
1.3 – Quimiometria e a RMN.....	13
1.3.1 – Análise Exploratória de Dados.....	16
1.3.1.1 – PCA - Análise de Componentes Principais.....	18
1.3.1.2 – HCA - Análise de Hierárquica de <i>Clusters</i>	19
1.3.2 – Classificação de amostras.....	20
2 – OBJETIVOS.....	22
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 – Preparo das amostras.....	25
3.1.1 – Preparo das amostras para a sonda HR-MAS.....	26
3.1.2 – Preparo das amostras para a sonda de líquidos.....	27
3.1.3 – Preparo das amostras para a análise de IV.....	28
3.2 – Obtenção das medidas espectroscópicas de RMN.....	28
3.2.1 – Sonda HR-MAS.....	29
3.2.2 – Sonda de líquidos.....	29
3.3 – Obtenção das medidas espectroscópicas de IV.....	31
3.4 – Tratamento Quimiométrico.....	31

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 – Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	33
4.2 – Análise das Amostras Intactas por Espectroscopia de RMN HR-MAS...	34
4.2.1 – Os espectros de RMN HR-MAS.....	34
4.2.2 – Análise quimiométrica dos dados de RMN HR-MAS.....	44
4.2.2.1 – Análise exploratória.....	44
4.2.2.2 – Classificação de amostras desconhecidas.....	52
4.3 – Análise dos Extratos Brutos por Espectroscopia de RMN em solução...	55
4.3.1 – Os espectros de RMN em solução e a elucidação dos metabólitos em mistura.....	55
4.3.1.1 – Líquen <i>Dirinaria aspera</i> (Dirin)	56
4.3.1.2 – Líquen <i>Heterodermia speciosa</i> (Hspec).....	63
4.3.1.3 – Líquen <i>Pyxine daedaleae</i> (Pyx).....	65
4.3.1.4 – Líquen <i>Hypotrachyna dactylifera</i> (Hypot).....	67
4.3.1.5 – Líquen <i>Canoparmelia cryptochlorophaea</i> (Canop).....	75
4.3.1.6 – Líquen <i>Parmotrema breviciliatum</i> (Pbrev).....	83
4.3.1.7 – Líquen <i>Parmotrema cornuta</i> (Pcor).....	90
4.3.1.8 – Líquen <i>Parmotrema delicatulum</i> (Pdel).....	92
4.3.1.9 – Líquen <i>Parmotrema dilatatum</i> (Pdil).....	102
4.3.1.10 – Líquen <i>Parmotrema mesotropum</i> (Pmes).....	108
4.3.1.11 – Líquen <i>Parmotrema tinctorum</i> (Ptinc).....	116
4.3.2 – Análise quimiométrica dos dados de RMN de amostras em solução.....	122
4.3.2.1 – Análise exploratória.....	122
4.3.2.2 – Classificação de amostras desconhecidas.....	127
4.4 – Análise dos Extratos Brutos por Espectroscopia de Infravermelho (IV)..	130
4.4.1 – Os espectros de IV.....	130
4.4.2 – Análise quimiométrica dos dados de IV.....	132
4.4.2.1 – Análise exploratória.....	133
4.4.2.2 – Classificação de amostras desconhecidas.....	138
4.5 – Análise quimiométrica comparativa entre as técnicas espectroscópicas de RMN e IV.....	141
4.5.1 – Todas as amostras de líquens (Famílias Physciaceae e Parmeliaceae).....	141

4.5.2 – Família Physciaceae.....	142
4.5.3 – Família Parmeliaceae.....	144
4.5.4 – Gênero <i>Parmotrema</i>	145
5 – CONCLUSÃO.....	146
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

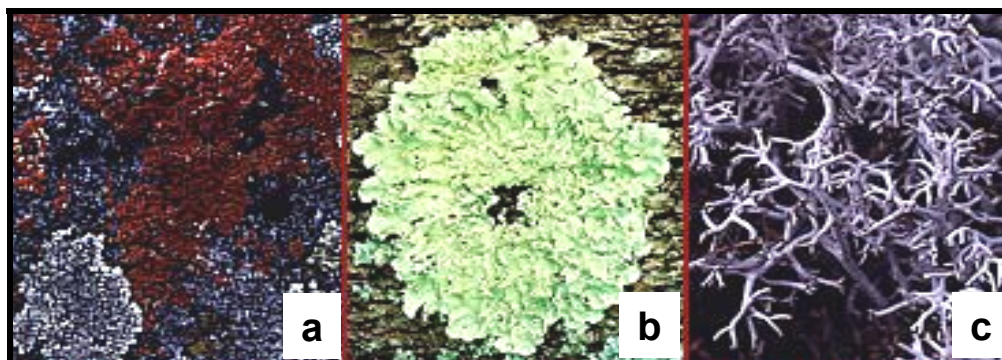
1.1 - Os Líquens

Líquens são associações simbióticas compostas por um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobionte), os quais formam uma íntima união biológica (NASH III, 1996). O fungo, responsável pela organização do talo liquênico, constitui cerca de 90-95% em massa do líquen e seus tecidos envolvem completamente a alga. O fungo beneficia-se dessa associação, pois a alga – responsável pela fotossíntese – satisfaz a sua necessidade de carboidratos para a respiração e crescimento; já para a alga, a principal vantagem está na hidratação que a liquenização lhe proporciona, evitando a sua dessecação, além também da proteção contra altas luminosidades (HONDA e VILEGAS, 1998).

Os líquens são encontrados nos mais variados habitats e micro-habitats, dependendo da disponibilidade de fatores físicos e climáticos que proporcionem as condições necessárias para seu desenvolvimento. A sua adaptabilidade às condições extremas, principalmente de temperatura, é uma propriedade interessante dos organismos liquênicos tanto que pode ser observada a sua presença na Antártida e nos desertos (KAPPEN, 1988; LINDSAY, 1978), condições em que o micobionte e o fotobionte, na forma de organismos livres, não existiriam ou seriam muito raros.

Quanto a sua forma de crescimento, os líquens podem ser classificados, como ilustrado na figura 1.1, em (HALE JR, 1983):

- a) Crostosos: possuem aspecto semelhante à crosta e encontram-se muito aderidos ao substrato;
- b) Foliosos: possuem aspecto semelhante a uma folha (estrutura laminar) e costumam ser muito estendidos; e
- c) Fruticosos: possuem talo ramificado, assemelhando-se a um arbusto.



Fonte: <http://www.ucmp.berkeley.edu/fungi/lichens/lichenmm.html>

FIGURA 1.1: Exemplos de líquens com diferentes estruturas morfológicas: crostosos (a), foliosos (b) e fruticosos (c).

As substâncias químicas produzidas por líquens são agrupadas em metabólitos primários - compreendendo os compostos que estão diretamente ligados à parede celular e no protoplasma, sintetizados pelo fungo ou pela alga - e metabólitos secundários, encontrados na medula ou no córtex e podendo aparecer como cristais na superfície das hifas. Essas substâncias são: ácidos alifáticos, meta e para-depsídeos, depsídonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e ácido pulvínico (ELIX, 1996), entre outros. Muitos desses compostos são pigmentos corticais: ácido úsnico, antraquinonas, xantonas, derivados do ácido pulvínico e outros.

Os compostos líquênicos são importantes do ponto de vista farmacológico. A ação antibiótica vem sendo estudada há décadas, tendo apresentado atividade alguns depsídeos, depsídonas e ácido úsnico. Substâncias líquênicas como (-)ácido úsnico, ácido protoliqueterínico, glucanas de líquens, liquenina e derivados têm mostrado atividades antitumoral e antimutagênica. Atividades antioxidante, alelopática, contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), dentre outras, também foram observadas nesses organismos simbióticos (HUNECK e YOSHIMURA, 1996). Comercialmente, a importância dos líquens é destacada através de seu uso na indústria de perfumes, onde, no sul da França, Marrocos e Iugoslávia chegam a ser colhidas cerca de 8.000 a 10.000 toneladas/ano (HONDA e VILEGAS, 1998).

Durante as últimas décadas, as análises de líquens tem tido uma acentuada importância no monitoramento da poluição ambiental. Graças à sua capacidade em acumular sais minerais, incluindo metais pesados e em níveis superiores às suas necessidades, estudos tem mostrado que estes podem ser usados como bioindicadores de poluição (BOONPRAGOB et al., 1989; SAIKI et al.,

2001). As vantagens do uso de líquens, em relação às medidas diretas dos poluentes em diversos materiais do ambiente, tais como água e ar, estão na sua facilidade de amostragem e distribuição geográfica. Sua tendência em concentrar contaminantes do ar permite comparações da concentração de metais em diversas regiões, permitindo também a construção de mapas de poluição de uma extensa área. Outro fator responsável pela utilização dos líquens como bioindicadores da qualidade do ar trata-se da morfologia desses organismos, pois os mesmos não apresentam variação morfológica com as estações, promovendo o acúmulo de metais ao longo do ano inteiro (SAIKI et al., 2001).

As substâncias líquênicas são consideradas caracteres taxonômicos importantes devido ao fato de ocorrerem com uma relativa constância de composição na maioria das espécies. Entretanto, podem apresentar variações de concentração em populações monoespecíficas e no interior dos talos individuais. Fatores do ambiente, em particular a luz, temperatura e localização geográfica, assim como fatores genéticos e de idade do talo, determinam essa variação (QUILHOT et al., 1987).

O uso de informações químicas para fins de taxonomia de líquens, deve-se ao fato desses organismos produzirem metabólitos secundários, os quais são em grande parte exclusivos do grupo vegetal (HONDA e VILEGAS, 1998). Como os líquens apresentam difícil diferenciação morfológica, sua análise nem sempre elucidam um dado espécime e a caracterização desses organismos através de seus metabólitos secundários é muito empregada (HUNECK e YOSHIMURA, 1996). A determinação quimiotaxonômica de líquens é realizada utilizando-se reações de coloração no talo, microcristalização, análises cromatográfica, por fluorescência e por espectrometria de massas. Dependendo da natureza do material em estudo, pode-se obter informações pelo uso de apenas uma das técnicas ou pelo conjunto delas.

A reação de coloração do talo, uma técnica muito empregada por liquenólogos, constitui no emprego de reações características para alguns grupos funcionais, presentes em metabólitos secundários, que promovam a alteração da coloração do talo líquênico. Um exemplo é o emprego de hidróxido de potássio que, por hidrólise da ligação éster de depsídeos e depsídonas, promove a variação de cor, determinando a presença destes no líquen (HUNECK e YOSHIMURA, 1996).

Entretanto, a caracterização de líquens por esta técnica é dificultada pelo fato de diferentes substâncias apresentarem os mesmos grupamentos químicos reativos.

A microcristalização, desenvolvida por ASAHINA e SHIBATA (1954), é também empregada devido ao fato de grande parte dos metabólitos secundários de líquens apresentarem formas cristalinas características quando observadas ao microscópio, permitindo a identificação quando comparado com dados da literatura e/ou microcristalização de substâncias-padrão. No entanto, esse método é limitado pois os cristais formados, em alguns casos, são muito difíceis de serem distinguidos.

As análises cromatográficas são as mais utilizadas para a quimiotaxonomia de líquens, em especial a cromatografia em camada delgada (CCD). Todavia, as análises quimiotaxonômicas por CCD necessitam que se disponha de padrões para comparação ou sejam comparados com dados da literatura, além do inconveniente da existência de diversos metabólitos secundários que através da eluição cromatográfica apresentam valores de R_f - fator de retardamento - muito similares (HUNECK e YOSHIMURA, 1996). Análises de extratos líquênicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também são destacadas na literatura, já a cromatografia gasosa possui a utilização limitada devido à baixa volatilidade dos compostos (HONDA e VILEGAS, 1998).

Mais recentemente tem sido sugerida a utilização de dados espectrais de RMN de ^{13}C de heteropolissacarídeos para a identificação de líquens. O espectro de RMN de ^{13}C de glucanas de *Stereoculon spp.* (TAKAHASHI et al., 1981; YOKOTA et al., 1979) e polissacarídeos de outros líquens têm sido sugeridos como uma base quimiotaxonômica (CARBONERO et al., 2001; CARBONERO et al., 2002; CARBONERO et al., 2005a; CARBONERO et al., 2005b), além de suas potenciais atividades biológicas (OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDOTTIR, 2001; MARTINICHENHERRERO et al., 2005). Heteropolissacarídeos de líquens contendo manose também foram estudados por RMN de ^{13}C para fins de quimiotaxonomia, nos quais as similaridades dentro dos gêneros e famílias foram mais freqüentes que as similaridades entre os gêneros e famílias, todavia diferenças marcantes no mesmo gênero e família também foram observadas (TEIXEIRA et al., 1995). O emprego da RMN para a identificação de líquens pode oferecer vantagens quando comparada às técnicas de identificação quimiotaxonômica comumente empregadas, pois a informação poder ser fornecida em um único espectro. No entanto, o seu emprego requer a análise dos espectros, além de um cuidadoso processo de extração,

fornecendo informações numerosas e muito semelhantes, onde a caracterização de espécimes torna-se muito difícil. GORIN e SPENCER (1970) já utilizaram a RMN de ^1H como subsídio na identificação e quimiotaxonomia de fungos através da análise de polissacarídeos contendo manose, embora o estudo tenha fornecido o mesmo perfil espectral para algumas espécies de diferentes gêneros.

Os metabólitos secundários de líquens, na sua maioria contendo derivados fenólicos, requerem cuidados especiais durante o processo de extração para evitar modificações na composição. Portanto, a análise por um método direto e não invasivo pode ser de grande interesse, pois evita as inconveniências correlacionadas ao pré-tratamento das amostras para análise (BRESCIA et al., 2002a). O advento da técnica HR-MAS (High Resolution – Magic Angle Spinning), a qual pode ser aplicada em amostras heterogêneas com a obtenção de espectros de RMN de ^1H com resolução semelhante à encontrada para líquidos, vem possibilitando a análise multi-discriminante, principalmente para a classificação e quantificação de misturas (GARROD et al., 1998). A obtenção de espectros de RMN das amostras sem pré-tratamento propicia a análise de misturas complexas, sem a necessidade de extração e purificação, representando uma economia de tempo e de reagentes, além de evitar alterações na composição.

Uma outra técnica que também dispensa a necessidade de pré-tratamento é a espectroscopia de infravermelho (IV). Trabalhos recentes apontam para diversas aplicações, tais como a identificação de sete espécies do grupo *Lactobacillus acidophilus* (LUGINBÜHL et al. 2006), a caracterização de óleos essenciais de plantas (SCHULZ et al., 2005) e análises de alimentos (REID et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2004). A técnica de IV também foi aplicada com sucesso na identificação e caracterização intra-espécies de fungos (FISCHER et al., 2003), utilizando-se a quimiometria, o qual apresentou-se como uma excelente ferramenta principalmente devido à rapidez e baixo custo das análises. Nesse contexto, a utilização da técnica de IV na análise de líquens, com os mesmos fins empregados na RMN, é uma proposta relevante para efeito comparativo, além do que, dados de IV, líquens e quimiometria são desconhecidos na literatura.

1.2 - A técnica HR-MAS

A RMN de Alta Resolução com Giro no Ângulo Mágico (HR-MAS, High Resolution Magic Angle Spinning), é uma técnica empregada no estudo de amostras heterogêneas, que alia as vantagens da RMN do estado sólido às do estado líquido, reduzindo os inconvenientes ligados à manipulação da amostra e fornecendo uma resolução espectral semelhante à dos líquidos (SACCO et al., 1998).

A HR-MAS tem sido muito empregada para a análise direta de tecidos animais e vegetais (CHENG et al., 1998; BROBERG et al., 1998; BROBERG e KENNE, 2000) e de alimentos (SACCO et al., 1998; GIL et al., 2000). Ela possui também a vantagem de ser muito sensível e requerer poucos minutos para o registro de sinais de RMN de ^1H utilizando alguns miligramas de material vegetal/animal (BROBERG et al., 1998). Além disso, com uma sonda de HR-MAS com gradiente de campo magnético, é possível realizar a maioria dos experimentos bidimensionais convencionais aplicando-se as mesmas seqüências de pulsos empregadas em RMN de líquidos, com consumo de tempo e resolução equivalentes (BROBERG e KENNE, 2000).

A condição da técnica HR-MAS em analisar amostras heterogêneas é explicada pelo grau de mobilidade molecular presente nos tecidos animal e vegetal. Assim, a adição de gotas de D_2O para as análises, tem como um dos objetivos, proporcionar a mobilidade das moléculas. No caso de uma resina como um sólido puro ou um polímero, a mobilidade necessária é alcançada quando um solvente é adicionado para solvatar a amostra, já para as amostras de tecidos animais e vegetais frescos, que possui água nas células, a adição de D_2O tem a função de proporcionar o ajuste da homogeneidade do campo magnético (Shimming) e a obtenção do *lock* de deutério (VIZZOTTO, 2004). Aliás, essa é mais uma diferença entre a HR-MAS de materiais heterogêneos e a HR-MAS de “sólidos verdadeiros”. No primeiro, tem-se a possibilidade do ajuste da homogeneidade do campo magnético para cada amostra, melhorando muito a resolução espectral, ao passo que no segundo usualmente se faz periodicamente um ajuste para uma amostra líquida padrão.

1.2.1 - Princípios da Técnica HR-MAS

As análises por RMN de amostras sólidas ou heterogêneas possuem resolução espectral muito limitada devido a fatores relacionados ao movimento

molecular restrito (BROBERG e KENNE, 2000), tais como a interação dipolar, o deslocamento químico anisotrópico e a heterogeneidade física da amostra, implicando diretamente no aumento da largura de linha e dificultando a análise espectral. No entanto, apesar da RMN HR-MAS tratar-se de uma técnica de análise de materiais heterogêneos, esses problemas convencionais são minimizados justamente devido ao giro no ângulo mágico ($54,7^\circ$) e os seus espectros possuem resolução semelhante à RMN de líquidos.

Os fatores que favorecem o alargamento dos sinais, tais como a interação dipolar e o deslocamento químico anisotrópico, são devido aos movimentos moleculares nas amostras heterogêneas serem mais restritos em relação aos das amostras líquidas. Desta forma, o princípio da técnica de RMN HR-MAS é a redução drástica das larguras de linha e o aumento da qualidade do espectro, que é produzido pelo giro rápido no ângulo de $54,7^\circ$ (ângulo mágico). Girando-se a amostra no ângulo mágico a uma velocidade de alguns KHz (4-8 KHz dependendo do campo magnético), os efeitos do acoplamento dipolar e do deslocamento químico anisotrópico são significativamente minimizados, bem como a diferença de susceptibilidade magnética advinda da heterogeneidade da amostra (BROBERG e KENNE, 2000).

1.2.2 - Efeitos relacionados à RMN de amostras heterogêneas

1.2.2.1 - Interação Dipolar

Dependendo da posição relativa entre dois núcleos, a intensidade do campo magnético experimentado por eles pode ser modificada, ou seja, o campo magnético gerado pelo spin de um núcleo pode aumentar ou diminuir a força do campo magnético local (B_{loc}) que o núcleo vizinho está sujeito (CLARIDGE, 1999). Este efeito implica na obtenção de uma extensa banda de frequências para um único núcleo.

Em amostras que possibilitam o movimento molecular livre, como é o caso dos líquidos não viscosos, o movimento molecular rápido e isotrópico das moléculas faz com que os efeitos da interação dipolar sejam minimizados. Desta forma, o acoplamento dipolar não é observado em RMN de líquidos. Todavia, quando a mobilidade é restrita, como em amostras heterogêneas, os efeitos dos acoplamentos dipolares não são mais negligenciáveis.

1.2.2.2 - Deslocamento Químico Anisotrópico

O campo magnético experimentado por um núcleo, bem como o seu deslocamento químico, depende da orientação da ligação em relação ao campo magnético principal (B_0), ou seja, é anisotrópico. Isto se deve ao fato da distribuição eletrônica em ligações químicas ser inerentemente não simétrica ou anisotrópica (CLARIDGE, 1999).

O movimento randômico da molécula em solução faz com que apenas uma única frequência média, a frequência isotrópica, seja observada para cada local distinto quimicamente. Porém, as amostras com mobilidade restrita apresentam deslocamentos químicos diferenciados para núcleos correspondentes, que são os deslocamentos químicos anisotrópicos, produzidos devido às diversas orientações das moléculas em relação ao campo magnético principal (B_0). O principal efeito está no alargamento dos sinais devido aos vários deslocamentos produzidos por um mesmo núcleo.

1.2.2.3 - Diferença de Susceptibilidade Magnética

Em amostras heterogêneas, devido à heterogeneidade física, observa-se a diferença de susceptibilidade magnética gerada nas interfaces entre as partículas sólidas, solventes e ar, por exemplo, proporcionando perdas na homogeneidade magnética local, o que implica num alargamento das linhas de ressonância. Para minimizar esse efeito, sondas e rotores especiais têm sido desenvolvidos pelas diversas companhias fabricantes de equipamentos de RMN. Uma delas utiliza rotores específicos para HR-MAS de materiais heterogêneos, onde a quantidade de material é muito menor que a utilizada em rotores convencionais, onde a cavidade da amostra possui uma forma esférica, além da adição de D_2O que também melhora a susceptibilidade magnética. Enfim, tudo isso resulta em uma resolução espectral muito semelhante à obtida em solução.

1.2.3 - O Giro no Ângulo Mágico

A diferença entre os campos magnéticos locais, B_{loc} , experimentada por spins nucleares equivalentes é responsável pela contribuição do acoplamento dipolar e do deslocamento químico anisotrópico para o alargamento dos sinais. Os campos magnéticos locais estão relacionados ao momento magnético dos spins

segundo a equação $B_{loc} = \pm\mu_S r_{IS}^{-3} (3\cos^2\theta - 1)$, no qual o B_{loc} corresponde ao campo magnético local experimentado por um núcleo I e gerado por um núcleo S, μ_S ao momento magnético do núcleo S, r_{IS} à distância intermolecular, θ ao ângulo entre o vetor intermolecular e o campo B_0 e o sinal \pm à orientação dos spins em relação ao campo. Quando o ângulo θ for igual a $54,7^\circ$, o termo $3\cos^2\theta - 1$ torna-se zero e o momento magnético também é levado a zero (SANDERS e HUNTER, 1987).

Assim, se a amostra for inclinada e girar no ângulo $54,7^\circ$ em relação ao campo magnético principal (B_0), o campo magnético local (B_{loc}) será eliminado, bem como os seus efeitos relacionados (Figura 1.2). A rotação no ângulo mágico supera os efeitos do deslocamento químico anisotrópico, desde que a frequência de rotação seja ao menos comparável ao deslocamento por anisotropia (SANDERS e HUNTER, 1987).

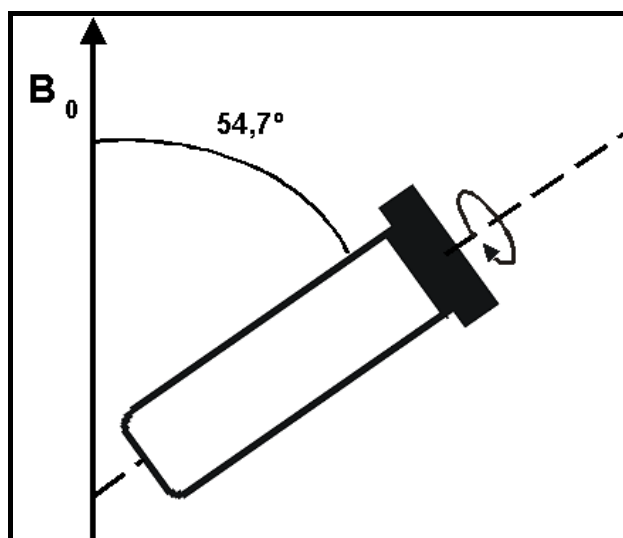


FIGURA 1.2: Esquema ilustrativo do giro do rotor no ângulo mágico (sonda HR-MAS).

Na figura 1.3, estão ilustrados dois espectros de RMN HR-MAS de 1H de líquens, obtidos com e sem o giro do rotor no ângulo mágico. O ganho de resolução girando-se o rotor a $54,7^\circ$ é indiscutível.

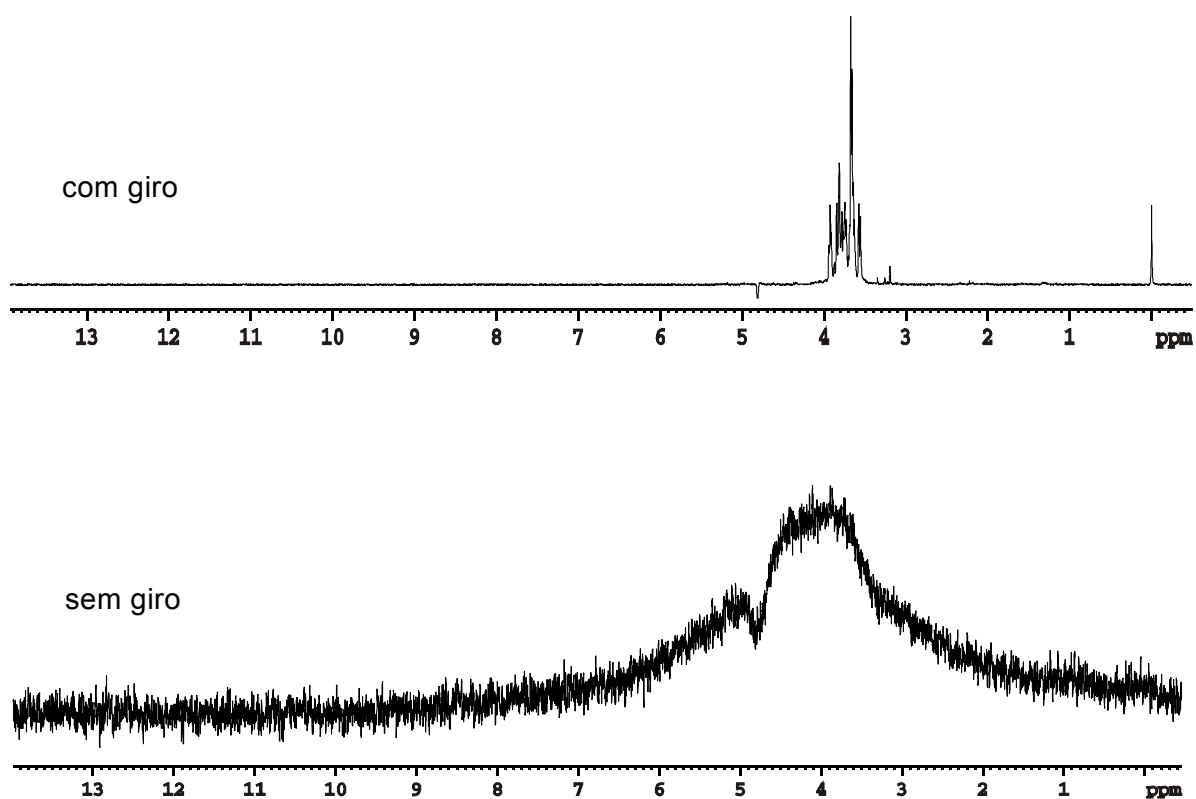


FIGURA 1.3: Espectros de RMN HR-MAS de ¹H obtidos com e sem giro no ângulo mágico, para comparação do ganho de resolução.

1.2.4 - As seqüências de pulsos empregadas nas análises de RMN

1.2.4.1 – Seqüência CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)

A análise de material vegetal pela técnica de RMN HR-MAS tem alguns inconvenientes quando se deseja observar os sinais de moléculas com massa molecular pequena, devido à presença de componentes rígidos oriundos das membranas e da parede celular. Para isso, os sinais dessas moléculas que possuem tempos de relaxação transversal (T_2) curtos precisam ser eliminados.

A seqüência CPMG (Figura 1.4), originalmente desenvolvida para se determinar os tempos de relaxação transversal (T_2), é apropriada para eliminar os sinais alargados provenientes de moléculas com T_2 curto, possibilitando uma melhor visualização dos sinais de moléculas com baixa massa molecular, também conhecida como filtro de T_2 . A aplicação da seqüência CPMG propicia que a refocagem dos ecos seja mantida em +y através de sucessivos pulsos de 180° , seguidos por um intervalo de tempo τ , minimizando assim, os efeitos causados pelas imperfeições dos pulsos. Com isso, os spins com T_2 curto (macromoléculas) acabam relaxando primeiro e passando a não ser observados durante a aquisição. O

espectro é então adquirido contendo essencialmente as ressonâncias de moléculas com T_2 mais longo (CLARIDGE, 1999). Evidentemente a aplicação da CPMG tem um efeito adverso, pois à medida que se espera as moléculas com T_2 curto relaxarem por completo, ou pelo menos a sua grande maioria, uma pequena porção das moléculas com T_2 longo também irão sofrer o mesmo processo. Como conseqüência, haverá também uma diminuição na intensidade dos sinais correspondentes às moléculas com T_2 longo.

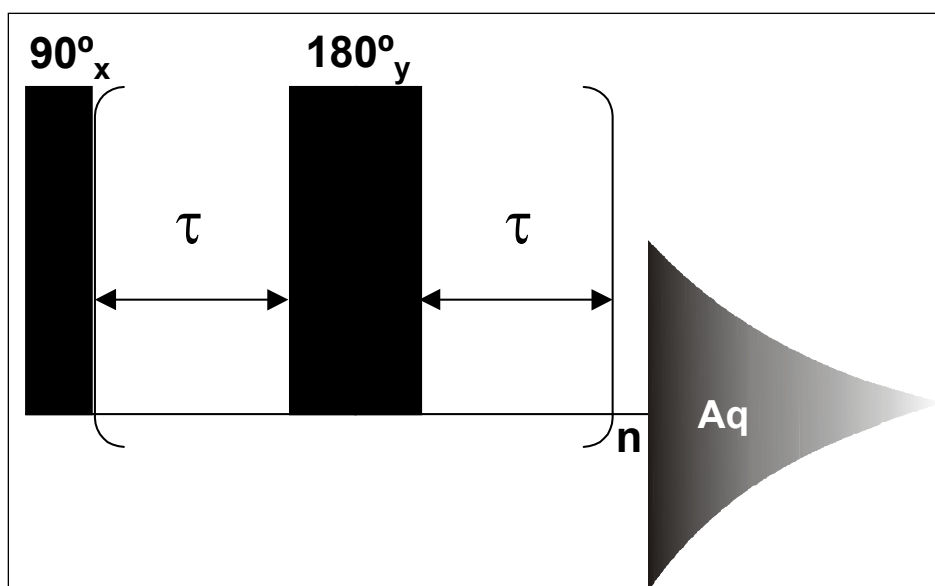


FIGURA 1.4: Seqüência de pulsos CPMG empregada na análise de RMN HR-MAS.

1.2.4.2 – Seqüência ZGCPPR (composite pulse presaturation)

As análises em sonda de líquidos foram efetuadas através do emprego da seqüência convencional de RMN de ^1H , modificada para a supressão do sinal da água contida no solvente.

Na seqüência ZGCPPR (Figura 1.5) ocorre a pré-saturação do sinal da água (ou qualquer outro sinal irradiado) mediante uma irradiação contínua e seletiva de radiofreqüência, a qual elimina a diferença de população dos estados de spin (DEROME, 1987). A seguir, é aplicado um pulso composto de 90° com fases invertidas ($90_x 90_y 90_{-x} 90_{-y}$), a fim reduzir os erros introduzidos pelas imperfeições do pulso, e após a espera de um curto período de tempo para se evitar os ruídos provenientes do pulso, é realizada a aquisição do espectro.

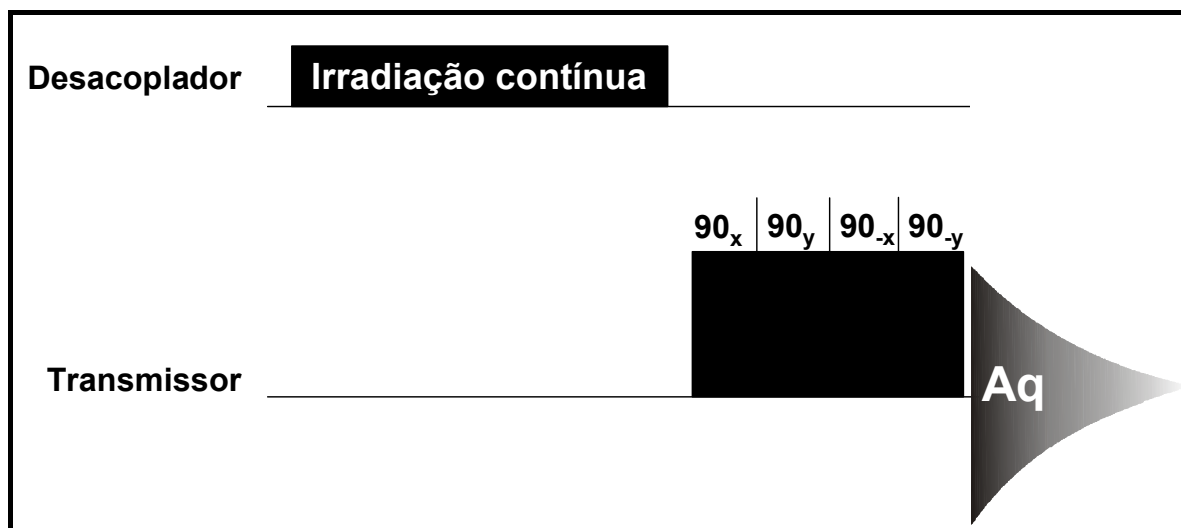


FIGURA 1.5: Seqüência de pulsos ZGCPPR empregada na análise de RMN em solução.

1.3 – Quimiometria e a RMN

Dado ao grande número de informações, muitas vezes com alto grau de semelhança, que podem estar contidas no espectro de RMN de uma única amostra, somente o uso de programas computacionais estatísticos permitem distinguir com clareza as sutilezas tanto em relação à variação dos constituintes químicos como quanto à sua quantidade. Uma ferramenta valiosa é a utilização de métodos quimiométricos como um instrumento estatístico na avaliação de perfis presentes em soluções de extratos brutos, ou até mesmo no material intacto, os quais permitam avaliar similaridades ou diferenças na composição química das amostras (DEFERNEZ e COLQUHOUN, 2003).

A quimiometria tem se mostrado uma ferramenta ideal quando se pretende comparar um grande número de amostras e com pequenas variações tanto no tipo de substâncias quanto na quantidade delas presentes (BELTON et al., 1998). Seu emprego é conhecido em diversas áreas da química, a partir de uma ampla diversidade de técnicas e aplicações diferenciadas, inclusive na quimiotaxonomia de cinco espécies de fungos *Penicillium*, a partir da avaliação de seus metabólitos secundários (FRISVAD, 1991).

A quimiometria é uma área interdisciplinar, como ilustrada na figura 1.6, que emprega tratamentos matemáticos e estatísticos para a resolução de problemas químicos. Dentre as aplicações da quimiometria, destaca-se:

- a) Planejamento Experimental: planejamento ou seleção de procedimentos ótimos de medidas e experimentos para a obtenção de melhores resultados com consumo menor de tempo e reagentes;
- b) Análise Multivariada: extração do máximo de informação química relevante, com a análise de um conjunto de dados oriundos de medidas químicas multivariadas (FERREIRA, 2006, disponível em <http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/downloads/Introducao.pdf>).

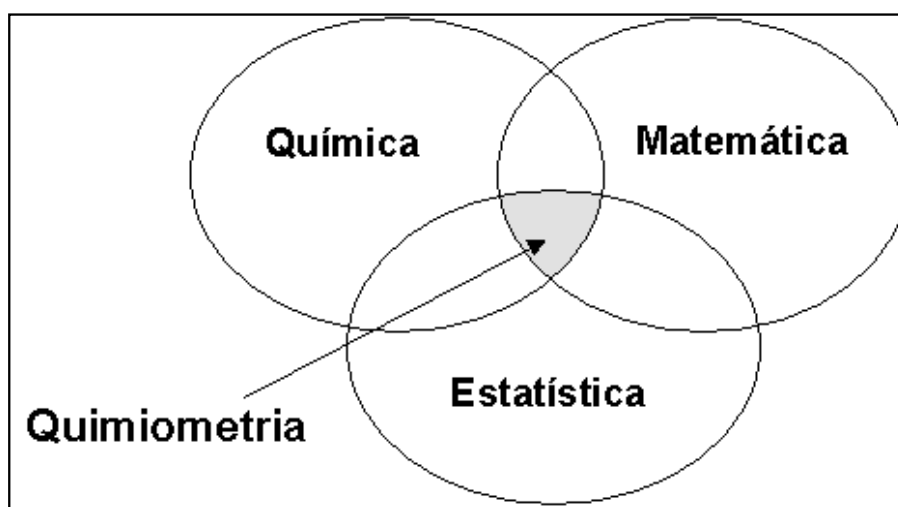


FIGURA 1.6: Esquema ilustrativo da Quimiometria como área interdisciplinar entre a química, matemática e estatística (FERREIRA, 2006, disponível em <http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/downloads/Introducao.pdf>).

A RMN aliada à quimiometria já vem sendo usada para a caracterização de plantas. Alguns trabalhos de determinação de *fingerprintings* através de espectros de RMN mostraram a eficácia na aplicação dos dados espectroscópicos para esse fim (WARD et al., 2003; BELTON et al., 1998; BRESCIA et al., 2002b; MANNINA et al., 2003; DUARTE et al., 2002). Extratos polares não fracionados de ecotipos de *Arabidopsis thaliana* foram avaliados, para a determinação de *fingerprintings* com o emprego de RMN de ^1H , tendo demonstrado como esse tipo de análise pode ser usada no futuro como uma primeira avaliação para rapidamente se determinar e caracterizar diferenças na composição molecular de amostras vegetais (WARD et al., 2003).

Diversos trabalhos com RMN e quimiometria em análises de alimentos também podem ser destacados, dentre os quais, a caracterização de variedades de maçãs a partir de sucos (BELTON et al., 1998), a origem geográfica de vinhos italianos (BRESCIA et al., 2002b), o controle de qualidade de óleos de oliva (MANNINA et al., 2003) e cerveja (DUARTE et al., 2002). Estudos com farinhas de trigo italianas, através da análise de amostras intactas via RMN HR-MAS, permitiu distinguir diferentes cultivares de trigo, bem como a sua origem geográfica (BRESCIA et al., 2002a; SACCO et al., 1998).

Uma outra vantagem das análises multivariadas está no emprego de amostras-padrão para a construção de um modelo, a fim de reconhecer e classificar amostras desconhecidas (BRESCIA et al., 2002a).

Numa análise quimiométrica pode-se aplicar as técnicas de análise exploratória de dados (*Principal Components Analysis – PCA*, *Hierarchical Clusters Analysis – HCA*) e de classificação de amostras (*Kth Nearest Neighbor – KNN*), como pode ser observado no esquema ilustrativo da figura 1.7.

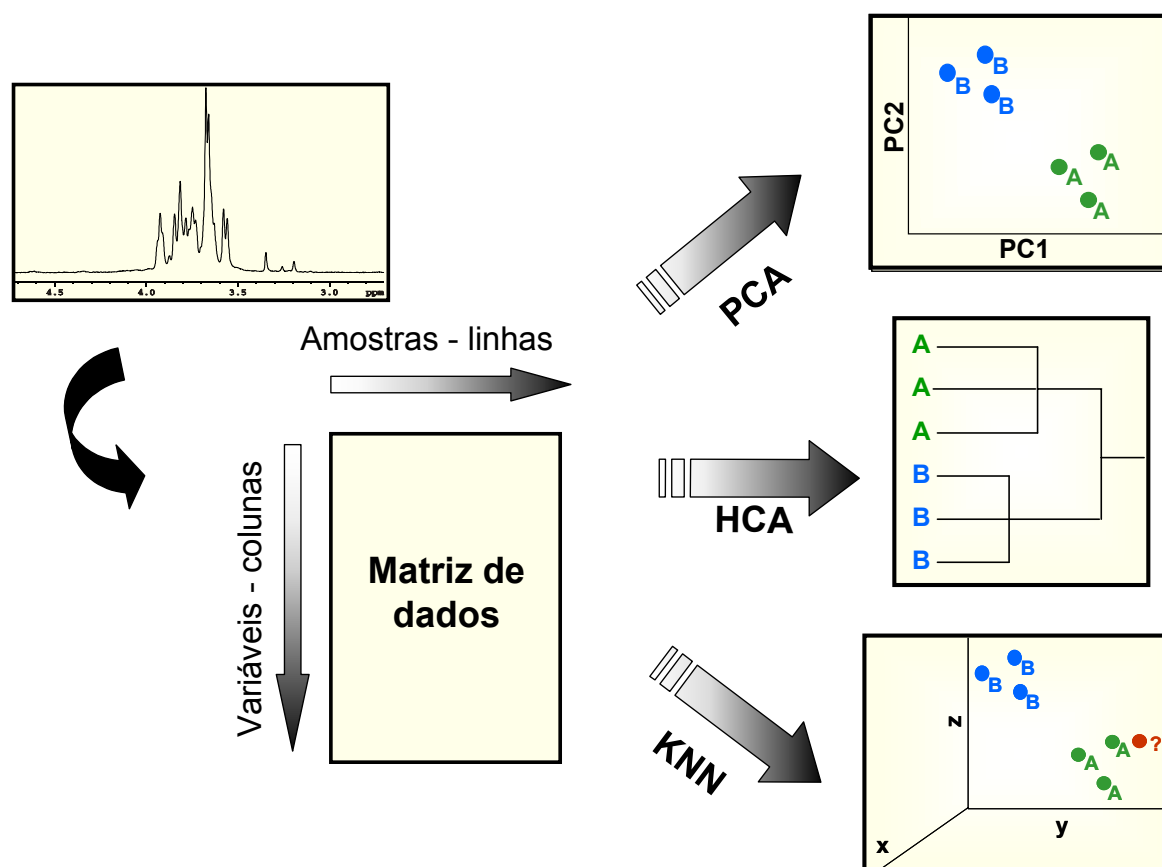


FIGURA 1.7: Esquema ilustrativo do tratamento quimiométrico empregado no presente estudo.

1.3.1 - Análise Exploratória de Dados

A análise exploratória de dados destina-se a agrupar amostras que possuam características semelhantes em um mesmo grupo e distingui-las das amostras com características mais distantes, auxiliando na identificação de amostras não usuais ou *outliers*, que não seguem o padrão das demais.

Na análise exploratória, algoritmos matemáticos reduzem os conjuntos de dados grandes e complexos para conjuntos de interpretação mais simples. As informações importantes, como as correlações existentes entre as amostras e/ou variáveis dependentes, são fornecidas em poucas variáveis derivadas dos conjuntos de dados originais (PIROUETTE[®], 1990-2001).

Para a análise exploratória, a partir dos espectros, constrói-se uma matriz de dados nos quais os experimentos (amostras) são transformados em linhas e os parâmetros do experimento (variáveis) correspondem às colunas da matriz (Figura 1.7). Os dados são organizados em um único arquivo, ou seja, uma única matriz de dados originais \mathbf{X} . A matriz \mathbf{X} é construída por n amostras e m variáveis ($n \times m$). Em um conjunto de dados espectroscópicos, as variáveis são os pontos utilizados para o processamento do espectro.

Uma análise quimiométrica envolve uma série de manipulações matemáticas prévias antes da aplicação da técnica propriamente dita. Essa manipulação matemática, conhecida como pré-processamento, é usada para remover ou reduzir fontes irrelevantes de variação, propiciando a otimização das respostas de uma dada matriz (BEEBE et al., 1998). O pré-processamento pode ser aplicado sobre as variáveis e sobre as amostras. Alguns dos principais pré-processamentos e transformações utilizados em quimiometria são:

a) Pré-processamentos:

- **Centrado na média:** É aplicado para obter uma resposta de intercepto dos dados, principalmente quando se obtém flutuações de linha de base. Esse pré-processamento é executado através da subtração da média de um dado vetor variável de todos os seus elementos (os elementos em vetor variável correspondem às intensidades para uma mesma variável em diferentes amostras). As flutuações de linha de base podem, em alguns casos, ser removidas antes mesmo do tratamento

quimiométrico, aplicando-se a correção de linha de base no programa de aquisição dos espectros;

- Escalamento pela variância: O escalamento pela variância é realizado através da divisão de cada elemento no vetor variável sobre um desvio padrão dessa variável. A principal razão para o escalamento sobre a variância é a remoção da influência (peso) que é imposta pela escala das variáveis. Na prática, esse pré-processamento é utilizado juntamente com o centrado na média (BEEBE et al., 1998), como está apresentado a seguir;

- Autoescalamento: Envolve a aplicação de ambos os métodos anteriores, centrado na média e escalamento pela variância. Usualmente os dados de RMN são autoescalados antes do início da análise exploratória (AMIX-VIEWER, 2002), pois, devido à diversidade de intensidade dos sinais de RMN, o autoescalamento certifica que os sinais mais intensos não mascarem a influência dos sinais menos intensos, garantindo que seja atribuída a mesma importância a todas as variáveis. Entretanto, para o emprego do autoescalamento em dados espectroscópicos, faz-se necessário a remoção dos ruídos espectrais, a fim de que esses não sejam destacados na análise quimiométrica.

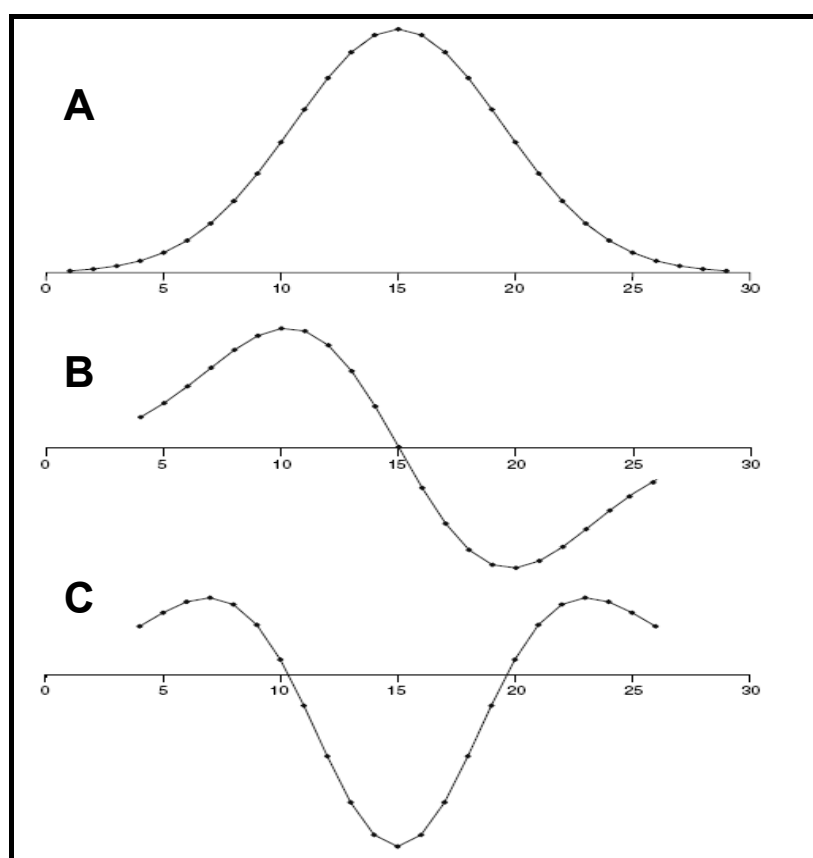
b) Transformações (pré-processamento sobre as amostras)

- Normalização: A normalização pode ser usada para remover variações sistemáticas, usualmente associadas com a quantidade total de amostra, como por exemplo, as variações nos volumes de injeção em cromatografia. Uma utilização comum é a normalização pelo sinal mais intenso, evitando assim, problemas de diferenças de concentração.

- *Smoothing*: O *smoothing*, ou alisamento, é usado para reduzir as variações randômicas (ruídos) com o objetivo de aumentar a relação sinal/ruído.

- Derivadas: Auxiliam na remoção de componentes de baixa frequência (ruídos), os quais não estão relacionados com a informação química, ou seja, reduzem variações sistemáticas de linha de base (*baseline correction*). Segundo BRERETON (2003), a utilização de derivadas possui a desvantagem de aumentar substancialmente o ruído, pois na primeira derivada o centro de cada sinal é levado à zero, e na segunda derivada, o centro do sinal é conduzido a um mínimo (Figura 1.8). Entretanto, essa limitação pode ser superada com a aplicação do método

estatístico, conhecido como Savitzky-Golay, o qual encontra-se embutido em diversos programas quimiométricos, como é o caso do programa Pirouette®.



Fonte: BRERETON, 2003.

FIGURA 1.8: Aplicação de derivadas sobre uma curva **A**: primeira derivada (**B**) e segunda derivada (**C**).

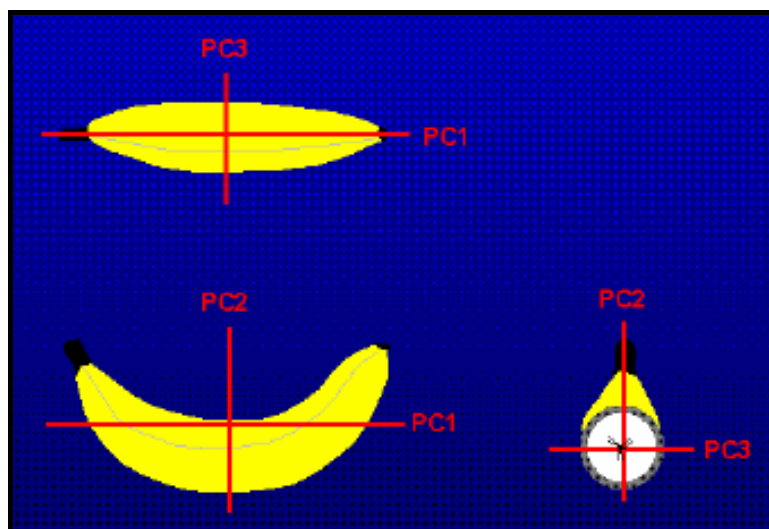
1.3.1.1 - PCA – Análise de Componentes Principais

Na análise de componentes principais, a partir da matriz de dados gera-se um novo conjunto de eixos, onde as informações presentes nas linhas e colunas são agora expressas nesse conjunto de eixos, denominados Componentes Principais (PCs). Nas componentes principais, as amostras são representadas por um único ponto e a relação entre elas obedece a relação entre as variáveis nas PCs.

As PCs reduzem a dimensionalidade do conjunto de dados, de forma que as informações relevantes fiquem contidas nas primeiras componentes principais e as irrelevantes nas últimas. Esses novos eixos são ortogonais entre si e construídos em ordem decrescente de variância, de forma que a primeira componente principal (PC1) descreva a maior variância que as componentes

principais posteriores (PC2, PC3...). A variância é a quantidade de informação dos dados originais que está descrita pelas componentes principais (PIROUETTE®, 1990-2001).

Considerando-se uma banana como uma matriz de dados, PC1 apresentará a informação sobre o seu comprimento, ou seja, maior variância, seguido da sua altura (PC2) e largura (PC3), como ilustra a figura 1.9, a seguir.



Fonte: PIROUETTE®, 1990-2001

FIGURA 1.9: Descrição de uma banana em perspectivas baseadas nas três componentes principais (PC1, PC2 e PC3).

Os gráficos das PCs e amostras são denominados gráfico de *scores*, e os das PCs e variáveis são os gráficos de *loadings*. Os *scores* mostram as informações importantes da relação entre as amostras, e os *loadings* mostram a influência das variáveis para a discriminação delas.

Muitas vezes, nas análises quimiométricas com dados de RMN, o gráfico de *loadings* apresenta-se confuso e a quantidade de informação extraída a partir deste é praticamente nula. Assim sendo, por meio de gráficos que expressem o poder discriminante das variáveis é possível extrair informações de quais regiões são relevantes e apresentam grande influência para a discriminação das amostras. Este gráfico de poder discriminante é obtido pelo método quimiométrico SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) e também avalia as componentes principais na análise de amostras.

1.3.1.2 - HCA – Análise de Agrupamentos Hierárquicos

Na análise de agrupamentos hierárquicos é apresentada uma relação entre as proximidades das amostras, agrupando-as entre si na forma de *clusters*. O importante no HCA é a distância entre as amostras, onde as amostras próximas (distâncias pequenas) são aproximadamente semelhantes.

O principal objetivo do HCA é apresentar os dados de maneira que seja enfatizado o agrupamento natural, revelando a similaridade ou discrepância entre elas. Os dados, apresentados na forma de dendrogramas, permitem a visualização das correlações entre as amostras ou variáveis, e esse agrupamento é visualizado mediante a análise do índice, ou grau, de similaridade.

O índice de similaridade varia de 0,0 a 1,0 (quando as amostras são idênticas). Segundo recomendações (PIROUETTE[®], 1990-2001), o índice de similaridade aceitável deve ser de até 0,6. Com o índice de similaridade 1,0 é observado que nenhum agrupamento é formado, pois só a própria amostra é igual a ela mesma.

1.3.2 - Classificação de amostras

As técnicas de reconhecimento supervisionado de padrões são usadas para identificar as semelhanças e diferenças em diversos tipos de amostras, comparando-as entre si. Para isso, deve-se saber quais amostras são semelhantes e quais são diferentes para se estabelecer critérios de classificação, e são, justamente esses critérios que serão utilizados para prever as características de novas amostras.

Há alguns métodos para a classificação de amostras desconhecidas, tais como KNN (*Kth Nearest Neighbor*) e SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*). No método KNN, calcula-se a distância entre uma amostra desconhecida e todas as amostras do modelo. A atribuição a uma classe é feita por votos usando a classe de amostras mais próximas como critério.

Por comparação, os K vizinhos mais próximos de cada amostra são escolhidos para votar. Cada um dá um voto para a sua classe, assim, a classe que recebe mais votos ganha a amostra (FERREIRA, 2006, disponível em <http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/downloads/CLASSIFICACAO.pdf>). Em caso de empate, a classe com a menor distância acumulada fica com a amostra.

Antes da classificação, um modelo é construído com amostras testes escolhendo-se o melhor número de vizinhos que serão empregados para a predição, ou seja, o número de vizinhos que apresente a menor quantidade de erros para as amostras testes será aplicado. Após a construção do modelo, as amostras desconhecidas são classificadas.

OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

- ✓ Classificação quimiotaxonômica de 11 espécies de líquens, assim distribuídas:
Família Physciaceae, gêneros: *Dirinaria* (1 espécie: *aspera*), *Heterodermia* (1 espécie: *speciosa*) e *Pyxine* (1 espécie: *daedalea*).
Família Parmeliaceae, gêneros: *Parmotrema* (6 espécies: *breviciliatum*, *cornuta*, *delicatulum*, *dilatatum*, *mesotropum* e *tinctorum*), *Hypotrachyna* (1 espécie: *dactylifera*) e *Canoparmelia* (1 espécie: *cryptochlorophaea*).
- ✓ Utilização da sonda HR-MAS juntamente com a seqüência de pulsos CPMG (filtro de T₂) no estudo das amostras intactas de líquens.
- ✓ Extração dos metabólitos secundários de líquens e obtenção dos espectros de RMN de ¹H na sonda de líquidos, a partir dos extratos não-fracionados, para comparação.
- ✓ Emprego de análises de espectroscopia na região do infravermelho (IV) em amostras intactas a fim de comparar as técnicas de RMN HR-MAS, RMN em solução e IV na quimiotaxonomia de líquens.
- ✓ Aplicação de métodos quimiométricos de análise exploratória e de classificação nos dados de RMN HR-MAS, RMN em solução e IV, na tentativa de, através desses dados complexos, correlacionar as diferenças ou similaridades encontradas na determinação quimiotaxonômica dos líquens.
- ✓ Identificação do maior número dos principais metabólitos secundários, presentes nos extratos não fracionados, através das técnicas de RMN 1D: ¹H, ¹³C, gNOESY e 2D: gCOSY, gHSQC, gHMBC e DOSY.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Preparo das amostras:

Os líquens, coletados na região de Aquidauana – MS, foram identificados preliminarmente pela Profa. Dra. Mariana Fleig, da Universidade Federal de Santa Maria. As exsicatas encontram-se depositadas no herbário do Laboratório de Pesquisa LP2, Departamento de Química - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Tabela 3.1).

As amostras foram previamente limpas para a retirada do material proveniente do caule das árvores dos quais foram coletados. Os líquens analisados estão descritos na Tabela 3.1, a seguir, com seus correspondentes códigos e números de depósito:

TABELA 3.1: Famílias, gêneros e espécimes das amostras de líquens analisadas:

Famílias	Gêneros	Espécimes	Número de depósito	Códigos
Physciaceae	<i>Dirinaria</i>	<i>aspera</i> (H. Magn.) Awasthi	0589	Dirin
	<i>Heterodermia</i>	<i>speciosa</i> (Wulf.) Trevisan	0549	Hspec
	<i>Pyxine</i>	<i>daedalea</i> Krog & R. Sant.	0536	Pyx
Parmeliaceae	<i>Hypotrachyna</i>	<i>dactylifera</i> (Vain.) Hale	0506	Hypot
	<i>Canoparmelia</i>	<i>cryptochlorophaea</i> (Hale) Hale	0501	Canop
	<i>Parmotrema</i>	<i>breviciliatum</i> (Hale) Hale	0376	Pbrev
		<i>cornuta</i> (Lynge) Hale	0574	Pcor
		<i>delicatulum</i> (Vain.) Hale	0559	Pdel
		<i>dilatatum</i> (Vain.) Hale	0524	Pdil
		<i>mesotropum</i> (Müll. Arg.) Hale	0534	Pmes
	<i>tinctorum</i> (Nyl.) Hale	0519	Ptinc	

3.1.1 – Preparo das amostras para a sonda HR-MAS

As amostras destinadas à análise na sonda HR-MAS foram sujeitas à moagem em moinho criogênico da marca Spex Certiprep, do tipo 6750 Freezer/Mill. Foram realizados três ciclos de moagem, cada qual de acordo com os seguintes parâmetros:

- Tempo de pré-congelamento: 1 minuto;
- Tempo de moagem: 2 minutos;
- Tempo de congelamento entre os ciclos: 1 minuto;
- Taxa: 10 batidas por segundo.

Nenhum outro pré-tratamento da amostra foi efetuado para a análise na sonda HR-MAS. O material triturado foi analisado em rotores de zircônio de 4 mm de diâmetro externo, com a adição de gotas de uma solução de TMSP-d₄ (3-(trimetilsilil)2,2,3,3-d₄-propionato de sódio) em D₂O para a calibração dos espectros e ajuste da homogeneidade do campo magnético principal.

A figura 3.1, a seguir, apresenta os acessórios empregados no preparo das amostras submetidas à HR-MAS, onde as dimensões dos objetos estão ilustradas pela comparação com um palito de fósforo localizado acima do parafuso. A amostra fica contida entre o rotor (1) e um espaçador (2), que possui um orifício para que o excesso de água e/ou amostra seja expelido. Desta forma, após a inserção do espaçador e posterior limpeza da região para a retirada do excesso de água e/ou amostra, este é fixado por um parafuso (3), a fim de garantir que a amostra não seja expelida devido ao giro. Em seguida tampa-se o rotor com uma tampa seccionada (4), que irá proporcionar o giro na velocidade necessária. A inserção e retirada do espaçador são facilitadas utilizando-se o parafuso longo (5).

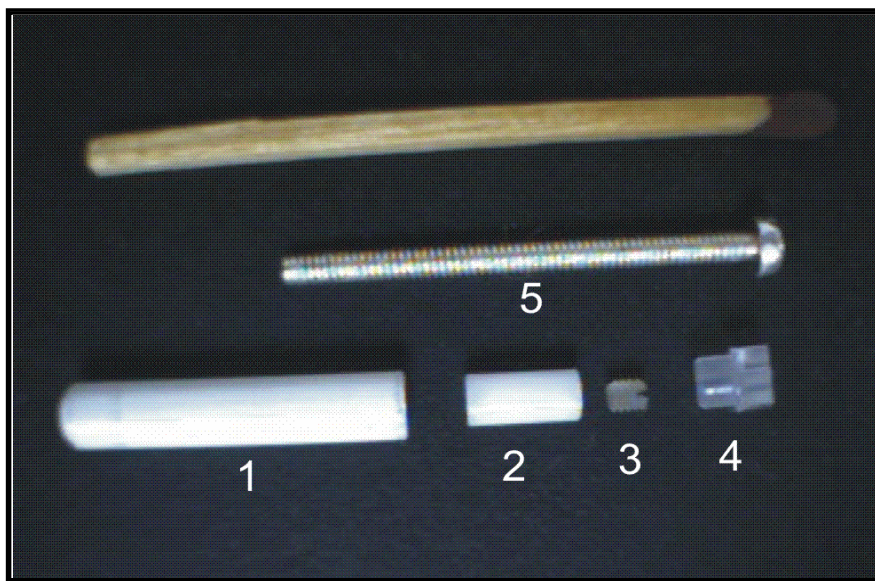


FIGURA 3.1: Acessórios empregados para a sonda HR-MAS.

No preparo das amostras para a análise de HR-MAS, esquematizado na figura 3.2, ao rotor (a) contendo a amostra (b) é inserido o espaçador (c), fazendo com que a amostra adquira volume esférico; após a retirada do excesso de amostra e/ou água, o parafuso (d) é adicionado (d) e, finalmente, a tampa seccionada é inserida no rotor (e).

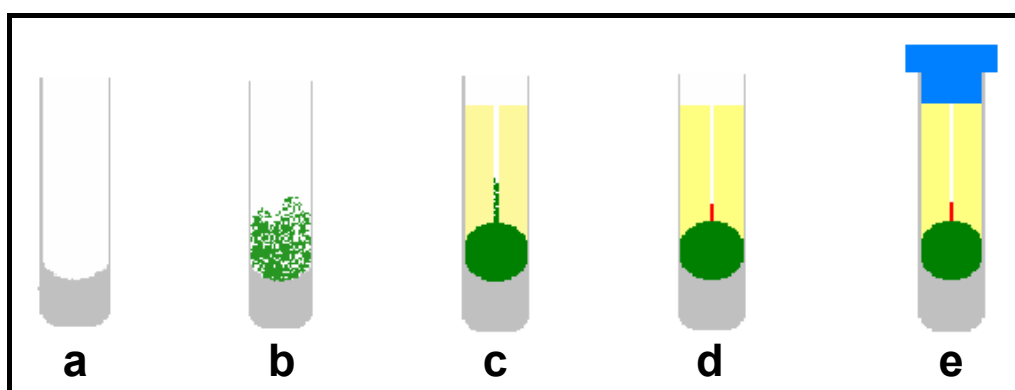


FIGURA 3.2: Esquema de preparo da amostra para a técnica HR-MAS.

3.1.2 – Preparo das amostras para a sonda de líquidos

A extração dos metabólitos secundários para a análise líquida foi efetuada no Laboratório de Pesquisa LP2, do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em Campo Grande – MS. Os líquens,

tritutados em almofariz, foram submetidos à extração em acetona sob aquecimento brando por aproximadamente quarenta minutos, e os extratos foram mantidos em dessecador após a evaporação do solvente em evaporador rotatório.

Após secos, os extratos foram cromatografados em camada delgada juntamente com alguns padrões de substâncias liquênicas para comparação, dentre os quais: atranorina, ácidos lecanórico, protocetrário, úsnico, salazínico, fumarprotocetrário, caperático, diváricático e estítico. A cromatografia em camada delgada foi efetuada em placa de sílica gel empregando-se como eluente uma solução de tolueno: acetato de etila: ácido acético 6:4:1 v/v/v, e reveladas por nebulização com metanol/ ácido sulfúrico 10% seguida de aquecimento em chapa aquecida e posterior nebulização com *p*-anisaldeído/H₂SO₄ e reaquecimento.

Para a análise de RMN de líquidos, foi efetuada a solubilização dos extratos em DMSO-*d*₆, adicionando-se vapores de TMS para o ajuste da homogeneidade do campo magnético principal e calibração dos espectros.

3.1.3 - Preparo das amostras para a análise de IV:

As amostras de líquens receberam tratamento similar às utilizadas na análise de RMN HR-MAS, ou seja, após a limpeza do material os líquens foram submetidos à moagem em moinho criogênico.

As pastilhas foram preparadas pesando-se 1 mg do líquen e 99 mg de brometo de potássio (KBr) (Brometo de potássio para Espectroscopia, VETEC Química Fina) seco e pulverizado. A amostra foi então misturada ao KBr através de moagem em um gral de ágata liso e a mistura KBr-amostra foi prensada em moldes especiais, sob uma pressão de 7500 tons (~10000 psi) por cinco minutos, até formar um disco translúcido.

3.2 – Obtenção das medidas espectroscópicas de RMN

As medidas de RMN foram executadas em um equipamento DRX 400 BRUKER de 9,4 Tesla (400,13 MHz para a frequência do hidrogênio), localizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química - UFSCar. Todas as amostras foram analisadas em triplicata para maior confiabilidade do método.

3.2.1 – Sonda HR-MAS

As medidas foram realizadas empregando-se uma sonda dual $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HR-MAS 4 mm, com detecção inversa e gradiente de campo na coordenada z. Para a manutenção do giro da amostra a 5 kHz foram empregados uma unidade pneumática e um fluxo de ar comprimido com pressão superior a 6 bar.

Os experimentos foram obtidos utilizando-se a seqüência de pulsos CPMG, com a inserção na seqüência de uma irradiação de onda contínua para a supressão do sinal do solvente. Cada espectro foi adquirido com um número de varreduras (NS) igual a 512, tempo de espera entre cada aquisição de 1 s (d1), tempo de aquisição de 2,0579 s (AQ) e um número de pontos na aquisição de 32k (TD). O processamento desses foi efetuado com 32k pontos (SI), acrescidos de uma multiplicação exponencial utilizando-se um fator $I_b=1\text{Hz}$ e correção automática de linha de base.

3.2.2 – Sonda de líquidos

As medidas foram realizadas em uma sonda BBI 5mm de diâmetro interno, com detecção inversa e bobinas geradoras de gradiente de campo na coordenada z, empregando-se a seqüência de pulsos convencional com supressão do sinal do solvente (ZGCPFR). Foram realizadas 64 varreduras (NS), tempo de espera entre cada aquisição de 1 s (d1), tempo de aquisição de 3,5652 s (AQ) com 64k pontos durante a aquisição (TD), 64k pontos para o processamento (SI) e utilizando-se uma multiplicação exponencial com um $I_b=0,3\text{ Hz}$ e correção automática de linha de base.

Para a elucidação dos compostos foram utilizados os experimentos de RMN de ^{13}C , *g*NOESY, *g*COSY, *g*HSQC, *g*HMBC e DOSY. Os espectros de RMN de ^{13}C foram realizados com o programa de pulsos *zgpg30*, com tempo de aquisição de 0,606 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição de 100 ms e número de pontos na aquisição de 32k (TD). O processamento foi realizado com 32k pontos (SI), utilizando-se uma multiplicação exponencial com um $I_b=3\text{ Hz}$. Os experimentos de *g*NOESY foram obtidos com o programa de pulsos *selnogp.3*, com tempo de aquisição de 3,067 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição de 3 s (d1) e número de pontos na aquisição de 32k (TD), tempo de recuperação do gradiente de

200 μ s (d16) e tempo de mistura de 500 ms (d8). O processamento foi realizado com 32k pontos (SI) e uma multiplicação exponencial com um $\text{lb}=3$ Hz.

Os experimentos bidimensionais de gCOSY foram realizados com o programa de pulsos cosygspr, com largura espectral em F2 (SWHF2) de 6410,26 Hz e em F1 (SWHF1) 6410,26 Hz, tempo de aquisição de 0,319 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,8 s e número de pontos na aquisição de 4k em F2 (TDF2) e 256 em F1 (TDF1). No processamento foram utilizados 2k (SI2) e 1k (SI1) pontos em F2 e F1, respectivamente, com utilização de multiplicação de seno quadrado (QSINE) e seno (SSB) igual a 3 em F2 e F1.

Os experimentos bidimensionais de gHSQC foram realizados com o programa de pulsos invietgpsi, com largura espectral em F2 (SWHF2) de 5827,51 Hz e em F1 (SWHF1) 22136,78 Hz, tempo de aquisição de 0,175 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,2 s e número de pontos na aquisição de 2k em F2 (TDF2) e 256 em F1 (TDF1). No processamento foram utilizados 2k (SI2) e 1k (SI1) pontos em F2 e F1, respectivamente, com utilização de multiplicação de seno quadrado (QSINE) e seno (SSB) igual a 3 em F2 e F1.

Os experimentos bidimensionais de gHMBC foram realizados com o programa de pulsos inv4gplplrnd, largura espectral de 5827,51 Hz (SWHF2) em F2 e 25155,79 Hz (SWHF1) em F1, tempo de aquisição de 0,175 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,2 s, tempo de espera de observação à longa distância (d6) de 62,5 ms e número de pontos na aquisição de 2k em F2 (TDF2) e 256 em F1 (TDF1). No processamento foram utilizados 2k (SI2) e 1k (SI1) pontos em F2 e F1, respectivamente, com utilização de multiplicação de seno quadrado (QSINE) e seno (SSB) igual a 3 em F2 e F1.

O experimento de DOSY foi obtido utilizando-se o programa de pulsos ledbpgp2s, com largura espectral de 5952,38 Hz (SWH), tempo de aquisição de 5,505 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição de 1,5 s (d1), número de pontos na aquisição de 64k (TDF2) e 64 (TDF1). O pulso de gradiente empregado foi de 2 ms (p30), tempo de recuperação do gradiente de 100 μ s (d16), tempo de dissipação das correntes de vórtice de 5ms (d21) e tempo de difusão de 100 ms (d20). A rampa de gradiente for ajustada de 2 a 95% da potência total do amplificador de gradiente. O tempo de aplicação do pulso de gradiente foi ajustado para que cerca de 5% da intensidade dos sinais permanecesse ao final do experimento.

3.3 – Obtenção das medidas espectroscópicas de IV

A análise de IV de cada pastilha foi conduzida em um espectrômetro Bomem Hartmann & Braun MB-Series, modelo 102.

Os espectros foram obtidos na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} , adquiridos em absorbância com 16 varreduras. No processamento foi realizada uma correção automática da linha de base.

3.4 – Tratamento Quimiométrico

A análise quimiométrica dos dados foi efetuada através do programa computacional *Pirouette*[®], versão 2.02, da Infometrix. Primeiramente foi efetuada a análise exploratória dos dados por PCA (*Principal Components Analysis*) e HCA (*Hierarchical Clusters Analysis*), e por fim foi construído um modelo de classificação, pelo método KNN (*Kth Nearest Neighbor*), para a previsão de amostras desconhecidas.

As matrizes de dados de RMN foram construídas com todos os espectros salvos na extensão “.dx”. Esses espectros foram importados para o programa Origin[®], salvos com a extensão “.dat” e por fim inseridos no programa. Na matriz, após a sua transposição, todas as amostras referem-se às linhas e os deslocamentos químicos, intensidades e multiplicidades dos sinais, em número de pontos, referem-se às colunas.

A matriz de dados de IV foi construída com todos os espectros salvos na extensão “.PRN”. Esses espectros foram importados para o programa Origin[®], salvos com a extensão “.dat” e por fim inseridos no programa de quimiometria. Na matriz, após a sua transposição, todas as amostras referem-se às linhas e as absorções de IV, em número de pontos, referem-se às colunas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As amostras de líquens, previamente identificadas, foram primeiramente cromatografadas em camada delgada (CCD). Os extratos, solubilizados em acetona, apresentaram o perfil cromatográfico mostrado na figura 4.1. Através do cromatograma, foi possível caracterizar a presença de algumas substâncias nos extratos líquênicos, tais como a atranorina que foi detectada em praticamente todos os extratos, o ácido salazínico no extrato de **Pdel**, o ácido lecanórico em **Ptinc**, o ácido protocetrário em **Pdil** e o ácido divaricático em **Dirin**. A cromatografia em camada delgada auxiliou na observação do perfil dos extratos, destacando a diversidade de substâncias encontradas na mistura, mostrando que a análise por RMN dos extratos brutos pode ser empregada para a identificação dos metabólitos sem a necessidade de isolamento e purificação, pois não se tratam de misturas muito complexas.

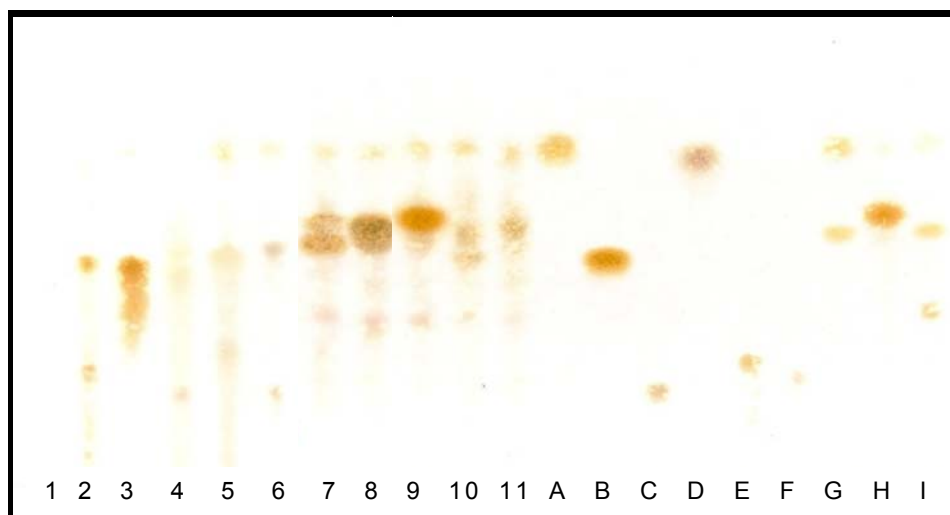


FIGURA 4.1 Cromatografia em camada delgada dos extratos de líquens e dos padrões das substâncias comumente encontradas (1: **Pmes**, 2: **Pdel**, 3: **Ptinc**, 4: **Pcor**, 5: **Pbreve**, 6: **Pdil**, 7: **Hypot**, 8: **Canop**, 9: **Dirin**, 10: **Hspec**, 11: **Pyx**, A: atranorina, B: ácido lecanórico, C: ácido protocetrário, D: ácido úsnico, E: ácido salazínico, F: ácido fumarprotocetrário, G: atranorina + ácido caperático, H: atranorina + ácido divaricático, I: atranorina + ácidos caperático e estífico).

4.2 - Análise das Amostras Intactas por Espectroscopia de RMN HR-MAS

4.2.1 - Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H

Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras intactas foram obtidos com a seqüência de pulsos CPMG devido ao ganho na resolução espectral, comparado com a seqüência convencional, pois os sinais alargados referentes às moléculas com tempo de relaxação transversal (T_2) curto ocasionariam a sobreposição dos sinais de maior interesse. Adicionado uma fonte de radiação de ondas contínuas à seqüência CPMG, todos os espectros foram obtidos com supressão do sinal do solvente, no caso D_2O , pois o ajuste do ganho do receptor do equipamento seria dado por esse sinal muito intenso, prejudicando a visualização dos sinais referentes à amostra.

A seguir (Figura 4.2), é apresentada a comparação entre um espectro de RMN de ^1H simples e um obtido com a seqüência de pulsos CPMG, onde em ambos os casos foram realizados a supressão do sinal do solvente. O ganho na resolução espectral, como pode ser observado, é relevante quando se compara a melhor definição dos sinais de 3,5 a 4,0 ppm. A CPMG ainda favorece a visualização de sinais em 3,2-3,4 ppm, quase totalmente encobertos quando esta seqüência pulsos não é utilizada.

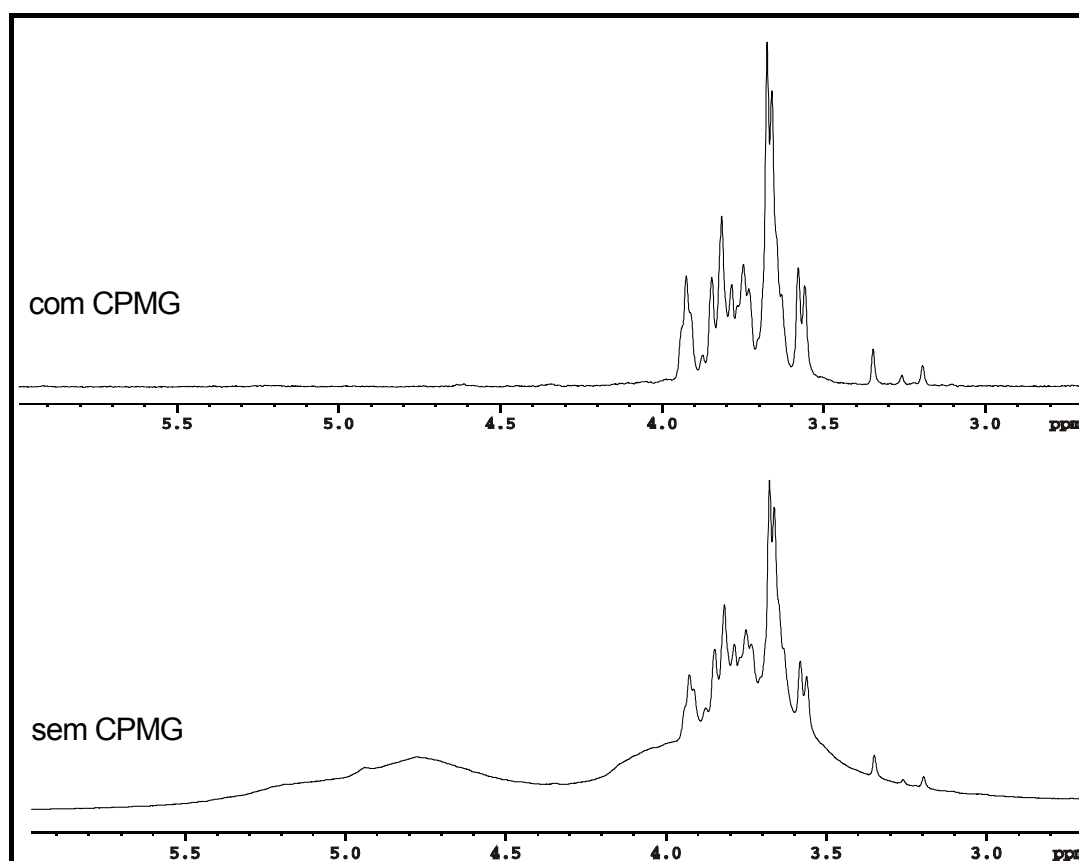


FIGURA 4.2: Comparação entre espectros de RMN HR-MAS de ^1H (DRX400 Bruker 9,4 T) obtidos com e sem a seqüência de pulsos CPMG, ambos com pré-saturação do sinal do HOD.

Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H dos líquens apresentaram sinais somente na região de 3,1 a 4,0 ppm (Figura 4.3). Os sinais das amostras foram muito semelhantes entre si, variando-se principalmente na proporção dos seus constituintes (Figuras 4.4 a 4.14). A similaridade dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H deve-se ao fato de que, por se analisar o material vegetal intacto, a grande quantidade de metabólitos primários, por exemplo, sobressaem aos metabólitos secundários, sendo que esses produtos do metabolismo primário de plantas não são muito diferentes como os de metabolismo secundário.

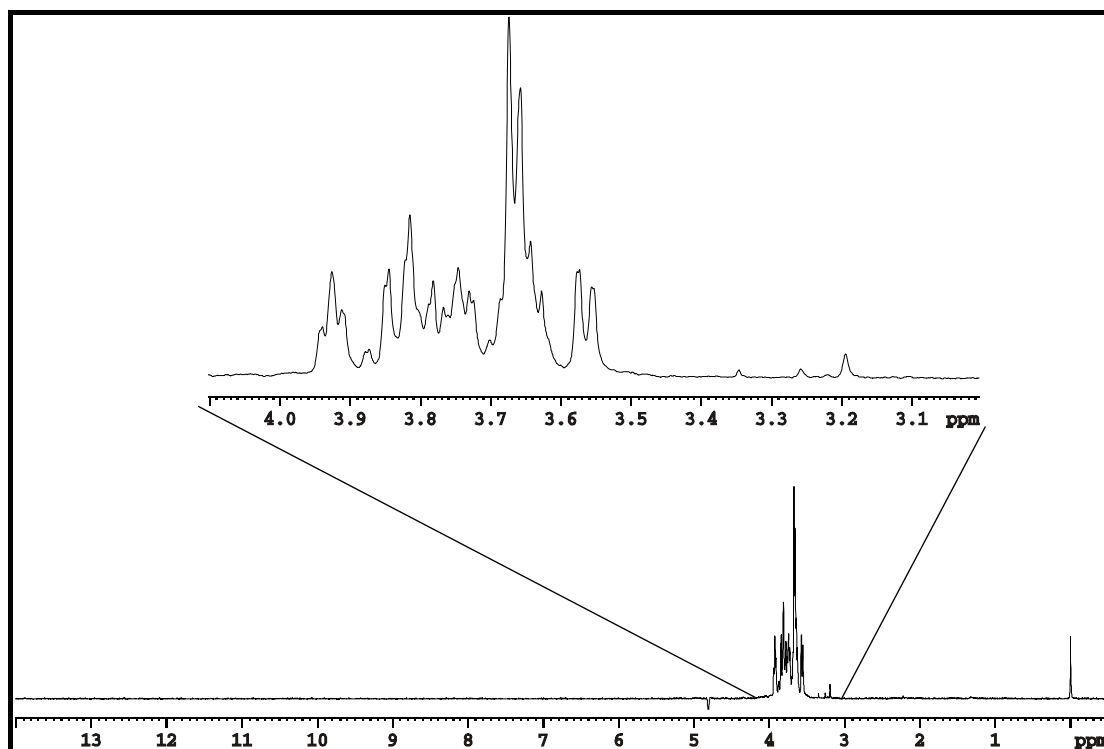


FIGURA 4.3: Esquema ilustrativo de um espectro de RMN HR-MAS de ^1H (DRX400 Bruker 9,4 T) de uma amostra de líquen, com sinais somente na região de 3,1 a 4,0 ppm.

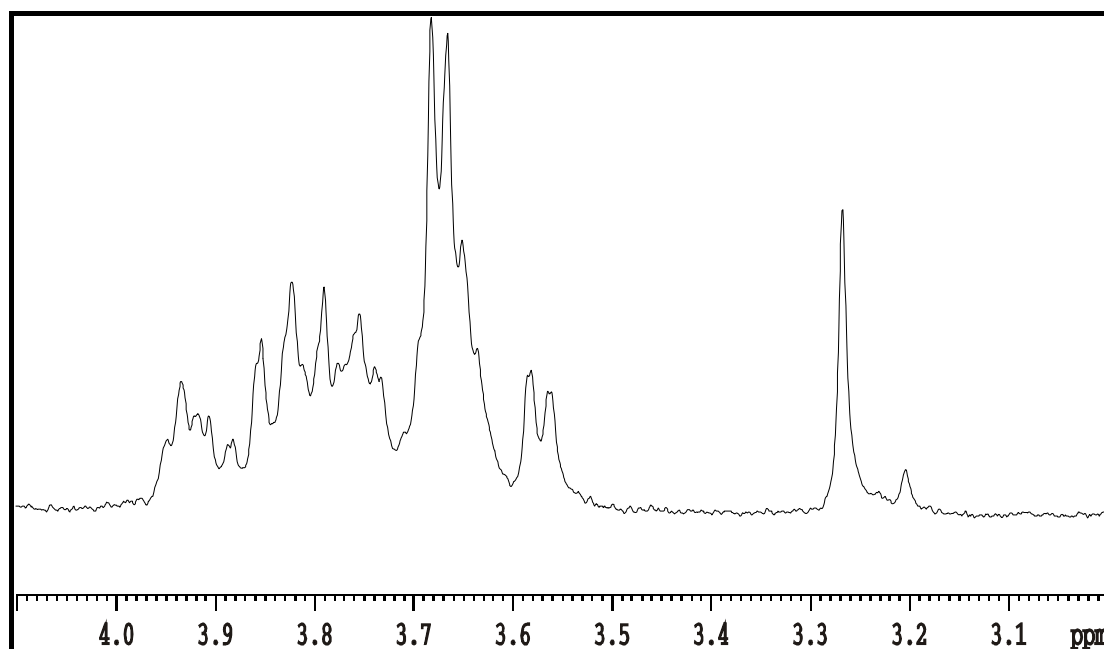


FIGURA 4.4: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Dirin** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

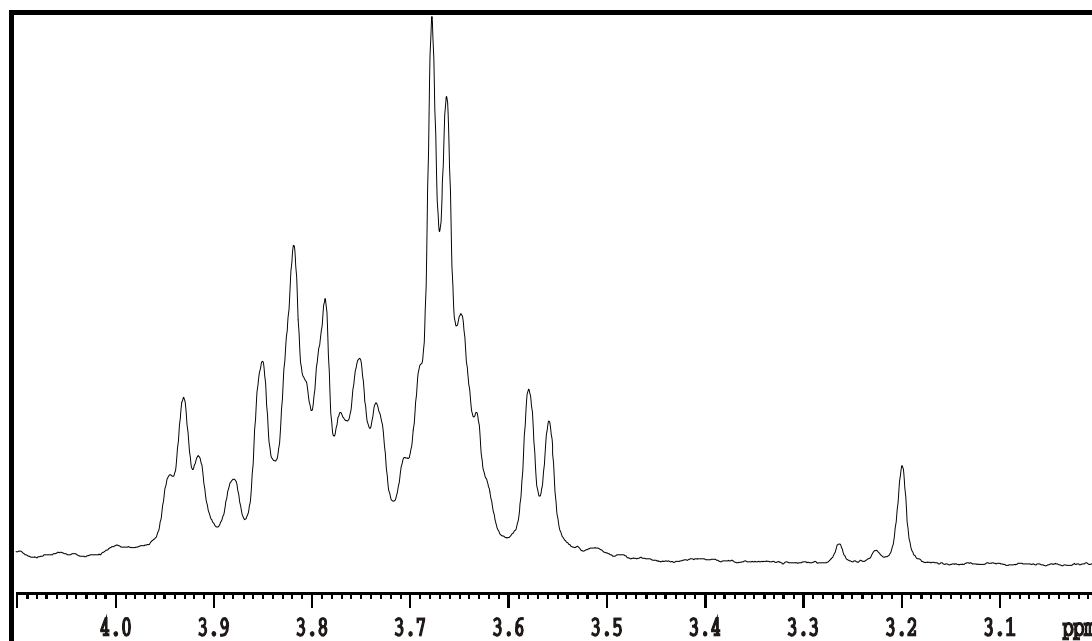


FIGURA 4.5: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Hspec** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

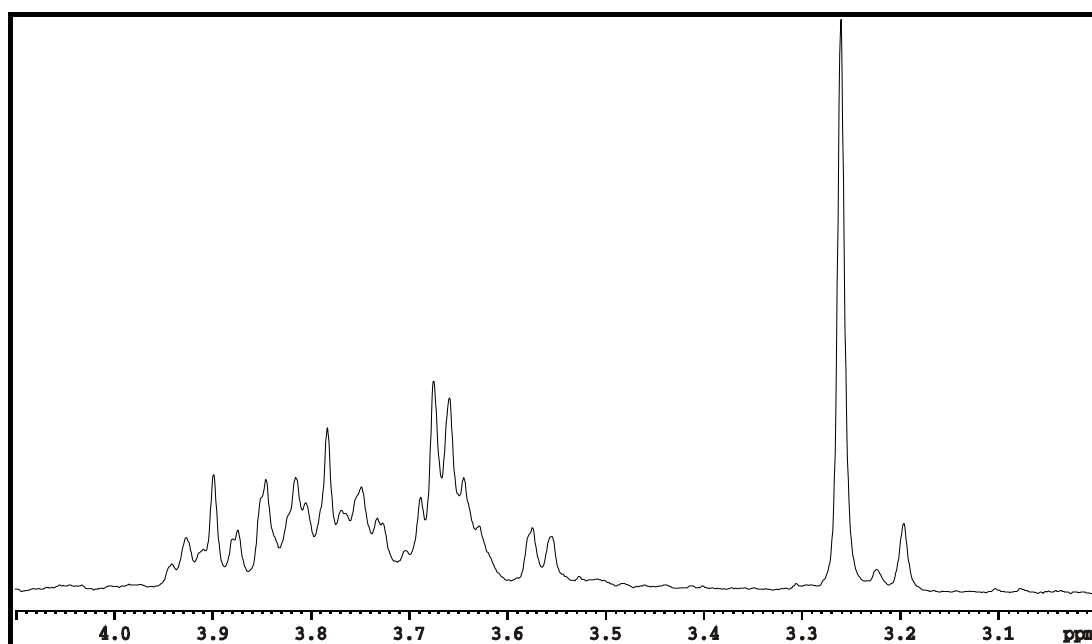


FIGURA 4.6: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Pyx** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

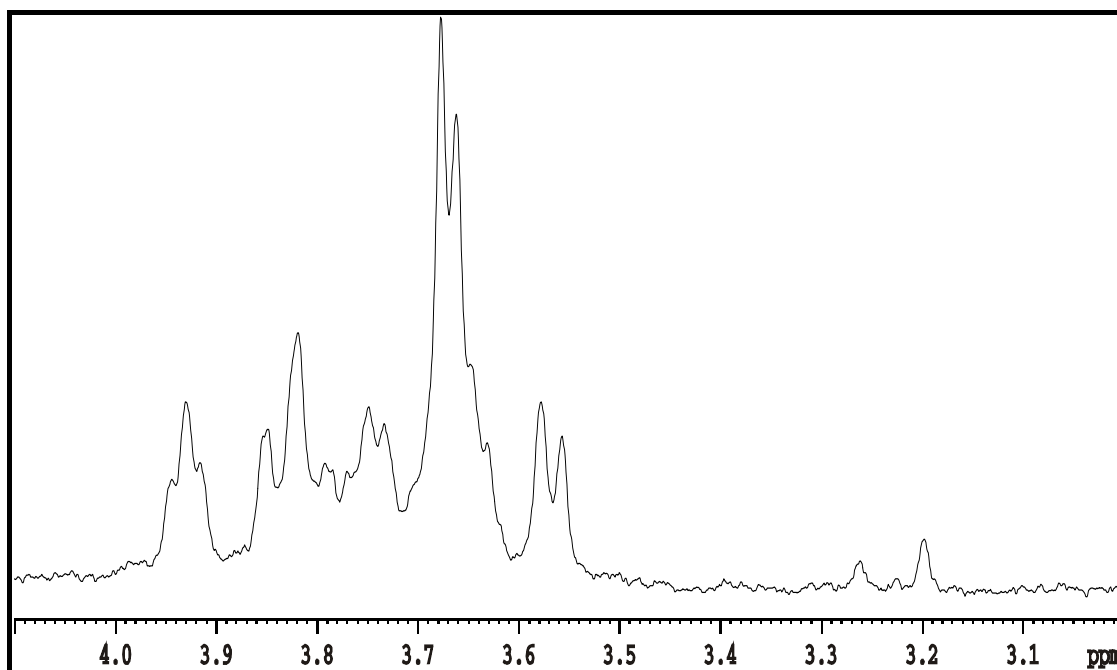


FIGURA 4.7: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Hypot** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

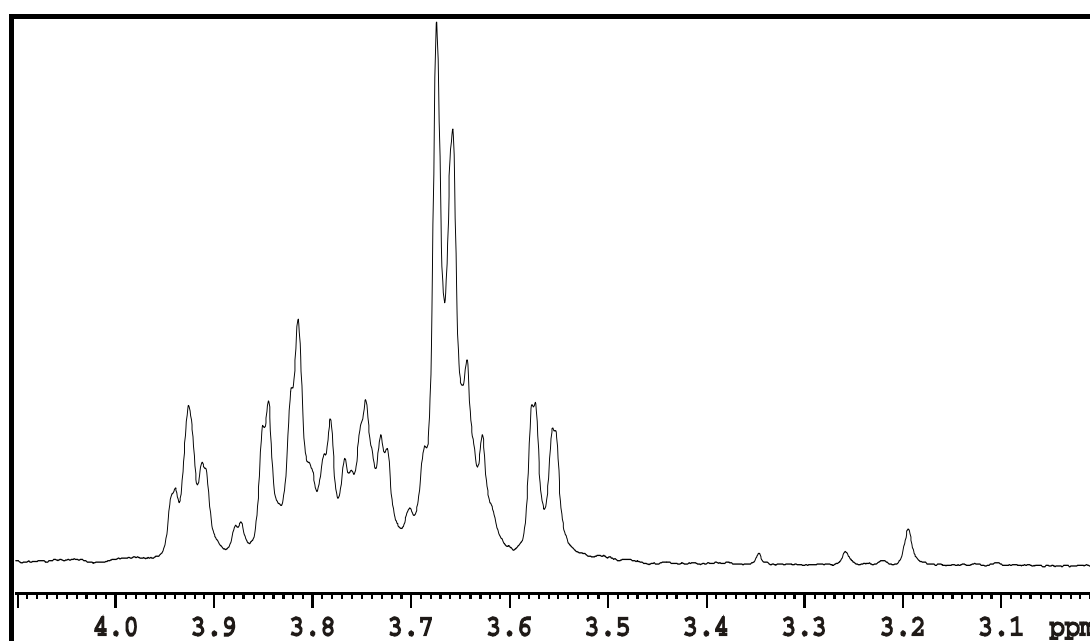


FIGURA 4.8: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Canop** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

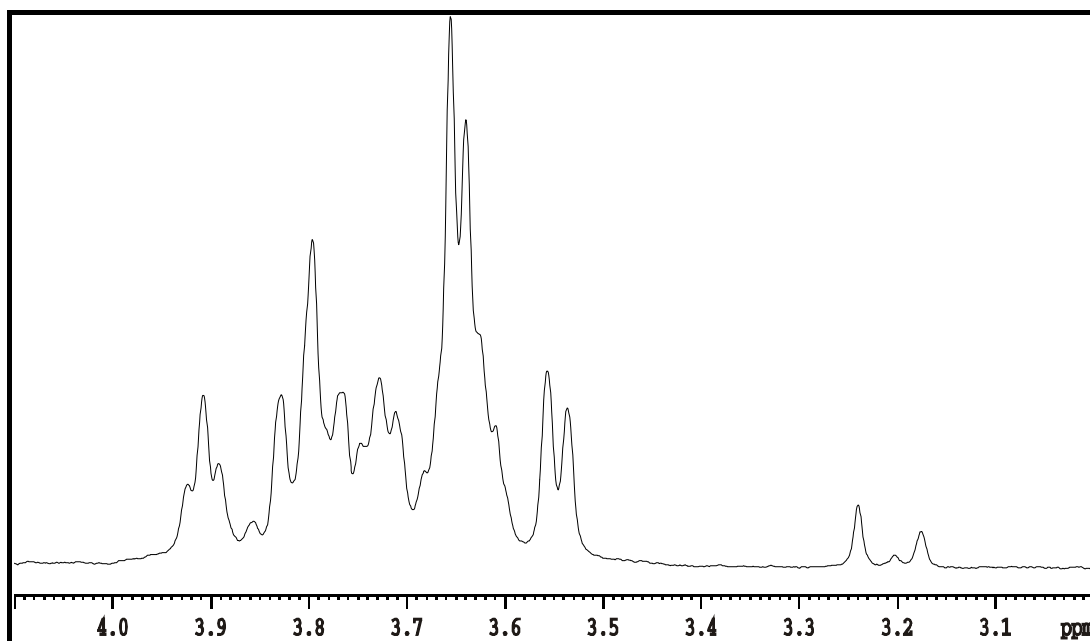


FIGURA 4.9: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Pbreve** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

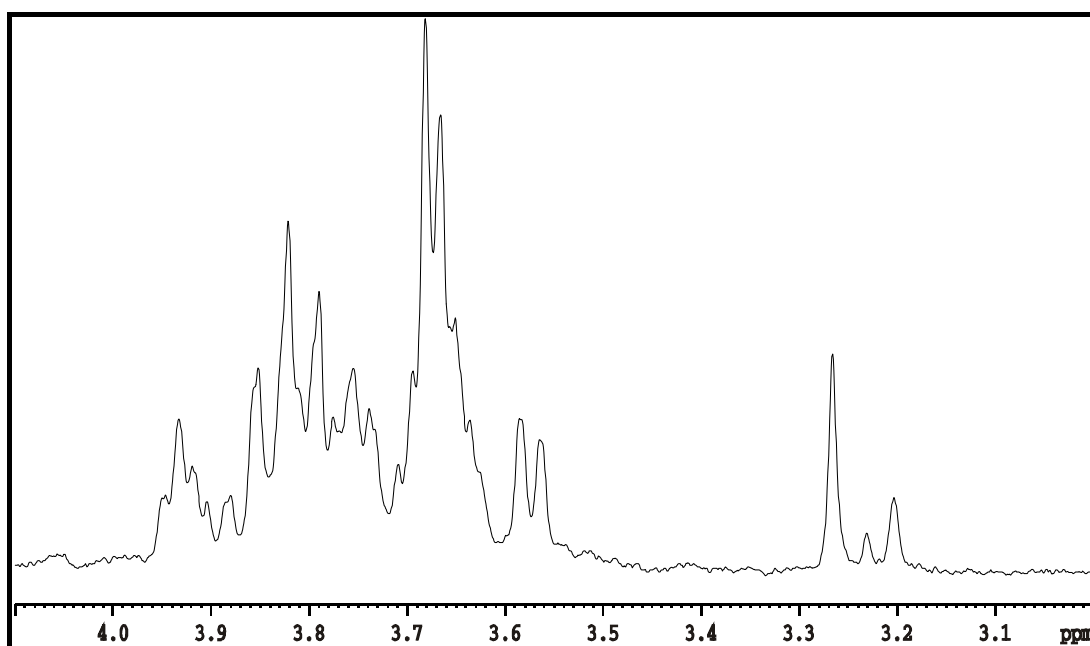


FIGURA 4.10: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Pcor** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

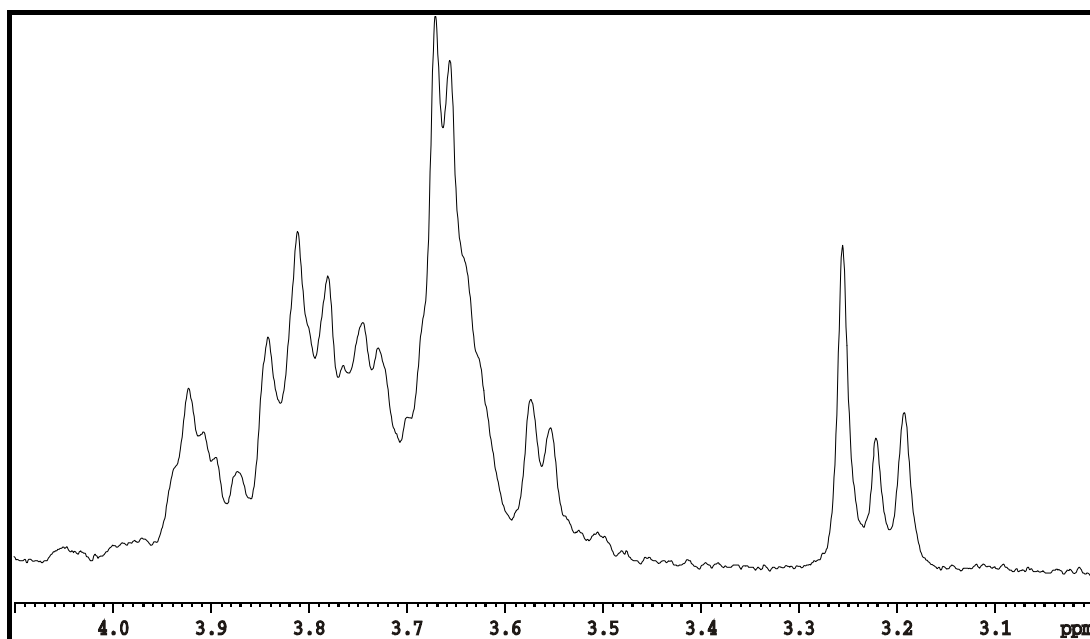


FIGURA 4.11: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Pdei** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

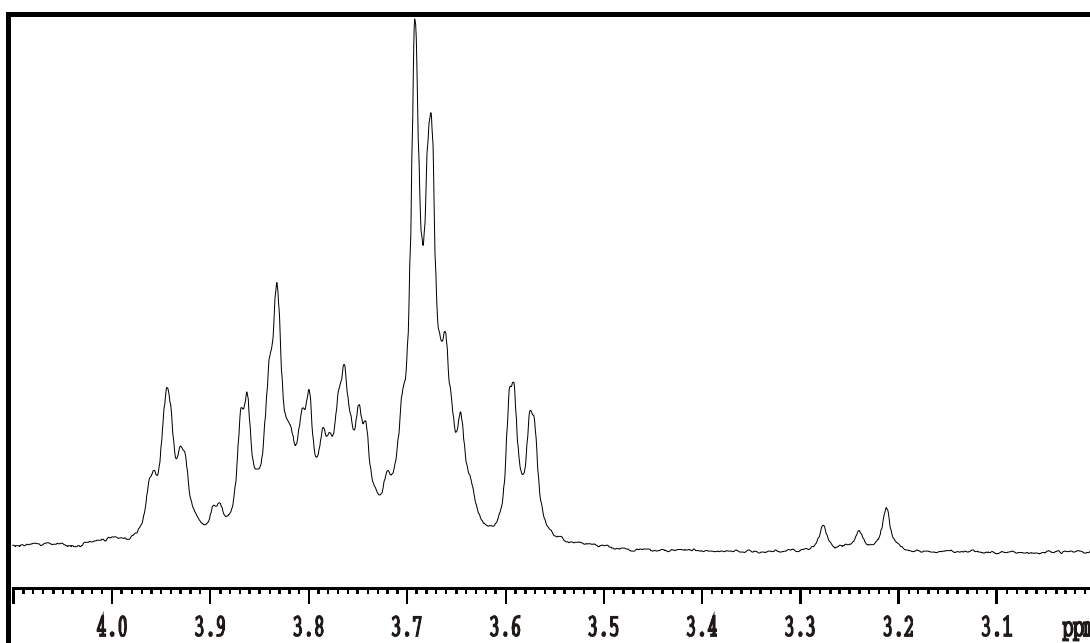


FIGURA 4.12: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Pdiil** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

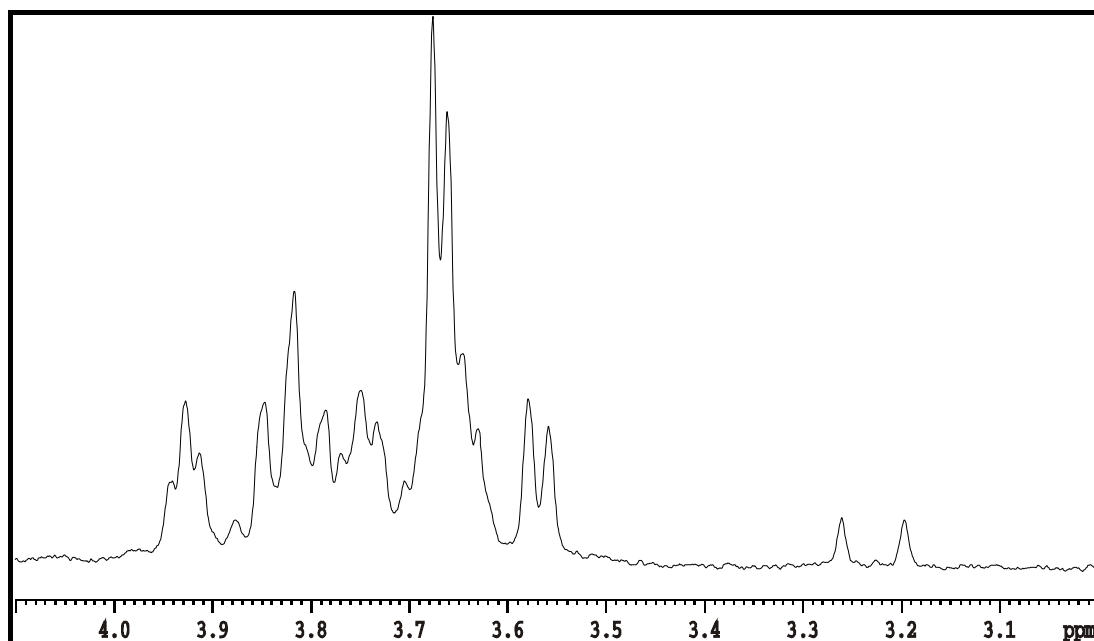


FIGURA 4.13: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Pmes** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

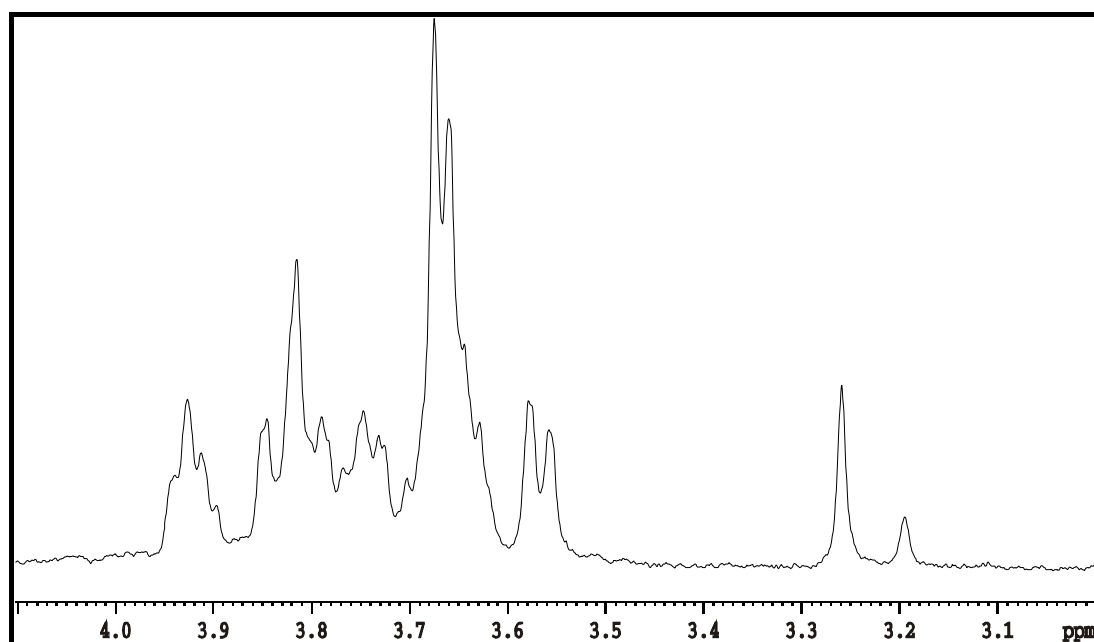


FIGURA 4.14: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra **Ptinc** (DRX400 Bruker 9,4 T) – material intacto.

A região espectral com presença de sinais nas análises de RMN HR-MAS de ^1H corresponde à região de carboidratos de 3,0-4,0 ppm. Nos líquens, são encontrados os carboidratos de alta e baixa massa molecular (CARBONERO, 2005). Os carboidratos de alta massa molecular compreendem os polissacarídeos e são encontrados, principalmente, em duas classes: os heteropolissacarídeos contendo manose e as glucanas (CARBONERO et al., 2005a). Já os carboidratos de baixa massa molecular são muito pouco investigados em líquens (NISHIKAWA et al., 1973; LINDBERG et al., 1953). Nesta classe, encontram-se os monossacarídeos (pentoses, metilpentoses, hexoses e cetoses), polióis (moléculas contendo entre 3 a 7 átomos de carbono) e os oligossacarídeos (GORIN et al., 1993). Os polióis são os carboidratos que ocorrem predominantemente em líquens, sendo que nesse grupo o manitol e o arabinitol destacam-se por sua grande ocorrência, embora muitos outros estejam presentes com menor frequência, tais como o glicerol, eritritol, ribitol, xilitol, entre outros (XAVIER-FILHO et al.; 2006). Desta forma, um experimento de gHSQC na sonda HR-MAS foi obtido para a investigação desses compostos.

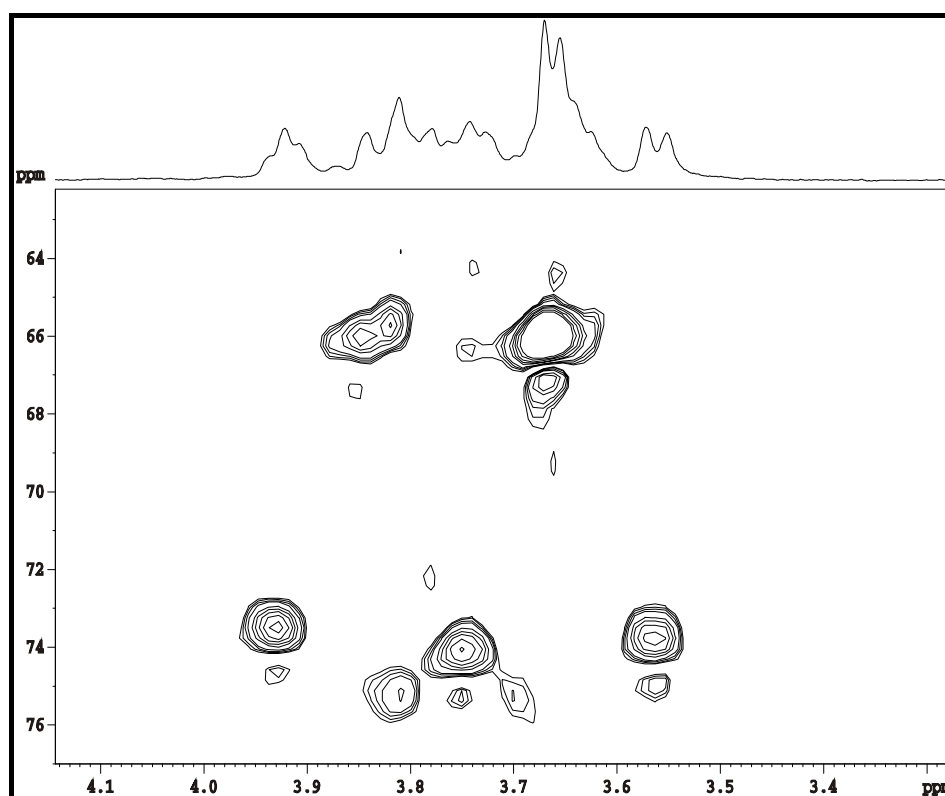


FIGURA 4.15: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC na sonda HR-MAS (DRX400 Bruker 9,4 T), de uma amostra de líquen intacto.

As correlações de ^{13}C obtidas pelo gHSQC foram observadas na região de 66-76 ppm (Figura 4.15), as quais correspondem aos polióis de líquens, visto que os hidrogênios anoméricos dos oligo- e polissacarídeos não foram observados. A identificação dos polióis pela análise de RMN HR-MAS, foi realizada mediante a comparação com dados da literatura, os quais correspondem aos sinais do arabinitol e manitol (AMENDOLIA et al., 1998; HIMMEILREICH et al., 2003; MANNINA et al., 2004, MATULOVÁ e HRICOVÍNIOVÁ, 2002; DE PAULA et al., 1998). Os sinais na região de δ 3,1 a 3,4 ppm não foram identificados (Figura 4.16).

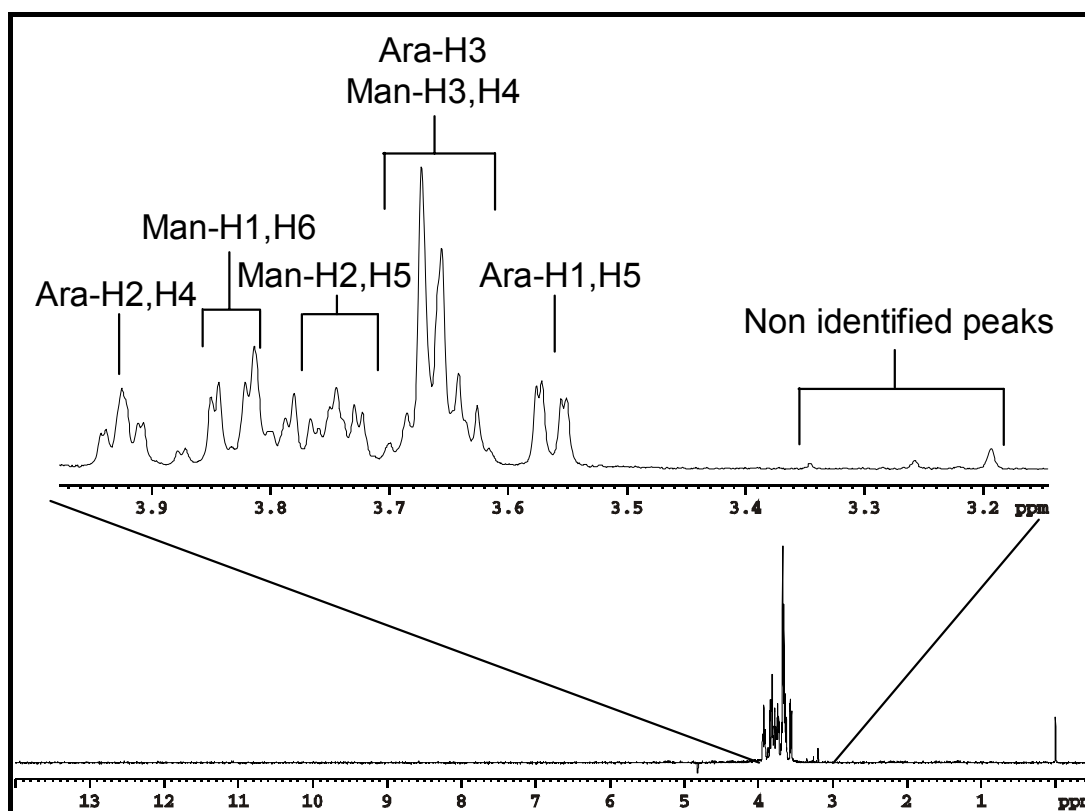


FIGURA 4.16: Espectro de RMN HR-MAS de ^1H de uma amostra de líquen com atribuições dos polióis arabinitol e manitol.

Os resultados, destacados posteriormente nas análises quimiométricas, apontam os carboidratos de baixa massa molecular, no caso os polióis, também como potenciais chaves na identificação quimiotaxonômica. A proposta da utilização da HR-MAS evidencia como essa técnica pode ser útil na quimiotaxonomia de líquens, pois como é analisado o material intacto, são os compostos provenientes de metabolismo primário, principalmente os carboidratos, que são detectados e analisados.

4.2.2 – Análise quimiométrica dos dados de RMN HR-MAS de ^1H

A matriz gerada possui 11 amostras e 320 variáveis. A visualização de todos os espectros de RMN HR-MAS de ^1H encontra-se destacada na figura 4.17.

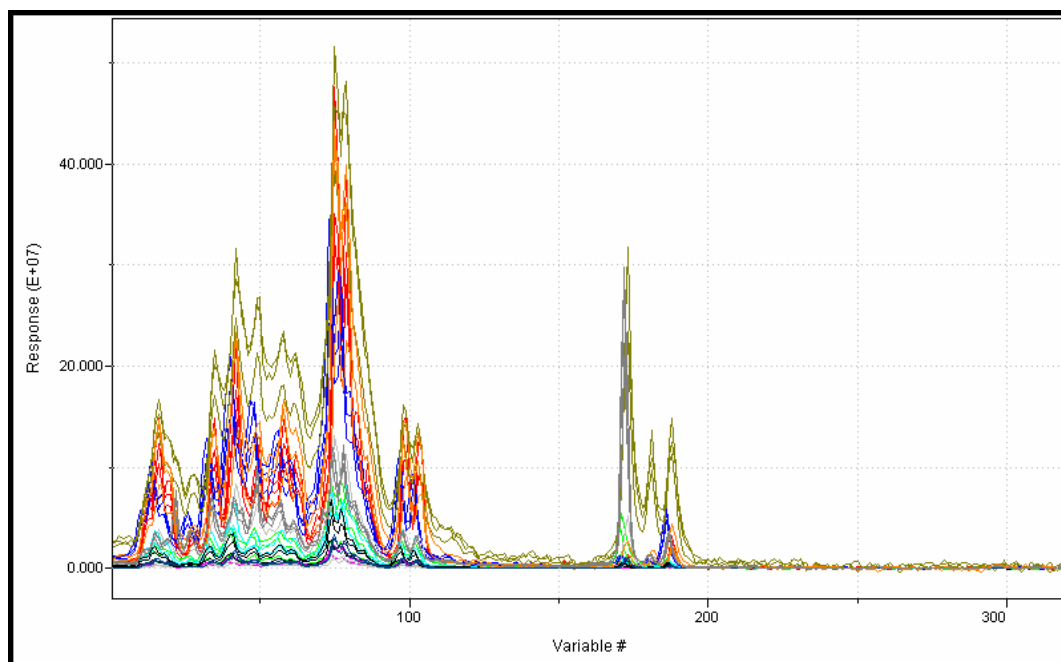


FIGURA 4.17: Visualização de todos os espectros de RMN HR-MAS empregados na análise quimiométrica.

4.2.2.1 – Análise exploratória

a) Todas as amostras de líquens (Famílias Physciaceae e Parmeliaceae)

Para as amostras analisadas na sonda HR-MAS observou-se a discriminação entre as famílias Parmeliaceae e Physciaceae, conforme mostra o gráfico de HCA (Figura 4.18). Na análise de agrupamentos hierárquicos das amostras, as melhores condições foram:

- Pré-processamento: autoescalamiento (após a remoção dos ruídos, para garantir que todos os sinais tenham a mesma importância);
- Transformação: Normalização dos espectros;
- Conexão: completa.

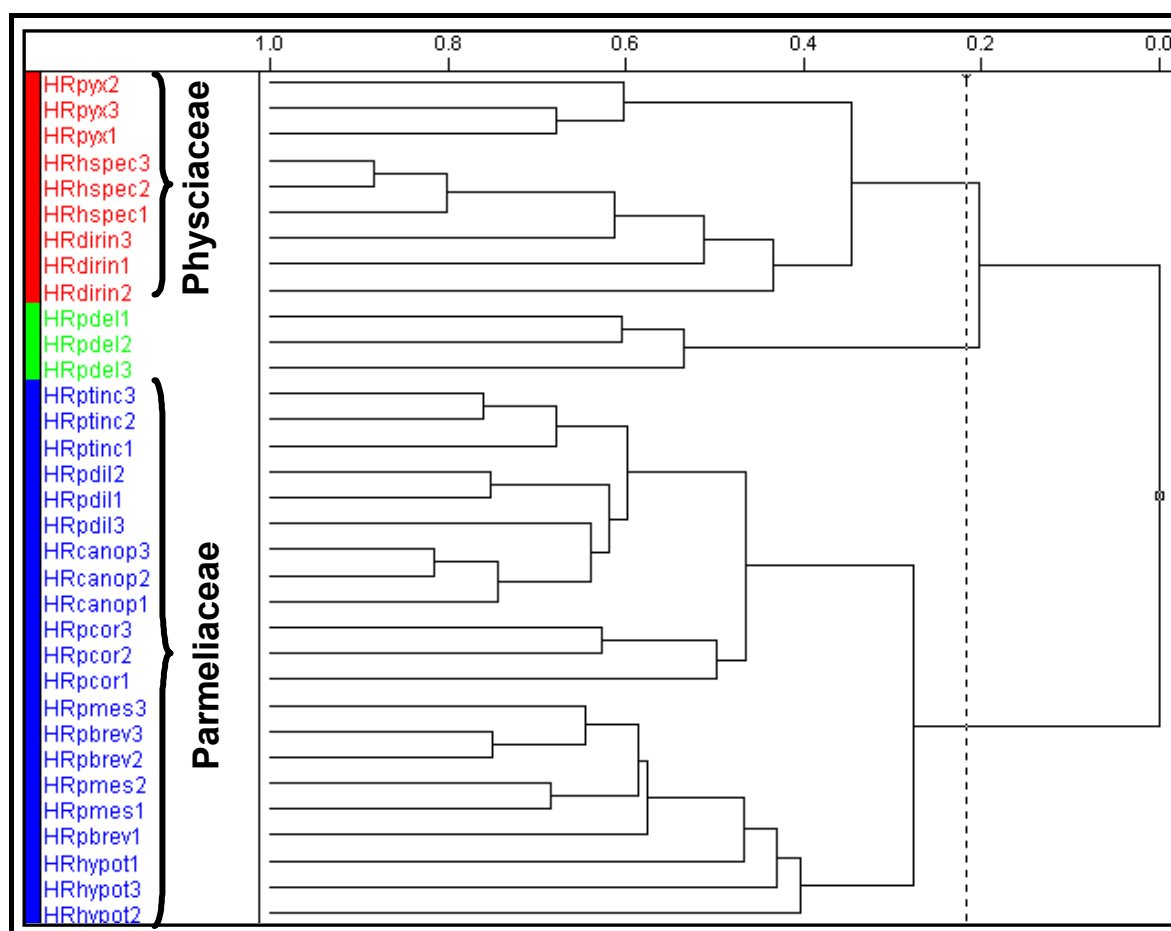


FIGURA 4.18: Gráfico de HCA de todas as amostras de líquens (análise de RMN HR-MAS) com índice de similaridade 0,217.

Embora a análise exploratória tenha fornecido informações relevantes quanto às famílias dos líquens analisados, a amostra *Parmotrema delicatulum* (**Pdel**) apresentou comportamento anômalo pois, com o índice de similaridade de 0,271, ficou isolada dos dois grupos (Parmeliaceae e Physciaceae), apresentando uma proximidade maior com as amostras da família Physciaceae do que com a Parmeliaceae. Isso indica que a discriminação entre famílias de líquens via RMN HR-MAS de ^1H é bastante viável e a informação quimiotaxonômica é excelente, todavia como se trata da análise de uma classe muito ampla, podem estar intrínsecos alguns erros.

No gráfico de PCA de todas as amostras também se observa que há distinção entre os líquens das famílias Physciaceae e Parmeliaceae (Figura 4.19). As amostras **Pyx**, **Dirin** e **Hspec**, pertencentes à família Physciaceae, apresentaram valores mais negativos em PC2 e mais positivos em PC1, diferentemente das

demais amostras. Assim como no HCA, a amostra **Pdel** apresentou-se mais distante do seu grupo, com valores mais negativos de PC2, comparadas às demais amostras Parmeliaceae. Um outlier da amostra **Pbrev** foi observado na análise de PCA de todas as amostras.

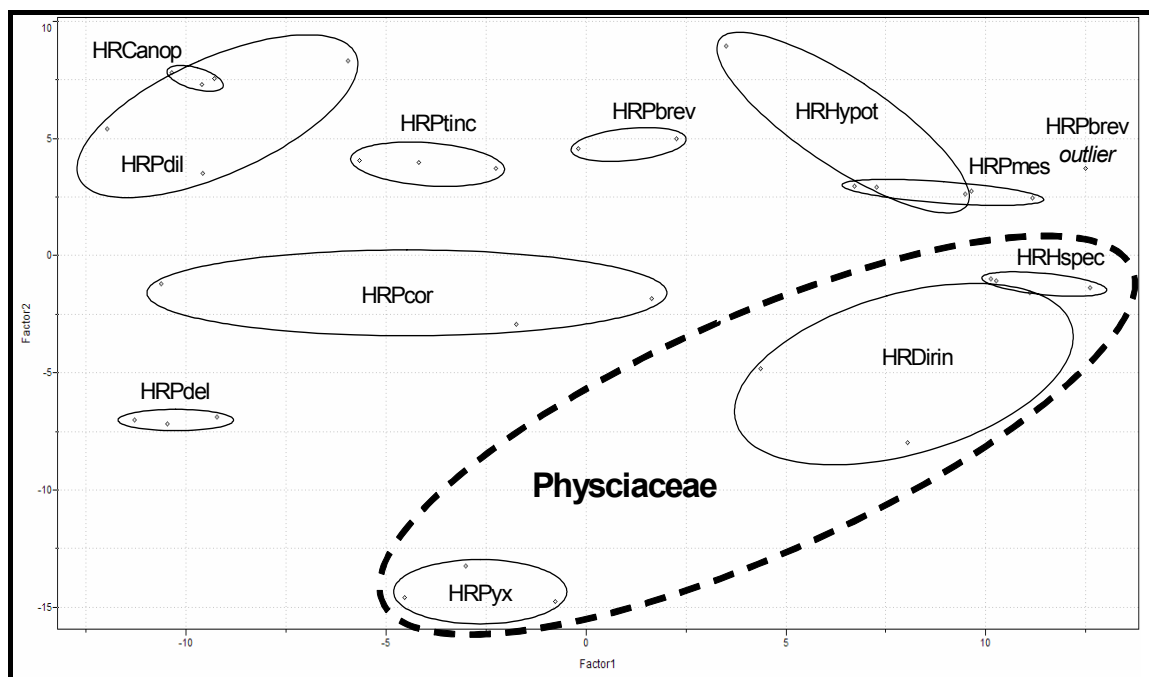


FIGURA 4.19: Gráfico de scores de todas as amostras de líquens estudadas – análise de RMN HR-MAS de ^1H (PC1 x PC2, 21,7 e 12,8%, respectivamente).

O gráfico de PC1xPC2 de todas as amostras representa que 34,3% da informação do sistema estão contidas nessas duas componentes principais. Esse valor de porcentagem cumulativa é extraído da curva de variância (Figura 4.20), obtida na análise de componentes principais (PCA), somando-se os valores de PC1 e PC2. A partir da curva de variância, obtém-se também o posto, ou seja, o número máximo de componentes principais que descrevem a matriz. A estimativa do posto é efetuada avaliando-se a porcentagem de variância para cada componente principal, sendo que valores pequenos (abaixo de 5%) e tendentes à porcentagens constantes determinam essa informação. Desta forma, para a análise de todas as amostras por RMN HR-MAS, o posto estimado foi igual a 5, com porcentagem cumulativa de 54,7%, pois até PC5 há consideráveis variações dos percentuais de variância, enquanto a partir de PC6, as porcentagens de informação em cada PC são pequenas e sem variações (Figura 4.19).

Em todas as análises de PCA dos dados de RMN HR-MAS de ^1H , as melhores condições foram:

- Pré-processamento: autoescalamento.
- Transformação: 1ª derivada e normalização dos espectros;

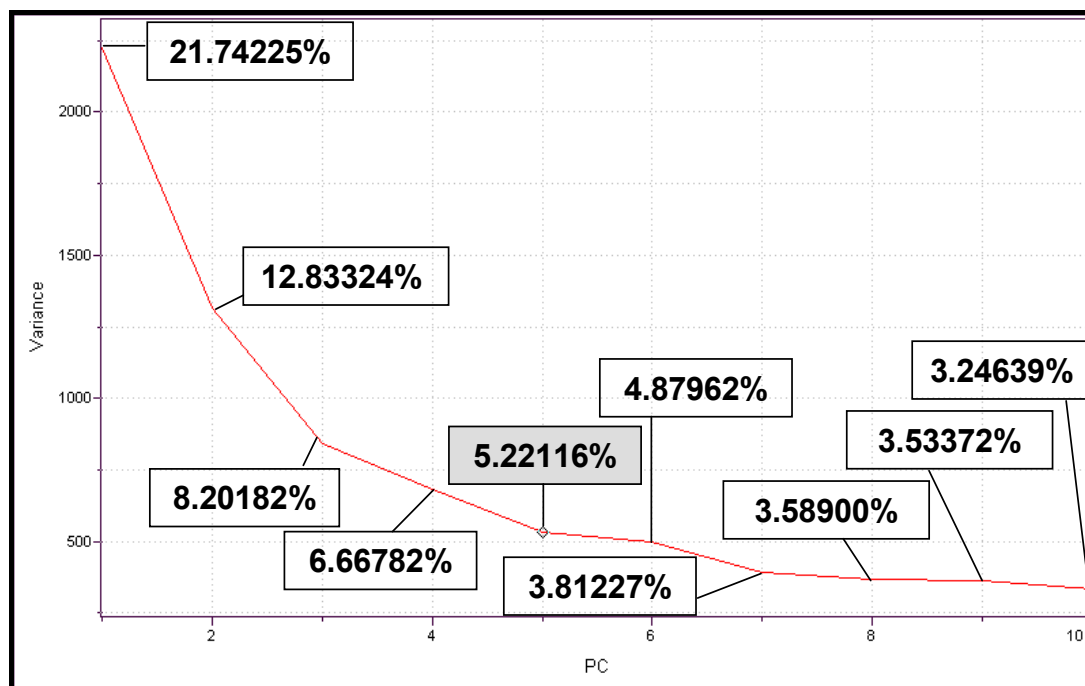


FIGURA 4.20: Curva de variância *versus* componentes principais, extraída da análise de PCA de todas as amostras de líquens estudadas – análise de RMN HR-MAS de ^1H .

A aplicação da primeira derivada nos espectros foi necessária, pois esse tipo de pré-processamento apresentou um melhor agrupamento entre as replicatas. Para confirmar que essa operação matemática não implicaria no aumento significativo do ruído, foi avaliado o perfil espectral após a derivação. Os resultados obtidos foram muito satisfatórios, com boa relação sinal/ruído, indicando que a primeira derivada pode ser utilizada nas transformações antecedentes ao tratamento quimiométrico, como pode ser observado na figura 4.21.

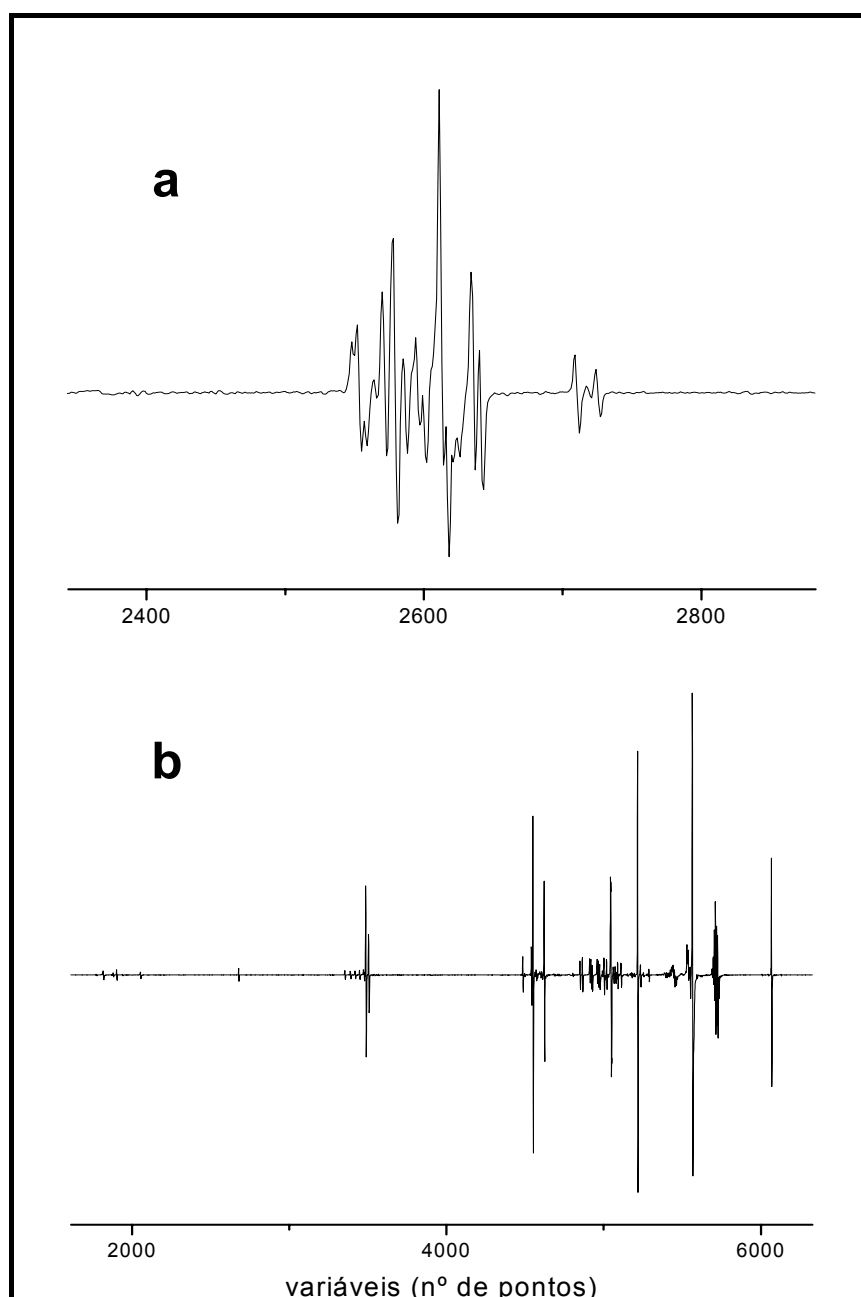


FIGURA 4.21: Espectros de RMN de ^1H , (a) HR-MAS e (b) em solução, após a aplicação da primeira derivada.

b) Família Physciaceae

Os três gêneros da família Physciaceae foram discriminados no gráfico de *scores* de PC1xPC2 (Figura 4.22), o qual contém 54,4% de informação do sistema. Para a discriminação dos gêneros de Physciaceae, as mesmas condições de tratamento quimiométrico foram empregadas e o posto foi também estimado para 5, com 89,5% de descrição do sistema. No entanto, pode-se observar através do agrupamento das replicatas que a reprodutibilidade das análises na sonda HR-MAS é menor quando comparada com a RMN em solução (vide Figura 4.109, página

123). Esse resultado deve-se ao fato da análise de RMN do material heterogêneo, devido às condições de preparo, principalmente no que diz respeito ao empacotamento da amostra no rotor, e a homogeneidade da amostra serem mais difíceis de ser reproduzidas.

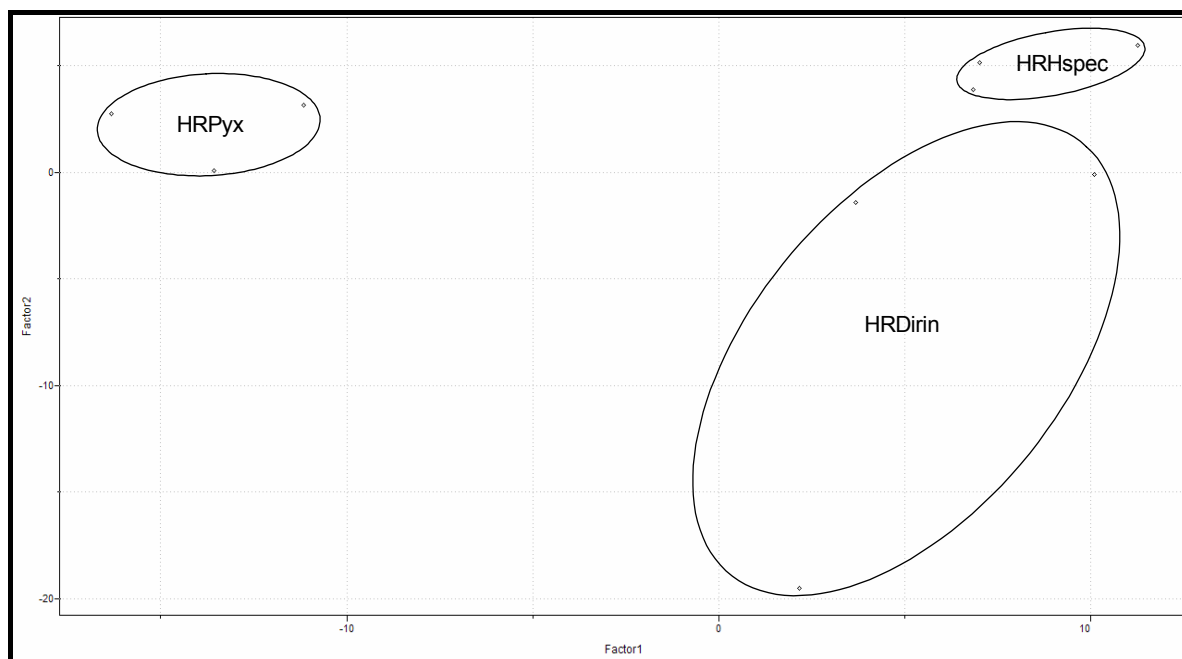


FIGURA 4.22: Gráfico de *scores* das amostras de líquens da família Physciaceae – análise de RMN HR-MAS de ^1H (PC1 x PC2, 35,8 e 18,6%, respectivamente).

c) Família Parmeliaceae

A análise quimiométrica dessa família (Figura 4.23) apresentou uma boa discriminação entre as espécies, embora não tenha sido possível o agrupamento das amostras referentes a um mesmo gênero, como é o caso dos *Parmotrema*, diferenciando-as dos gêneros *Canoparmelia* e *Hypotrachyna*. O gráfico de *scores* de PC1xPC2 representa 38,6% de informação e o posto foi estimado para 6, com 65,5% de descrição cumulativa do sistema.

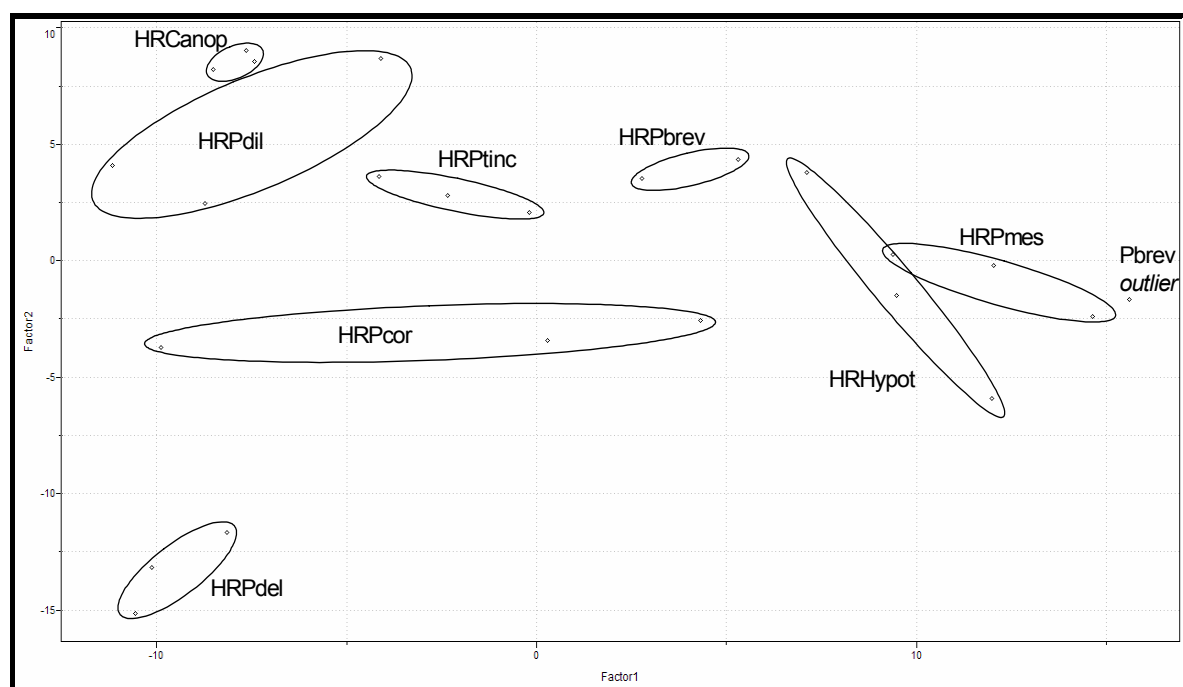


FIGURA 4.23: Gráfico de *scores* das amostras de líquens da família Parmeliaceae – análise de RMN HR-MAS de ^1H (PC1 x PC2, 24,9 e 13,7%, respectivamente).

d) Gênero *Parmotrema*

Todas as espécies do gênero *Parmotrema* foram perfeitamente discriminadas via RMN HR-MAS de ^1H e quimiometria. O gráfico de *scores* de PC1xPC2 (Figura 4.24), com 42,0% de informação do sistema, apresentou uma das replicatas da amostra *Parmotrema breviciliatum* (**Pbrev**) como um *outlier*, ou seja, possuiu um comportamento anômalo não se agrupando com as demais replicatas. O posto avaliado para essa análise de PCA foi igual a 5, com 58,1% de descrição cumulativa do sistema.

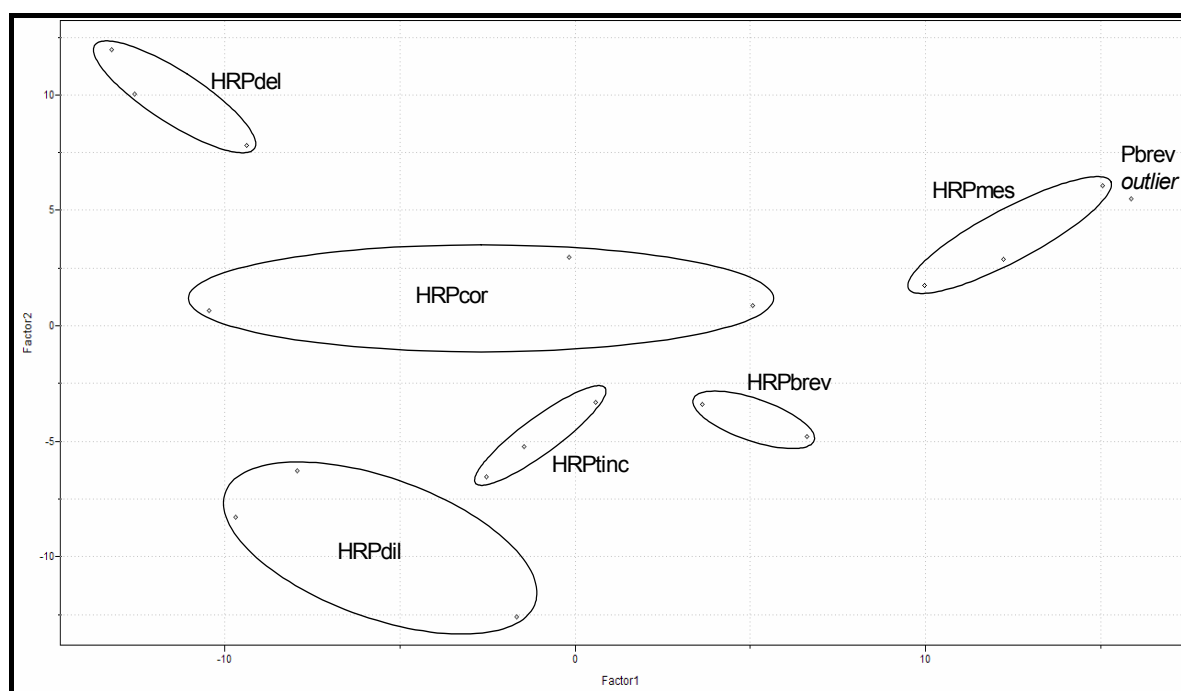


FIGURA 4.24: Gráfico de scores das amostras de líquens do gênero *Parmotrema* – análise de RMN HR-MAS de ^1H (PC1 x PC2, 27,7 e 14,3%, respectivamente).

A influência das regiões espectrais de HR-MAS para as análises quimiométricas foi avaliada a partir do gráfico de poder discriminante, obtido para as componentes principais de maior porcentagem de informação, PC1 e PC2 (Figura 4.25). Nesse gráfico a intensidade dos sinais corresponde à relevância daquela região para as análises exploratórias. Assim, como destacado na figura 4.24, os sinais em δ 3,2-3,3 contêm a maior quantidade de informação na discriminação quimiométrica, seguido da região em δ 3,65-3,70 e 3,85-4,00.

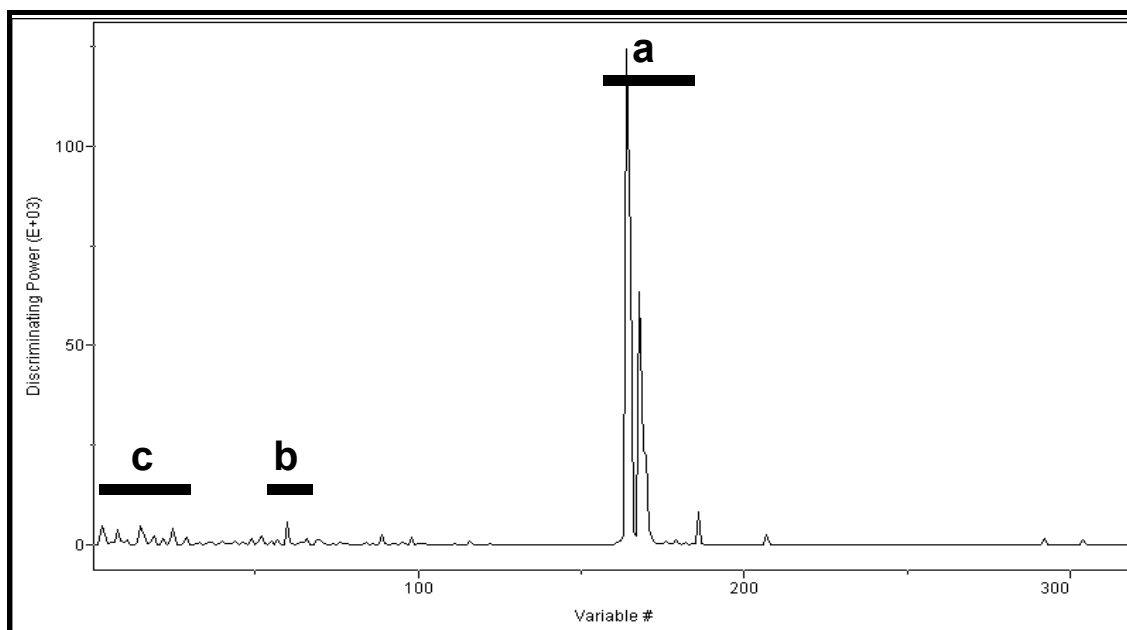


FIGURA 4.25: Gráfico mostrando o poder discriminante dos sinais de RMN HR-MAS de ^1H – material intacto, com destaque às regiões mais relevantes na análise quimiométrica: a) δ 3,20-3,30; b) δ 3,65-3,70; c) δ 3,85-4,00.

4.2.2.2 – Classificação de amostras desconhecidas

Antes da predição de amostras foi construído um modelo pelo método KNN, empregando-se todas as amostras padrões. O modelo foi construído com um vizinho mais próximo, pois com esse valor há somente três erros de predição, conforme mostra a figura 4.26.

A classificação de amostras desconhecidas ao modelo foi realizada com um conjunto de vinte e quatro amostras, correspondentes a oito classes em triplicata, das quais cinco amostras foram preditas erroneamente (Tabela 4.1). Dentro das cinco predições incorretas, como mostrado na tabela 4.1, foram observados dois erros de classificação dentro das triplicatas, como foi o caso da amostra **HR3b**, correspondente ao líquen **Canop** e amostra **HR5b** correspondente ao líquen **Pdil**. Somente uma espécie de líquen foi completamente classificada de forma inadequada (amostra **Ptinc**). Desta forma, embora as análises de HR-MAS de ^1H padeçam de alguns inconvenientes, tais como reprodutibilidade, o percentual de acerto da classificação é considerado muito satisfatório, pois apresentou um acerto de 70,8%.

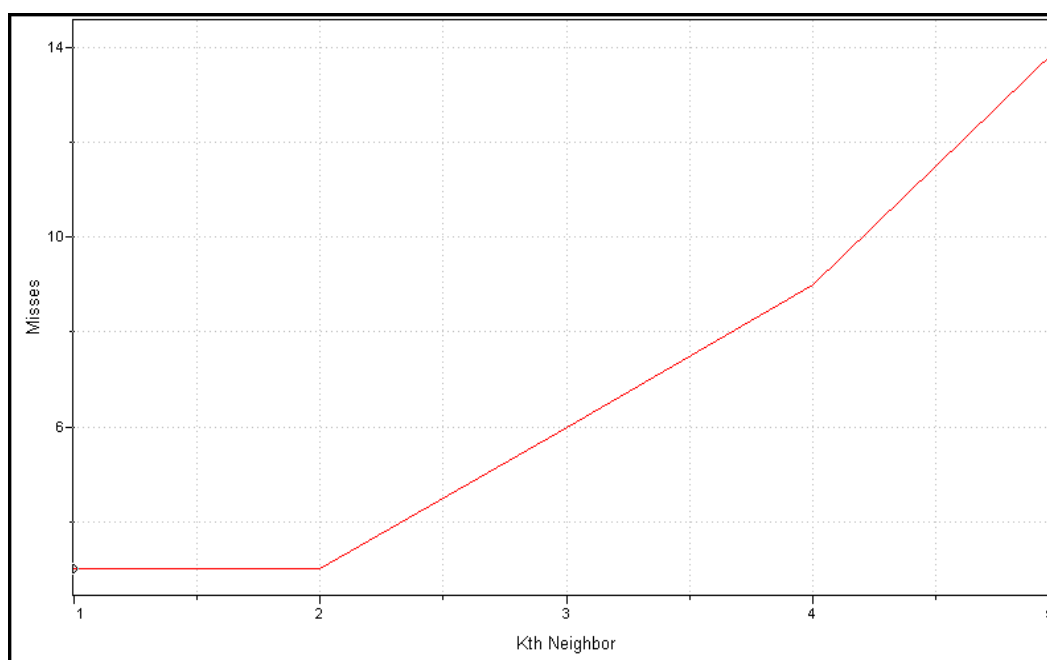


FIGURA 4.26: Gráfico mostrando os erros do modelo de predição de amostras intactas (RMN HR-MAS) em função do número de vizinhos empregados na análise por KNN.

TABELA 4.1: Classificação de amostras desconhecidas através da análise de RMN HR-MAS de ^1H .

Amostras desconhecidas	Classificação por KNN	Classificação correta?
HR1a	Hspec	✓
HR1b	Hspec	✓
HR1c	Hspec	✓
HR2a	Dirin	✓
HR2b	Dirin	✓
HR2c	Dirin	✓
HR3a	Pbrev	✓
HR3b	Canop	não (Pbrev)
HR3c	Pbrev	✓
HR4a	Pcor	✓
HR4b	Pcor	✓
HR4c	Pcor	✓
HR5a	Pdil	✓
HR5b	Pmes	não (Pdil)

HR5c	Pdil	✓
HR6a	Pmes	✓
HR6b	Pmes	✓
HR6c	Pmes	✓
HR7a	Pbrev	não (Ptinc)
HR7b	Pmes	não (Ptinc)
HR7c	Pmes	não (Ptinc)
HR8a	Pyx	✓
HR8b	Pyx	✓
HR8c	Pyx	✓

A discriminação dos líquens em família, gênero e espécies e a classificação de amostras via RMN HR-MAS de ^1H e quimiometria foi satisfatória, embora resultados mais interessantes tenham sido encontrados com as técnicas de RMN em solução e IV. A análise do material intacto é sem dúvida um grande atrativo da técnica HR-MAS, no entanto, os problemas de agrupamento das replicatas implicam no menor percentual de classificação entre as três técnicas utilizadas.

4.3 - Análise dos Extratos Brutos por Espectroscopia de RMN em solução

4.3.1 – Os espectros de RMN em solução e a elucidação dos metabólitos em mistura

A análise de RMN em solução corresponde à obtenção de espectros a partir dos extratos brutos solubilizados em DMSO-d₆.

Os espectros de RMN do material intacto (HR-MAS) e do extrato bruto foram muito diferentes, devido ao fato de no extrato encontrarem-se os metabólitos secundários do líquen, enquanto na análise do material intacto esses estão em menor proporção comparados aos constituintes da parede celular e aos compostos de metabolismo primário.

Os sinais observados nos espectros de RMN de ¹H compreendem a região espectral de 0,8 a 14,0 ppm. Cada espécie analisada apresentou sinais de RMN de ¹H característicos da presença de alguns metabólitos secundários majoritários, bem como a presença de alguns sinais de polióis, observados principalmente na região de 66-80 ppm dos espectros de RMN de ¹³C. A atribuição dos sinais de RMN e a elucidação estrutural das substâncias liquênicas foram efetuadas a partir dos experimentos de RMN dos extratos brutos, ou seja, sem nenhum processo de isolamento e purificação. A seguir, é apresentado o perfil do espectro de RMN de ¹H de todos os extratos, bem como os experimentos de RMN (1D e 2D) necessários para a identificação dos metabólitos secundários.

As substâncias elucidadas nas espécies estudadas já estão descritas na literatura, no entanto, a partir desse trabalho pode-se encontrar a confirmação de suas estruturas, bem como a apresentação de muitos dados de RMN que não estavam completamente relatados. Alguns valores de constantes de acoplamento e multiplicidade, não descritos, puderam ser atribuídos.

É importante destacar que, por se analisar o extrato bruto em DMSO-d₆, algumas hidroxilas dos ácidos liquênicos não foram observadas, exceto as hidroxilas queladas, devido à troca química dos hidrogênios hidroxilícos pelo deutério da água presente no solvente. Entretanto, a identificação dessas substâncias não foi prejudicada, pois os valores de deslocamentos químicos dos carbonos diretamente ligados a essas hidroxilas são facilmente detectados ($\delta \sim 156-162$)

4.3.1.1 – Líquen *Dirinaria aspera* (Dirin)

A amostra **Dirin** (*Dirinaria aspera*) apresentou sinais de RMN de ^1H (Figura 4.27) característicos dos metabólitos secundários atranorina (**1**) e ácido divaricático (**2**), confirmados pelos experimentos bidimensionais *g*HSQC e *g*HMBC (Figuras 4.29 a 4.34). Para a completa atribuição, foi adquirido o espectro de RMN de ^{13}C da amostra (Figura 4.28), visto que somente pelos dados de 2D não foi possível a total identificação.

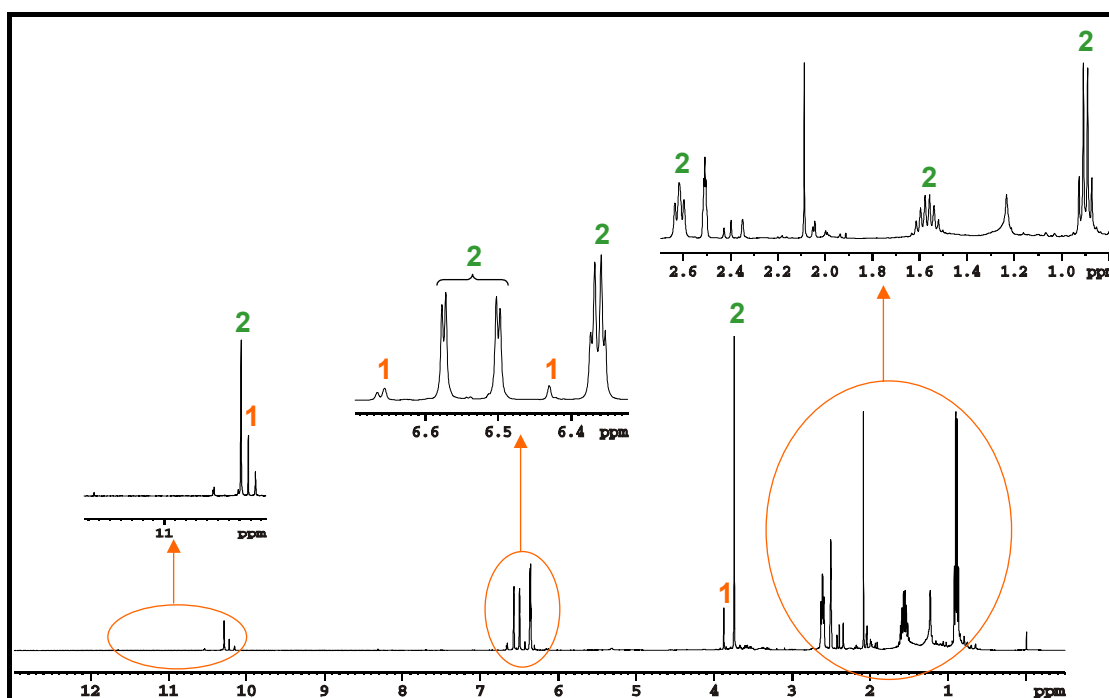
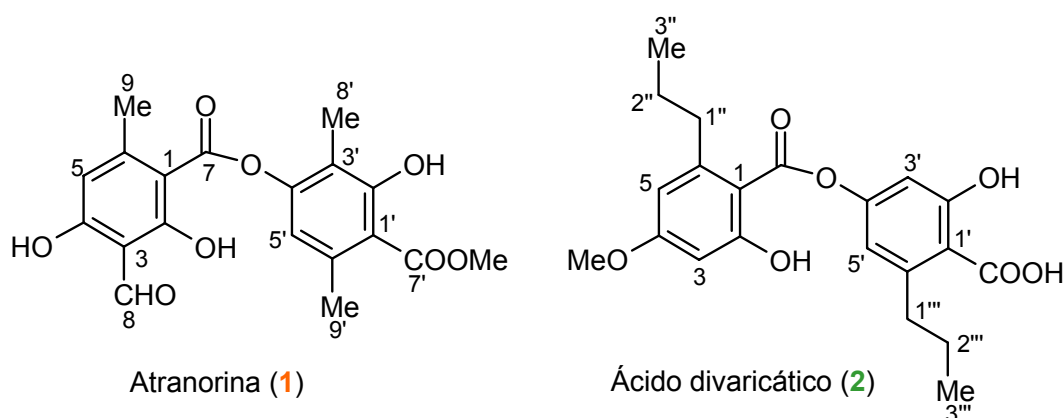


FIGURA 4.27: Espectro de RMN de ^1H da amostra **Dirin** (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.

A substância atranorina (**1**) foi identificada pela presença do singlete em δ 3,88 correspondente aos hidrogênios metoxílicos, dos dois singletos aromáticos em δ 6,43 e 6,65, correspondentes a H-5 e H-5' (Figura 4.27) e do singlete em δ 10,22 referente ao hidrogênio aldeídico H-8, com correlação direta no experimento de HSQC com o carbono em δ 193,8, (Figura 4.31). A elucidação completa dos sinais da substância atranorina (**1**) (Tabela 4.2) foi realizada com o auxílio dos espectros de RMN dos demais extratos, os quais apresentaram a atranorina na composição, devido a sua presença minoritária na amostra **Dirin**. A investigação dessa substância nos demais extratos foi realizada, principalmente, pela análise dos sinais de RMN de ^1H aqui destacados.

Recentemente, CARVALHO e colaboradores (2000) apresentaram o assinalamento completo da atranorina (**1**) por RMN ^1H , ^{13}C e HMBC. Esses dados, obtidos em CDCl_3 , encontram-se em concordância com os apresentados neste trabalho, embora algumas variações nos valores de deslocamentos químicos possam ser observadas devido à diferença de solventes (Tabela 4.2).

TABELA 4.2: Atribuições dos sinais de RMN da substância atranorina (**1**) (DMSO-d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	CARVALHO et al., 2000 (ppm)*	
				$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	110,6	-	-	102,8
2	-	161,7	-	-	169,1
3	-	107,8	-	-	108,5
4	-	163,4	-	-	167,5
5	6,43 (s)	108,9	21,0; 107,8; 110,6	6,39 (s)	112,8
6	-	148,9	-	-	152,4
7	-	164,4	-	-	169,7
8	10,22 (s)	193,8	161,7	10,30 (s)	193,8
9	2,40 (s)	21,0	108,9; 110,6; 148,9	2,67 (s)	25,6
1'	-	115,3	-	-	110,3
2'	-	157,3	-	-	162,8

3'	-	116,3	-	-	116,7
4'	-	151,4	-	-	152,0
5'	6,65 (s)	115,7	21,1; 115,3; 151,4	6,50 (s)	115,9
6'	-	136,5	-	-	139,9
7'	-	169,8	-	-	172,2
8'	2,04 (s)	9,2	116,3; 151,4; 157,3	2,07 (s)	9,4
9'	2,35 (s)	21,1	115,7; 136,5	2,53 (s)	24,0
- COOMe	3,88 (s)	52,3	169,8	3,97	52,3
2'-OH	10,54 (s)	-	115,4; 136,5; 157,3	11,94 (s)	-

* Dados da literatura obtidos em CDCl₃/ 400 MHz (¹H).

A substância ácido divaricático (**2**), presente majoritariamente no líquen **Dirin** apresentou sinais de hidrogênios alifáticos, aromáticos e carbinólicos bem definidos (Figura 4.27). A seguir estão apresentados a tabela com as atribuições dos sinais de RMN (Tabela 4.3) e o espectro de RMN de ¹³C da amostra **Dirin** com os sinais da substância ácido divaricático (**2**) em destaque (Figura 4.28), bem como os experimentos bidimensionais analisados (Figuras 4.29 a 4.34). Numa das revisões mais recentes da literatura de líquens (HUNECK e YOSHIMURA, 1996), não há registros da identificação do ácido divaricático (**2**) por RMN, somente espectroscopia de infravermelho, espectrometria de massas e derivação química.

FIGURA 4.3: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido divaricático (**2**) (DMSO-d₆, DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC
1	-	111,8	-
2	-	157,8	-
3	6,35 (d, J=2,31 Hz)	99,0	106,8; 111,8; 157,8; 161,6
4	-	161,6	-
5	6,37 (d, J=2,31 Hz)	106,8	35,7; 99,0; 111,8; 161,6; 166,7
6	-	142,4	-
7	-	166,7	-
1'	-	143,4	-
2'	-	158,8	-
3'	6,57 (d, J=2,10 Hz)	106,7	113,0; 118,9; 151,8; 158,8
4'	-	151,8	-
5'	6,50 (d, J=2,10 Hz)	113,0	35,66; 106,7; 118,9; 151,8

6'	-	118,9	-
7'	-	169,9	-
1''	2,61 (<i>t</i> , J=7,29 Hz) e	35,6	13,8; 24,1; 106,8; 111,8; 142,4
1'''	2,62 (<i>t</i> , J=7,29 Hz)	35,4	13,8; 113,0; 118,9; 143,4
2''	1,55 (<i>sext</i> , J=7,29 Hz)	23,8	13,8; 35,6
2'''	1,59 (<i>sext</i> , J=7,29 Hz)	24,1	13,8; 35,4
3'' e 3'''	0,89 (<i>t</i> , J=7,29 Hz) e 0,91 (<i>t</i> , J=7,29 Hz)	13,8	23,8; 24,1; 35,4; 35,6
MeO-4	3,74 (<i>s</i>)	55,1	161,6
2-OH	10,28 (<i>s</i>)	-	99,0; 111,8; 157,8

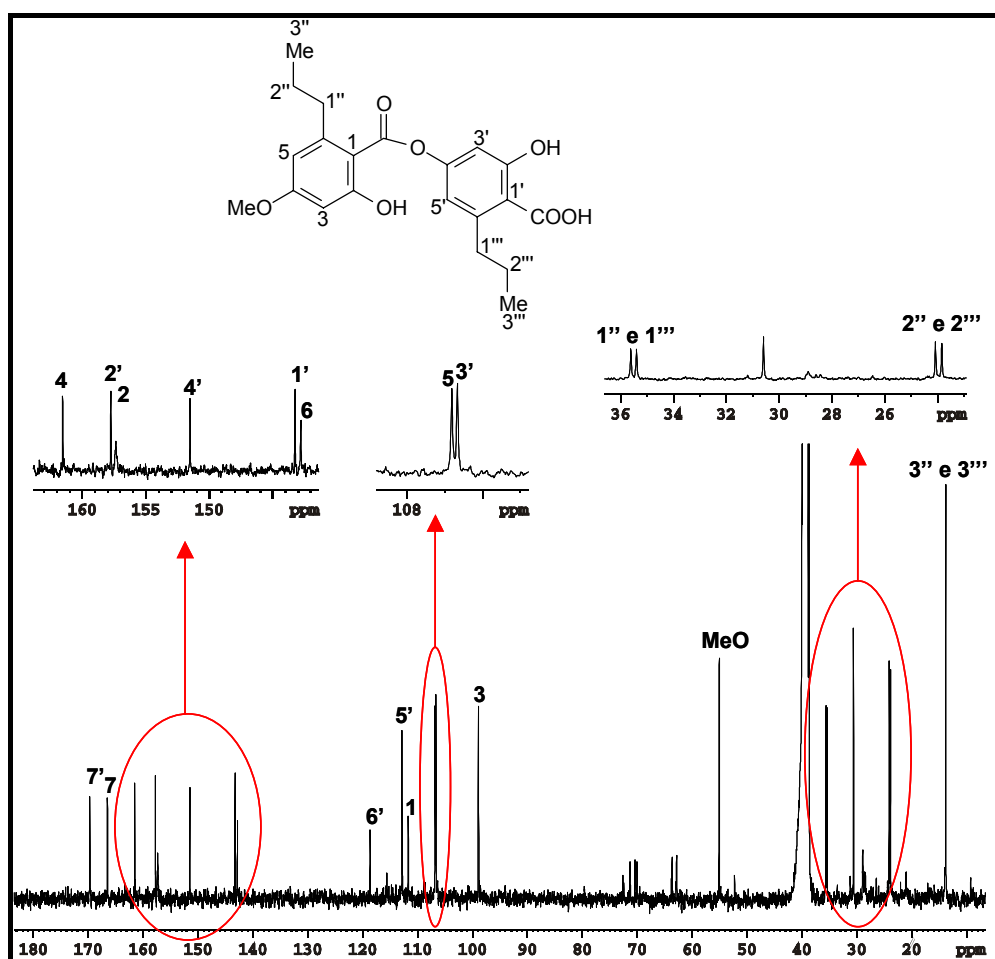


FIGURA 4.28: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra **Dirin** com atribuições do ácido divaricático (**2**) em destaque – análise de RMN em solução.

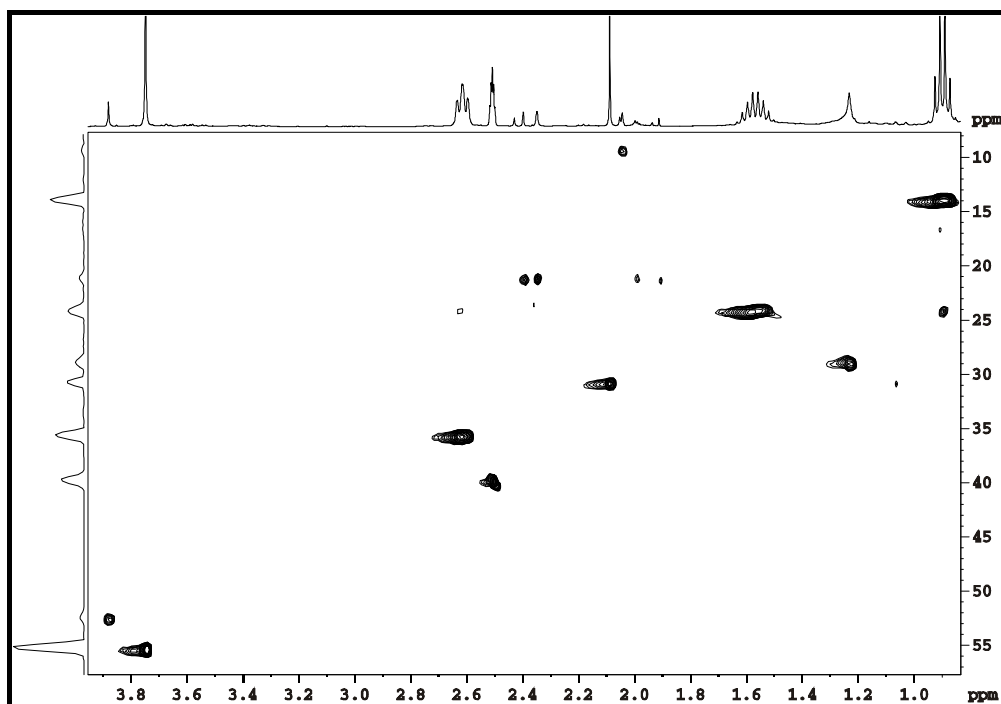


FIGURA 4.29: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Dirin** – ampliação 1.

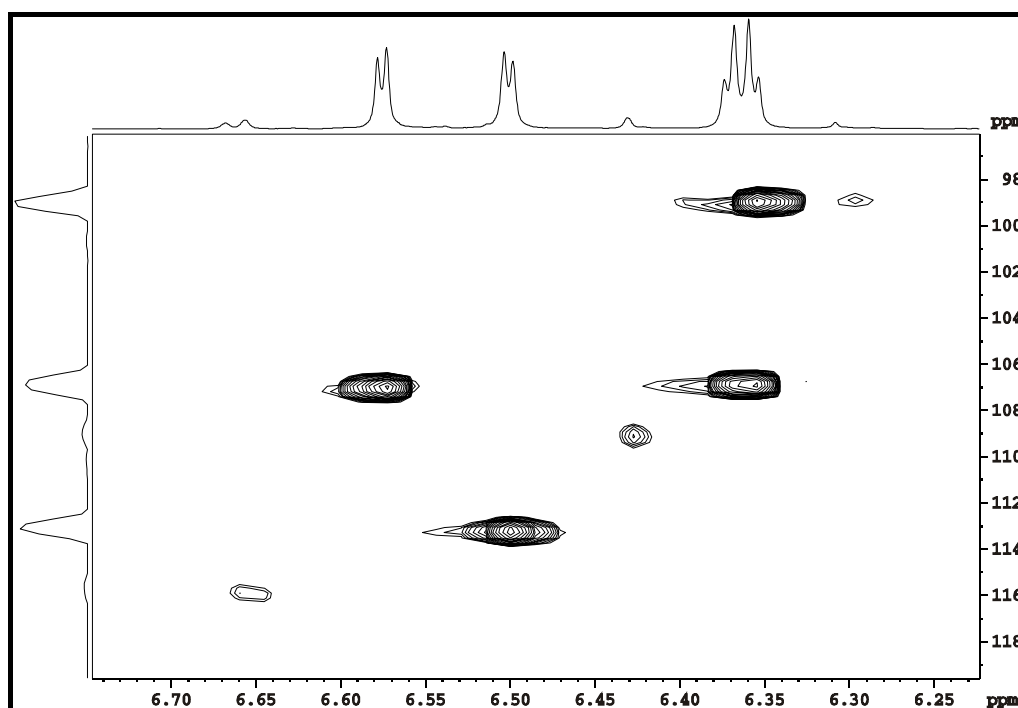


FIGURA 4.30: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Dirin** – ampliação 2.

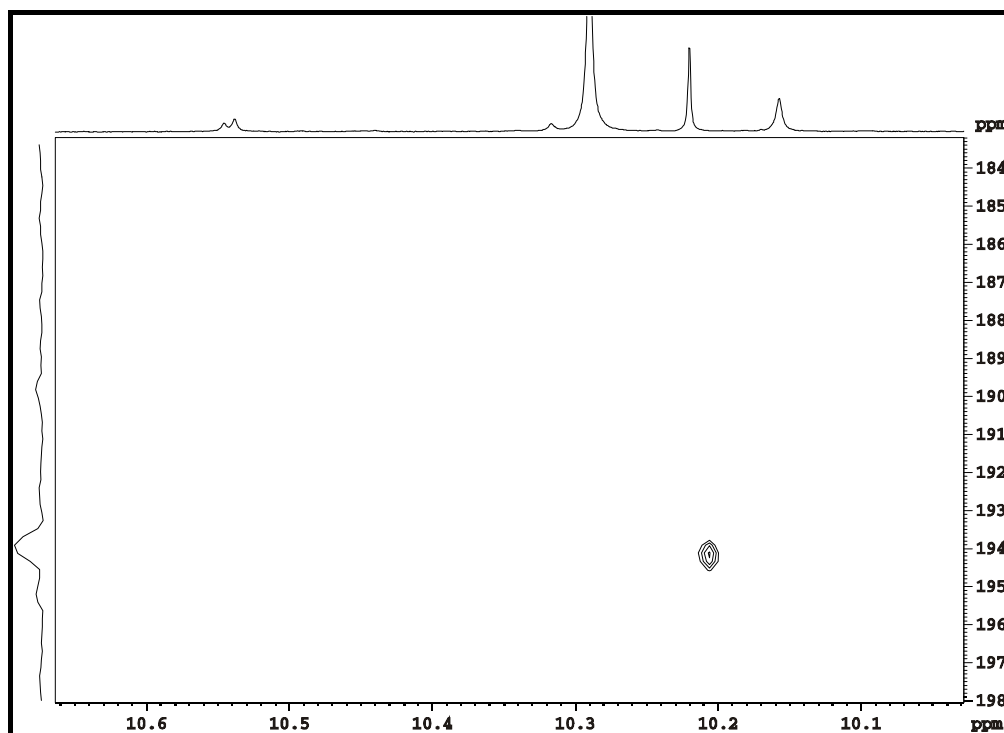


FIGURA 4.31: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Dirin** – ampliação 3.

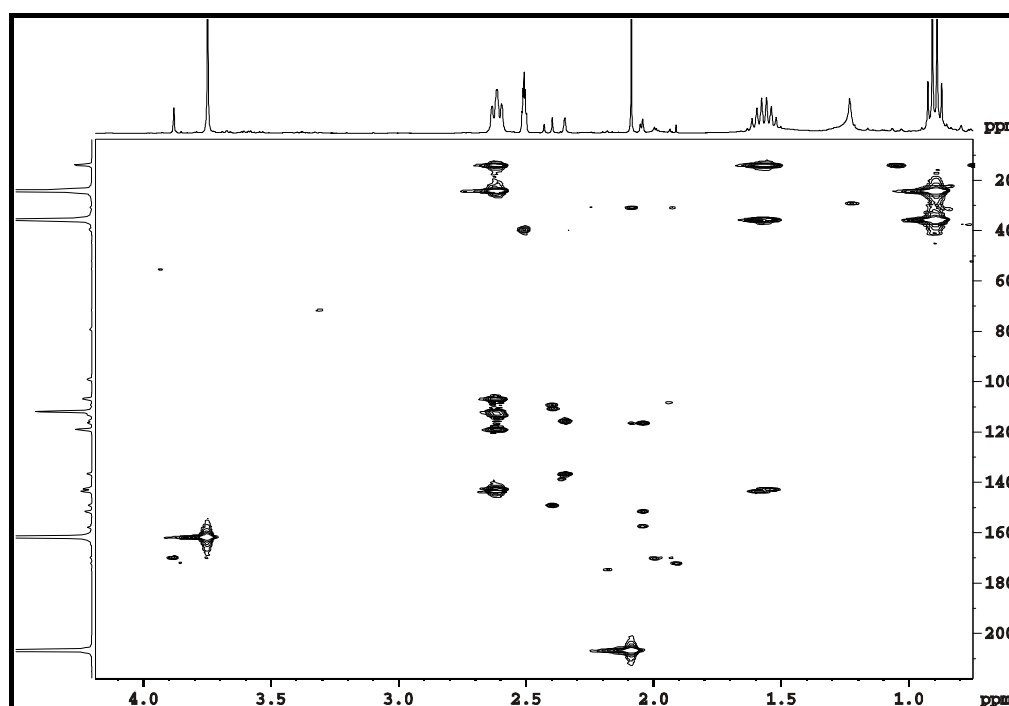


FIGURA 4.32: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Dirin** – ampliação 1.

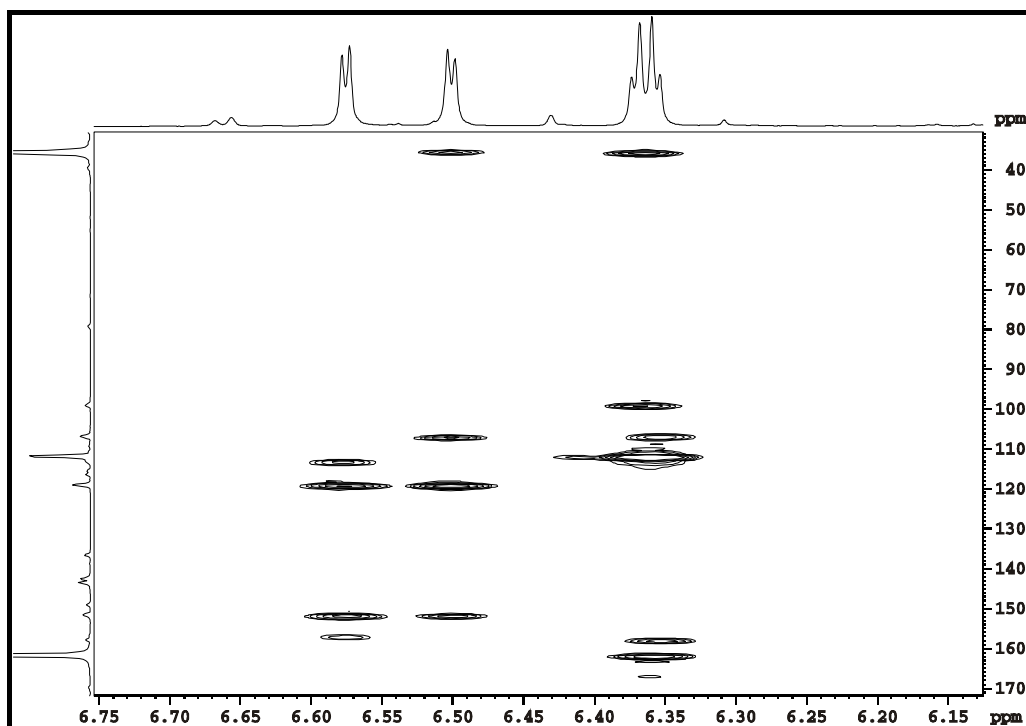


FIGURA 4.33: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Dirin** – ampliação 2.

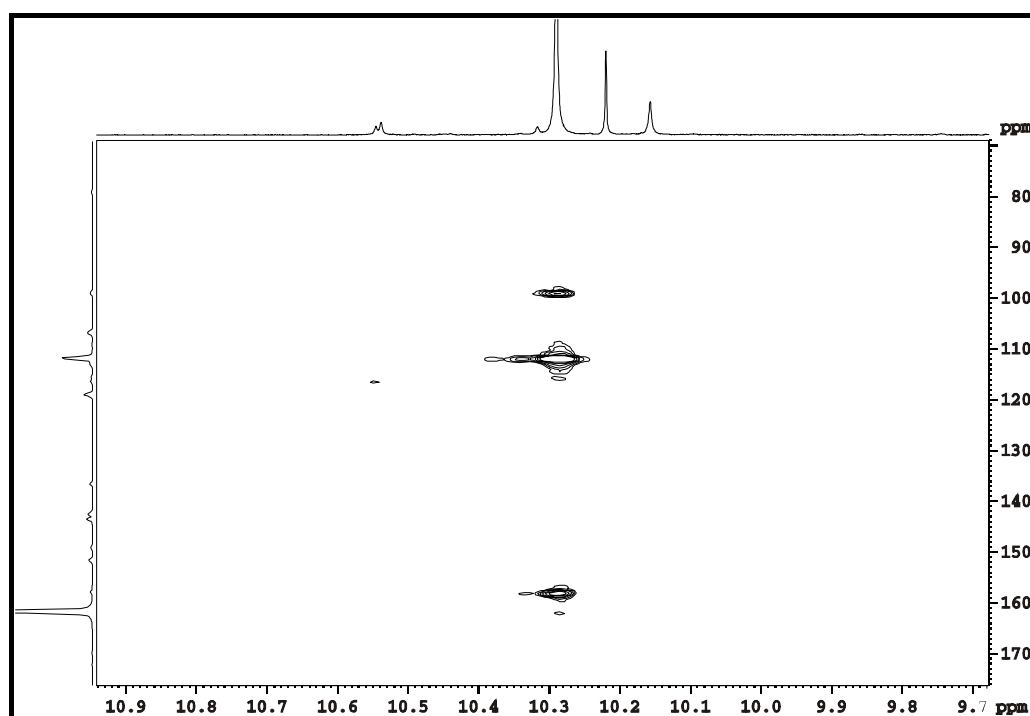


FIGURA 4.34: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Dirin** – ampliação 3.

4.3.1.2 – Líquen *Heterodermia speciosa* (Hspec)

A amostra **Hspec** (*Heterodermia speciosa*) apresentou sinais característicos do metabólito secundário atranorina (**1**) (Figura 4.35). Foi observada também a presença de demais sinas na região de 0,70-2,50 ppm, no entanto, devido à grande sobreposição nos experimentos bidimensionais (Figuras 4.36 e 4.37), não foi possível a identificação em mistura desses metabólitos.

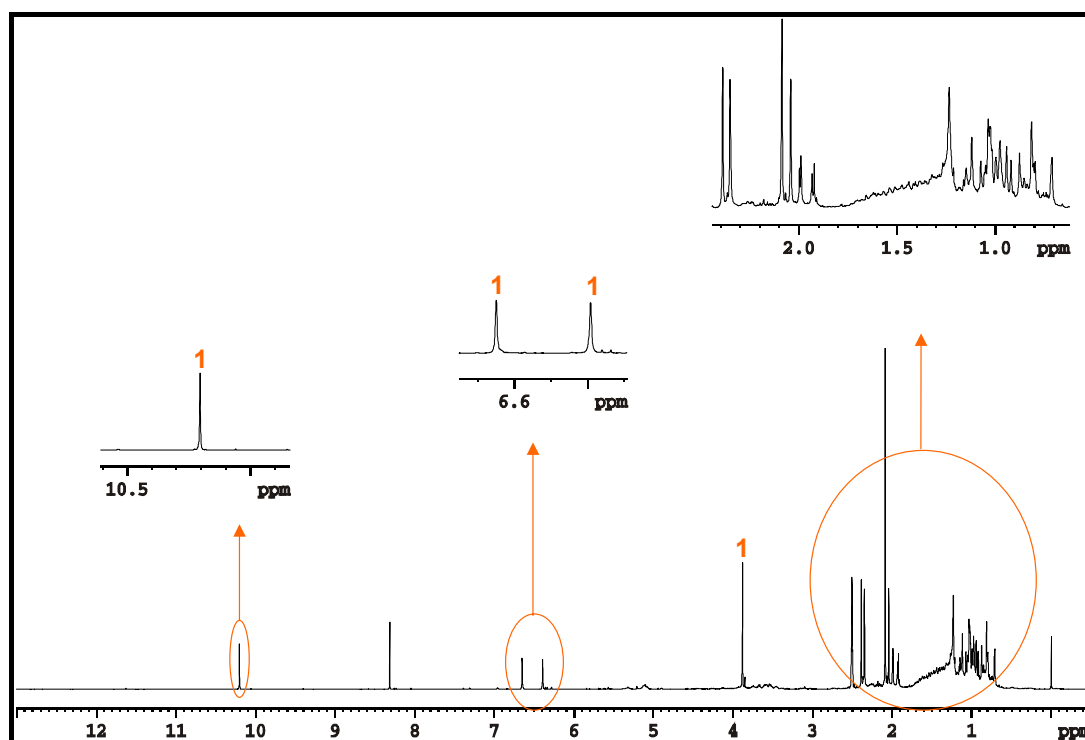


FIGURA 4.35: Espectro de RMN de ^1H da amostra **Hspec** (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.

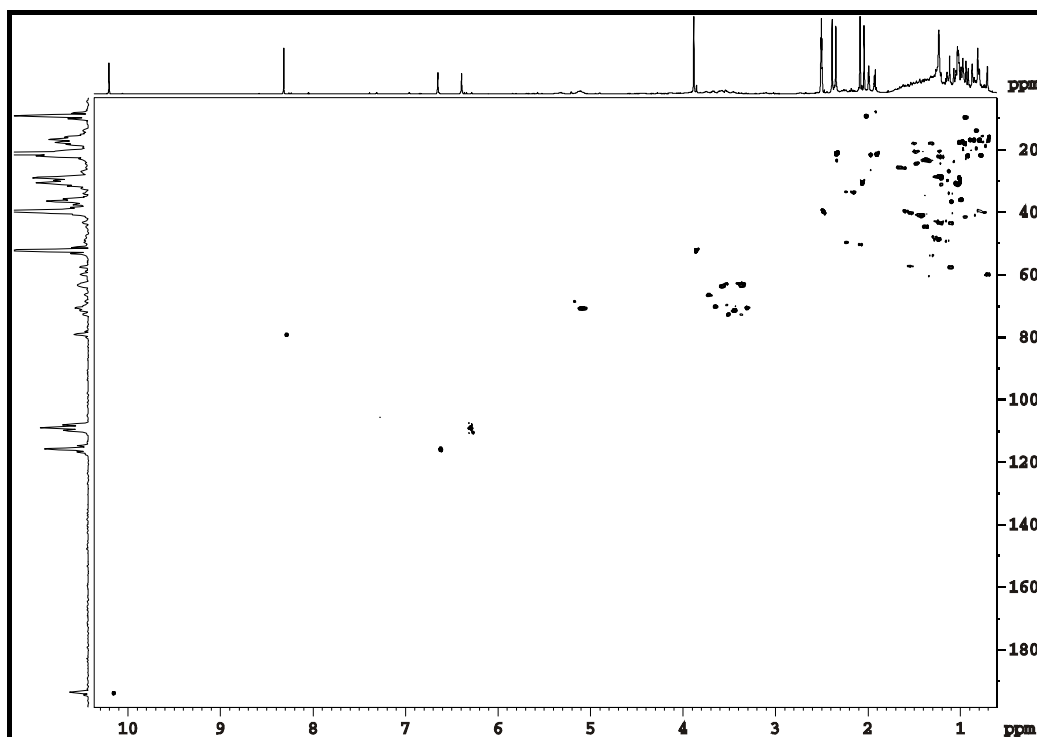


FIGURA 4.36: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Hspec**.

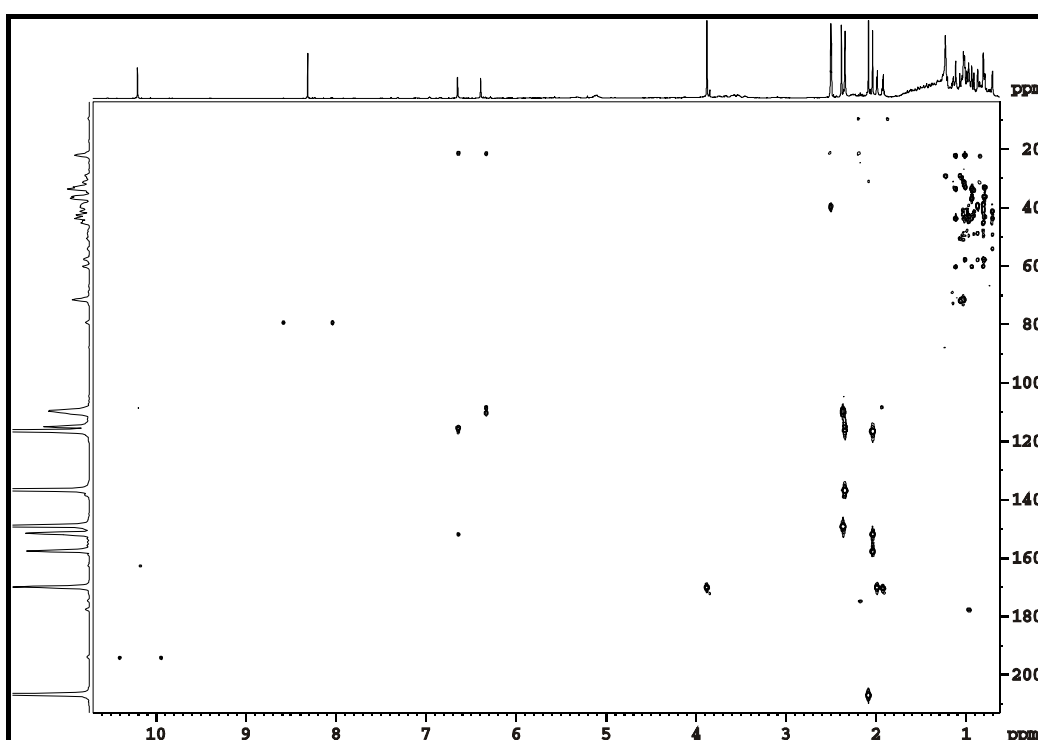


FIGURA 4.37: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Hspec**.

4.3.1.3 – Líquen *Pyxine daedaleae* (Pyx)

A amostra **Pyx** (*Pyxine daedaleae*) também apresentou sinais característicos do depsídeo atranorina (**1**) (Figura 4.38). Uma grande quantidade de sinais na região alifática sugere a presença de compostos terpênicos, todavia, a elucidação em mistura não pode ser realizada devido à grande sobreposição de sinais, o qual apresentou correlações complexas nos experimentos bidimensionais (Figuras 4.39 e 4.40).

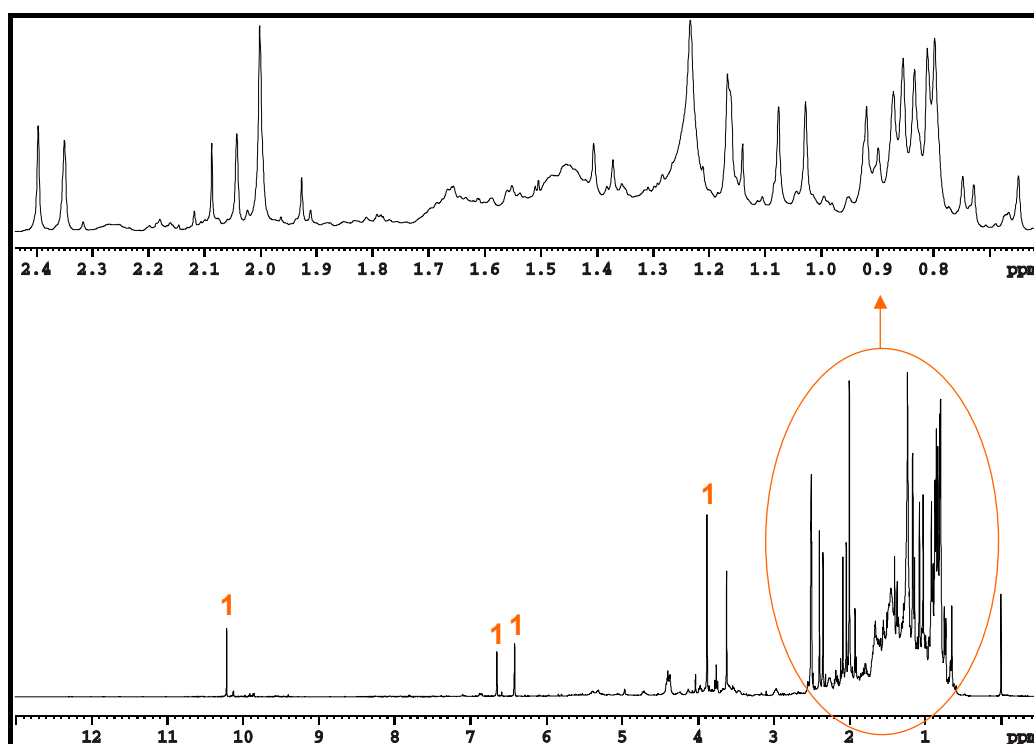


FIGURA 4.38: Espectro de RMN de ^1H da amostra **Pyx** (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.

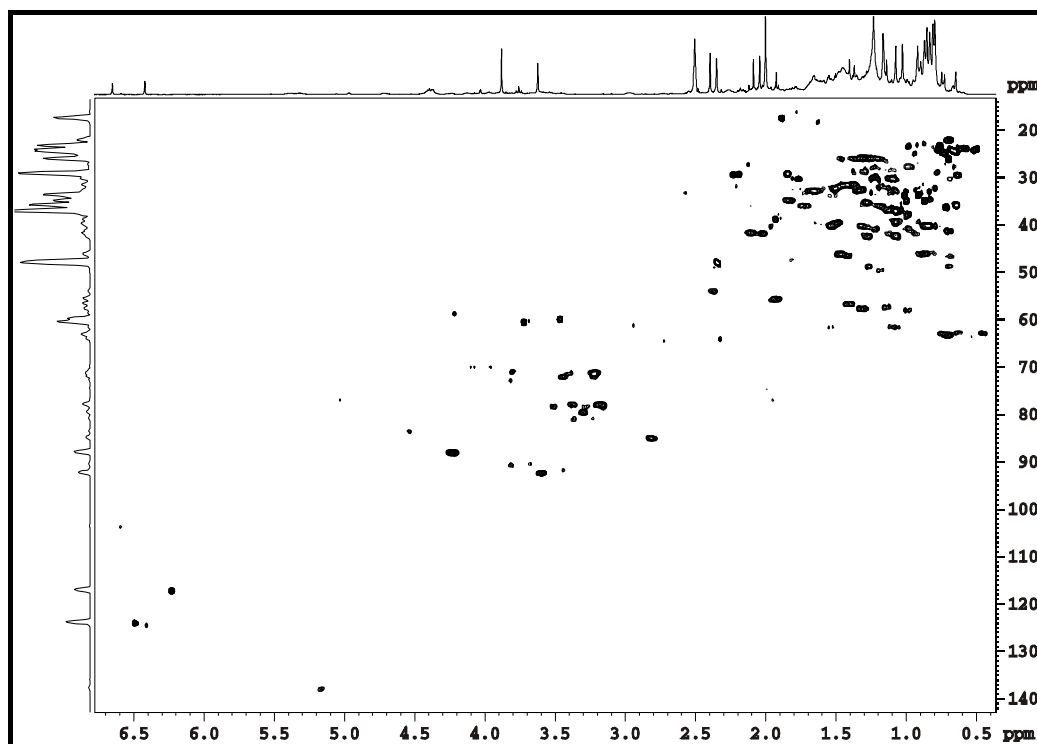


FIGURA 4.39: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pyx**.

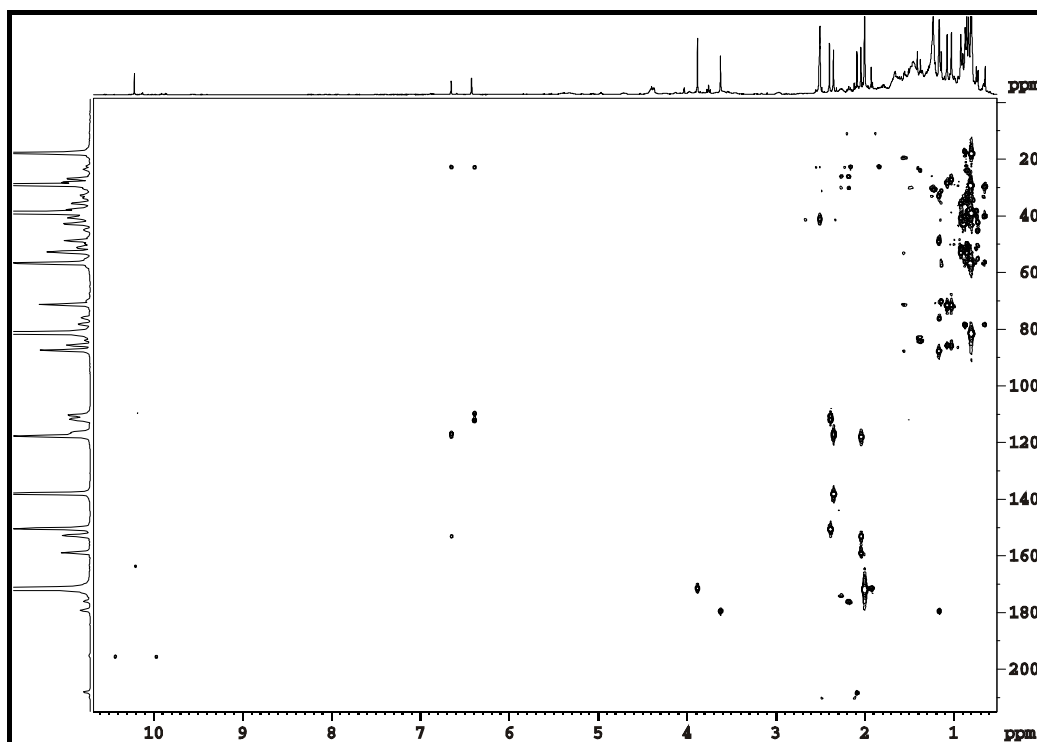
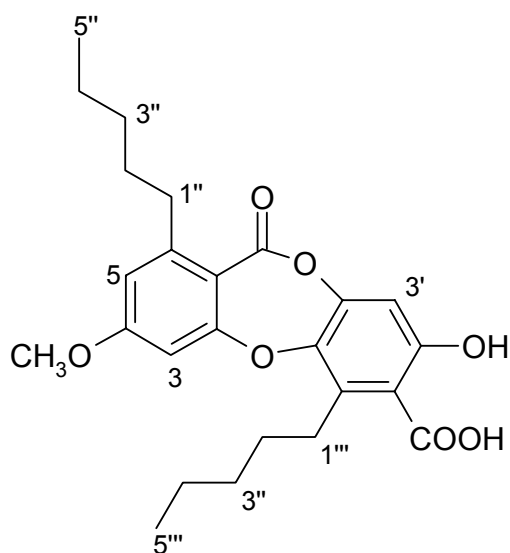


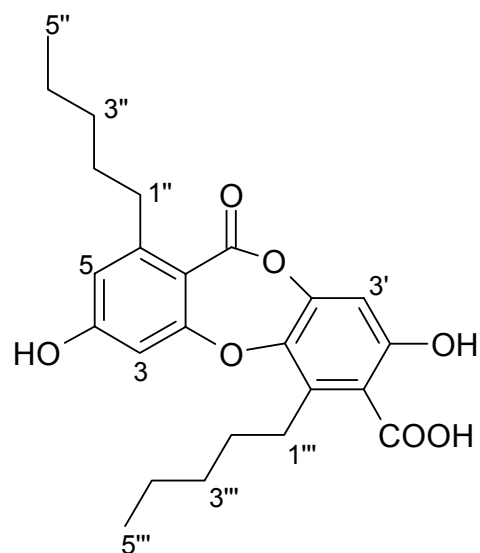
FIGURA 4.40: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra **Pyx**.

4.3.1.4 – Líquen *Hypotrachyna dactylifera* (Hypot)

A amostra **Hypot** (*Hypotrachyna dactylifera*) apresentou sinais de RMN de ^1H característicos do depsídeo atranorina (**1**), além de outras duas depsidonas que foram identificadas: os ácidos colensóico (**3**) e norcolensóico (**4**) (Figura 4.41). Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H , em comparação com os dados da literatura (FOX et al., 1970; HUNECK e YOSHIMURA, 1996), foram identificados pelo espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.42) e experimentos bidimensionais (Figura 4.43 a 4.48). O ácido norcolensóico apresentou-se como metabólito majoritário, seguido do ácido colensóico e atranorina (minoritária).



Ácido colensóico (**3**)



Ácido norcolensóico (**4**)

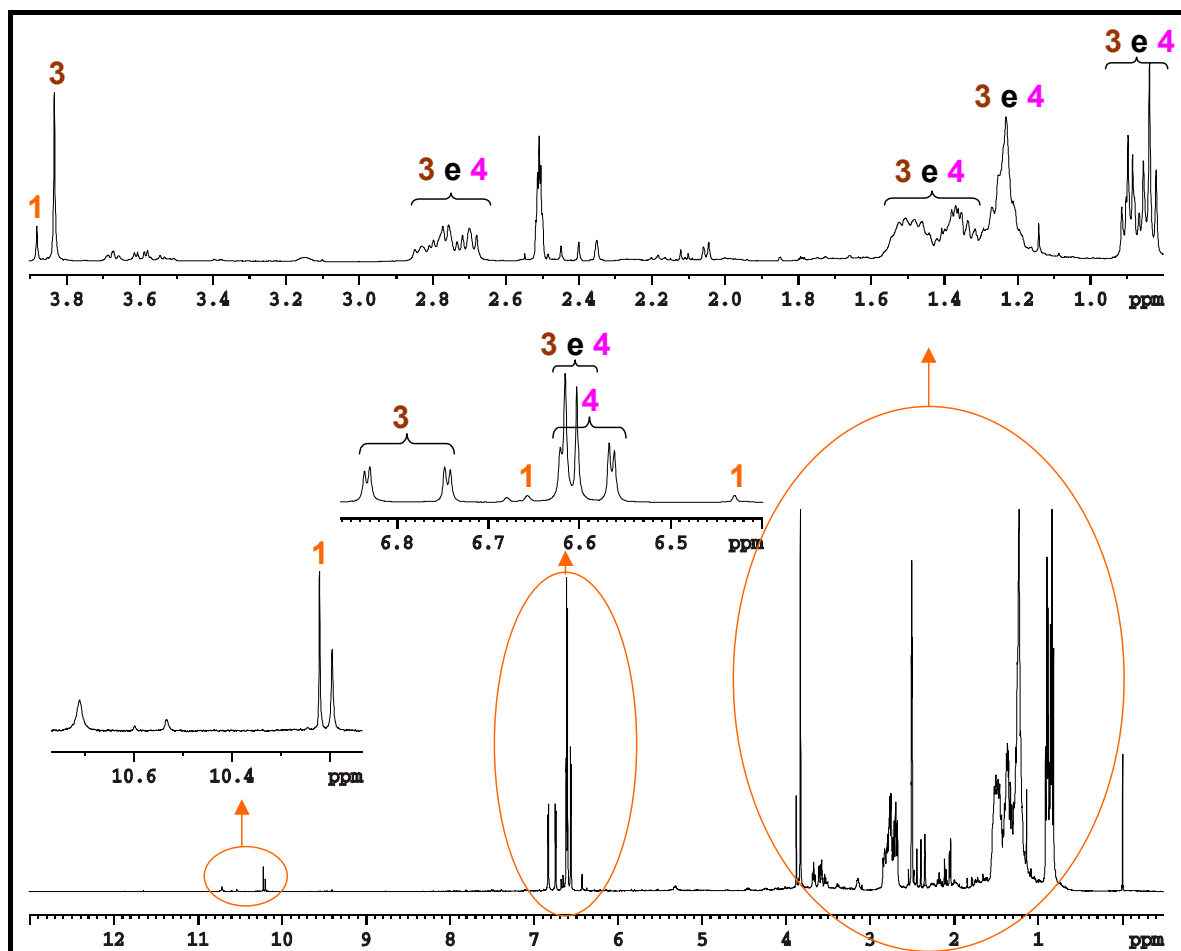


FIGURA 4.41: Espectro de RMN de ^1H da amostra **Hypot** (DMSO-d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.

Os ácidos colensóico (**3**) e norcolensóico (**4**) possuem estruturas muito similares. A principal diferença observada no espectro de RMN de ^1H foi a maior desblindagem dos hidrogênios aromáticos H-3 e H-5 para o ácido norcolensóico (**4**) em relação ao ácido colensóico (**3**) (Tabelas 4.4 e 4.5). Essa desblindagem é decorrente da presença do grupo metoxila no ácido colensóico (**3**) na posição 4, enquanto que no ácido norcolensóico (**4**), nessa mesma posição, tem-se um grupamento hidroxila o qual é mais fortemente ativante, ou seja, um maior doador de densidade eletrônica às posições *orto* e *para* do anel benzênico.

FOX e colaboradores (1970) e HUNECK e YOSHIMURA (1996) apresentaram as atribuições de RMN de ^1H para esses dois ácidos liquênicos. Entretanto, esses dados não apresentam as multiplicidades e constantes de acoplamento de grande parte dos sinais. Desta forma, embora as hidroxilas não tenham sido observadas devido à troca química pelo deutério, os dados de RMN de

^1H , ^{13}C e as correlações encontradas nos experimentos de HMBC e aqui registradas (Tabelas 4.4 e 4.5) são de grande importância.

TABELA 4.4: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido colensóico (3) (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	FOX et al., 1970 (ppm)*
				$\delta^1\text{H}$
1	-	112,7	-	-
2	-	162,3	-	-
3	6,74 (<i>d</i> , J=2,30 Hz)	103,3	112,7; 162,3	6,74 e 6,81 (2 <i>d</i> , J=2,5 Hz)
4	-	163,0	-	-
5	6,83 (<i>d</i> , J=2,30 Hz)	114,1	32,8; 103,3; 112,7; 163,0	6,74 e 6,81 (2 <i>d</i> , J=2,5 Hz)
6	-	149,1	-	-
7	-	162,2	-	-
1'	-	119,2	-	-
2'	-	153,3	-	-
3'	6,61 (<i>s</i>)	105,3	119,2; 140,5; 144,5; 153,3; 168,4	6,87 (<i>s</i>)
4'	-	144,5	-	-
5'	-	140,5	-	-
6'	-	133,9	-	-
7'	-	168,4	-	-
1''	2,75 (<i>t</i> , J=7,74 Hz)	32,8	30,7; 114,1; 149,1	2,40-3,50 (<i>m</i>)
1'''	2,78-2,88 (<i>m</i>)	26,9	30,2; 119,2; 133,9; 140,5	2,40-3,50 (<i>m</i>)
2'' e 2'''	1,44-1,57 (<i>m</i>)	30,2 e 30,7	21,8; 30,89; 31,2; 32,8	1,15-2,00 (<i>m</i>)
3'' e 3'''	1,34-1,44 (<i>m</i>)	30,89 e 31,2	21,8	1,15-2,00 (<i>m</i>)
4'' e 4'''	1,22-1,44 (<i>m</i>)	21,8	13,7; 31,4	1,15-2,00 (<i>m</i>)
5'' e 5'''	0,89-0,90 (<i>t</i> , J=7,09 Hz)	13,7	21,8; 31,4	0,70-1,15 (<i>m</i>)
MeO-4	3,83 (<i>s</i>)	55,9	163,0	3,93 (<i>s</i>)

* Dados da literatura obtidos em CDCl_3 / 60 MHz (^1H).

TABELA 4.5: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido norcolensóico (4) (DMSO-d₆, DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	HUNECK e YOSHIMURA, 1996 (ppm)*
				$\delta^1\text{H}$
1	-	111,0	-	-
2	-	162,6	-	-
3	6,57 (d, J=2,21 Hz)	104,7	111,0; 115,1; 161,9; 162,6	6,60 (sl)
4	-	161,9	-	-
5	6,62 (d, J=2,21 Hz)	115,1	32,7; 104,7; 111,0; 161,9	6,60 (sl)
6	-	149,2	-	-
7	-	162,5	-	-
1'	-	119,1	-	-
2'	-	153,4	-	-
3'	6,59 (s)	105,3	119,1; 140,6; 144,7; 153,4; 168,5	6,60 (sl)
4'	-	144,7	-	-
5'	-	140,6	-	-
6'	-	133,7	-	-
7'	-	168,5	-	-
1''	2,70(t, J=7,74 Hz)	32,7	30,6; 111,0; 115,1; 149,2	2,44-2,76 (m)
1'''	2,78-2,88 (m)	27,0	30,0; 119,1; 133,7; 140,6	2,44-2,76 (m)
2'' e 2'''	1,44-1,57 (m)	30,0 e 30,6	21,8; 31,4; 32,7	1,16-1,60 (m)
3'' e 3'''	1,34-1,44 (m)	30,87 e 31,4	21,8	1,16-1,60 (m)
4'' e 4'''	1,22-1,44 (m)	21,8	13,7; 30,87; 31,4	1,16-1,60 (m)
5'' e 5'''	0,84 (t, J=7,09 Hz)	13,7	21,8; 30,87; 31,4	0,72-0,96 (m)

* Dados da literatura obtidos em CDCl₃/ 60 MHz (¹H).

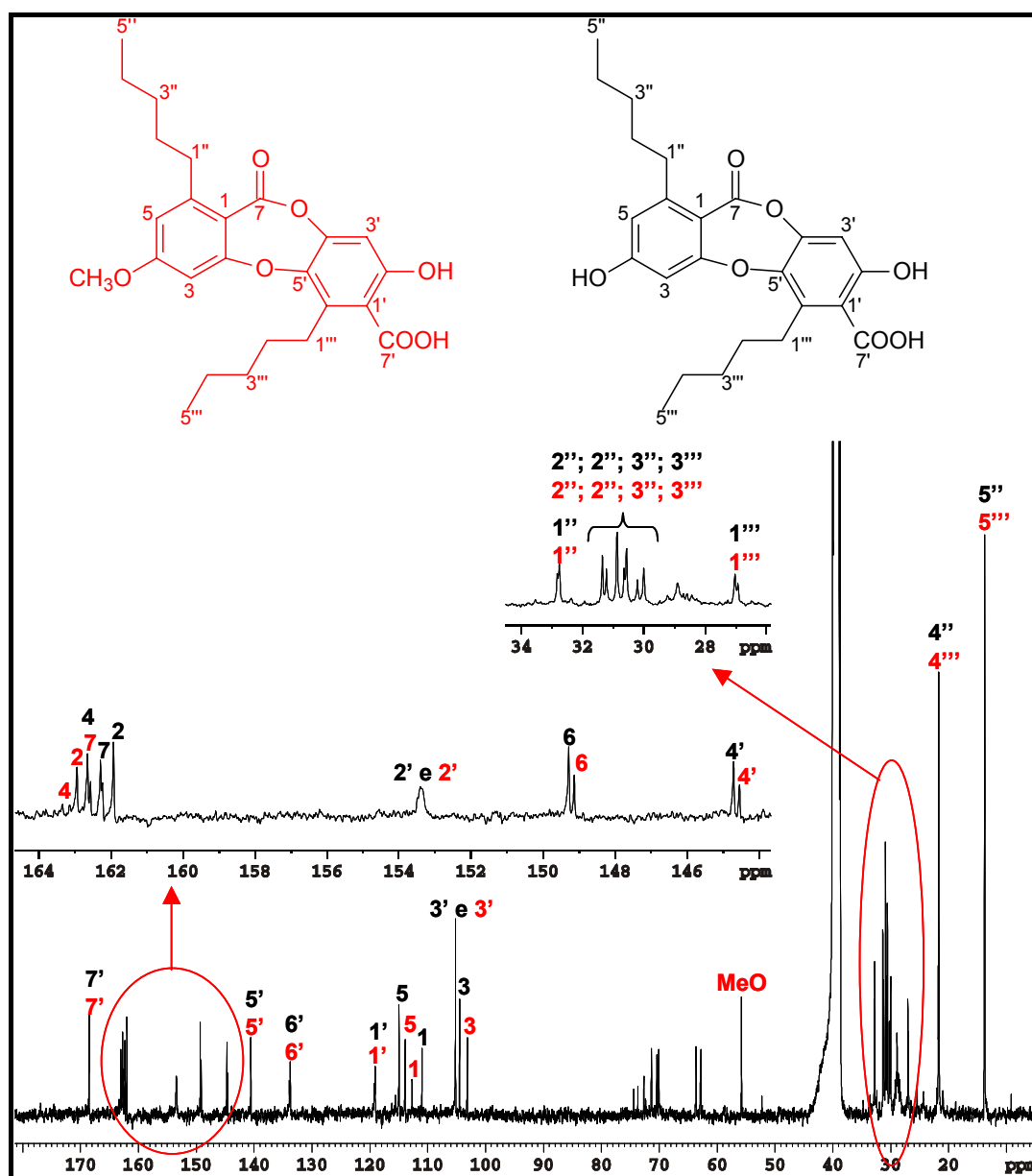


FIGURA 4.42: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra **Hypot** com atribuições dos ácidos colensóico (**3**) e norcolensóico (**4**) em destaque – análise de RMN em solução.

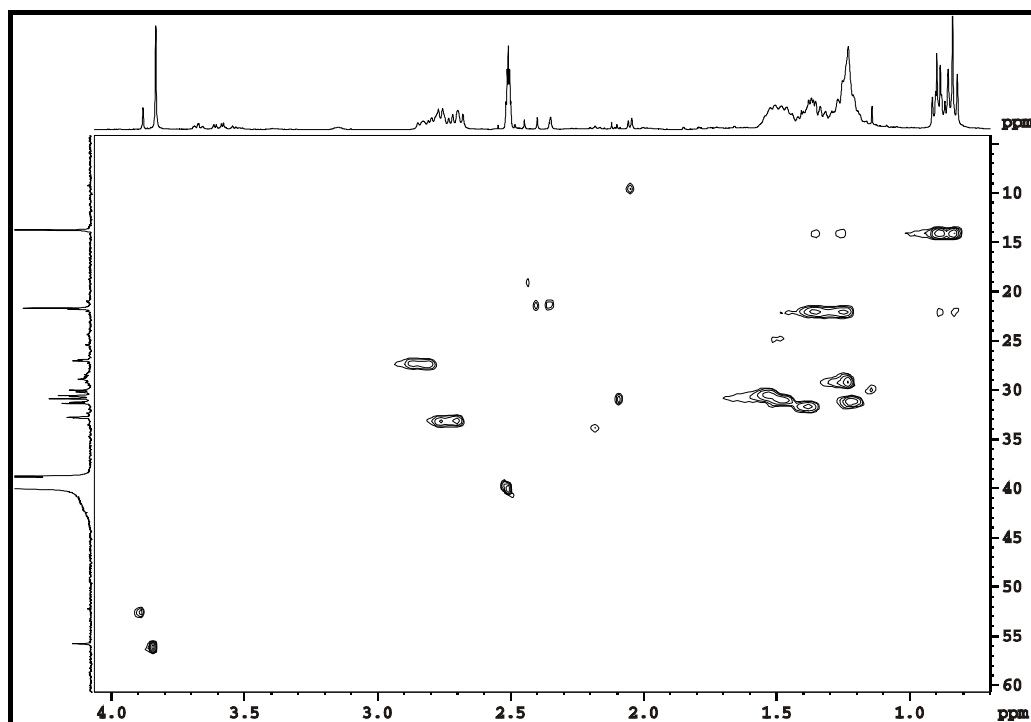


FIGURA 4.43: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Hypot** – ampliação 1.

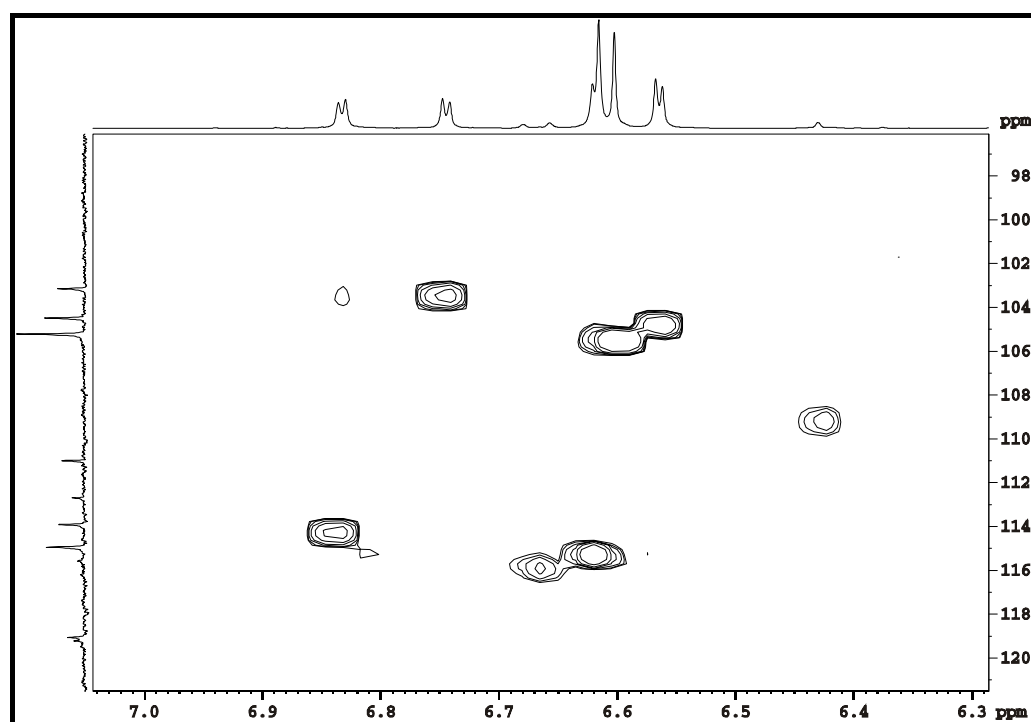


FIGURA 4.44: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Hypot** – ampliação 2.

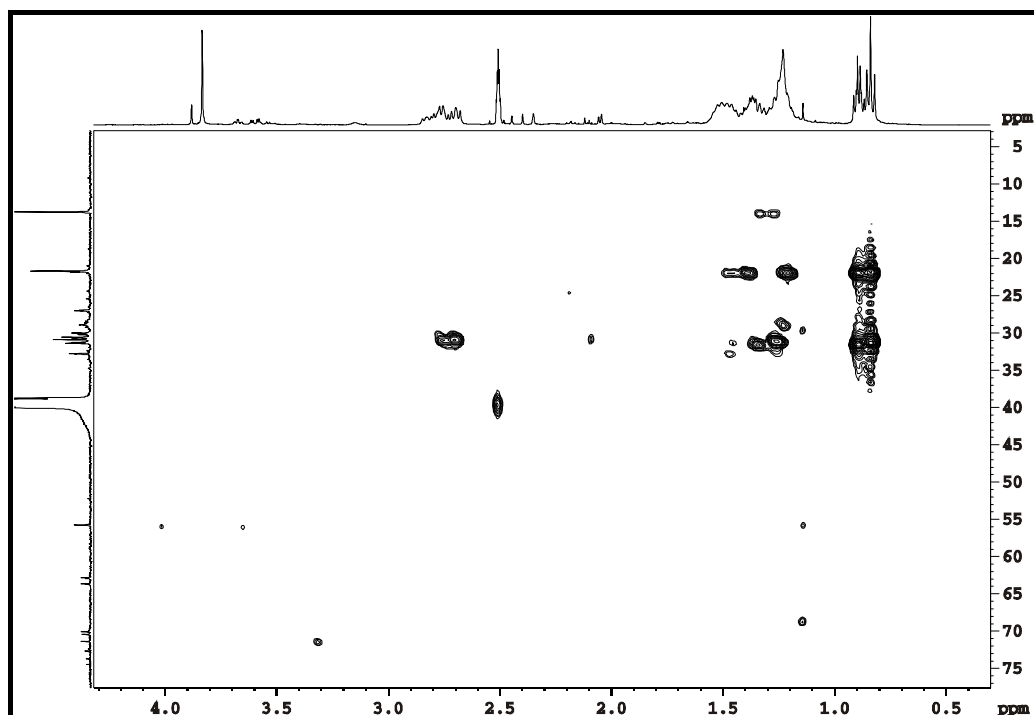


FIGURA 4.45: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Hypot** – ampliação 1.

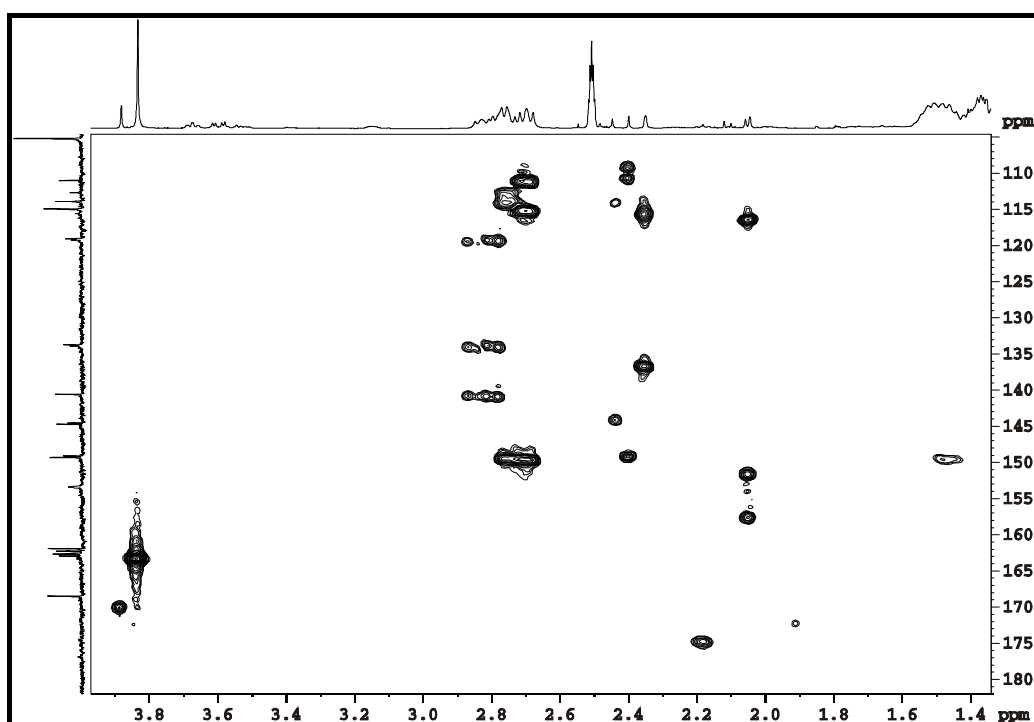


FIGURA 4.46: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Hypot** – ampliação 2.

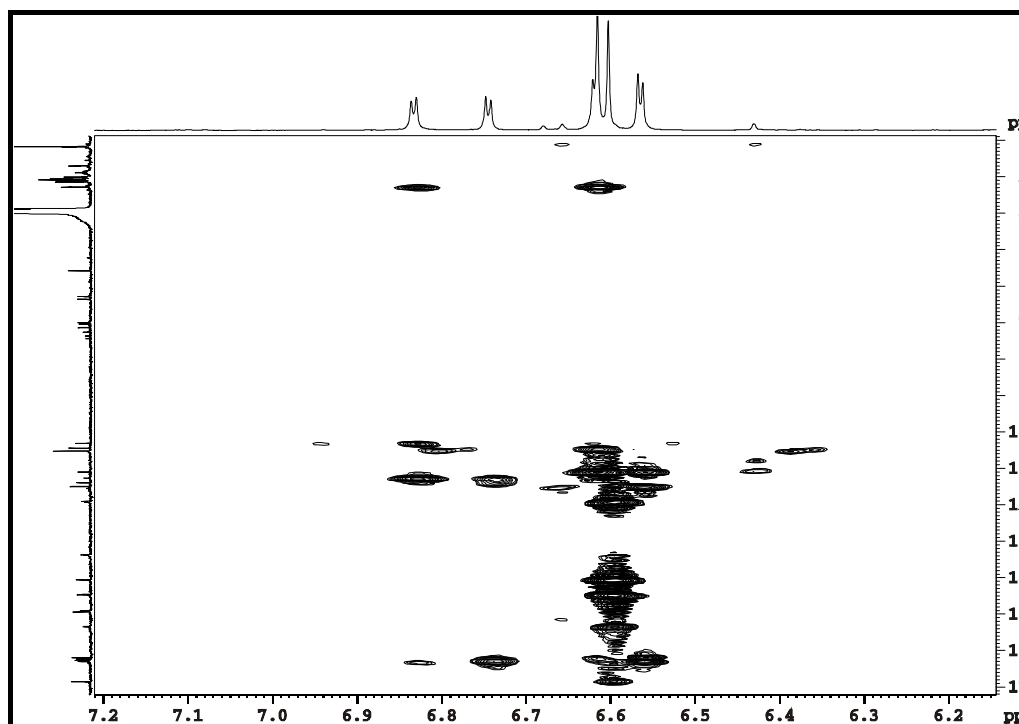


FIGURA 4.47: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Hypot** – ampliação 3.

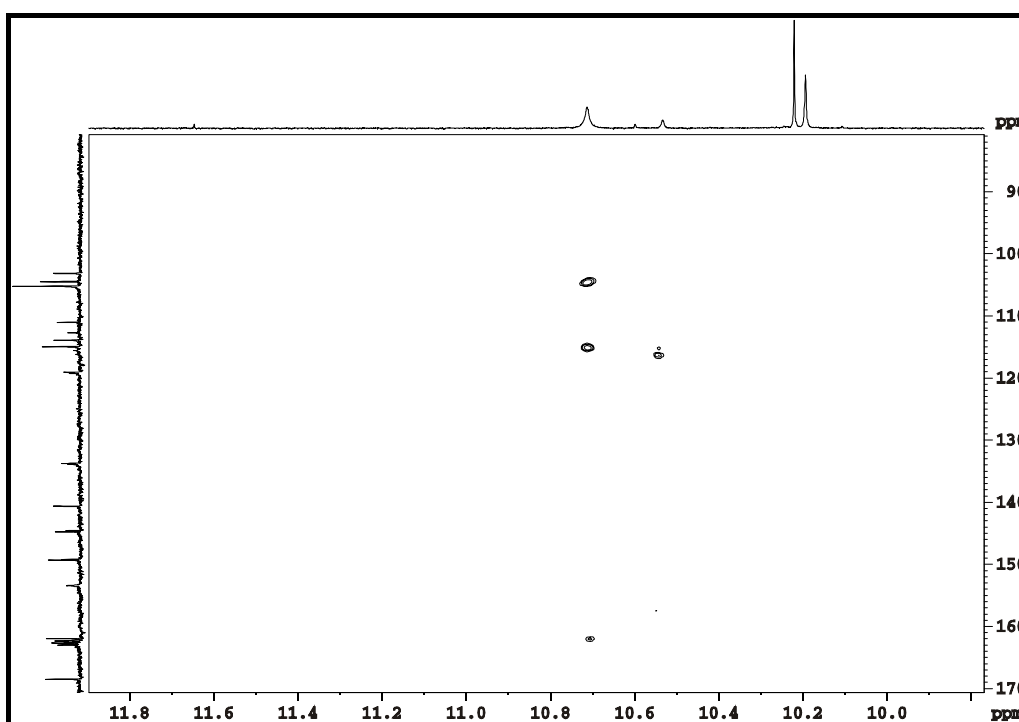
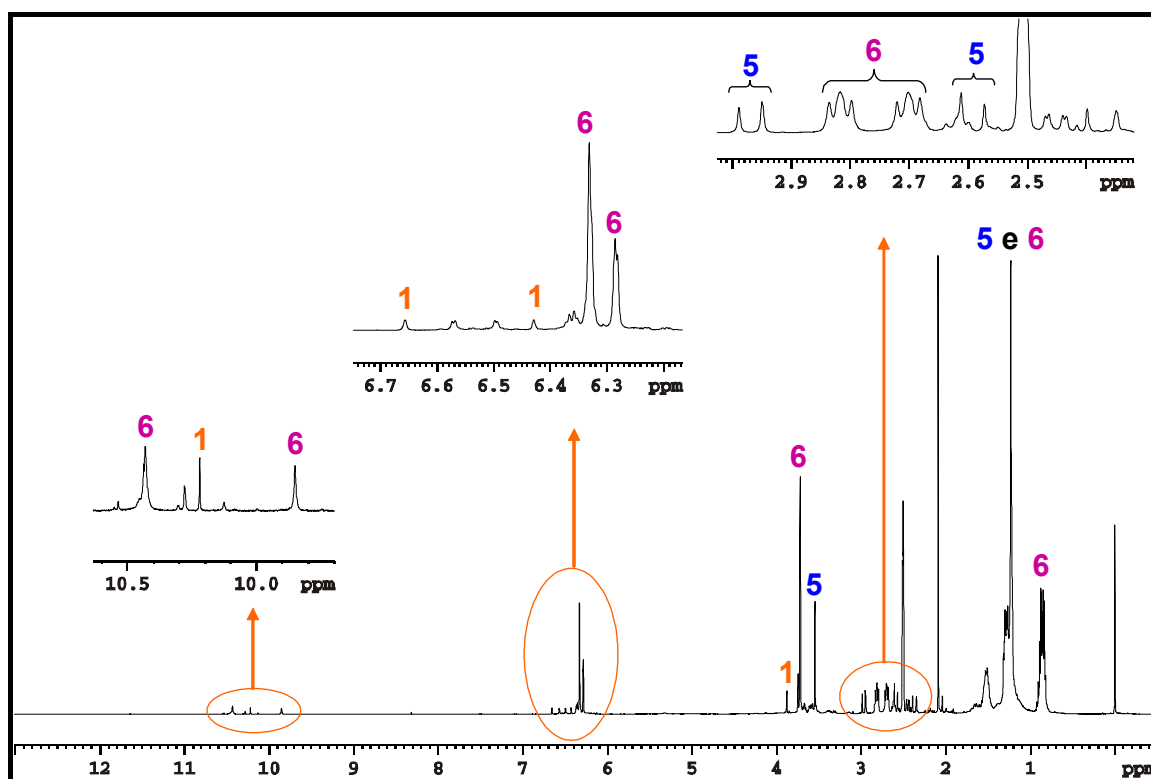
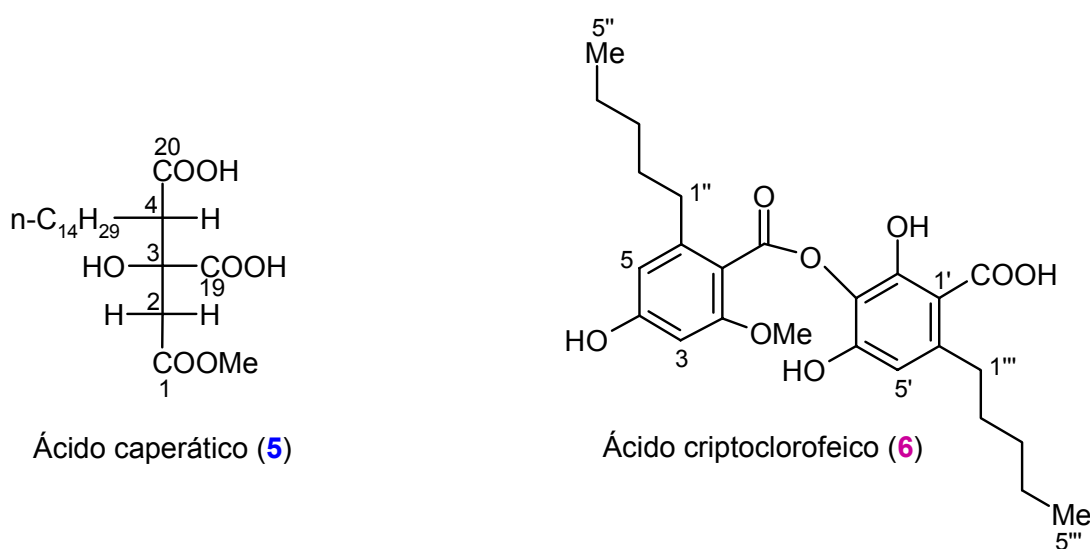


FIGURA 4.48: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Hypot** – ampliação 4.

4.3.1.5 – Líquen *Canoparmelia cryptochlorophaea* (Canop)

A amostra **Canop** (*Canoparmelia cryptochlorophaea*) apresentou sinais característicos do depsídeo atranorina (**1**). Foram identificados também o ácido caperático (**5**) e o depsídeo ácido criptocloroфеico (**6**) (Figura 4.49). A atribuição dos sinais desses metabólitos foi efetuada mediante os dados de *g*HSQC e *g*HMBC e encontram-se destacados nas tabelas 4.6 e 4.7. A aquisição do espectro de RMN de ^{13}C permitiu atribuir os sinais dos carbonos não identificados nos experimentos bidimensionais.



Espectro 4.49: Espectro de RMN de ^1H da amostra **Canop** (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.

O ácido caperático (**5**), identificado na amostra **Canop**, apresenta dados de RMN de ^1H descritos na literatura (KEETON e KEOGH, 1973), embora a atribuição dos sinais de ^{13}C ainda não tenha sido explorada. Desta forma, como pode ser observado na tabela 4.6, as atribuições realizadas estão em concordância com os resultados prévios apresentados por KEETON e KEOGH (1973), somado ainda aos assinalamentos de ^{13}C , auxiliados pelos experimentos bidimensionais de *g*HSQC e *g*HMBC.

TABELA 4.6: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido caperático (**5**) (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	<i>g</i> HMBC	KEETON e KEOGH, 1973
				(ppm)** $\delta^1\text{H}$
1	-	170,1	-	-
2a	2,97 (<i>d</i> ; J=15,92 Hz)	40,7	75,0; 170,1	3,12 (<i>d</i> , J=16 Hz)
2b	2,59 (<i>d</i> ; J=15,92 Hz)		75,0; 170,1; 174,7	
3	-	75,0	-	-
4	2,61 (<i>t</i> , J=7,71 Hz)	33,5	-	2,67 (<i>t</i>)
(CH ₂) ₁₃	1,23 (<i>sl</i>)	~29,0	~29,0	1,29 (<i>sl</i>)
CH ₃	0,82-0,92 (<i>m</i>)	*	-	0,88 (<i>t</i>)
19	-	174,7	-	-
20	-	173,6	-	-
-COOMe	3,55 (<i>s</i>)	51,5	170,1	3,61 (<i>s</i>)

*Deslocamento químico de carbono não identificado através de *g*HSQC e *g*HMBC devido ao grande congestionamento de sinais nessa região do espectro, visto que o ácido caperático não é o composto majoritário da espécie. **Dados da literatura obtidos em acetona- d_6 / 220 MHz (^1H).

Na região de aproximadamente δ 9,80 a 10,60 do espectro de RMN de ^1H da amostra **Canop** (Figura 4.50) há alguns sinais não identificados. Desta forma, foi adquirido um experimento de *g*NOESY na tentativa de observar as correlações principalmente dos hidrogênios ácidos do ácido caperático (**5**). A irradiação seletiva em cada dubleto de H-2a e H-2b dessa substância, como mostrado na figura 4.50, apresentou NOE somente com o seu respectivo hidrogênio geminal, não sendo

possível a visualização de outros núcleos, e portanto, os hidrogênios ácidos do ácido caperático (5) não foram atribuídos.

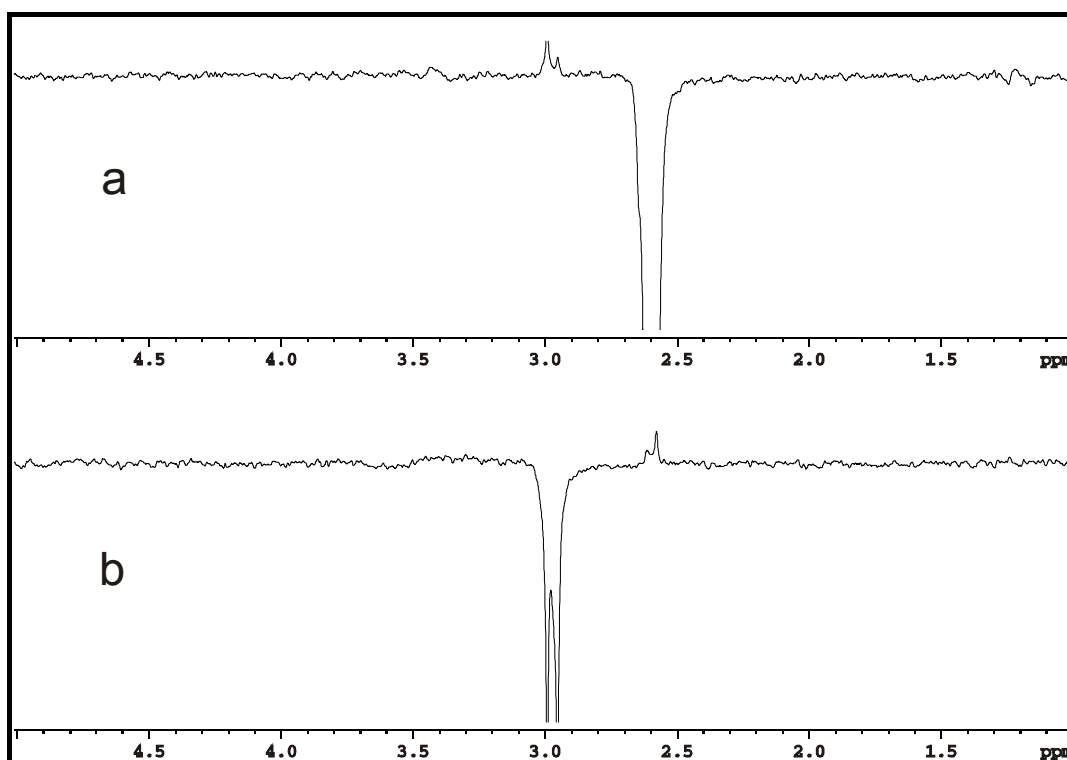


FIGURA 4.50: Espectro gNOESY (DMSO-d₆, DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra **Canop** com irradiações em δ 2,59 (a) e δ 2,97 (b) – análise de RMN em solução.

A substância ácido criptoclorofoico (6) foi identificada majoritariamente no líquen **Canop**. Na literatura (HUNECK e YOSHIMURA, 1996) encontram-se dados de RMN de ¹H sem a distinção dos hidrogênios H-2'', H-2''', H-3'', H-3''', H-4'' e H-4''', bem como dos hidrogênios aromáticos H-3, H-5 e H-5', os quais não apresentam as suas constantes de acoplamento, pois são considerados como um único singleto (Tabela 4.7). Com a realização desse trabalho, foi possível a atribuição completa dos sinais de RMN dessa substância, a partir dos experimentos bidimensionais (Figuras 4.52 a 4.58) e do espectro de ¹³C (Figura 4.51).

TABELA 4.7: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido criptoclorofoico (6) (DMSO-d₆, DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	HUNECK e YOSHIMURA, 1996 (ppm)*
				$\delta^1\text{H}$
1	-	113,2	-	-
2	-	158,3	-	-
3	6,33 (<i>d</i> ; J=1,96 Hz)	97,2	108,1; 113,2; 159,5; 164,6	6,50 (<i>s</i>)
4	-	159,5	-	-
5	6,29 (<i>d</i> ; J=1,96 Hz)	108,1	33,0; 97,2; 113,2; 159,5	6,50 (<i>s</i>)
6	-	143,2	-	-
7	-	164,6	-	-
1'	-	124,4	-	-
2'	-	144,0	-	-
3'	-	150,1	-	-
4'	-	153,8	-	-
5'	6,33 (<i>s</i>)	109,9	35,6; 104,4; 124,4; 153,8	6,50 (<i>s</i>)
6'	-	104,4	-	-
7'	-	173,2	-	-
1''	2,70 (<i>t</i> , J=7,71 Hz)	33,0	30,9; 108,1; 113,2; 143,2	3,00 (<i>tl</i>)
1'''	2,82 (<i>t</i> , J=7,71 Hz)	35,6	31,1; 104,4; 109,9; 144,0	3,00 (<i>tl</i>)
2''; 2'''; 3'' e 3'''	1,48-1,58 (<i>m</i>)	30,9 e 31,1	31,2; 22,1	1,22-1,84 (<i>m</i>)
3'' e 3'''	1,25-1,31 (<i>m</i>)	31,2	14,1; 22,1	1,22-1,84 (<i>m</i>)
4'' e 4'''	1,25-1,31 (<i>m</i>)	22,1	14,1; 31,2	1,22-1,84 (<i>m</i>)
5'' e 5'''	0,82-0,92 (<i>m</i>)	14,1	22,1; 31,2	0,91 (<i>tl</i>)
MeO-2	3,72 (<i>s</i>)	55,8	158,3	3,91 (<i>s</i>)
4-OH	9,86 (<i>sl</i>)	-	97,2; 108,1; 159,5	8,20 (<i>sl</i>)
OH ou -COOH	10,43 (<i>sl</i>)	-	124,2	8,20 (<i>sl</i>)

* Dados da literatura obtidos em acetona-d₆ / 60 MHz (¹H).

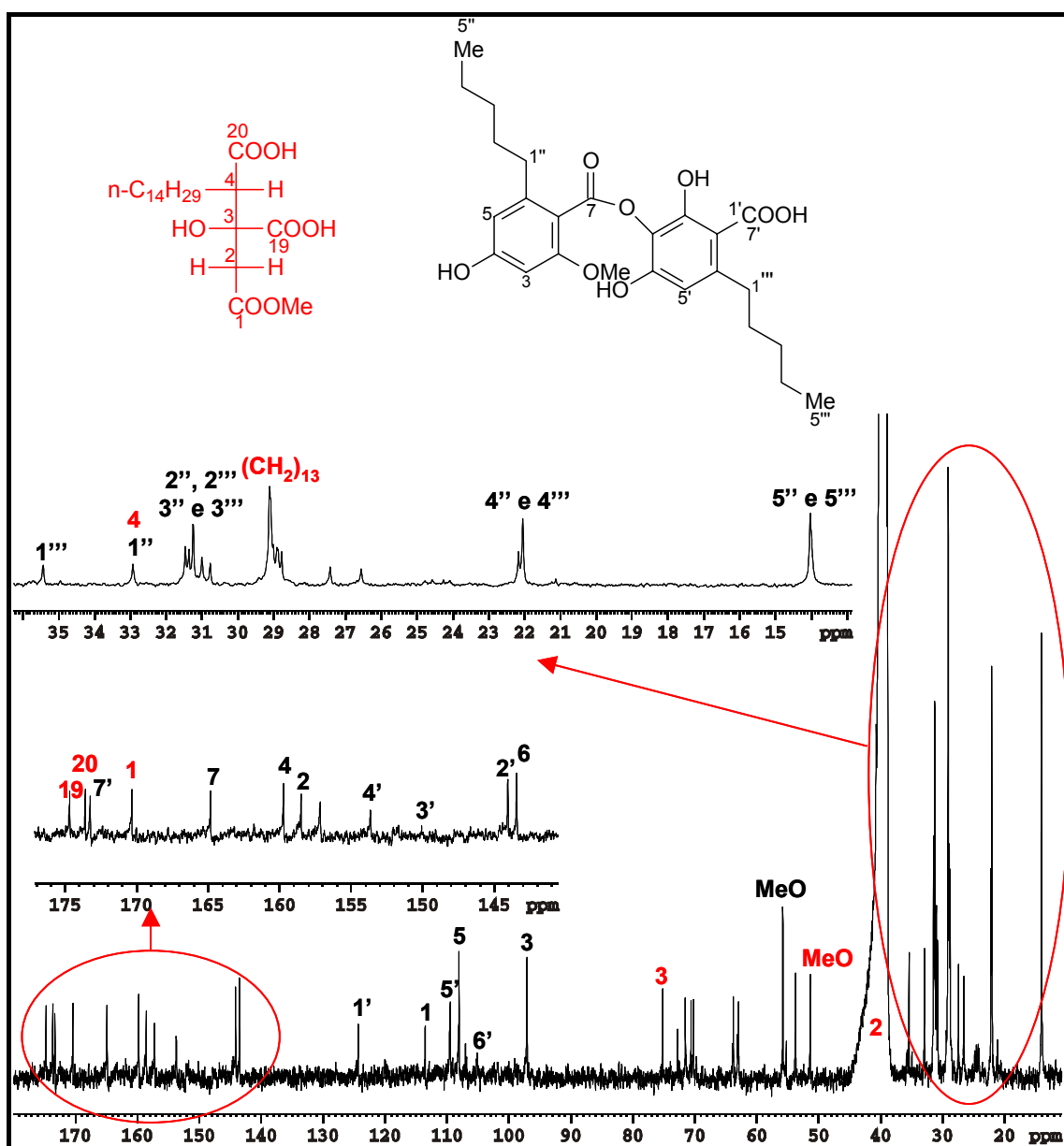


FIGURA 4.51: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra **Canop** com atribuições dos ácidos caperático (5) e criptoclorofeico (6) em destaque – análise de RMN em solução.

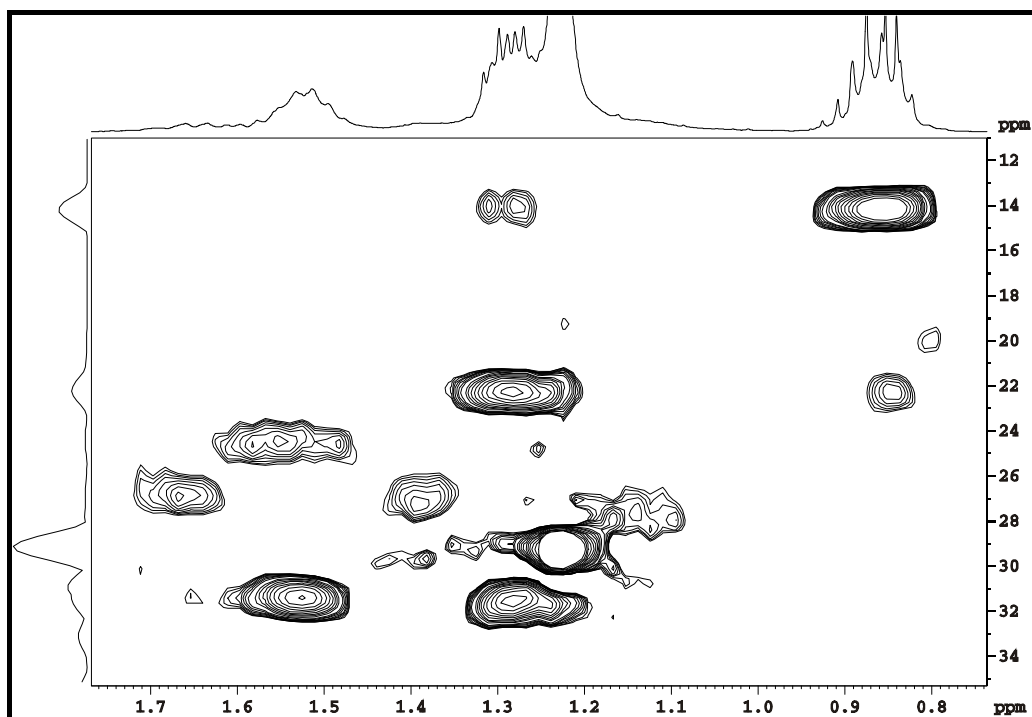


FIGURA 4.52: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Canop** – ampliação 1.

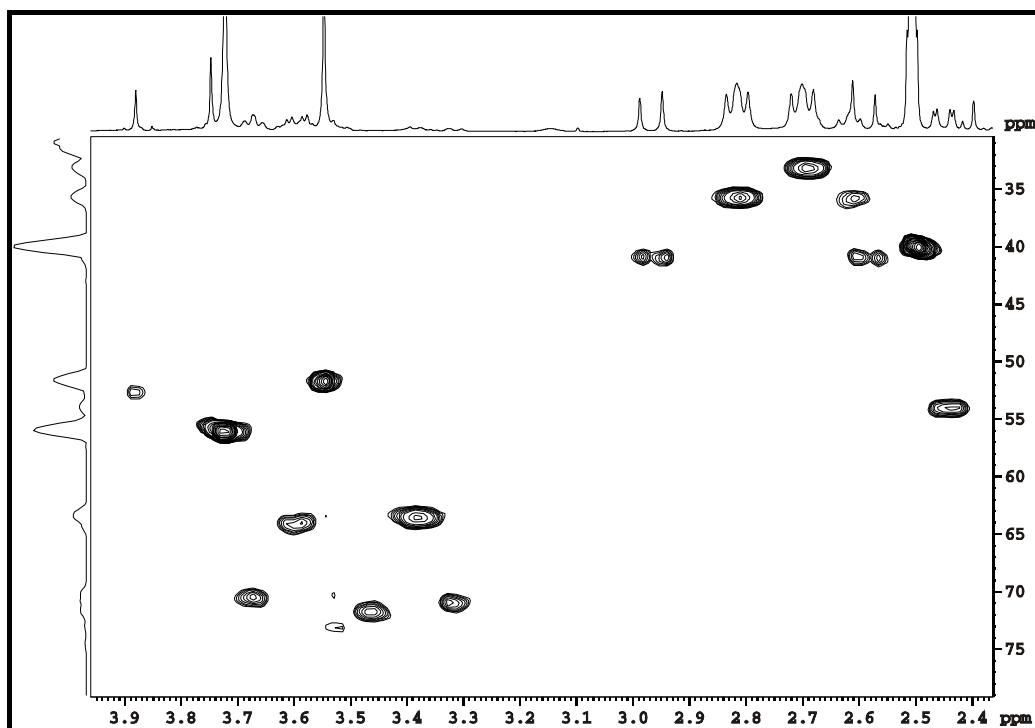


FIGURA 4.53: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC, da amostra **Canop** – ampliação 2.

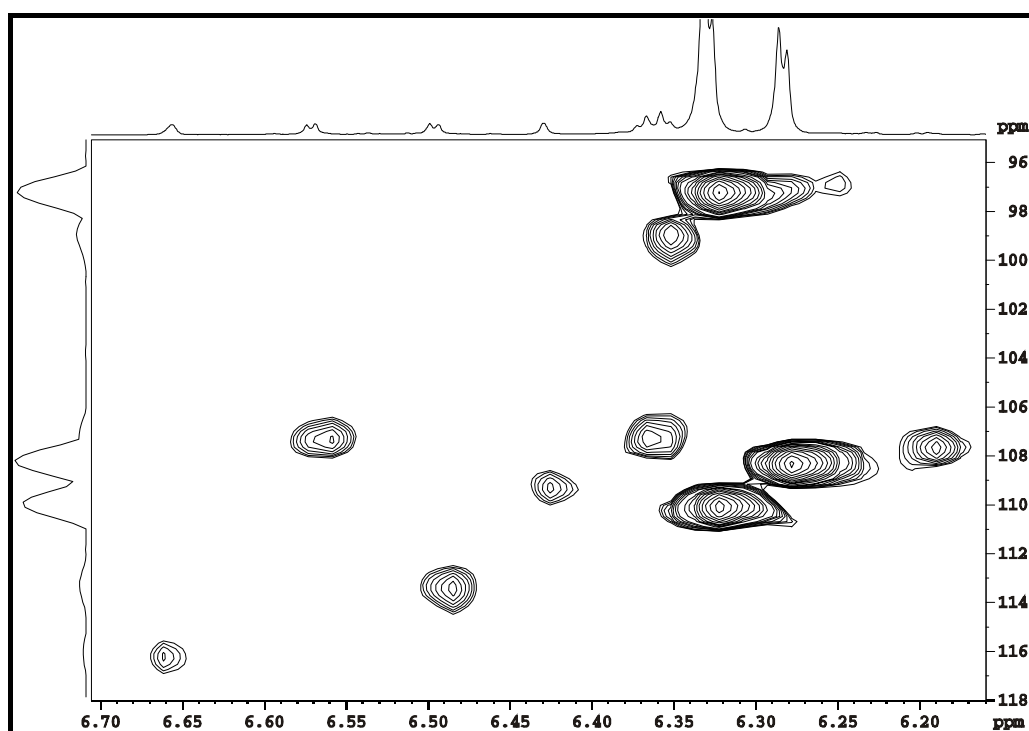


FIGURA 4.54: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Canop** – ampliação 3.

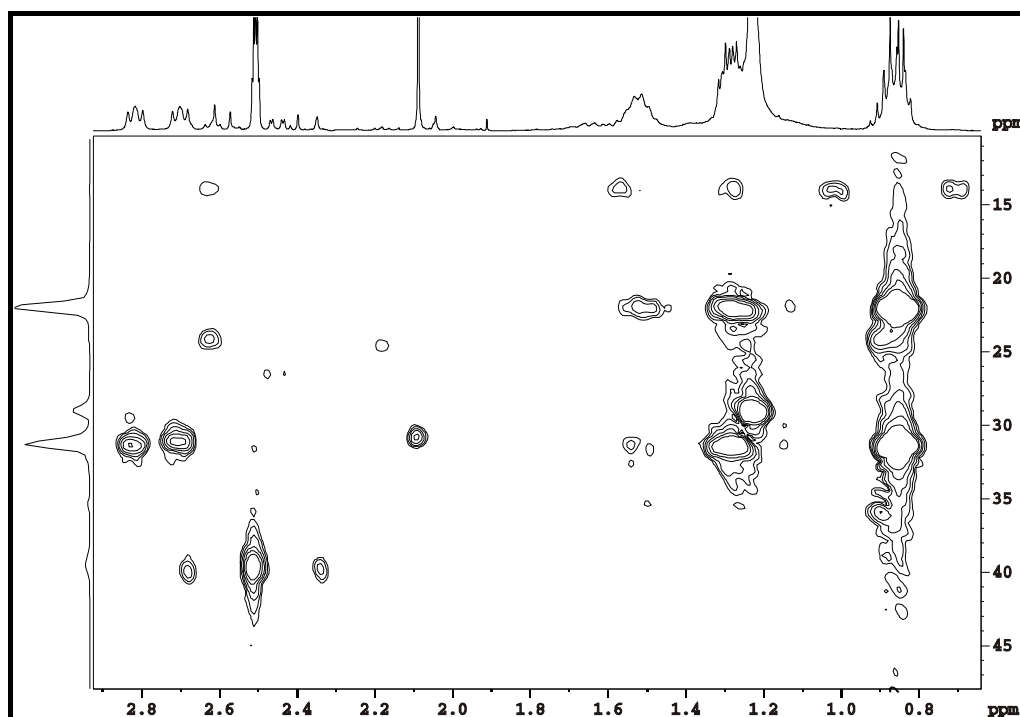


FIGURA 4.55: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Canop** – ampliação 1.

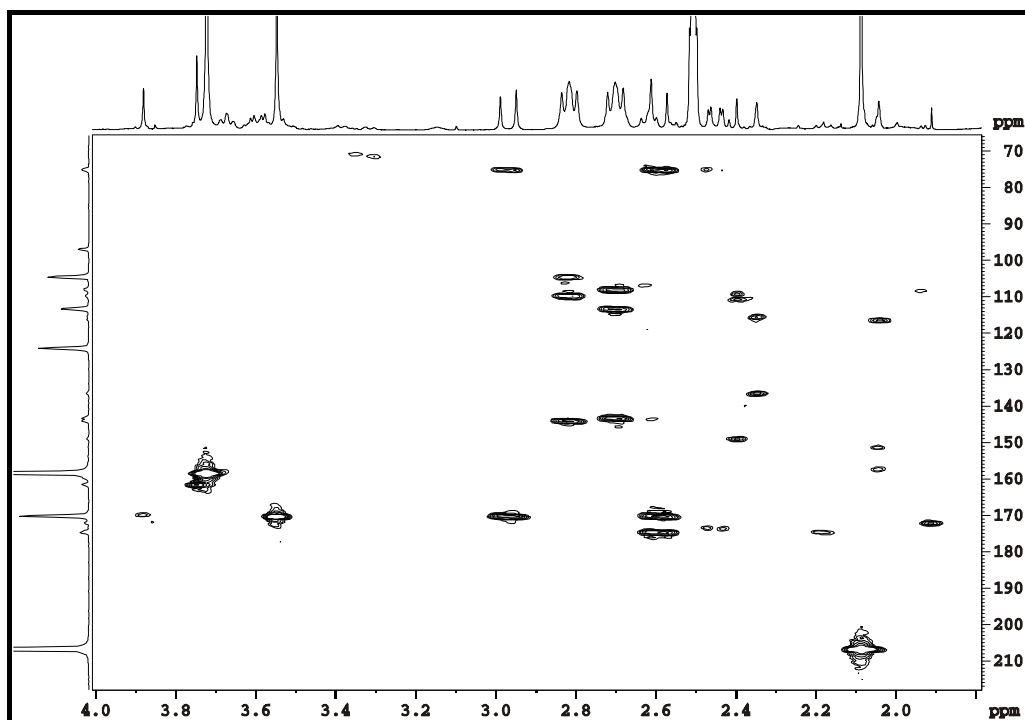


FIGURA 4.56: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Canop** – ampliação 2.

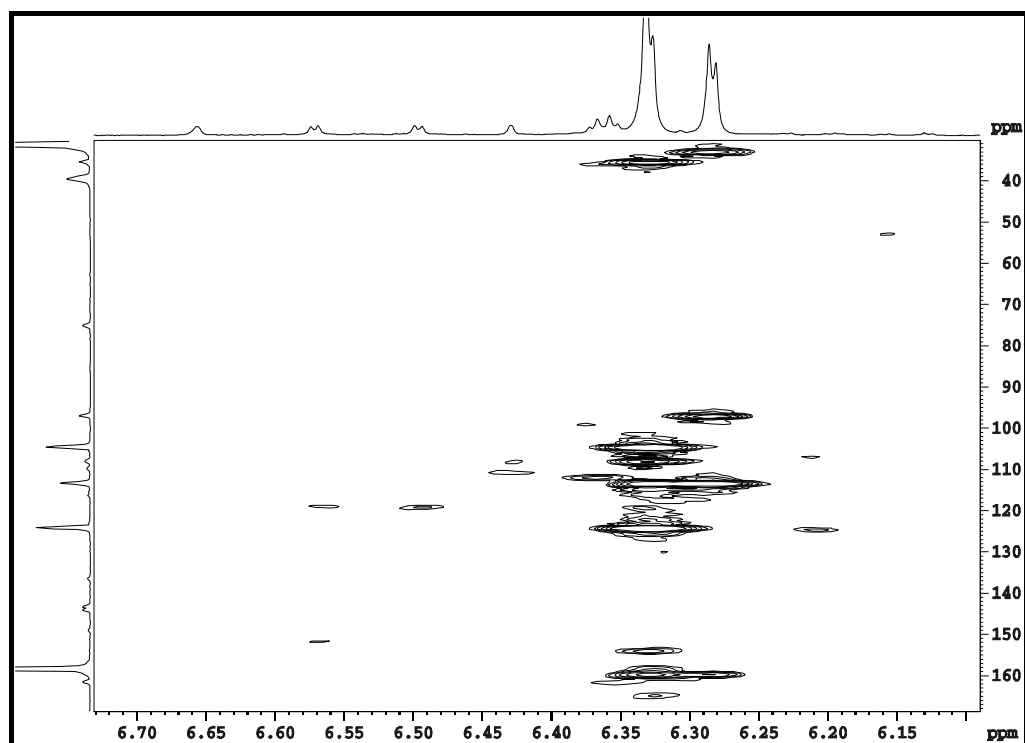


FIGURA 4.57: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Canop** – ampliação 3.

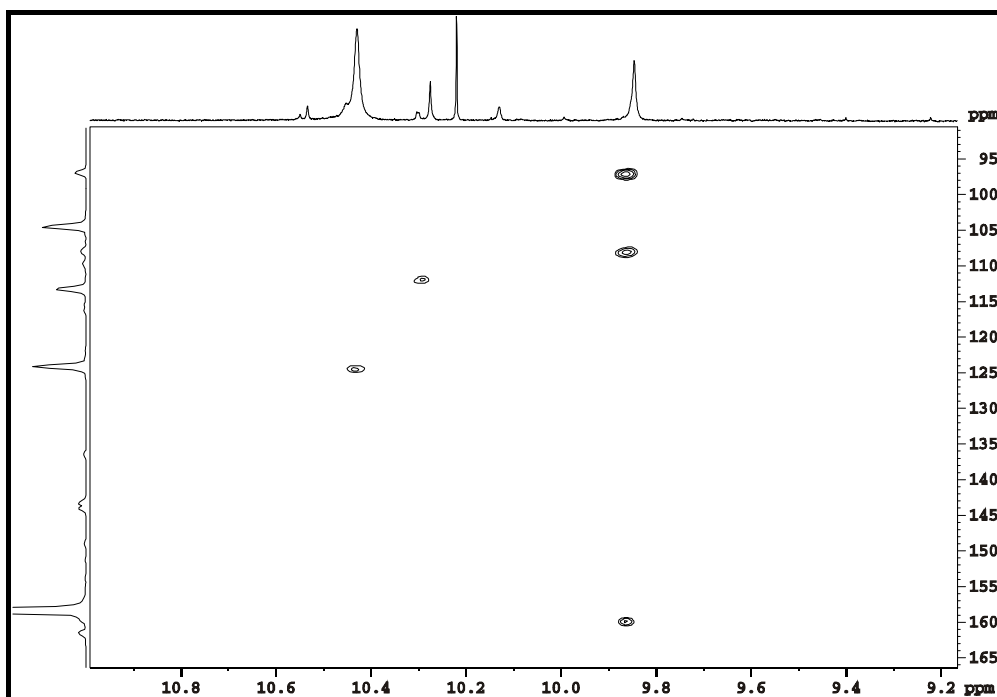


FIGURA 4.58: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Canop** – ampliação 4.

4.3.1.6 – *Parmotrema breviciliatum* (Pbrev)

A amostra **Pbrev** (*Parmotrema breviciliatum*) apresentou sinais característicos do depsídeo atranorina (**1**), visualizados a partir do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.59). O componente majoritário ácido α -alectorônico (**7**) foi identificado após a aquisição do espectro de ^{13}C (Figura 4.60) e experimentos bidimensionais de gHSQC e gHMBC, apresentados nas figuras 4.61 a 4.65.

Segundo ELIX e colaboradores (1974), a depsidona ácido α -alectorônico (**7**) apresenta-se em equilíbrio entre as duas estruturas apresentadas a seguir. Esse equilíbrio é deslocado no sentido do tautômero cíclico, embora a existência do tautômero pseudo-ácido tenha sido confirmada por esterificação ácida com metanol. O equilíbrio tautomérico apresentou dificuldade na identificação dos sinais de RMN dos núcleos em 1''', 2''' e 3''' (Tabela 4.8).

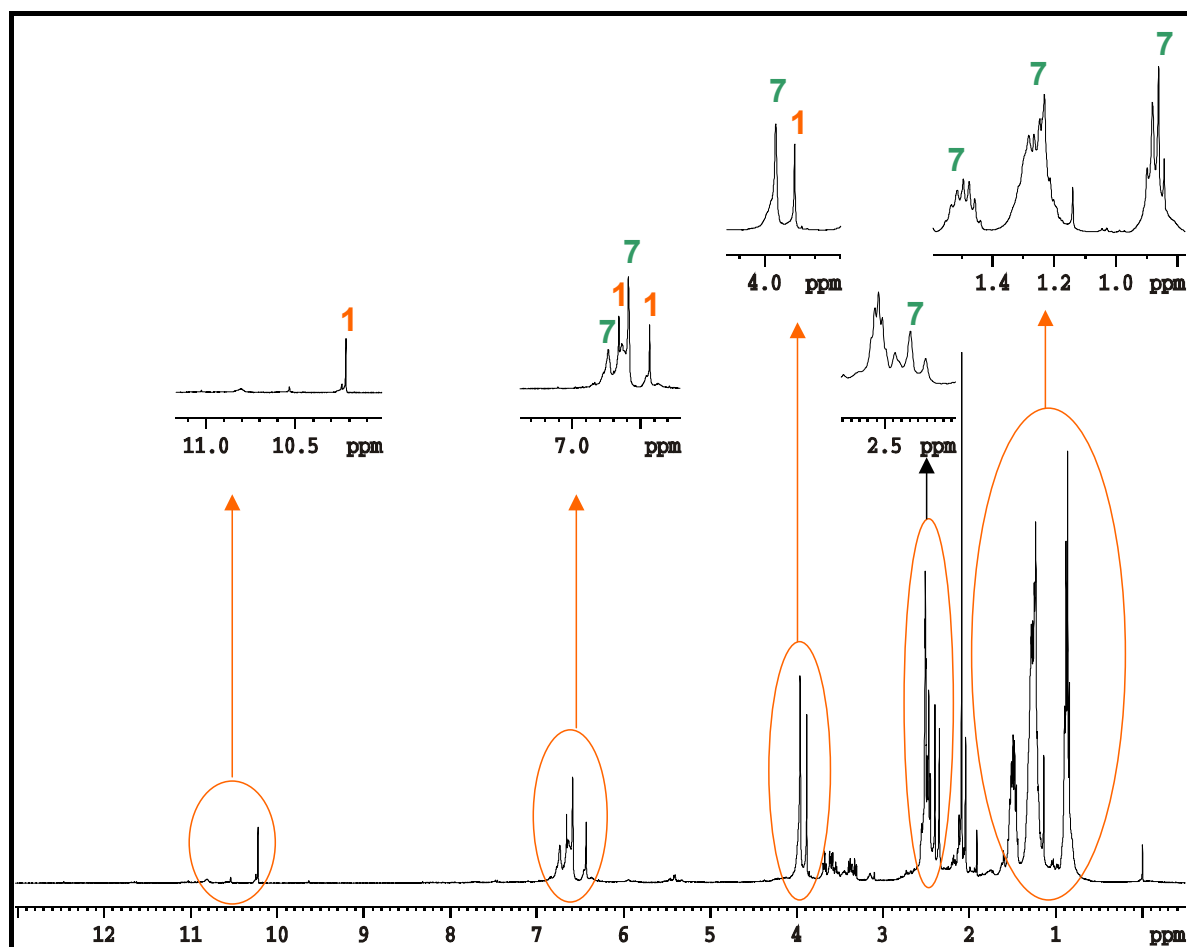
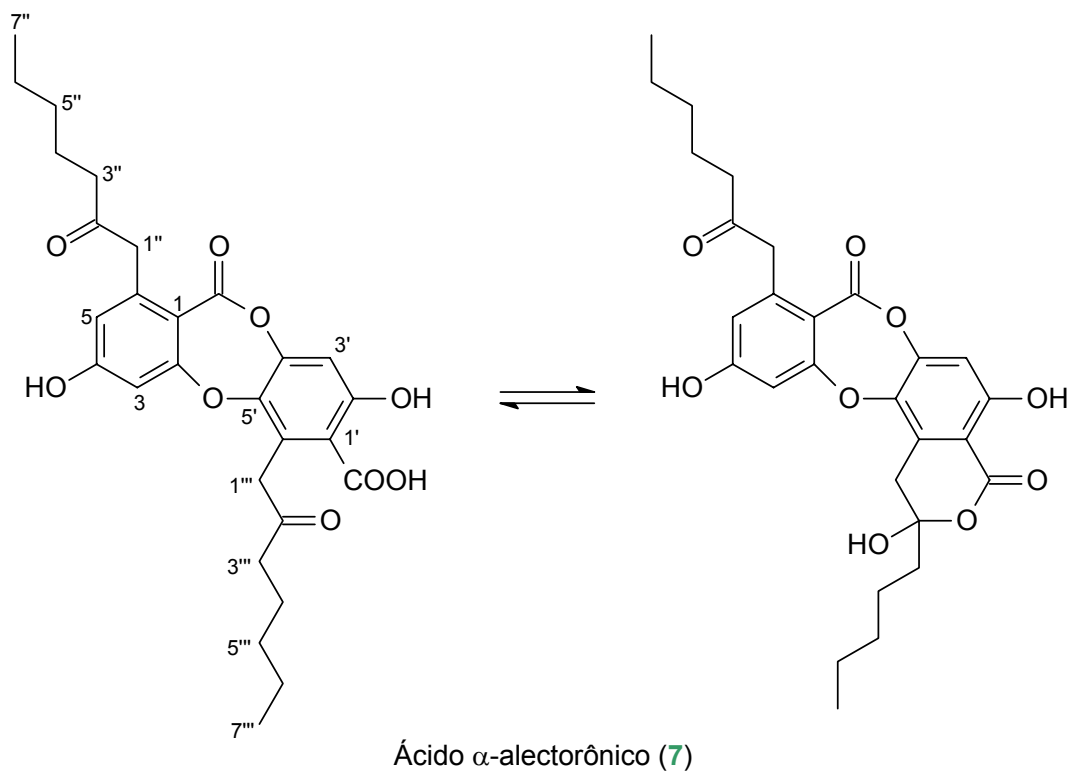


FIGURA 4.59: Espectro de RMN de ^1H da amostra **Pbrev** (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.

Apesar dos relatos na literatura a respeito da estrutura do ácido α -alcoarônico (7), os assinalamentos completos de RMN da substância ainda não foram publicados. HUNECK e YOSHIMURA (1996) apresentaram somente a atribuição dos sinais de RMN de ^1H , sem as devidas multiplicidades e constantes de acoplamento. A seguir, na tabela 4.8, encontram-se as atribuições dos sinais de RMN.

TABELA 4.8: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido α -alcoarônico (7) (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	HUNECK e YOSHIMURA, 1996 (ppm)*
				$\delta^1\text{H}$
1	-	111,6	-	-
2	-	161,7	-	-
3	6,63 (s)	105,3	-	6,78 (m)
4	-	162,0	-	-
5	6,58 (s)	117,0	47,0; 105,3; 111,6; 162,0	6,78 (m)
6	-	141,5	-	-
7	-	163,3	-	-
1'	-	116,9	-	-
2'	-	161,4	-	-
3'	6,71 (s)	106,8	-	6,78 (m)
4'	-	148,9	-	-
5'	-	141,3	-	-
6'	-	129,8	-	-
7'	-	169,6	-	-
1''	3,95 (s)	47,0	111,6; 117,0; 141,3; 206,4	4,04 (s)
2''	-	206,4	-	-
3''	2,47 (t, J=7,38 Hz)	41,7	22,6; 30,7; 206,4	2,54 (t)

1''	*	*	-	3,90 (s/)
2''	-	*	-	-
3''	*	30,8	-	2,16 (m)
4''	1,48 (<i>quint</i> , J=7,38 Hz)	22,6	~21,8; ~30,6; 41,7; 206,4	1,05-1,85 (m)
4'''	1,51 (<i>quint</i> , J=7,38 Hz)	22,7	~21,8; ~30,6; 30,8;	1,05-1,85 (m)
5'' e 5'''	1,20-1,30 (m)	30,6 e 30,7	21,8; 21,9	1,05-1,85 (m)
6'' e 6'''	1,20-1,30 (m)	21,8 e 21,9	13,6; 13,7; 30,6; 30,7	1,05-1,85 (m)
7'' e 7'''	0,86 e 0,88 (<i>t</i> , J=7,11 Hz)	13,7 e 13,8	21,8; 21,9; 30,6; 30,7	0,80-1,05 (m)

*Deslocamentos químicos não identificados, possivelmente devido ao equilíbrio entre os tautômeros do ácido α -electrônico. ** Dados da literatura obtidos em acetona-d₆ / 100 MHz (¹H).

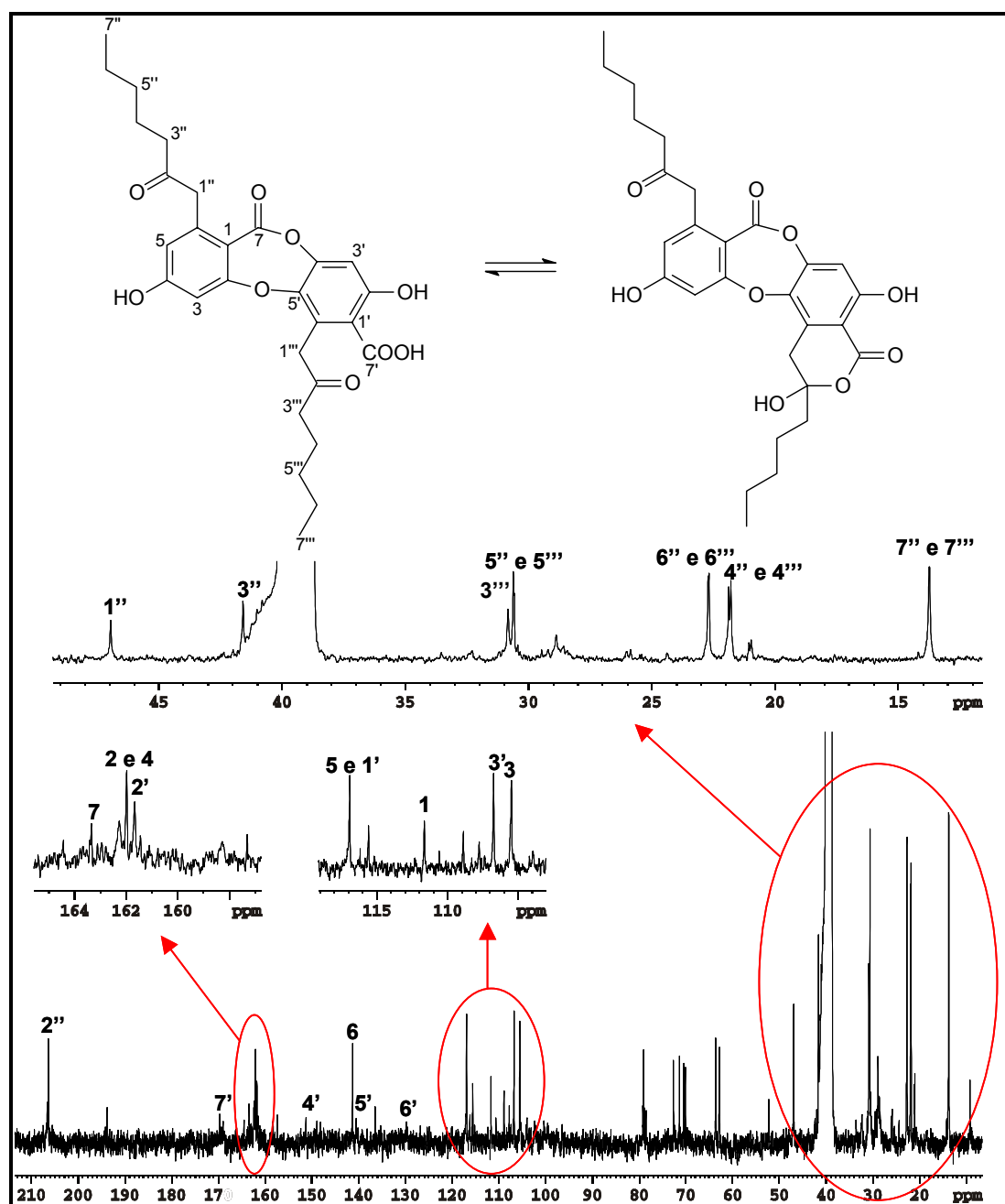


FIGURA 4.60: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra **Pbreve** com atribuições do ácido α -alectorônico (**7**) em destaque – análise de RMN em solução.

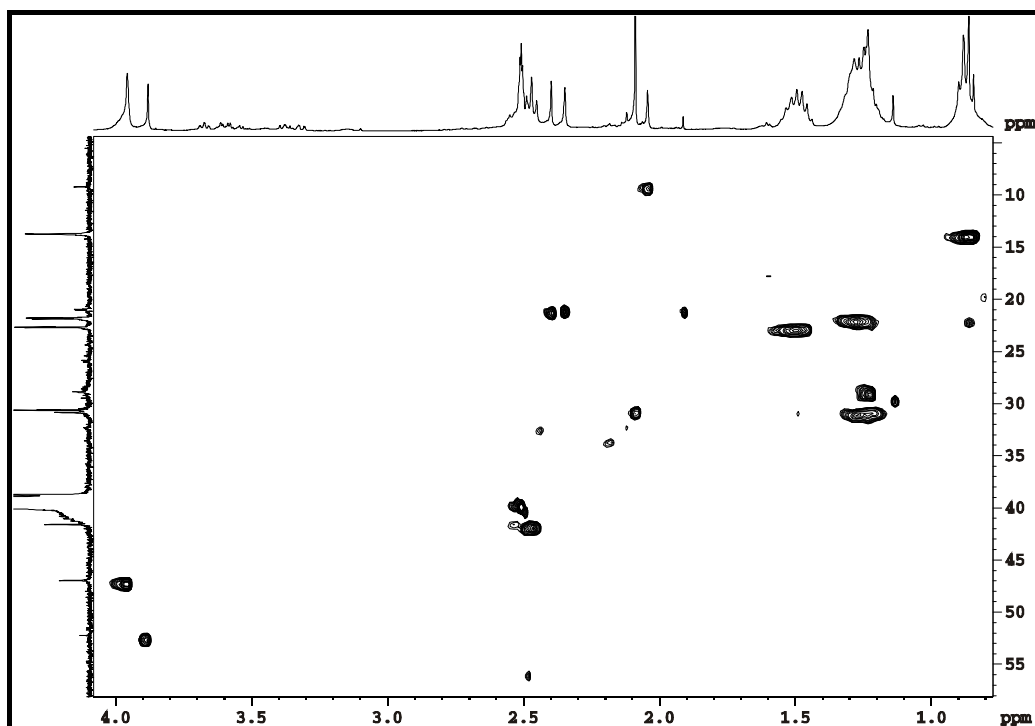


FIGURA 4.61: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC, da amostra **Pbrev** – ampliação 1.

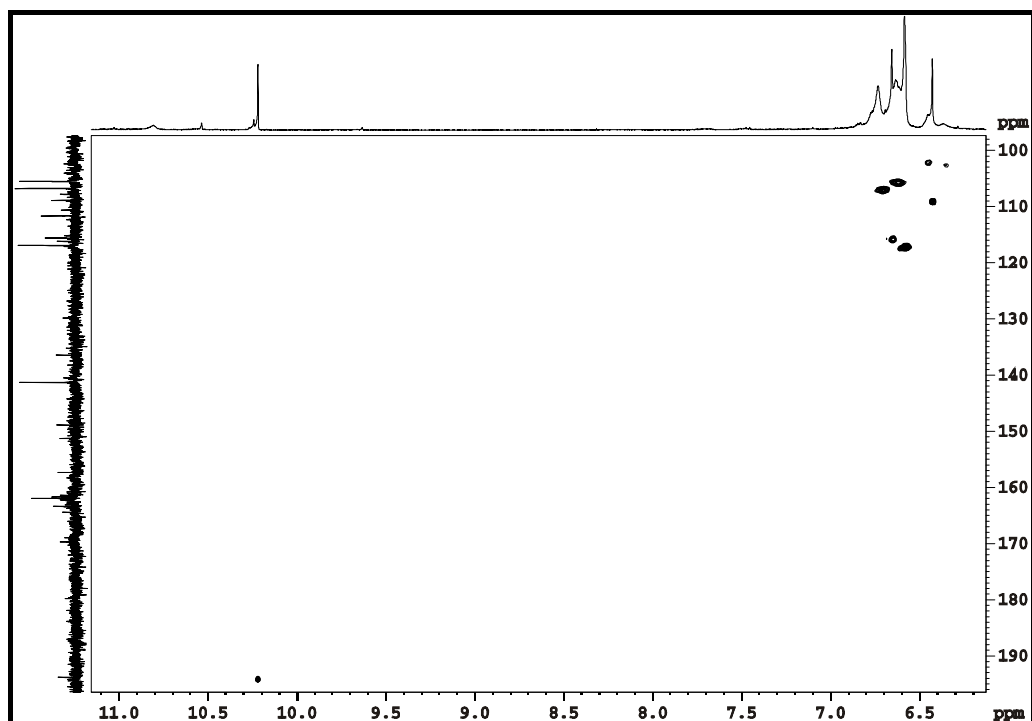


FIGURA 4.62: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC, da amostra **Pbrev** – ampliação 2.

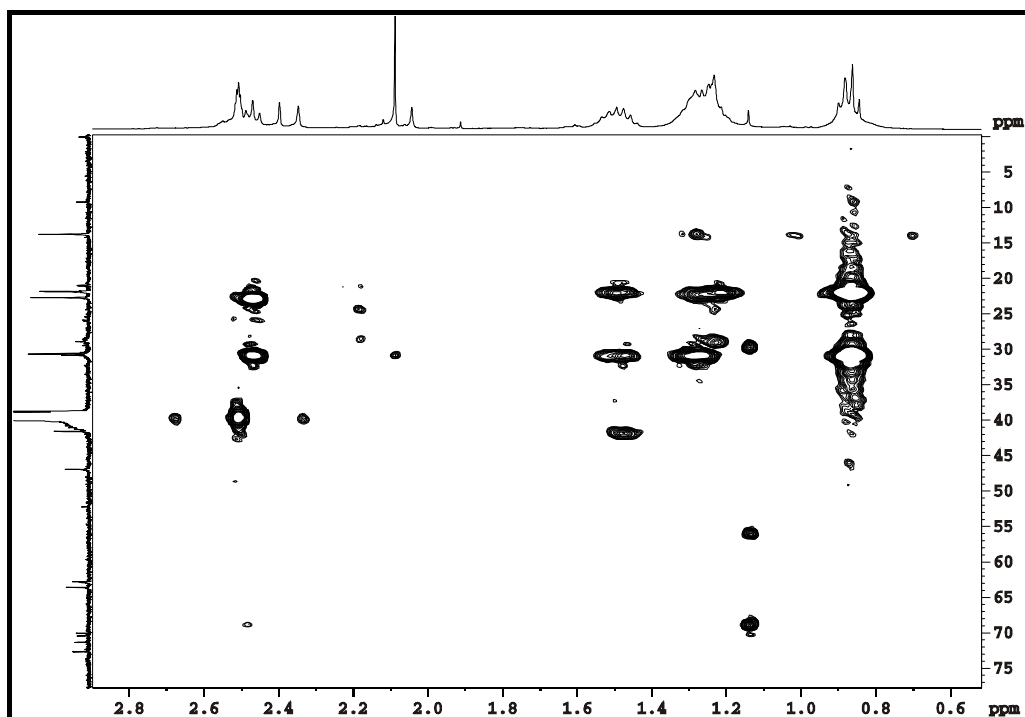


FIGURA 4.63: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra **Pbreve** – ampliação 1.

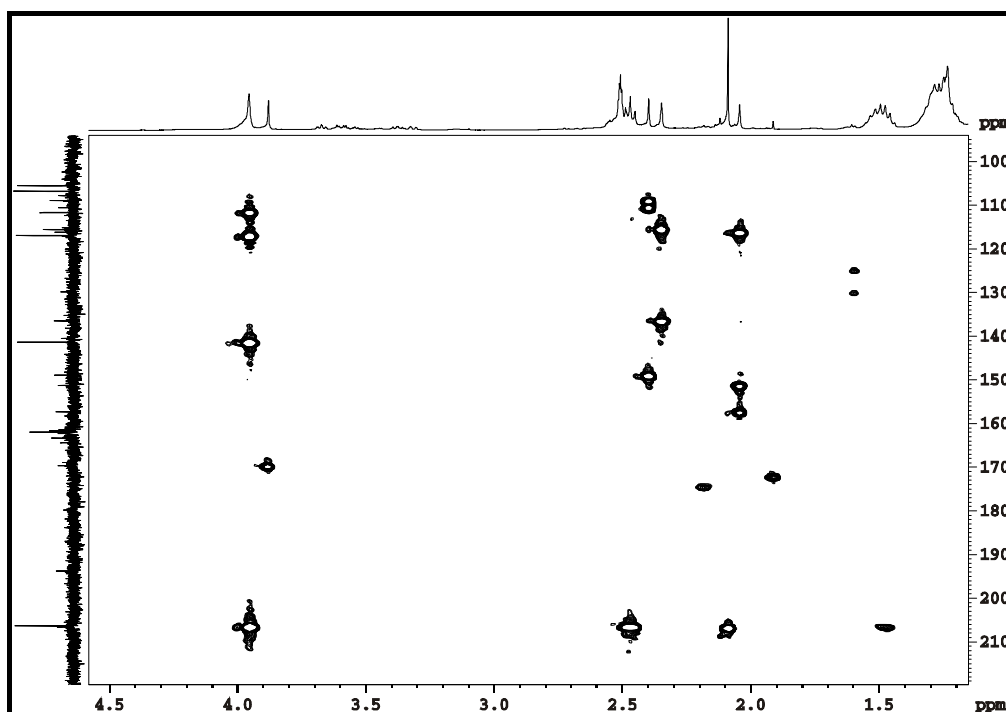


FIGURA 4.64: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra **Pbreve** – ampliação 2.

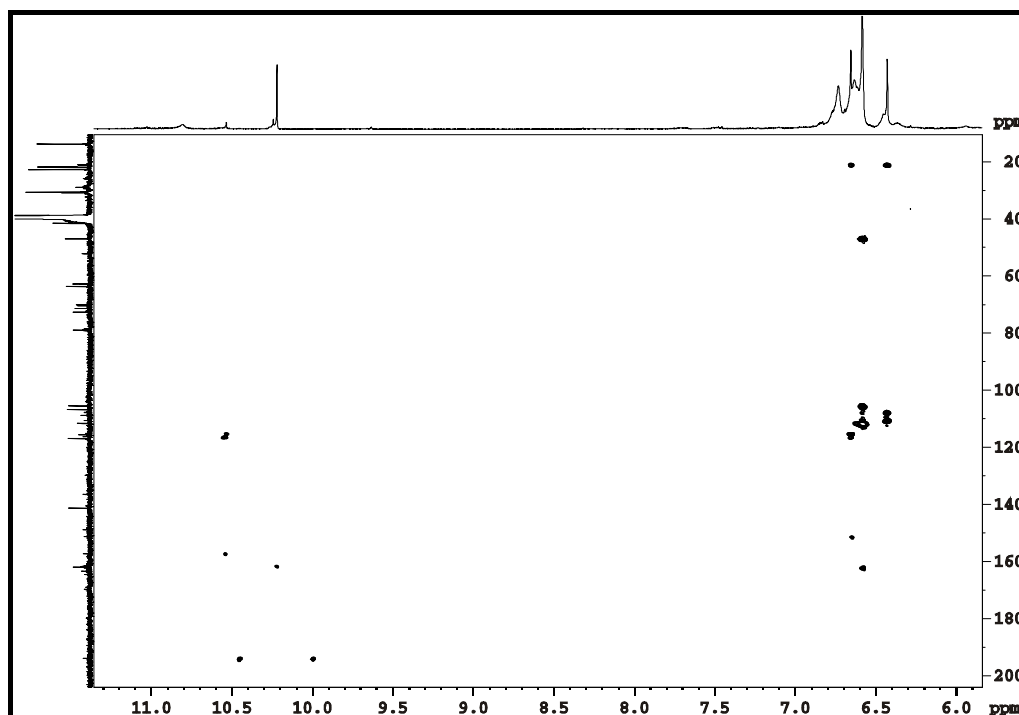


FIGURA 4.65: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra **Pbrev** – ampliação 3.

4.3.1.7 – Líquen *Parmotrema cornuta* (Pcor)

A amostra **Pcor** (*Parmotrema cornuta*) apresentou sinais característicos do depsídeo atranorina (Figura 4.66). Os demais metabólitos secundários presentes no extrato não foram identificados devido ao congestionamento de sinais (Figuras 4.67 e 4.68).

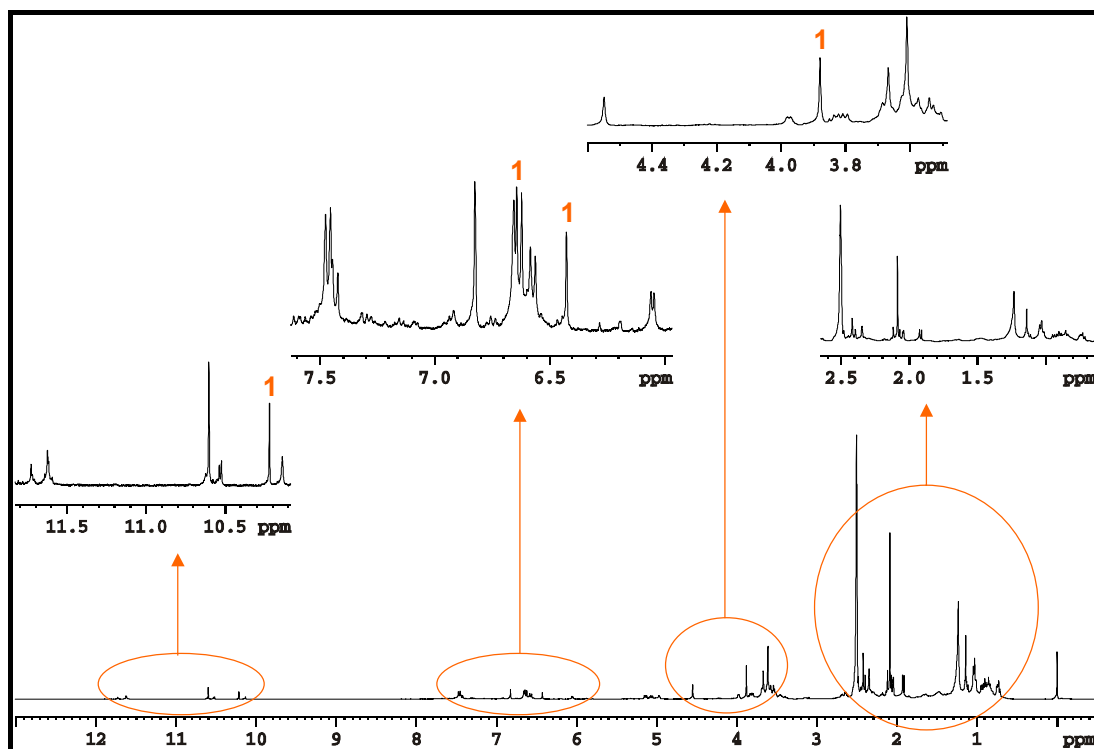


FIGURA 4.66: Espectro de RMN de ^1H da amostra **Pcor** (DMSO-d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.

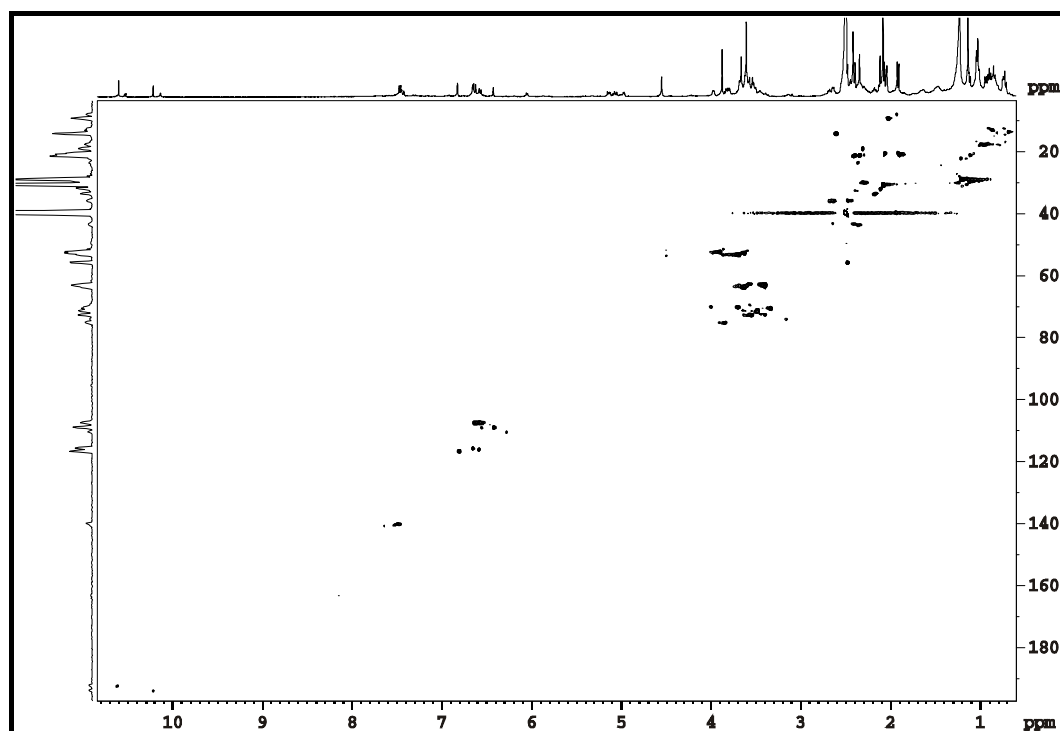


FIGURA 4.67: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO-d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pcor**.

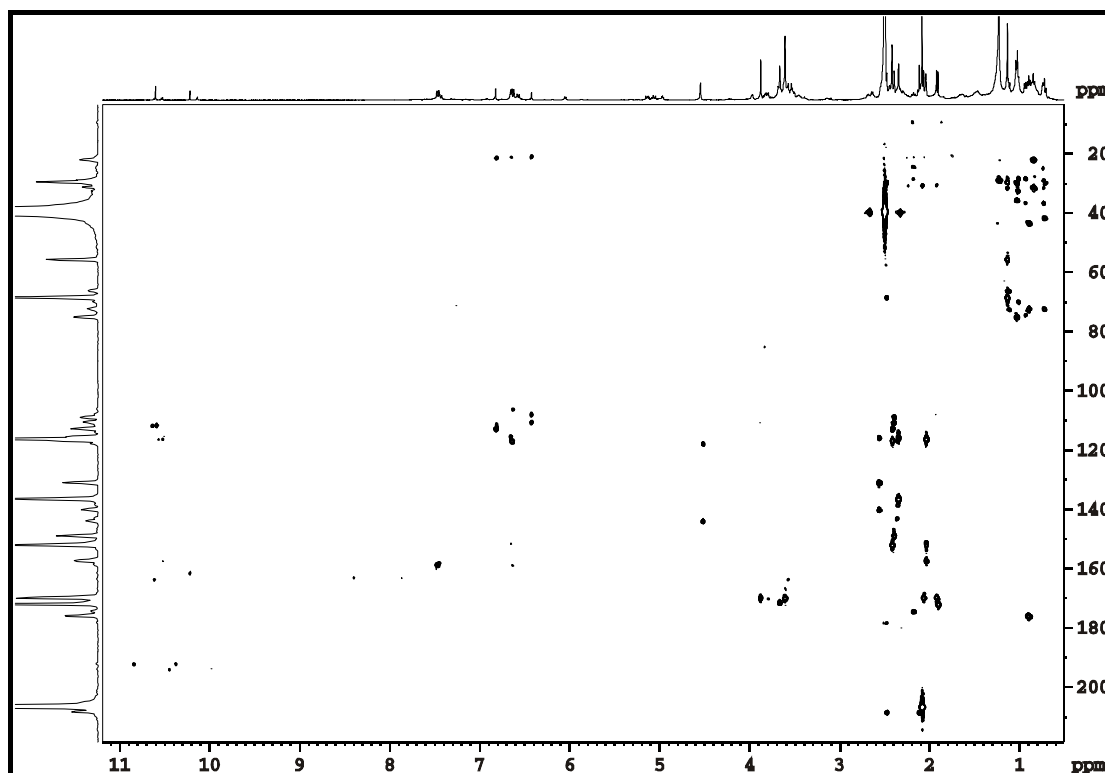
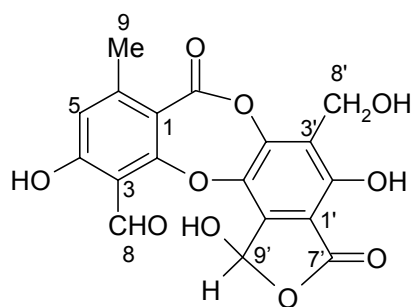


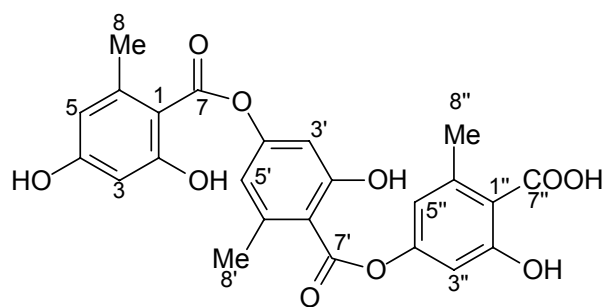
FIGURA 4.68: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra **Pcor**.

4.3.1.8 – Líquen *Parmotrema delicatulum* (Pdel)

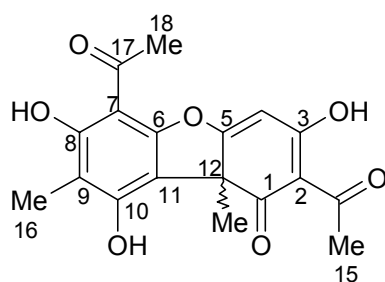
A amostra **Pdel** (*Parmotrema delicatulum*) apresentou sinais de RMN de ^1H (Figura 4.69) característicos dos ácidos salazínico (8), girofórico (9) e úsnico (10). Foram observadas também pequenas quantidades do depsídeo atranorina (1), identificado pelo sinal da metoxila em δ 3,88. Os sinais das demais substâncias foram identificados pelo espectro de ^1H , em comparação com os dados da literatura e confirmados pelos experimentos bidimensionais (Figura 4.71 a 4.77) e encontram-se discriminados nas tabelas 4.9, 4.10 e 4.11. A aquisição do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.70) permitiu a completa elucidação do ácido girofórico (9), no entanto, as atribuições dos sinais de ^{13}C dos ácidos salazínico (8) e úsnico (10) não foram completadas, devido à sobreposição de sinais na mistura.



Ácido salazínico (8)



Ácido girofórico (9)



Ácido úsnico (10)

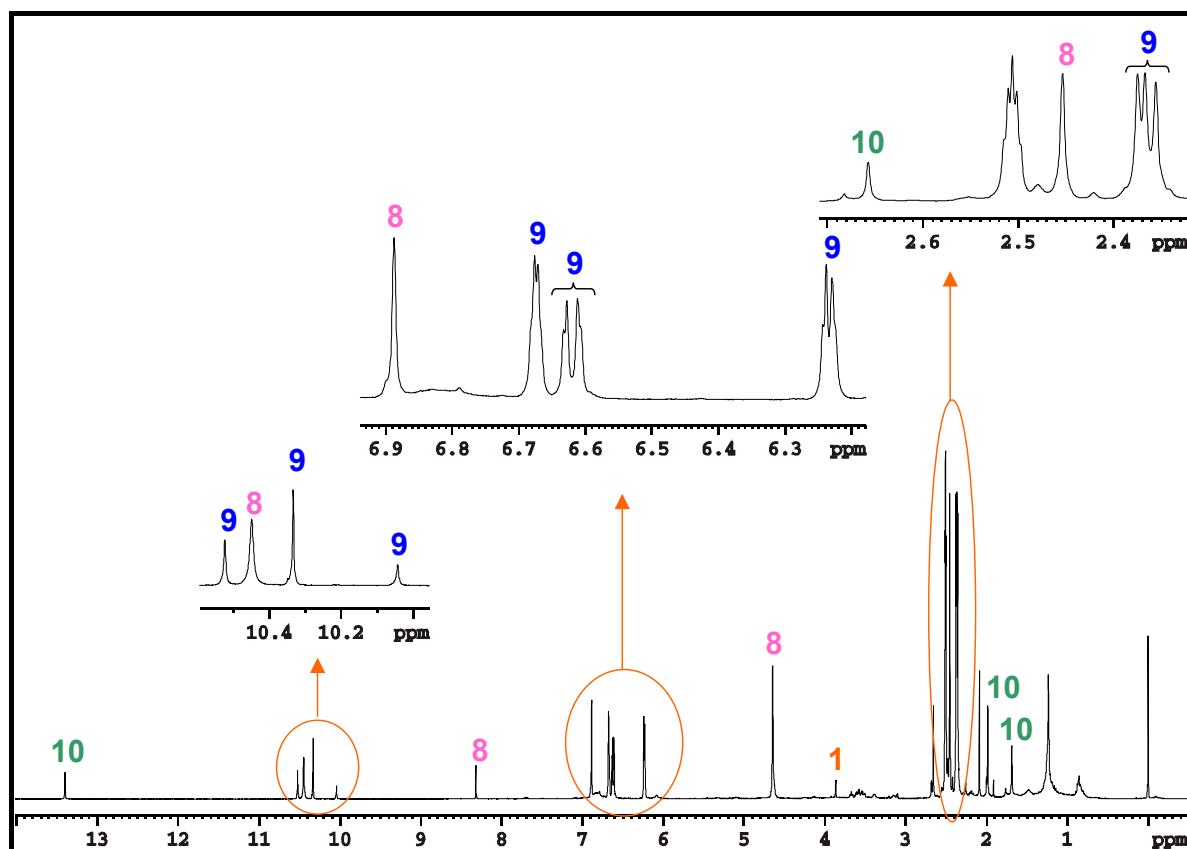


FIGURA 4.69: Espectro de RMN de ^1H da amostra **PdeI** (DMSO-d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.

TABELA 4.9: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido salazínico (8) (DMSO-d₆, DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	EIFLER-LIMA et al., 2000 (ppm)**	
				$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	111,9	-	-	111,9
2	-	*	-	-	163,0
3	-	*	-	-	110,3
4	-	163,9	-	-	164,0
5	6,89 (s)	117,2	21,4; 111,9; 163,9	6,84 (m)	117,5
6	-	152,2	-	-	152,8
7	-	*	-	-	160,0
8	10,45 (s)	192,7	-	-	193,5
9	2,45 (s)	21,4	111,9; 117,2; 152,2	2,47 (d, J=0,8 Hz)	21,9
1'	-	*	-	-	109,6
2'	-	153,2	-	-	153,3
3'	-	123,3	-	-	122,5
4'	-	147,9	-	-	147,9
5'	-	*	-	-	137,6
6'	-	*	-	-	137,5
7'	-	*	-	-	166,3
8'	4,65 (s)	52,4	123,3; 147,9; 153,2	4,70 (s)	54,2
9'	*	*	-	6,78 (s/l)	95,2
9'-OH	8,33 (s)	-	-	8,30 (s/l)	-

*Deslocamentos químicos não identificados devido à sobreposição de sinais. **Dados da literatura obtidos em CDCl₃:DMSO-d₆ 1:3/ 300 MHz (¹H); 75 MHz (¹³C)

TABELA 4.10: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido girofórico (9) (DMSO-d₆, DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	NARUI et al., 1998 (ppm)*	
				$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	108,6	-	-	108,23

2	-	159,9	-	-	160,08
3	6,25 (<i>d</i> , J=2,10 Hz)	100,3	108,6; 159,9; 166,9	6,24 (<i>d</i> , J=2,14 Hz)	100,49
4	-	160,9	-	-	161,08
5	6,23 (<i>d</i> , J=2,10 Hz)	109,7	21,2; 100,3; 108,6; 160,9	6,24 (<i>d</i> , J=2,14 Hz)	109,85
6	-	140,2	-	-	140,21
7	-	166,9	-	-	167,07
8	2,36 (s)	21,2	109,7; 140,2	2,37 (s)	21,22
1'	-	118,2	-	-	117,88
2'	-	156,2	-	-	156,30
3'	6,68 (<i>d</i> , J=2,10 Hz)	107,0	114,1; 118,2; 152,0; 156,2	6,70 (<i>d</i> , J=1,68 Hz)	107,17
4'	-	152,0	-	-	152,18
5'	6,67 (<i>d</i> , J=2,10 Hz)	114,1	19,2; 107,1; 118,2; 152,0; 166,0	6,67 (<i>d</i> , J=1,68 Hz)	114,17
6'	-	138,2	-	-	137,95
7'	-	166,0	-	-	165,52
8'	2,37 (s)	19,2	118,2; 138,2	2,38 (s)	19,26
1''	-	117,3	-	-	116,80
2''	-	158,8	-	-	158,77
3''	6,64 (<i>d</i> , J=1,96 Hz)	107,0	114,2; 152,0; 158,8	6,62 (<i>d</i> , J=1,98 Hz)	107,14
4''	-	151,9	-	-	152,08
5''	6,61 (<i>d</i> , J=1,96 Hz)	114,2	20,9; 107,0; 117,3; 151,9	6,59 (<i>d</i> , J=1,98 Hz)	114,43
6''	-	139,5	-	-	139,56
7''	-	170,6	-	-	170,37
8''	2,38 (s)	20,9	114,2; 117,2; 139,5	2,40 (s)	20,84
2'-OH	10,04 (s)	-	100,3; 109,7; 160,9	10,42 (s)	-
2-OH	10,33 (s)	-	100,3; 108,6; 159,9	10,29 (s)	-
2''-OH	10,51 (s)	-	107,1; 118,2; 156,2	9,96 (s)	-
4-OH	-	-	-	-	-

* Dados da literatura obtidos em DMSO- d_6 / 500 MHz (^1H); 125 MHz (^{13}C).

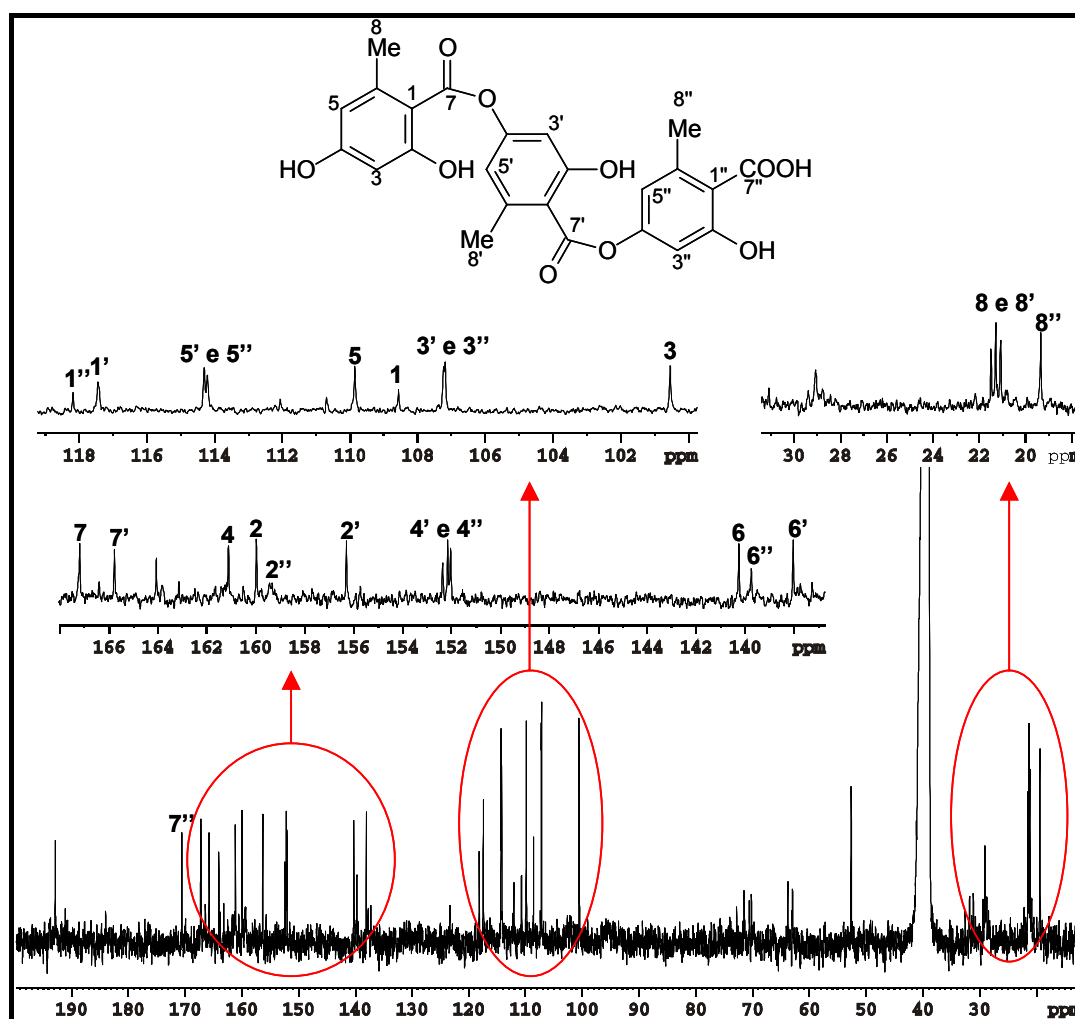


FIGURA 4.70: Espectro de RMN de ^{13}C da amostra **Pdel** (material em solução) com atribuições do ácido gikofórico (9) em destaque.

TABELA 4.11: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido úsnico (10) (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	RASHID et al., 1999 (ppm)**	
				$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	*	-	-	198,07
2	-	*	-	-	105,10
3	-	*	-	-	191,71
4	6,05 (s)	99,6	-	5,96 (s)	98,34
5	-	*	-	-	179,40
6	-	*	-	-	155,21
7	-	101,0	-	-	101,54

8	-	162,3	-	-	163,91
9	-	106,4	-	-	109,36
10	-	158,2	-	-	157,52
11	-	*	-	-	103,96
12	-	*	-	-	59,08
13	1,69 (s)	31,4	-	1,75 (s)	32,11
14	-	*	-	-	201,77
15	1,14 (s)	29,3	-	2,65 (s)	27,88
16	1,99 (s)	7,4	106,4; 158,2; 162,3	2,10 (s)	7,54
17	-	200,9	-	-	200,32
18	2,66 (s)	30,8	200,9	2,66 (s)	31,27
3-OH	*	-	-	18,81 (s)	-
8-OH	13,40 (s)	-	101,0; 106,4; 162,3	13,30 (s)	-

*Deslocamentos químicos não identificados devido à sobreposição de sinais. **Dados da literatura obtidos em CDCl_3 / 500 MHz (^1H); 125 MHz (^{13}C).

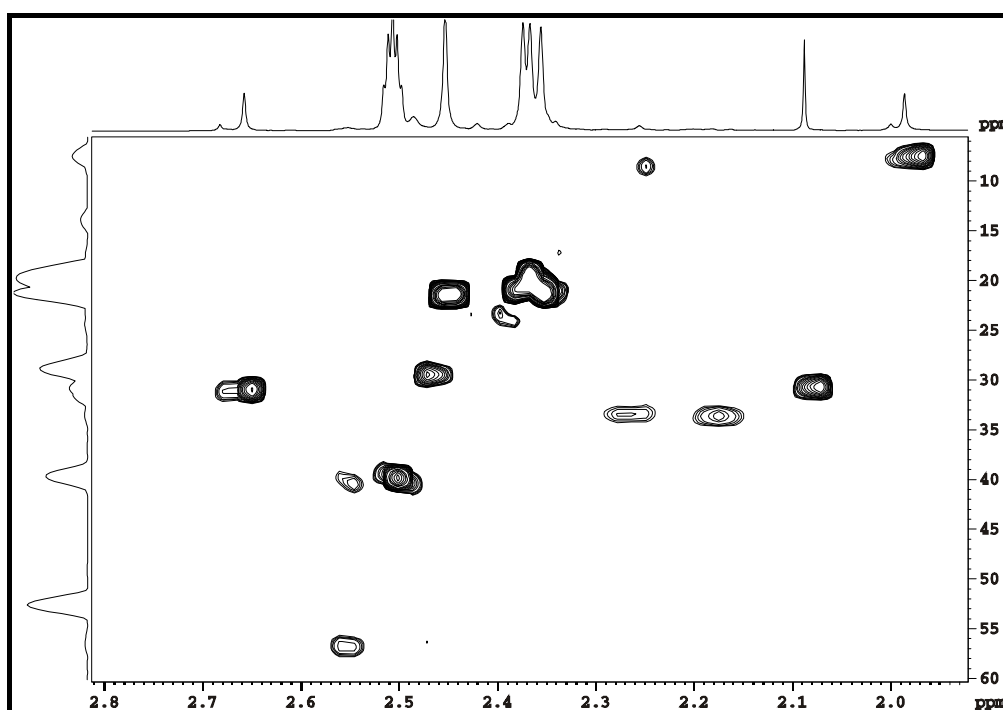


FIGURA 4.71: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdel** – ampliação 1.

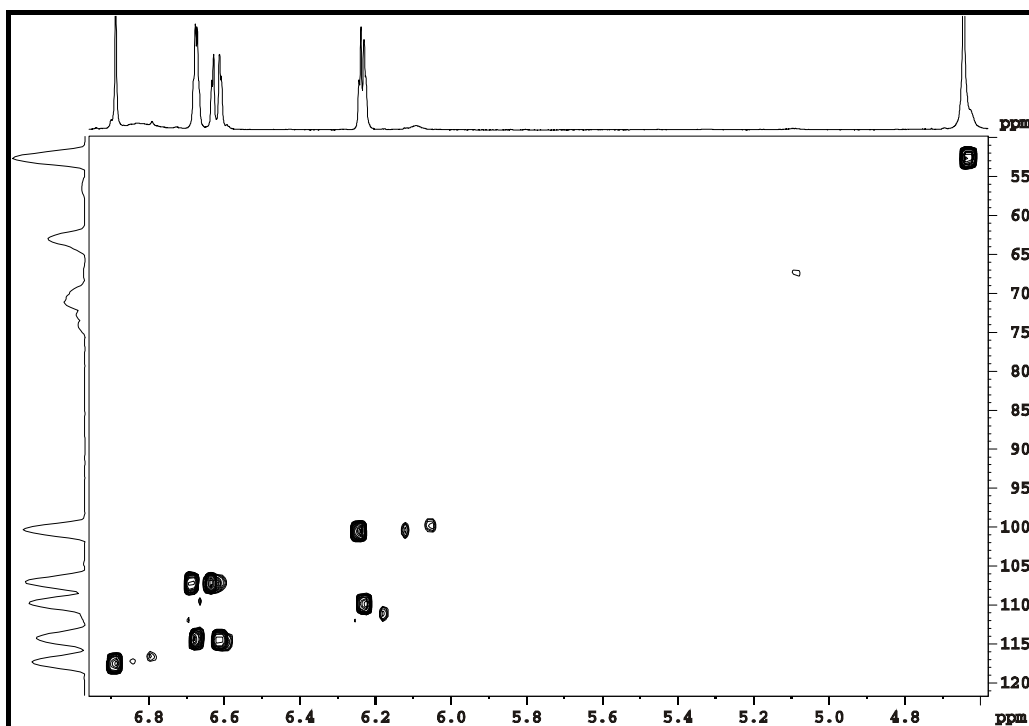


FIGURA 4.72: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdel** – ampliação 2.

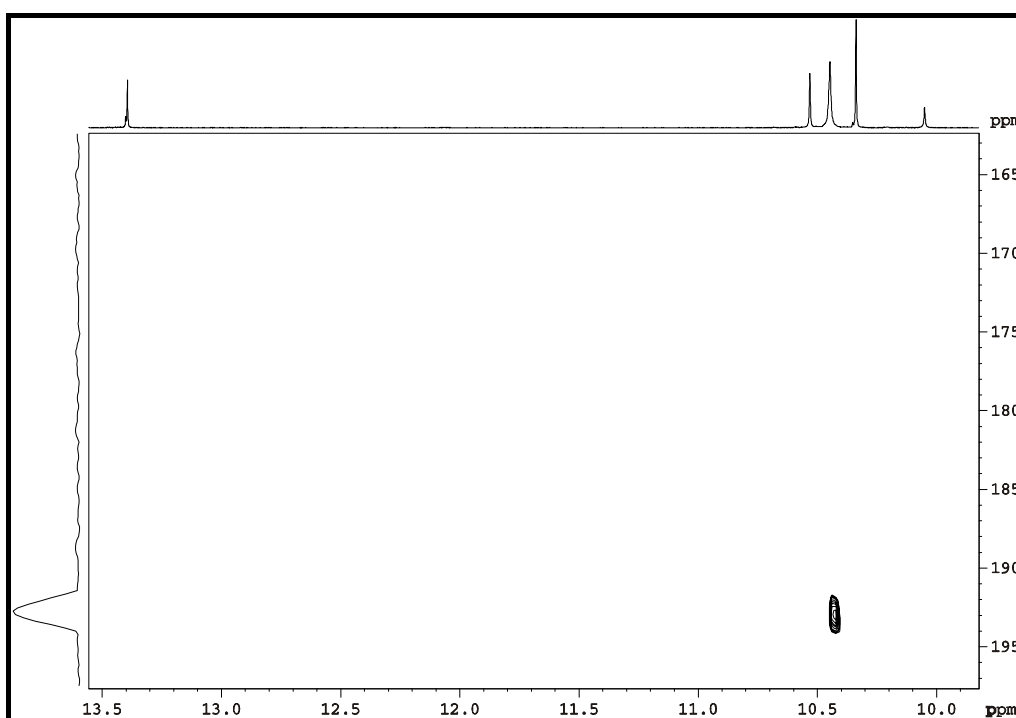


FIGURA 4.73: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdel** – ampliação 3.

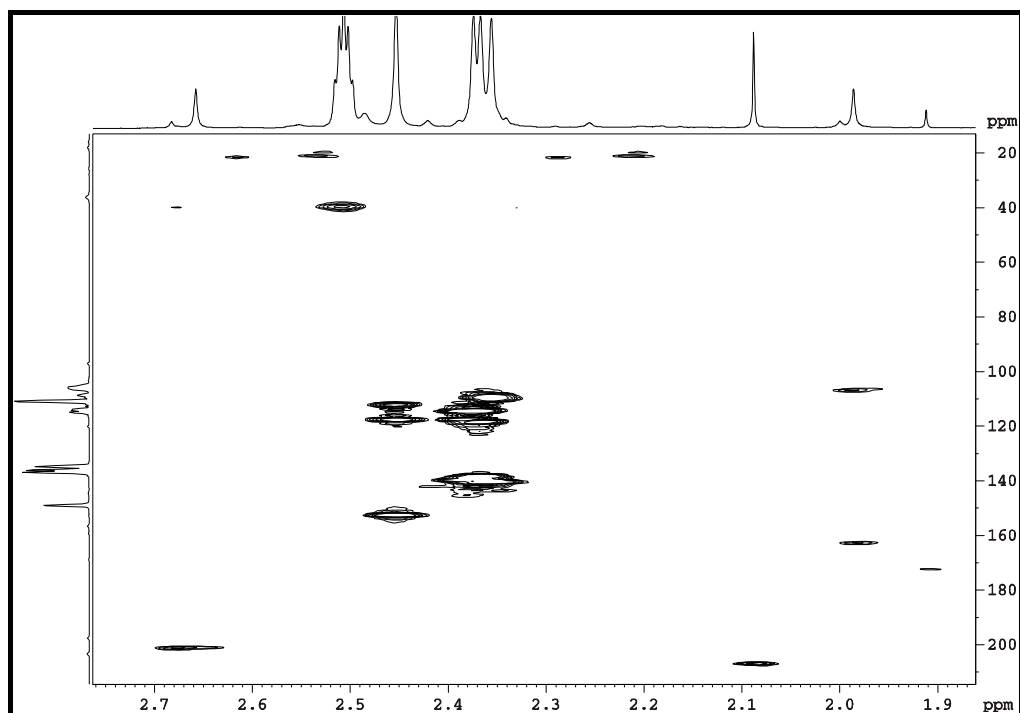


FIGURA 4.74: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdel** – ampliação 1.

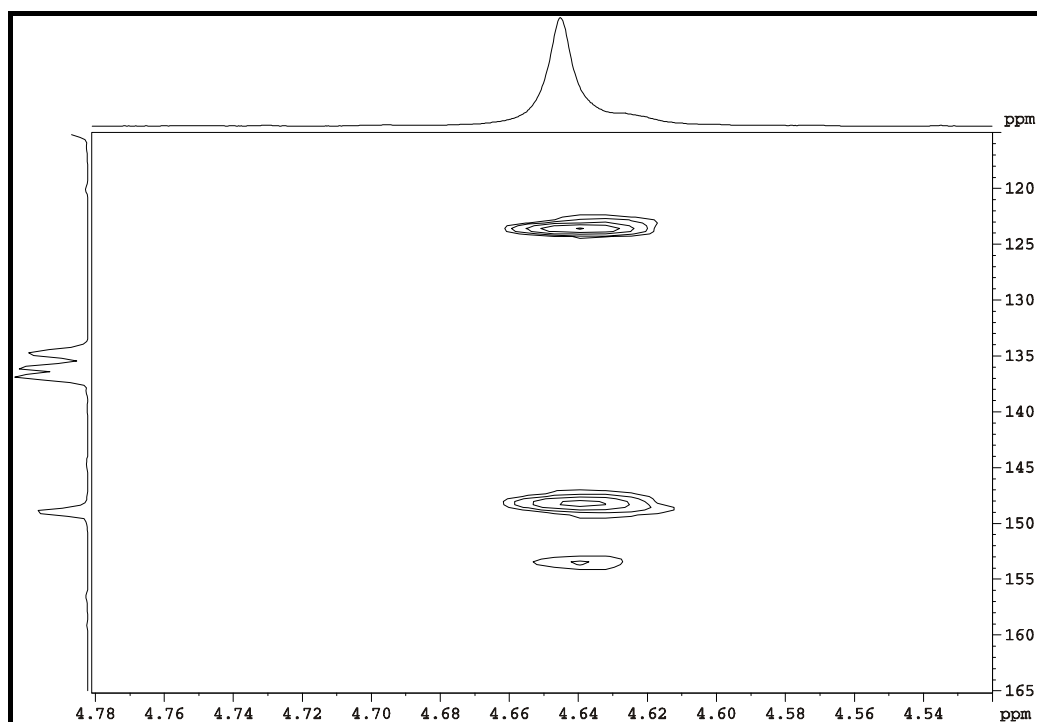


FIGURA 4.75: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdel** – ampliação 2.

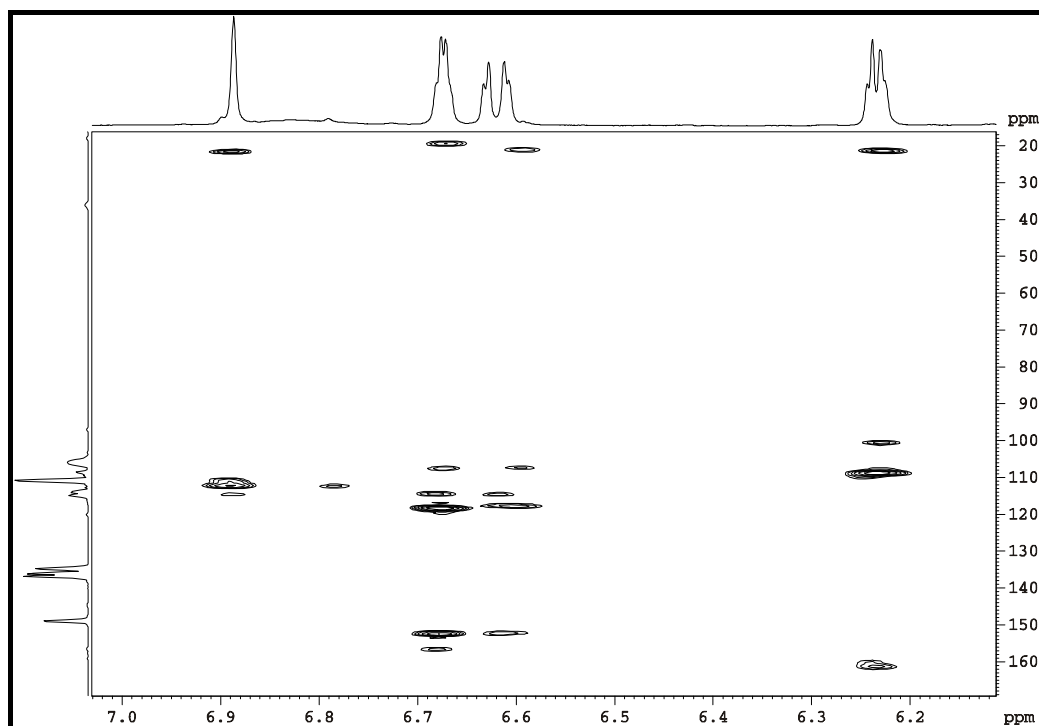


FIGURA 4.76: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdel** – ampliação 3.

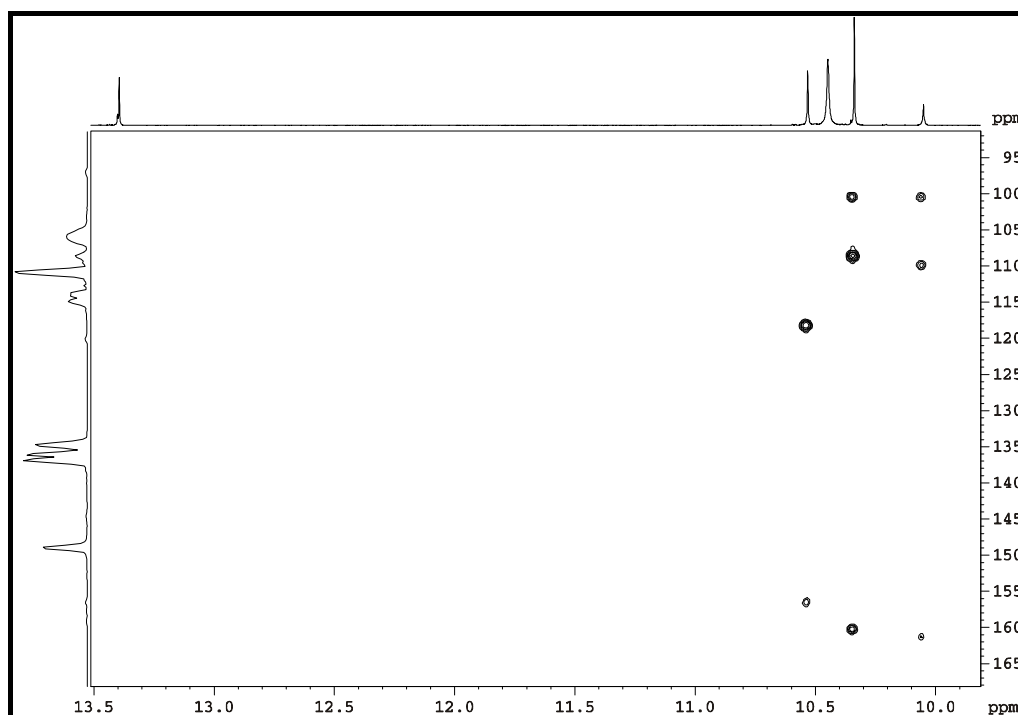


FIGURA 4.77: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdel** – ampliação 4.

Em RMN há uma poderosa ferramenta para a análise de misturas complexas, principalmente sem a necessidade de separação química prévia, a qual possibilita a visão geral dos tamanhos das partículas em uma amostra e a detecção de impurezas: a técnica DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) (SOUZA e LAVERDE JR., 2002).

O experimento de DOSY é baseado na medida do coeficiente de difusão, que é realizada através de experimentos unidimensionais com variações da amplitude dos pulsos de gradiente de campo. À medida que o gradiente de campo aumenta, há uma maior atenuação dos sinais, proporcionando a sua diminuição exponencial ao longo dos experimentos. Desta forma, como o coeficiente de difusão está relacionado ao decaimento, quanto maior a velocidade de decaimento dos sinais, maior o coeficiente de difusão da molécula.

Visto que a separação dos sinais pelo seu coeficiente de difusão é melhor visualizada em substâncias com distintos volumes moleculares, a amostra **Pdel**, a qual apresenta a maior diferença no volume molecular das substâncias identificadas, foi empregada para a análise pela técnica DOSY (Figura 4.78).

Os sinais do ácido girofórico (9) apresentaram menor coeficiente de difusão que os sinais dos ácidos salazínico (8) e úsnico (10). Entretanto, a visualização foi comprometida em regiões de grande proximidade de sinais, como em 2,0-2,5 ppm, e discrepâncias nos coeficientes de difusão também foram observadas na região de 10,0-10,5 ppm. Os diferentes coeficientes de difusão foram evidenciados na região aromática (6,35-6,90 ppm), onde foi possível correlacionar corretamente os sinais de hidrogênios aromáticos dos ácidos girofórico (9) e salazínico (8) (Figura 4.78).

Assim, a aplicação da técnica DOSY no extrato **Pdel** permitiu concluir que o emprego desse experimento não seria útil aos demais extratos liquênicos, avaliados nesse trabalho, devido à grande similaridade entre os volumes moleculares das substâncias, além da sobreposição de sinais encontrados.

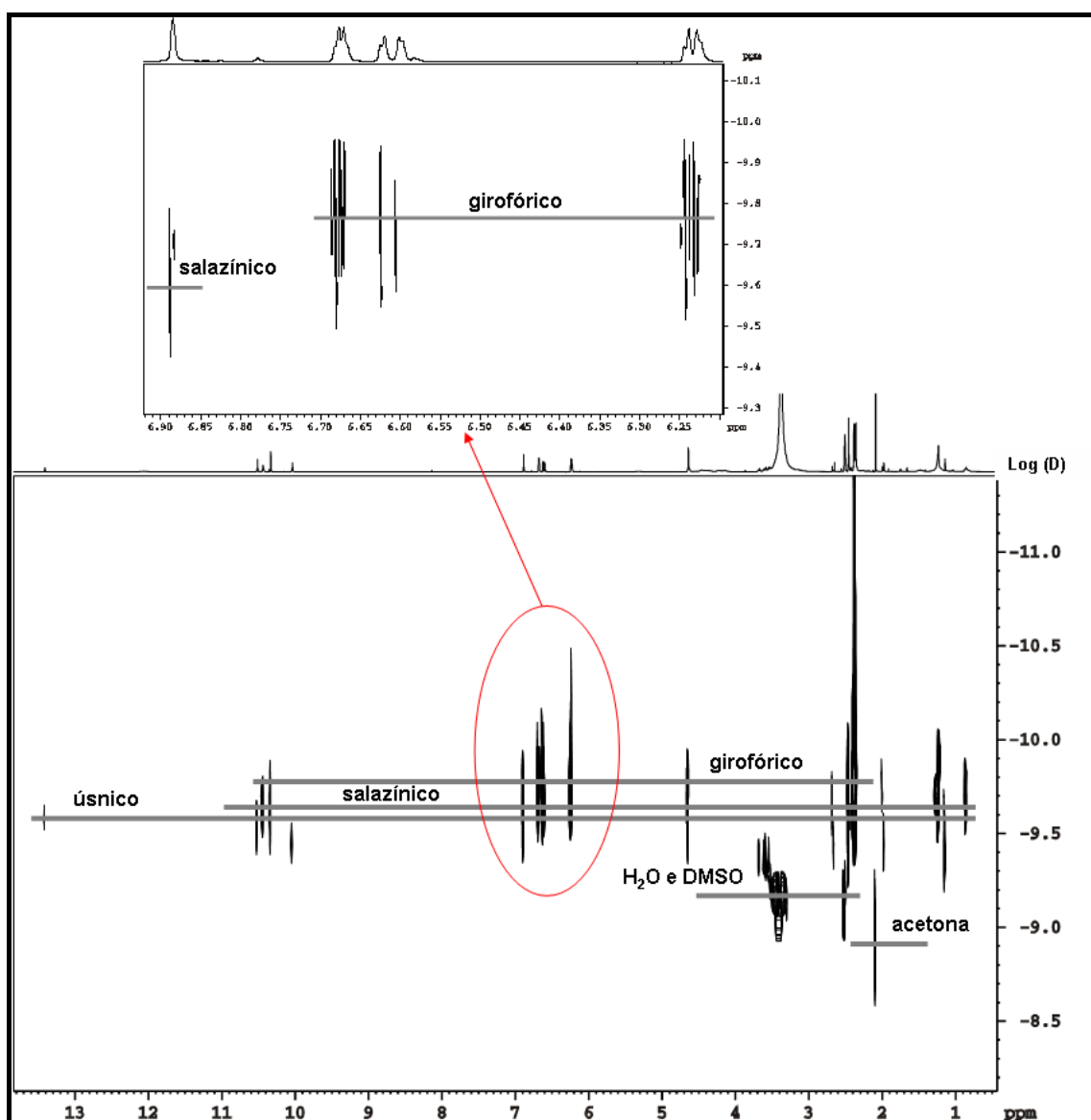
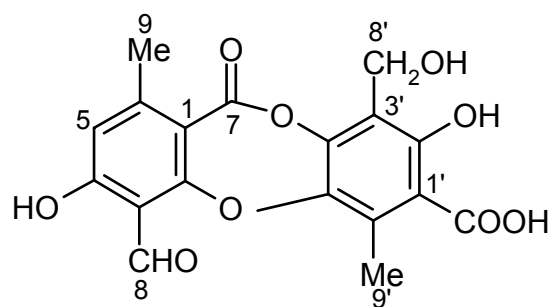


FIGURA 4.78: Espectro de RMN de DOSY (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra **Pdel**, a qual contém uma mistura dos ácidos girofórico (9), salazínico (8) e úsnico (10).

4.3.1.9 – Líquen *Parmotrema dilatatum* (Pdil)

A amostra **Pdil** (*Parmotrema dilatatum*) apresentou sinais característicos do depsídeo atranorina (1) e majoritariamente da depsidona ácido protocetrário (11) (Figura 4.79). A atribuição dos sinais do ácido protocetrário estão apresentadas na tabela 4.12, mediante a aquisição de experimentos de gHSQC e gHMBC (Figuras 4.80 a 4.86), onde a completa identificação foi realizada após a obtenção do espectro de ^{13}C da amostra (Figura 4.87). Na tabela 4.12, também pode ser observado os assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C da literatura

(HUNECK e YOSHIMURA, 1996), os quais apresentam grande concordância com os obtidos experimentalmente neste trabalho.



Ácido protocetrário (**11**)

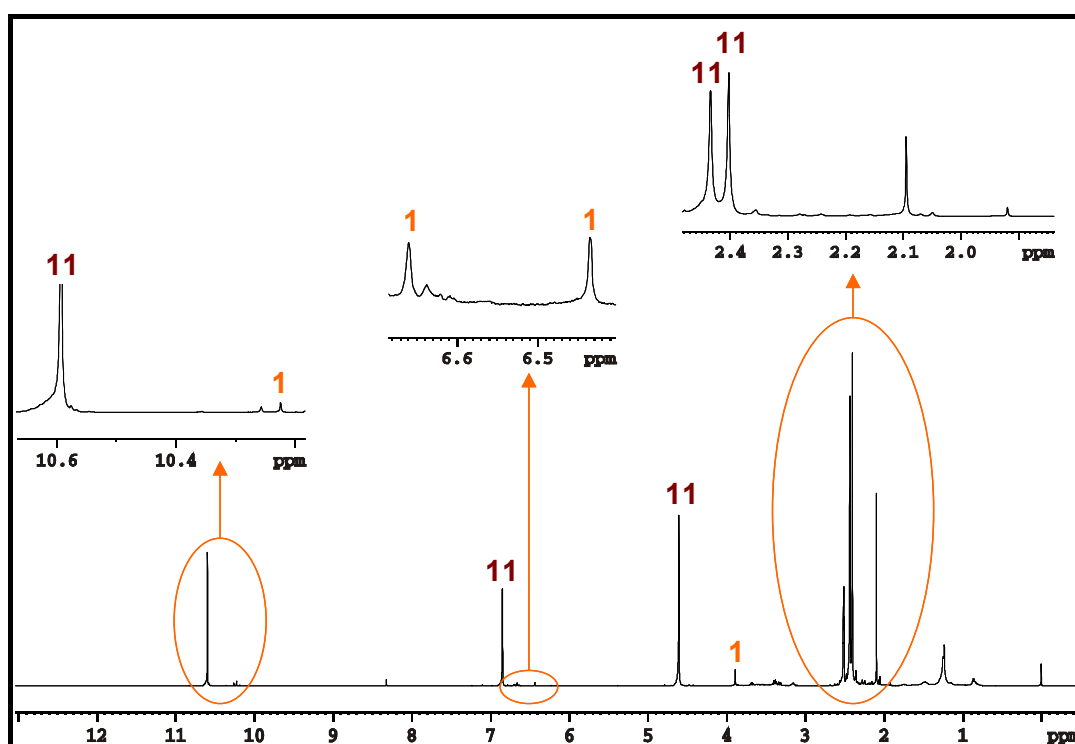


FIGURA 4.79: Espectro de RMN de ^1H da amostra **Pdil** (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.

TABELA 4.12: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido protocetrário (**11**) (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	HUNECK e YOSHIMURA, 1996 (ppm)*	
				$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	112,7	-	-	112,9
2	-	161,4	-	-	165,5
3	-	111,6	-	-	112,0

4	-	163,8	-	-	163,9
5	6,85 (s)	117,3	21,4; 111,6; 112,7; 163,8	6,75 (s)	117,2
6	-	152,2	-	-	152,2
7	-	164,1	-	-	161,8
8	10,59 (s)	191,9	163,8; 111,6; 117,3	10,72 (s)	191,9
9	2,45 (s)	21,4	112,7; 117,3; 152,2	2,67 (s)	21,7
1'	-	116,9	-	-	116,3
2'	-	155,0	-	-	156,6
3'	-	118,7	-	-	112,9
4'	-	144,7	-	-	145,6
5'	-	141,8	-	-	141,7
6'	-	129,6	-	-	131,6
7'	-	170,2	-	-	170,9
8'	4,61 (s)	53,0	118,7; 144,7; 155,0	4,81 (s)	57,7
9'	2,41 (s)	14,6	116,9; 129,6; 141,8	2,47 (s)	14,8

* Dados da literatura obtidos em acetona-d₆ / 200 MHz (¹H); 50 MHz (¹³C).

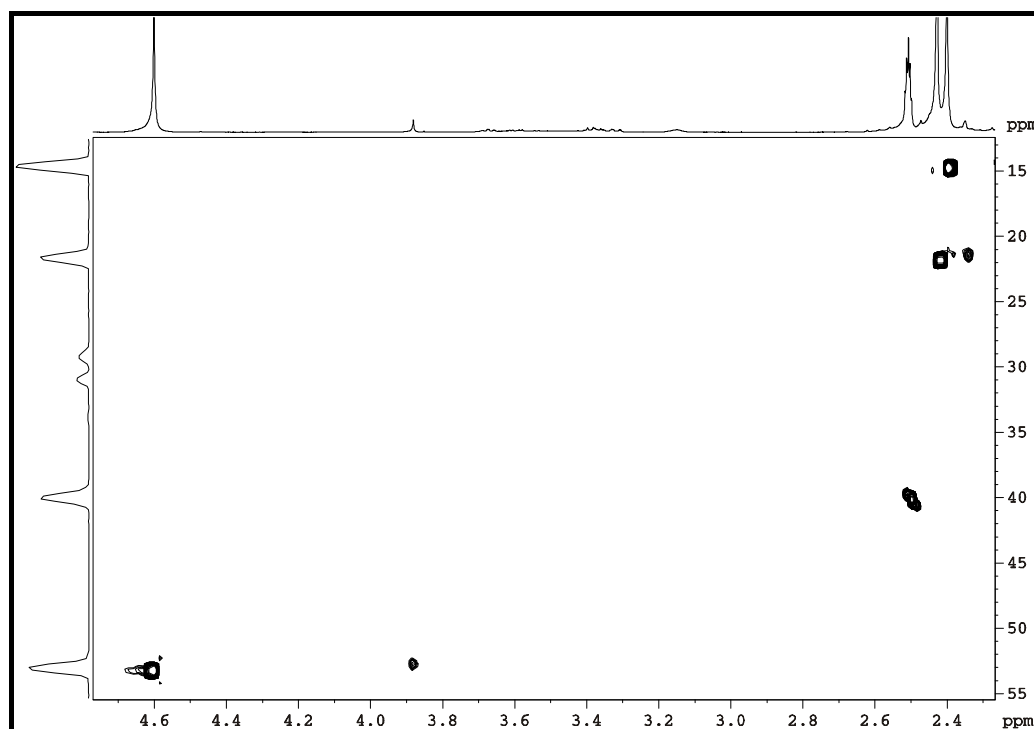


FIGURA 4.80: Correlações ¹H-¹³C, obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO-d₆, DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdil** – ampliação 1.

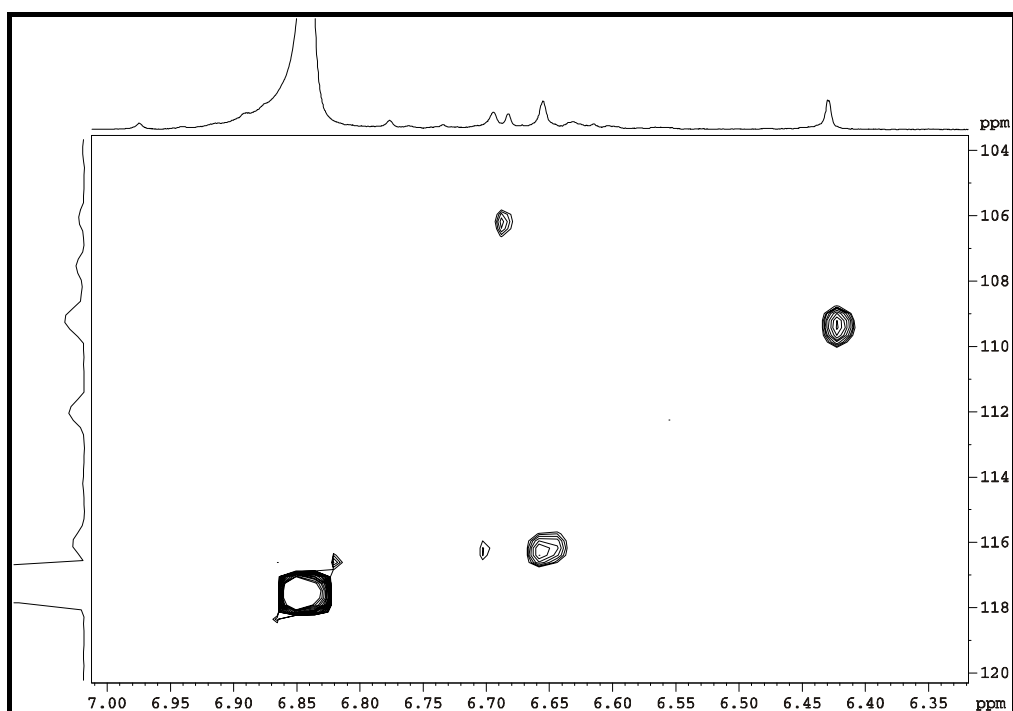


FIGURA 4.81: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdil** – ampliação 2.

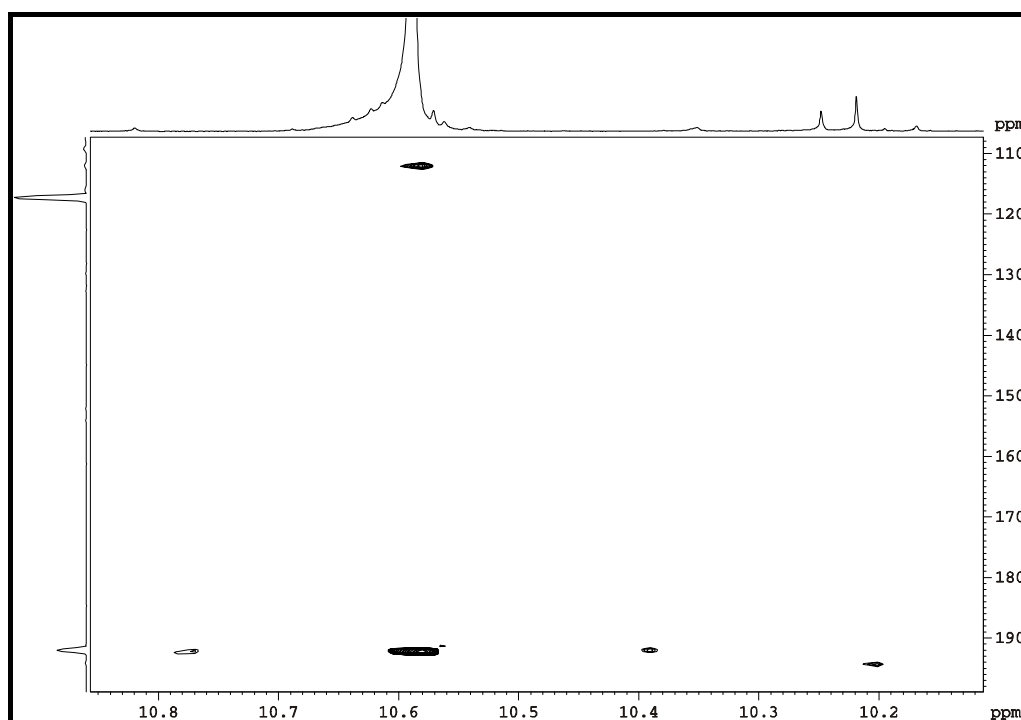


FIGURA 4.82: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdil** – ampliação 3.

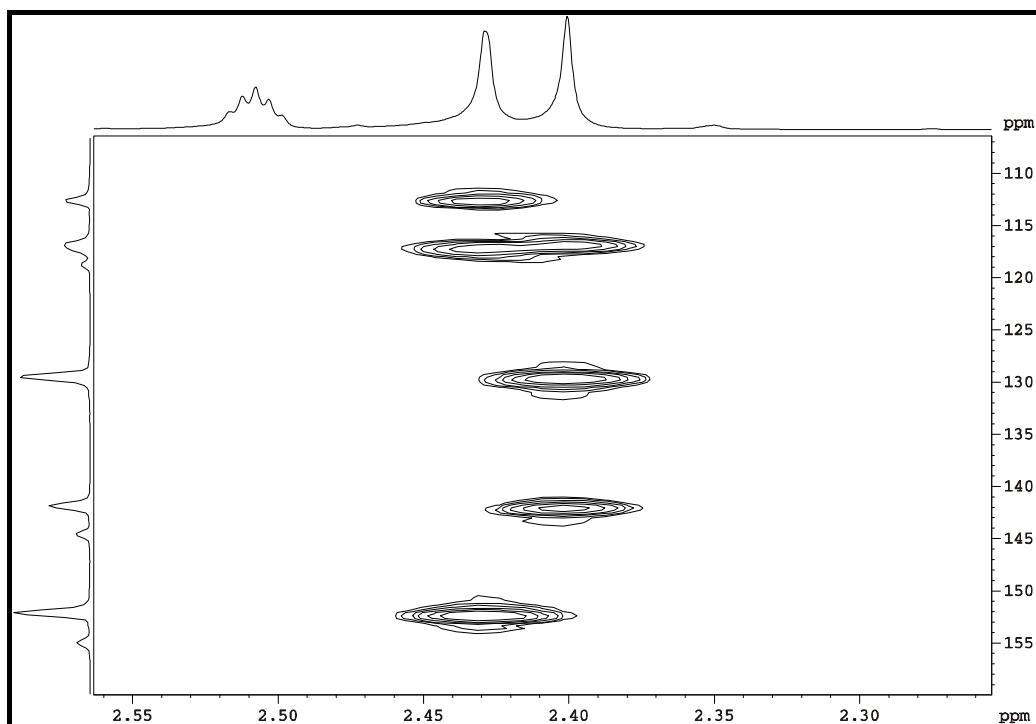


FIGURA 4.83: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdil** – ampliação 1.

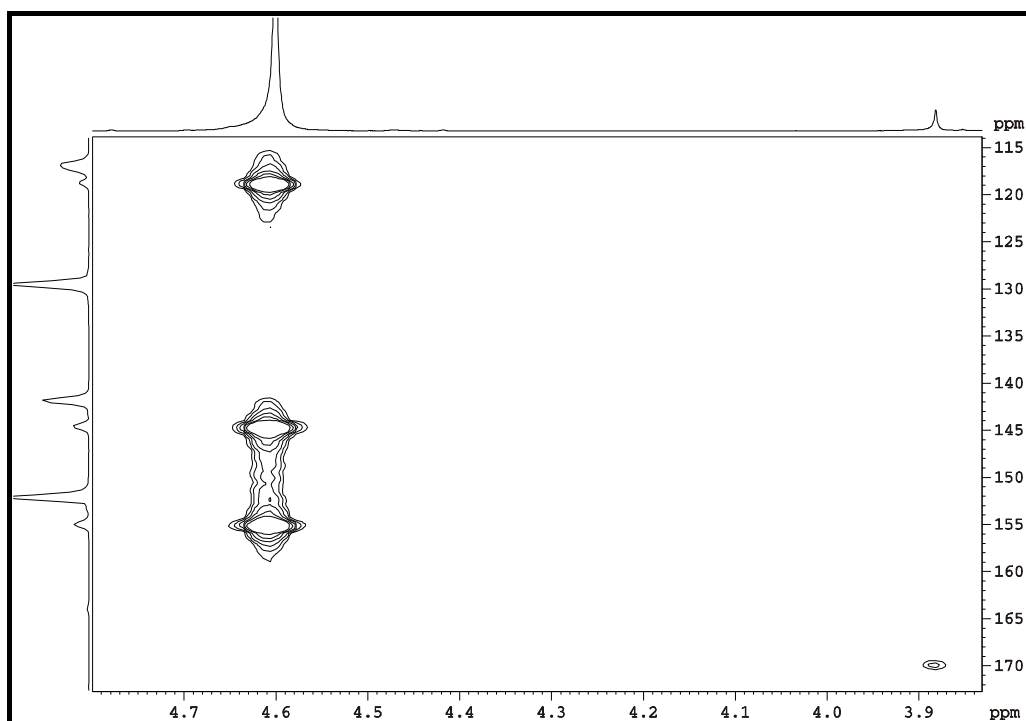


FIGURA 4.84: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdil** – ampliação 2.

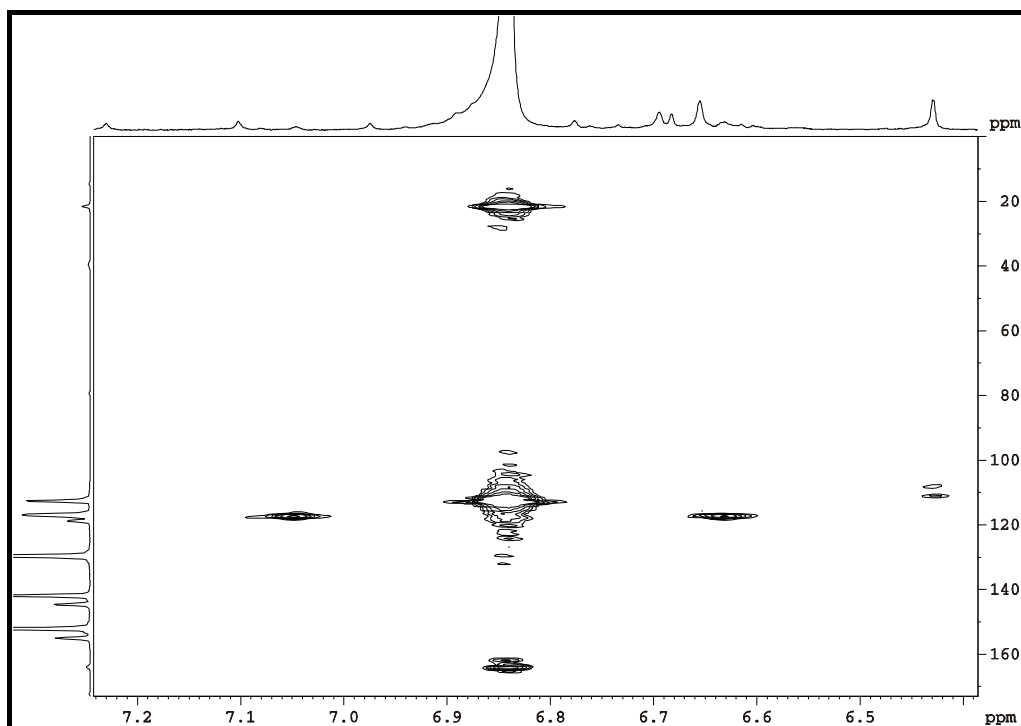


FIGURA 4.85: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdil** – ampliação 3.

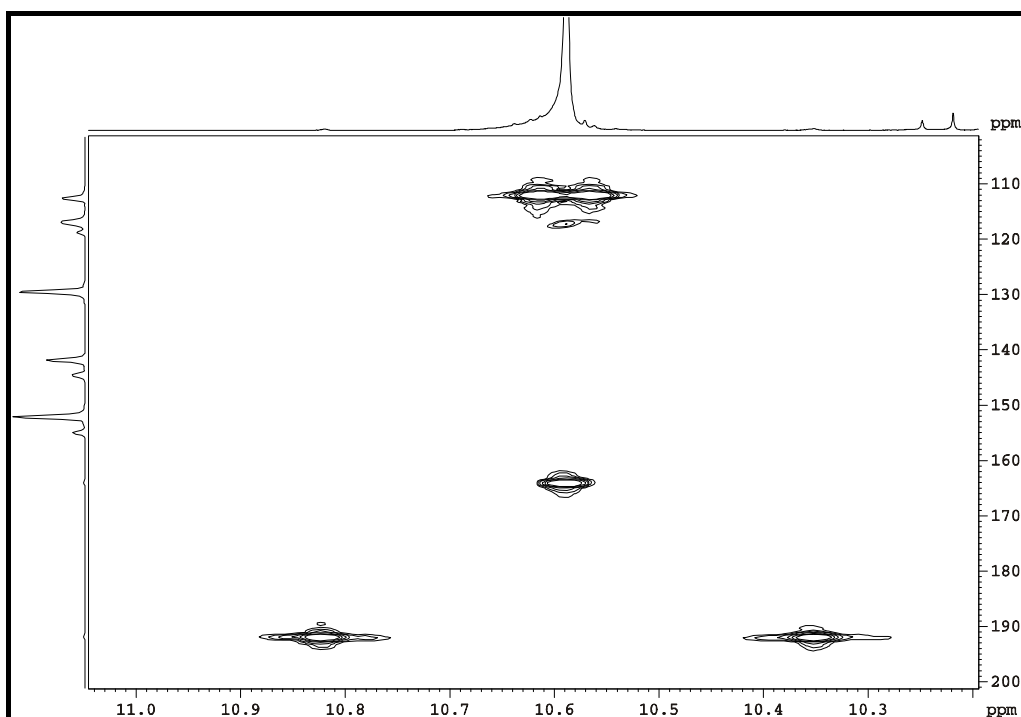


FIGURA 4.86: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Pdil** – ampliação 4.

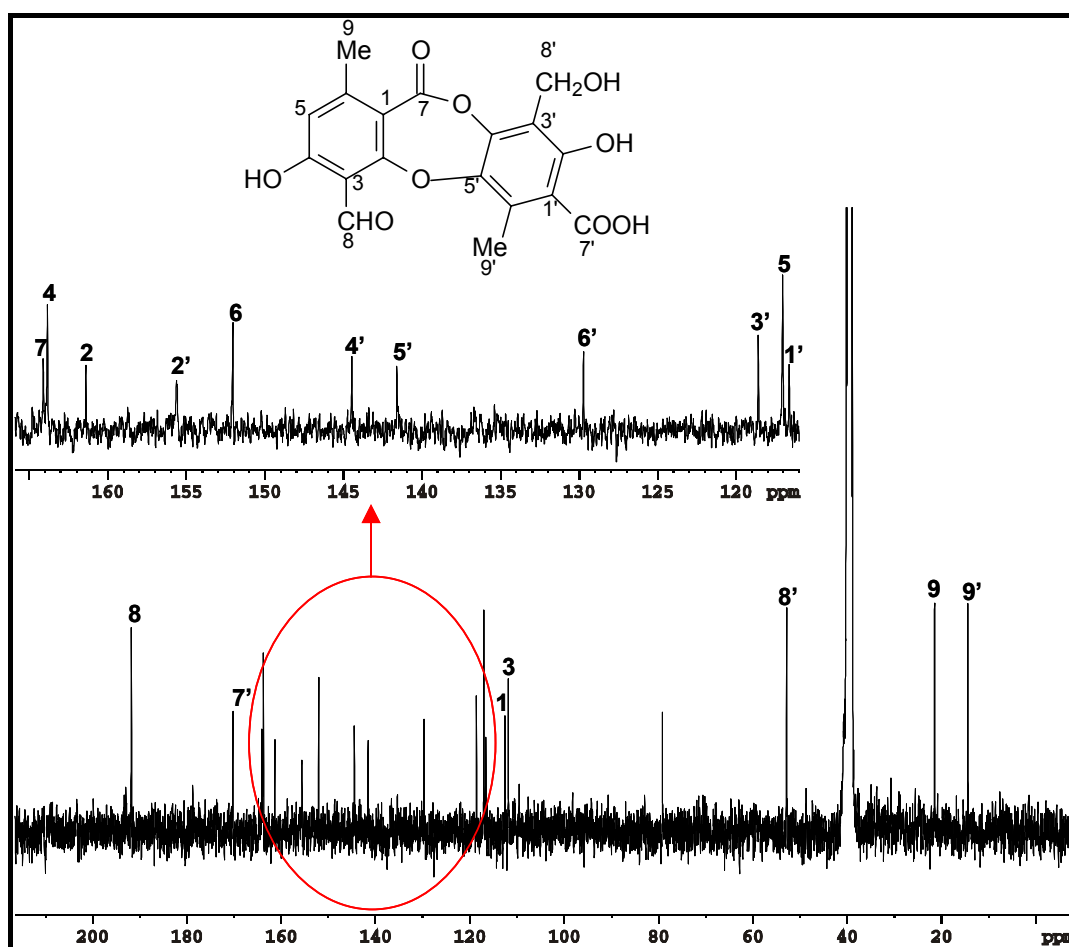
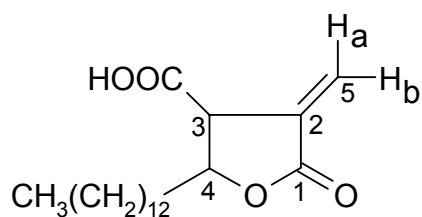
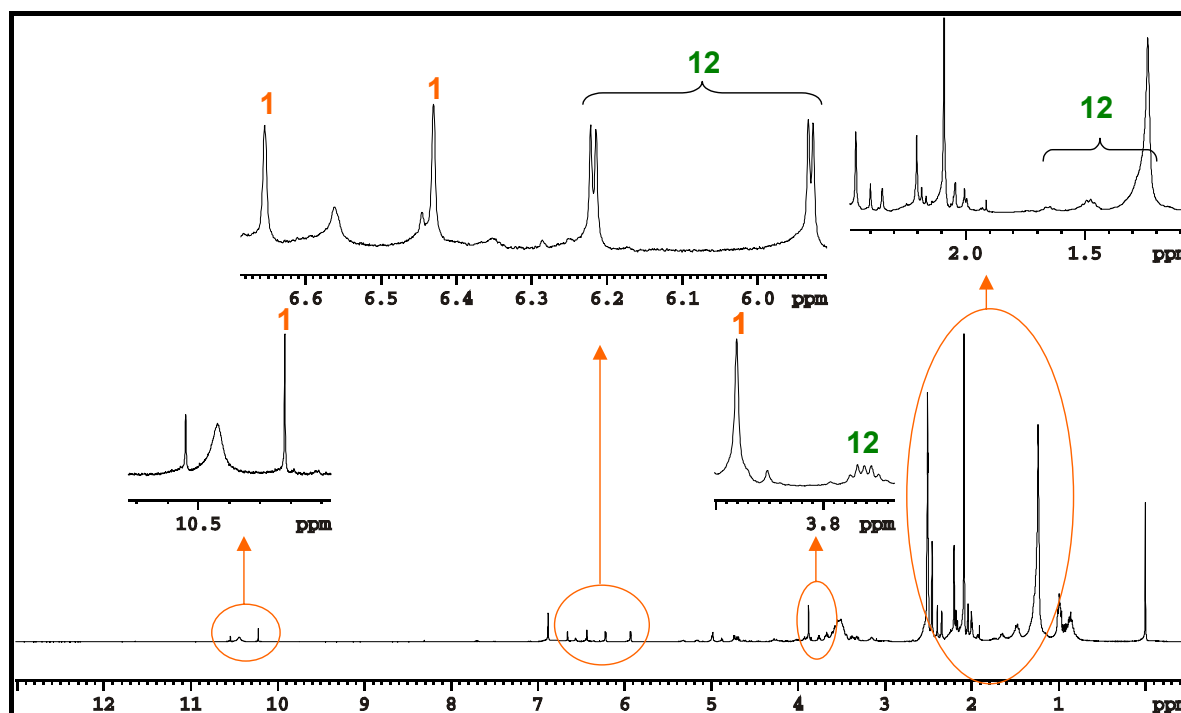


FIGURA 4.87: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra **Pdil** com atribuições do ácido protocetrárico (**11**) em destaque – análise de RMN em solução.

4.3.1.10 – Líquen *Parmotrema mesotropum* (Pmes)

A amostra **Pmes** (*Parmotrema mesotropum*) apresentou sinais característicos da atranorina (**1**), a qual corresponde ao metabólito majoritário no extrato (Figura 4.88). Foi identificado também o composto ácido protoliqueterínico (**12**), a partir dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 4.89) e experimentos bidimensionais (Figuras 4.90 a 4.95). Os assinalamentos de RMN desse metabólito foram comparados com os dados da literatura (HUNECK e YOSHIMURA, 1996), os quais possuem os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C já atribuídos. Na tabela 4.13, a seguir, encontram-se as atribuições efetuadas neste trabalho, juntamente com as atribuições da literatura, onde podem ser observados novos valores de constantes de acoplamento e multiplicidades para os hidrogênios H-3 e H-4 do ácido protoliqueterínico (**12**).

Ácido protoliquesterínico (**12**)FIGURA 4.88: Espectro de RMN de ^1H da amostra **Pmes** (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.TABELA 4.13: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido protoliquesterínico (**12**) (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	HUNECK e YOSHIMURA, 1996 (ppm)*	
				$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	174,4	-	-	174,4
2	-	133,8	-	-	132,6
3	3,76 (dt; $J_{3,4}=5,38$; $J_{3,5a-b}=2,64$ Hz)	49,1	171,1	3,60 (ddd, $J_{3,4}=6$; $J_{3,5}=3$ Hz)	49,6

4	4,70 (<i>dt</i> , $J_{4,3}=5,38$; $J_{4,7}=6,0$ Hz)	79,1	-	4,84 (<i>ddd</i> , $J_{4,3}=6$; $J_{4,7}=6$ Hz)	78,9
5a	5,93 (<i>d</i> ; $J=2,64$ Hz)	124,1	-	6,03 (<i>d</i> , $J=3$ Hz)	125,9
5b	6,22 (<i>d</i> ; $J=2,64$ Hz)			6,39 (<i>d</i> , $J=3$ Hz)	
6	-	171,1	-	-	168,2
7	1,62-1,70 (<i>m</i>)	34,7	-	1,75 (<i>m</i>)	35,8
(CH ₂) ₁₁	1,23 (<i>s</i>)	~29,0	-	1,27 (<i>s</i>)	29,2- 29,4
19	0,82-0,92 (<i>m</i>)	13,7	-	0,68 (<i>t</i> , $J=6$ Hz)	14,0

* Dados da literatura obtidos em CDCl₃:CD₃OD 2:1 / 270 MHz (¹H); CDCl₃ / 20 MHz (¹³C)

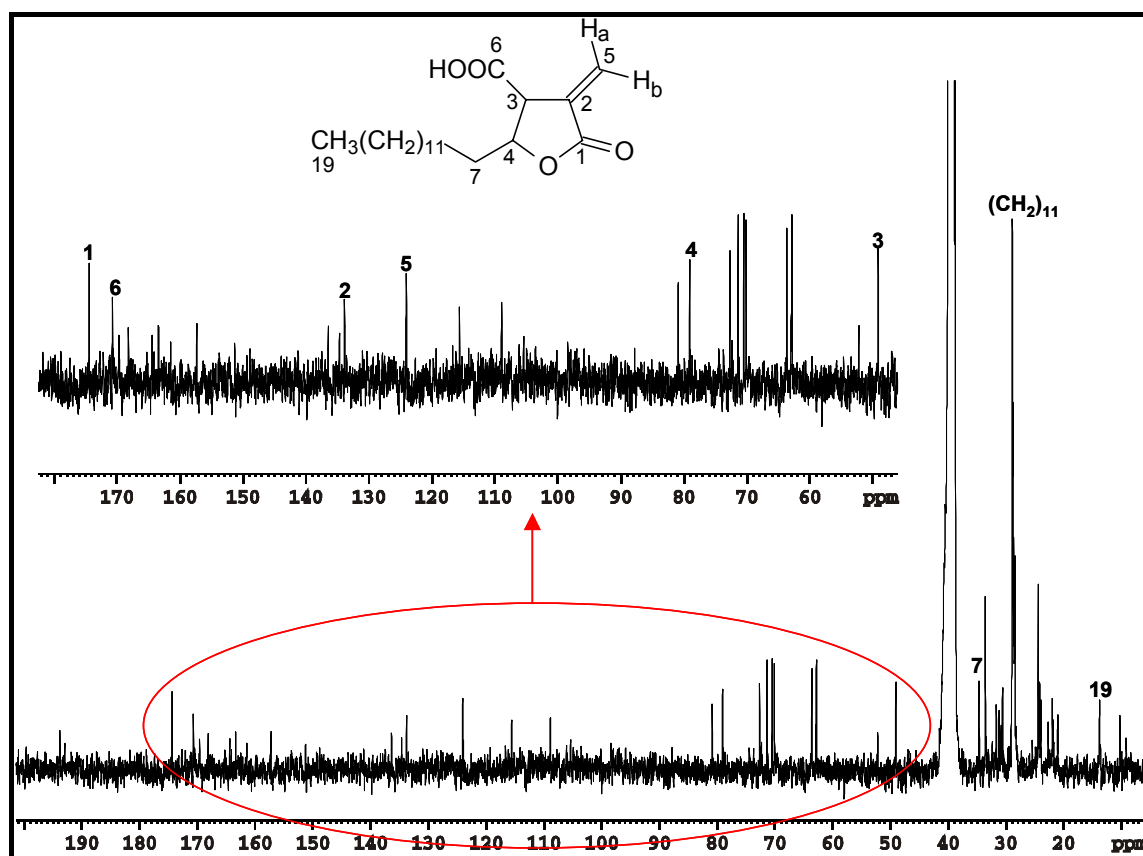


FIGURA 4.89: Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-d₆, DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra **Pmes** com atribuições do ácido protolipídico (**12**) em destaque – análise de RMN em solução.

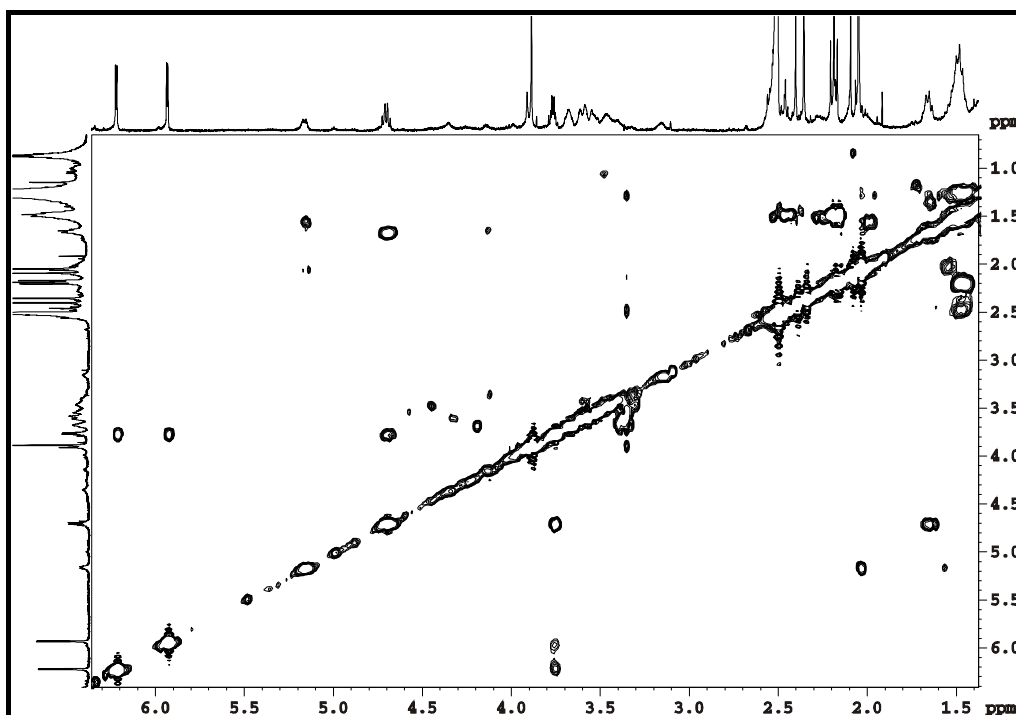


FIGURA 4.90: Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gCOSY, da amostra **Pmes**.

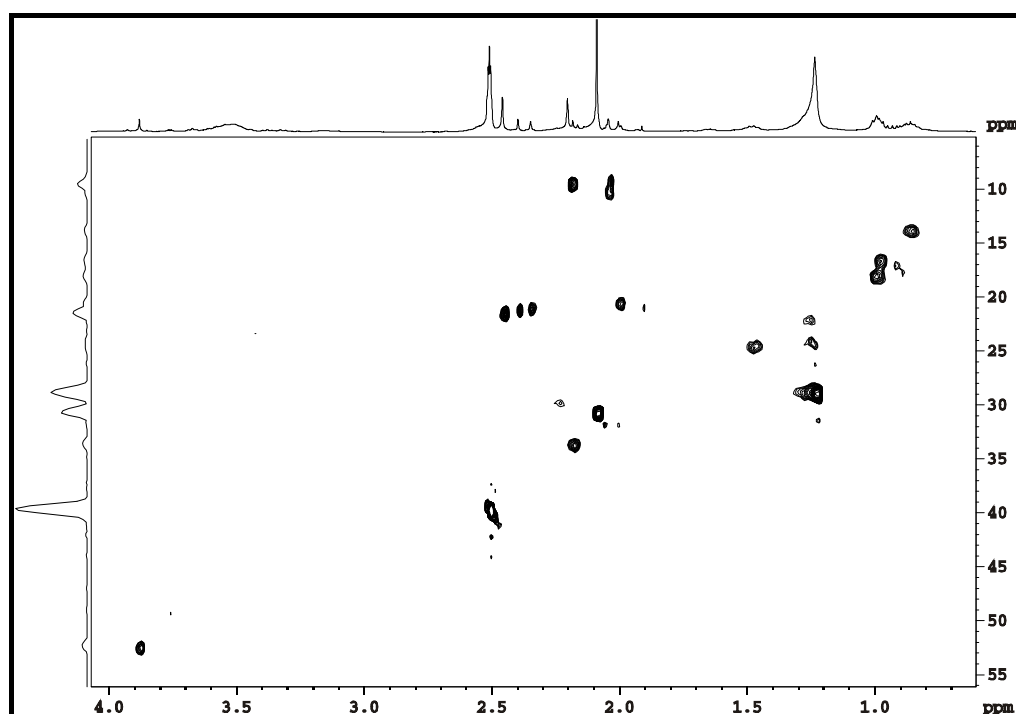


FIGURA 4.91: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC, da amostra **Pmes** – ampliação 1.

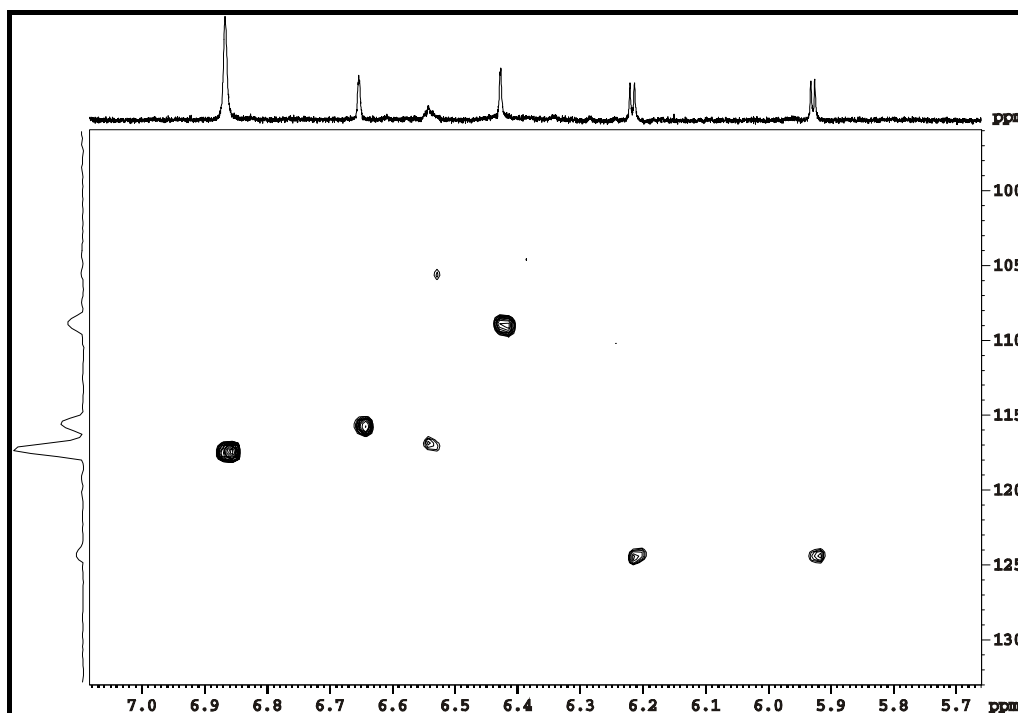


FIGURA 4.92: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC, da amostra **Pmes** – ampliação 2.

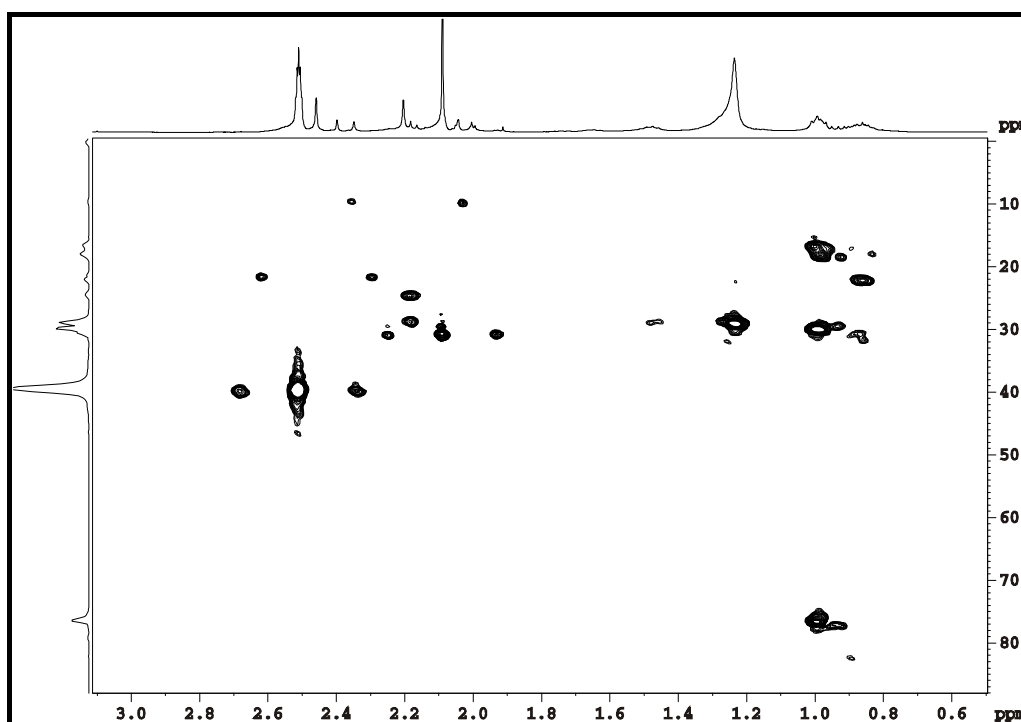


FIGURA 4.93: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra **Pmes** – ampliação 1.

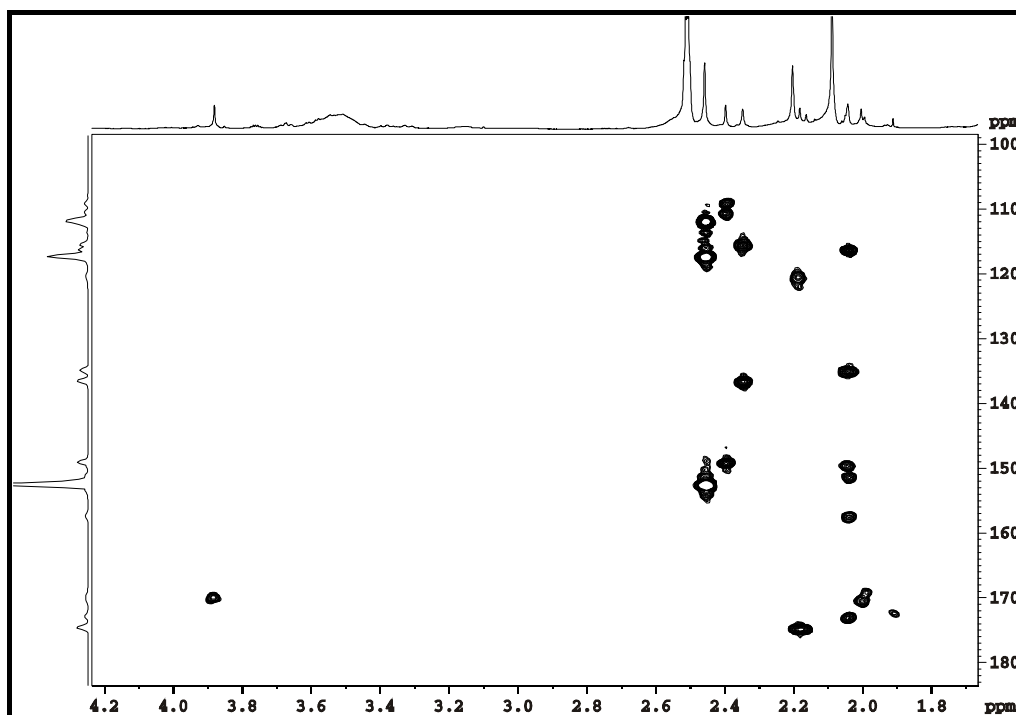


FIGURA 4.94: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra **Pmes** – ampliação 2.

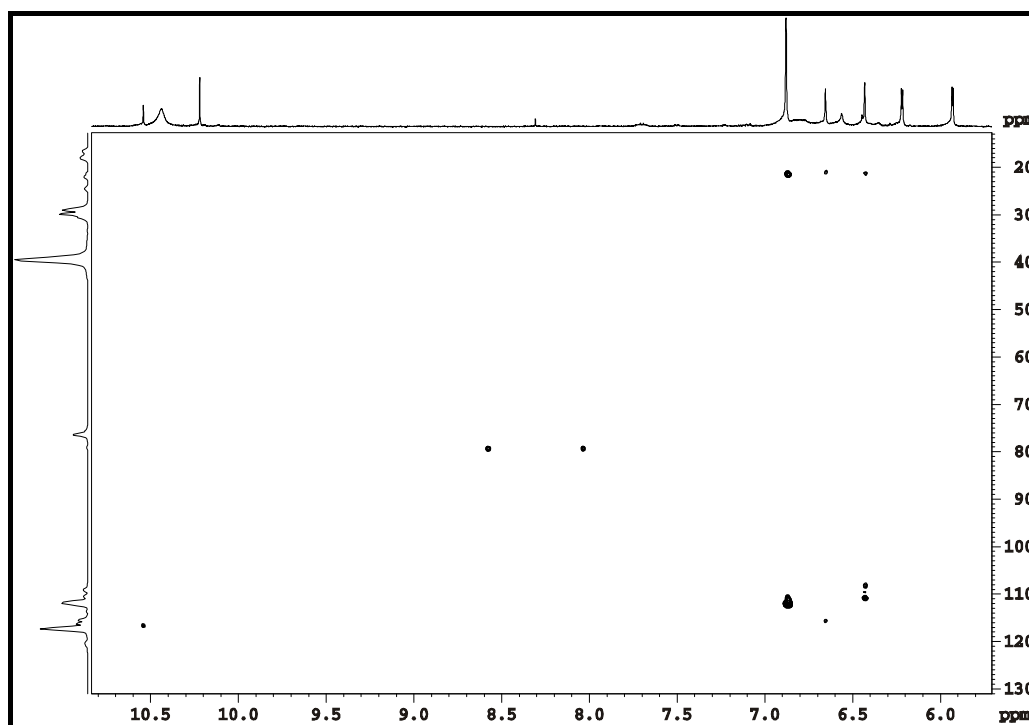


FIGURA 4.95: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC, da amostra **Pmes** – ampliação 3.

Os novos valores das constantes de acoplamento e multiplicidades dos hidrogênios H-3 e H-4 do ácido protoliqueterínico (**12**) foram corroborados a partir da obtenção de espectros simulados pelo programa FOMSC3 (First Order Multiplet Simulator 3, 2006, disponível em <http://artemis.ffclrp.usp.br/NMR.htm>). A comparação entre a multiplicidade experimental do sinal em δ 3,76 (Figura 4.96), correspondente ao hidrogênio H-3, e a calculada (Figura 4.97) permitiu ratificar o sinal de H-3 do ácido protoliqueterínico e confirmar as constantes de acoplamento apresentadas na tabela 4.13.

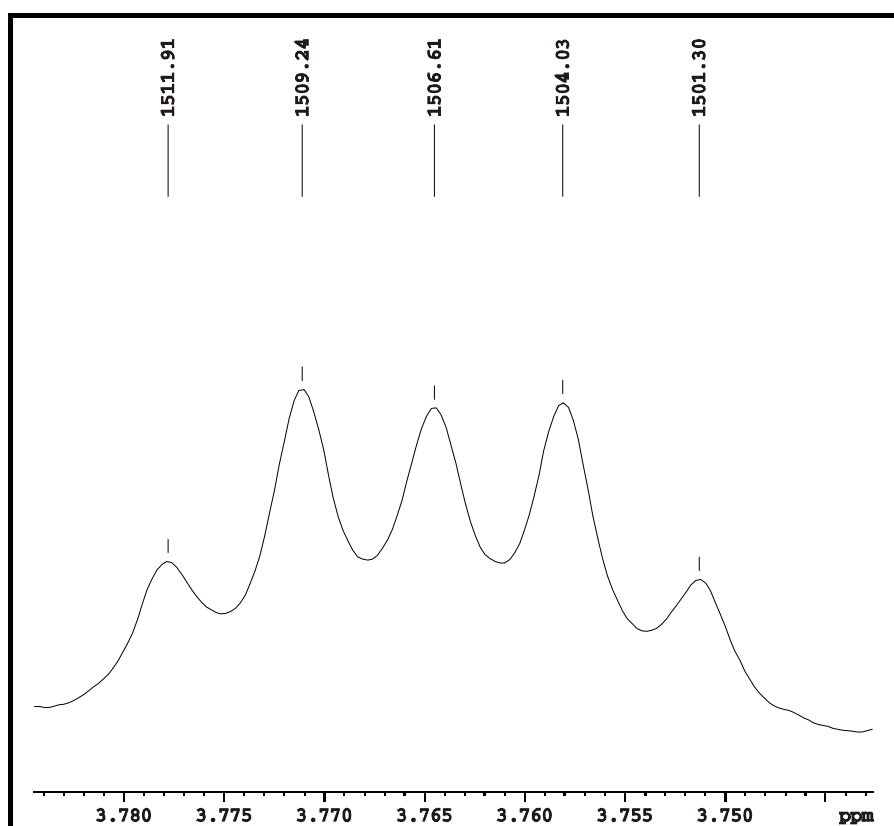


FIGURA 4.96: Sinal de RMN de ^1H do H-3 do ácido protoliqueterínico (**12**), isolado da amostra **Pmes**, obtido experimentalmente.

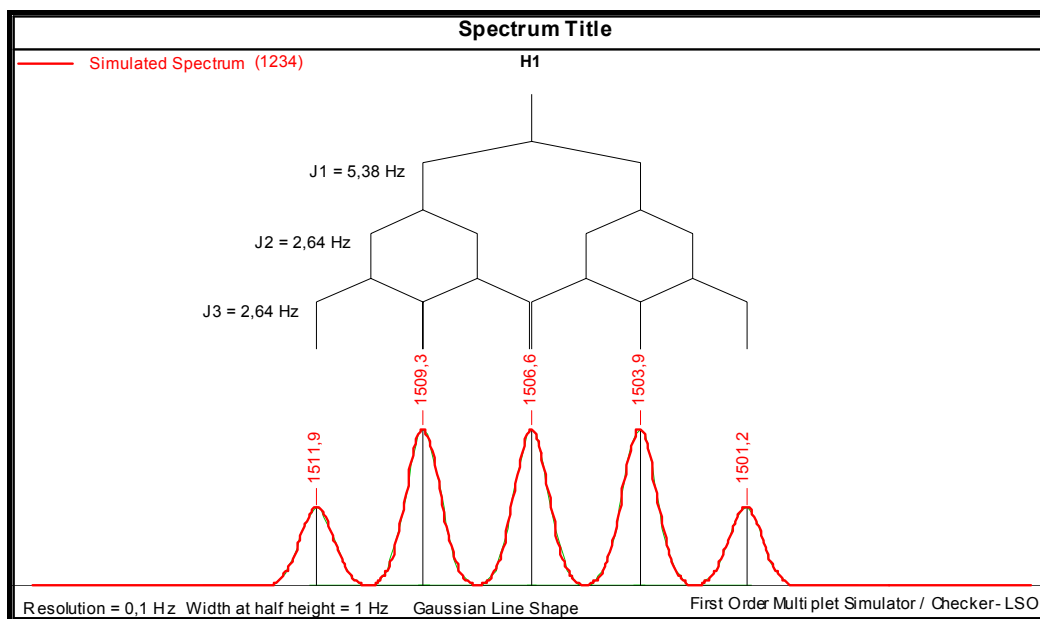


FIGURA 4.97: Sinal de RMN de ^1H do H-3 do ácido protoliquisterínico (**12**), isolado da amostra **Pmes**, calculado através do programa de simulação FOMSC3.

Similar ao estudo comparativo entre os espectros de RMN de ^1H experimental e simulado do H-3, obteve-se a simulação do sinal de H-4 do ácido protoliquisterínico (**12**), em δ 4,70. Os valores de deslocamentos químicos experimentais (Figura 4.98) estão em concordância com os obtidos no programa FOMSC3 (Figura 4.99), indicando que as constantes de acoplamento e a multiplicidade, apresentadas na tabela 4.13, estão corretas.

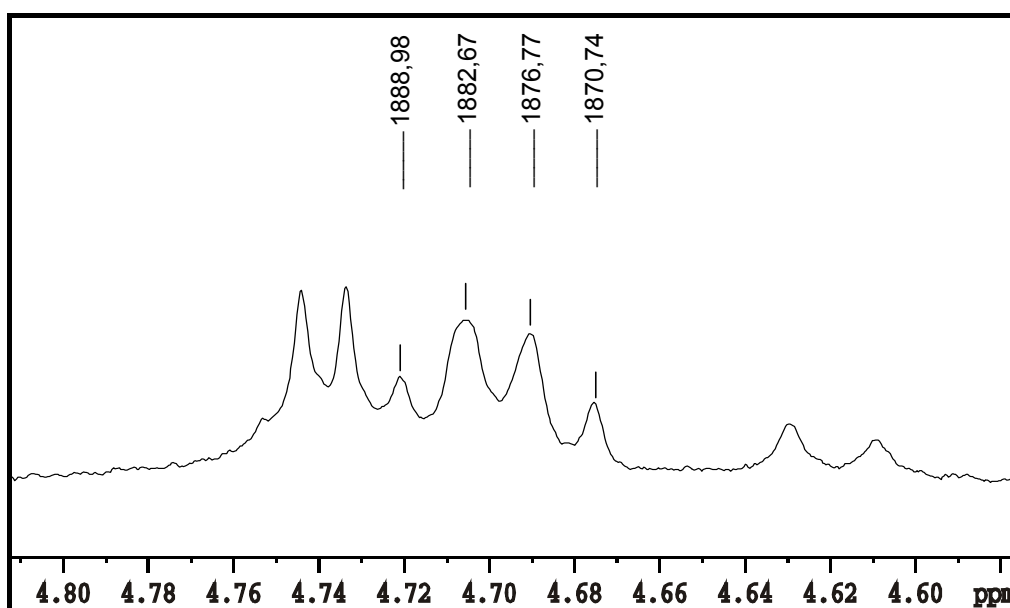


FIGURA 4.98: Sinal de RMN de ^1H do H-4 do ácido protoliquisterínico (**12**), isolado da amostra **Pmes**, obtido experimentalmente.

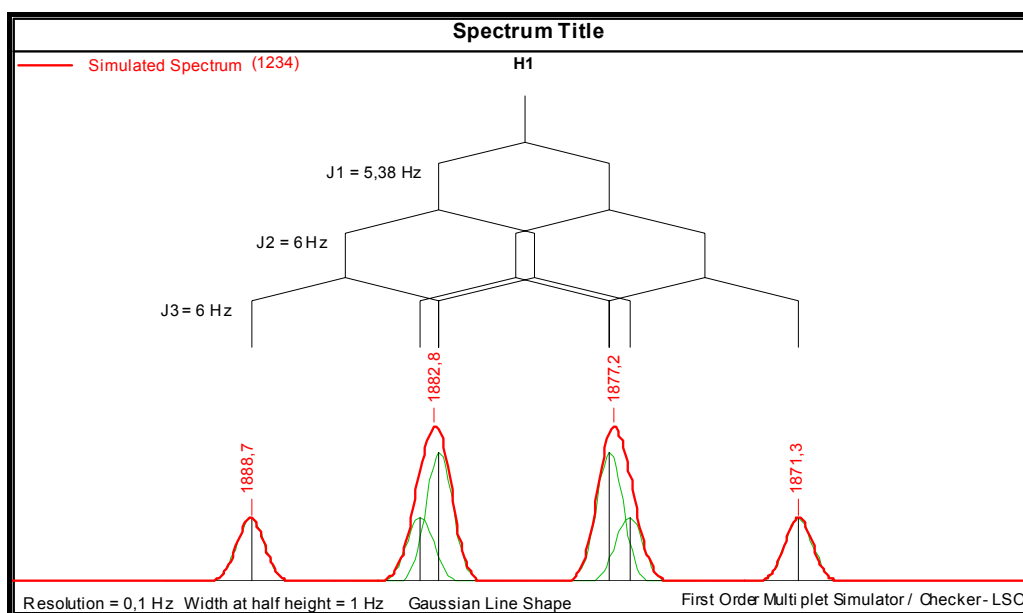
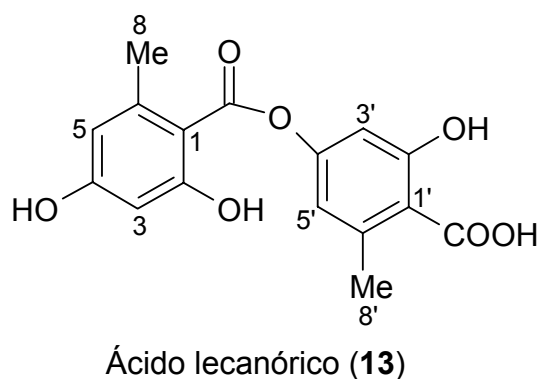


FIGURA 4.99: Sinal de RMN de ^1H do H-4 do ácido protoliquorínico (**12**), isolado da amostra **Pmes**, calculado através do programa de simulação FOMSC3.

4.3.1.11 – Líquen *Parmotrema tinctorum* (Ptinc)

A amostra **Ptinc** (*Parmotrema tinctorum*) apresentou sinais característicos dos depsídeos atranorina (**1**) e ácido lecanórico (**13**) (Figura 4.100), os quais foram totalmente identificados pelos experimentos bidimensionais de *g*HSQC e *g*HMBC (Figuras 4.102 e 4.107). O espectro de RMN de ^{13}C está apresentado na figura 4.101, com a indicação dos sinais do ácido lecanórico, onde os valores completos de deslocamentos químicos estão apresentados na tabela 4.14, seguidos dos dados obtidos na literatura (NARUI et al., 1998).



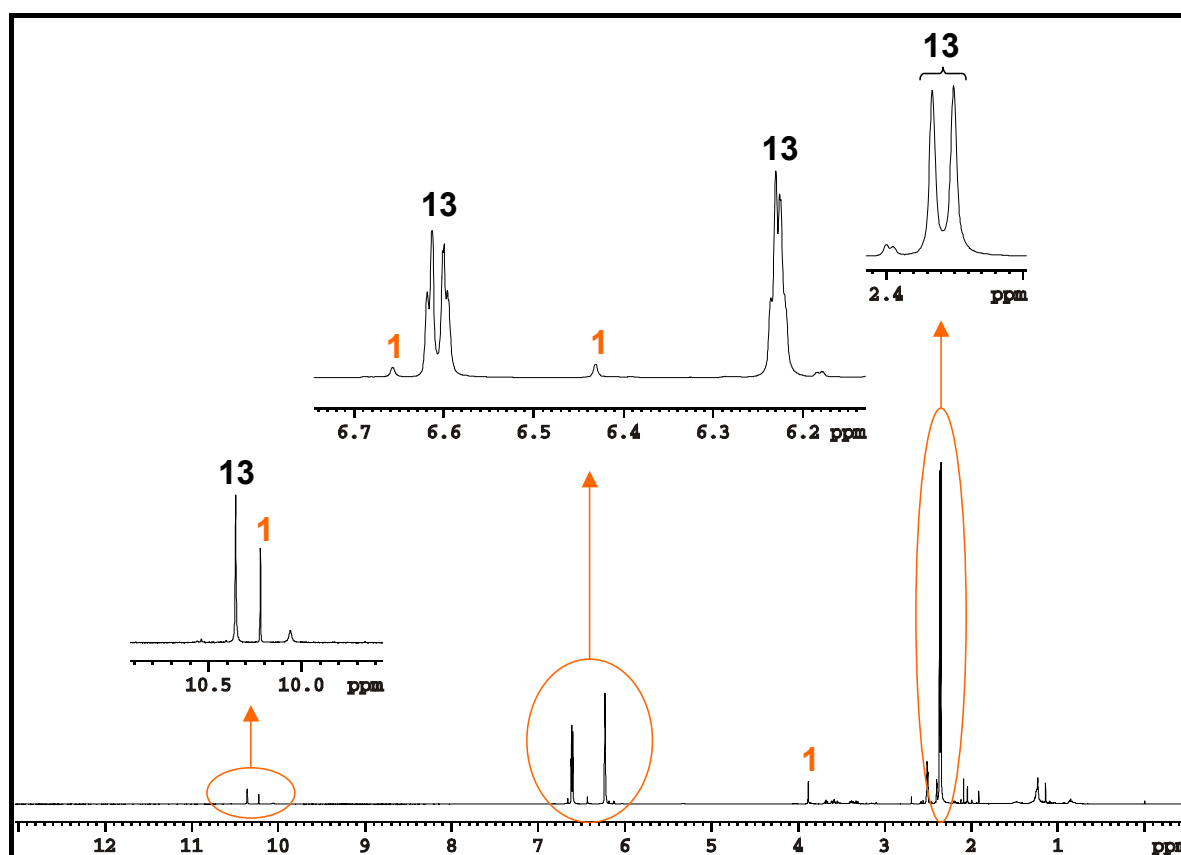


FIGURA 4.100: Espectro de RMN de ^1H da amostra **Ptinc** (DMSO-d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T) – análise de RMN em solução.

TABELA 4.14: Atribuições dos sinais de RMN da substância ácido lecanórico (**13**) (DMSO-d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T).

Posições	$\delta^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ – ppm	gHMBC	NARUI et al., 1998 (ppm)*	
				$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	108,1	-	-	108,23
2	-	159,9	-	-	160,15
3	6,23 (<i>d</i> ; J=2,38 Hz)	100,7	108,1; 159,9; 160,9; 166,9	6,22 (<i>d</i> ; J=2,14 Hz)	100,47
4	-	160,9	-	-	161,11
5	6,22 (<i>d</i> ; J=2,38 Hz)	110,1	21,4; 100,7; 108,1; 160,9; 166,9	6,21(<i>d</i> ; J=2,14 Hz)	109,86
6	-	140,4	-	-	140,31
7	-	166,9	-	-	167,12
8	2,35 (s)	21,4	108,1; 110,1; 140,4	2,34 (s)	21,33

1'	-	116,5	-	-	116,56
2'	-	158,8	-	-	159,22
3'	6,62 (<i>d</i> ; J=2,10 Hz)	107,6	114,9; 116,5; 152,1; 158,8; 170,5	6,59 (<i>d</i> ; J=2,14 Hz)	107,36
4'	-	152,1	-	-	152,19
5'	6,60 (<i>d</i> ; J=2,10 Hz)	114,9	21,2; 107,6; 116,5; 152,1	6,57 (<i>d</i> ; J=2,14 Hz)	114,61
6'	-	139,3	-	-	139,62
7'	-	170,5	-	-	170,62
8'	2,37 (s)	21,2	114,9; 116,5; 139,3	2,37 (s)	21,08
4-OH	10,06 (s)	-	100,7; 110,1; 160,9	10,00 (s)	-
2-OH	10,35 (s)	-	100,7; 108,1; 159,9	10,31 (s)	-

* Dados da literatura obtidos em DMSO-d₆ / 500 MHz (¹H); 125 MHz (¹³C)

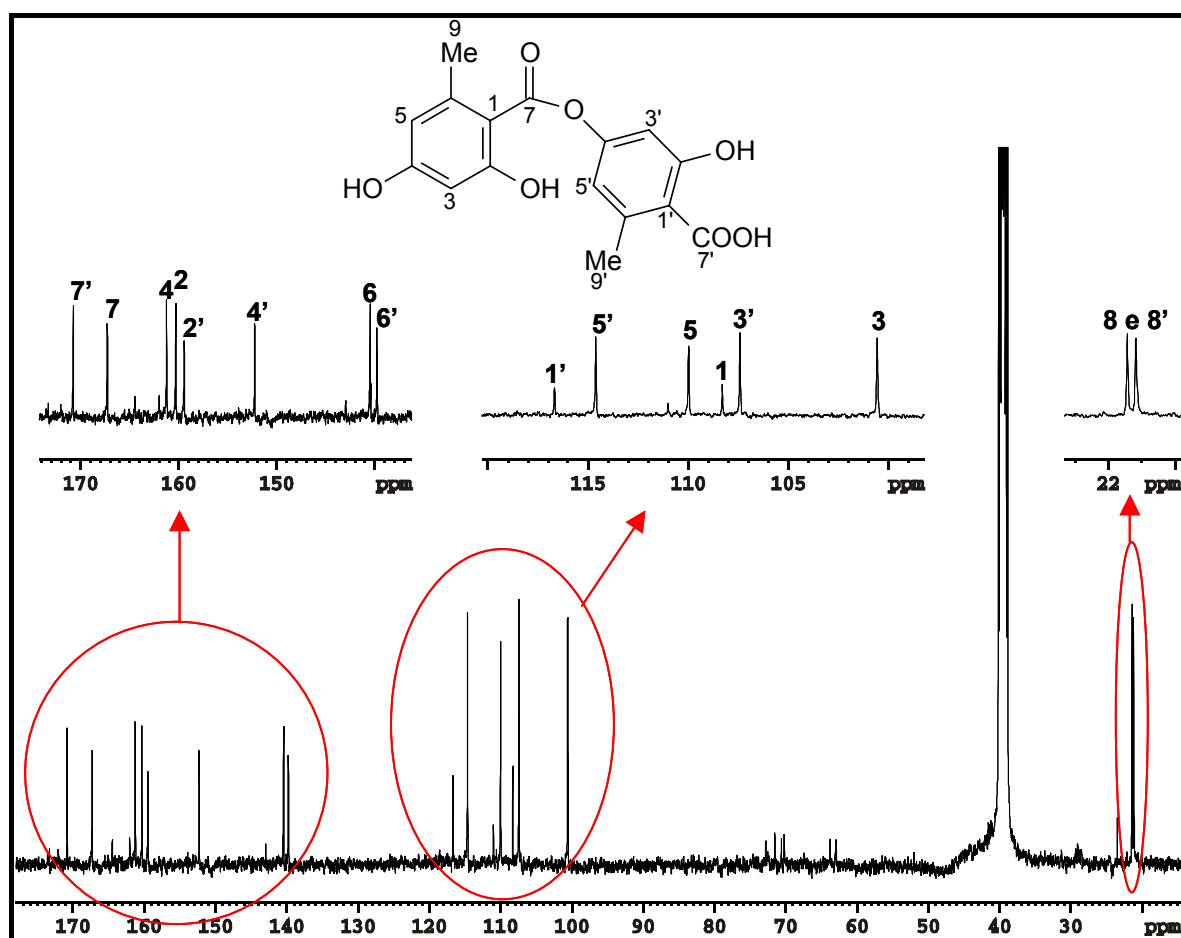


FIGURA 4.101: Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-d₆, DRX400 Bruker 9,4 T) da amostra **Ptinc** com atribuições do ácido lecanórico (**13**) em destaque – análise de RMN em solução.

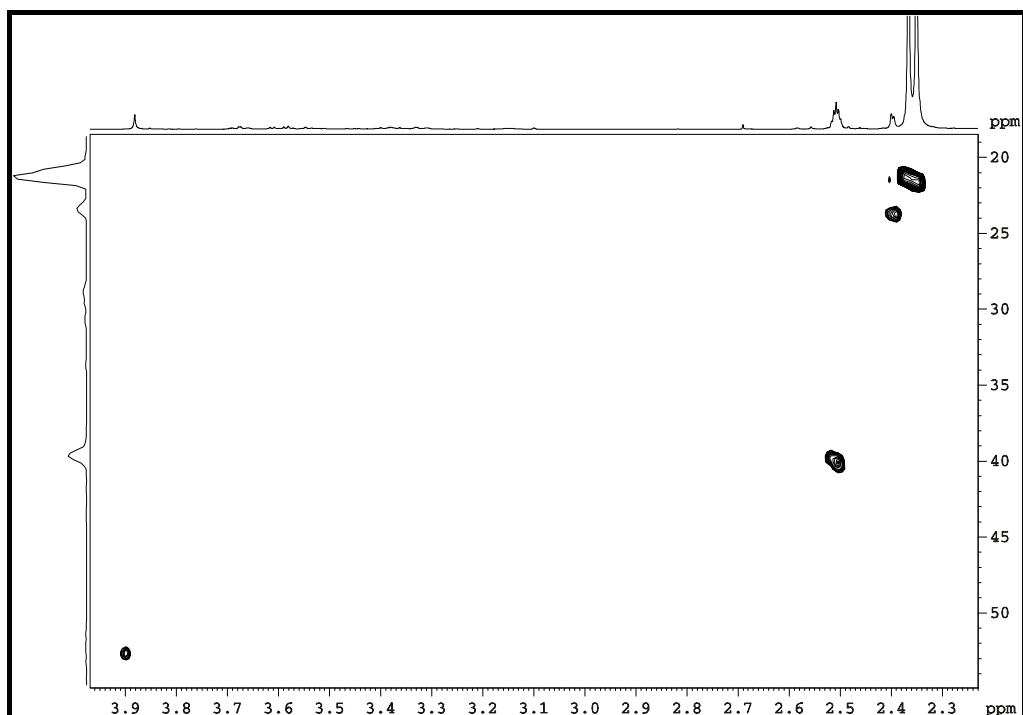


FIGURA 4.102: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Ptinc** – ampliação 1.

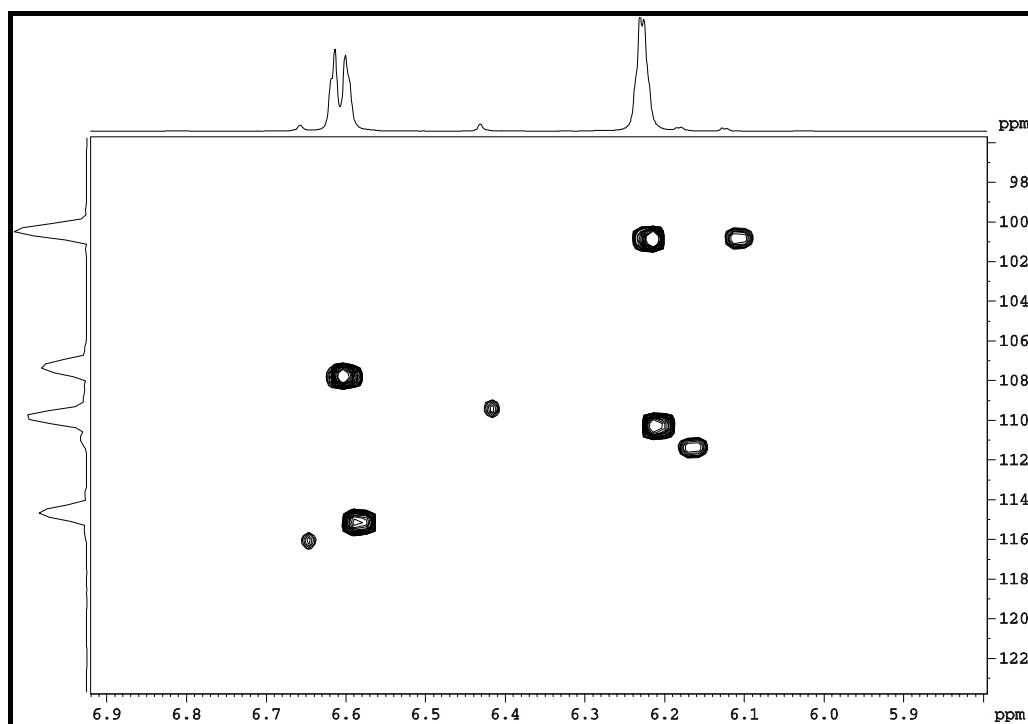


FIGURA 4.103: Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Ptinc** – ampliação 2.

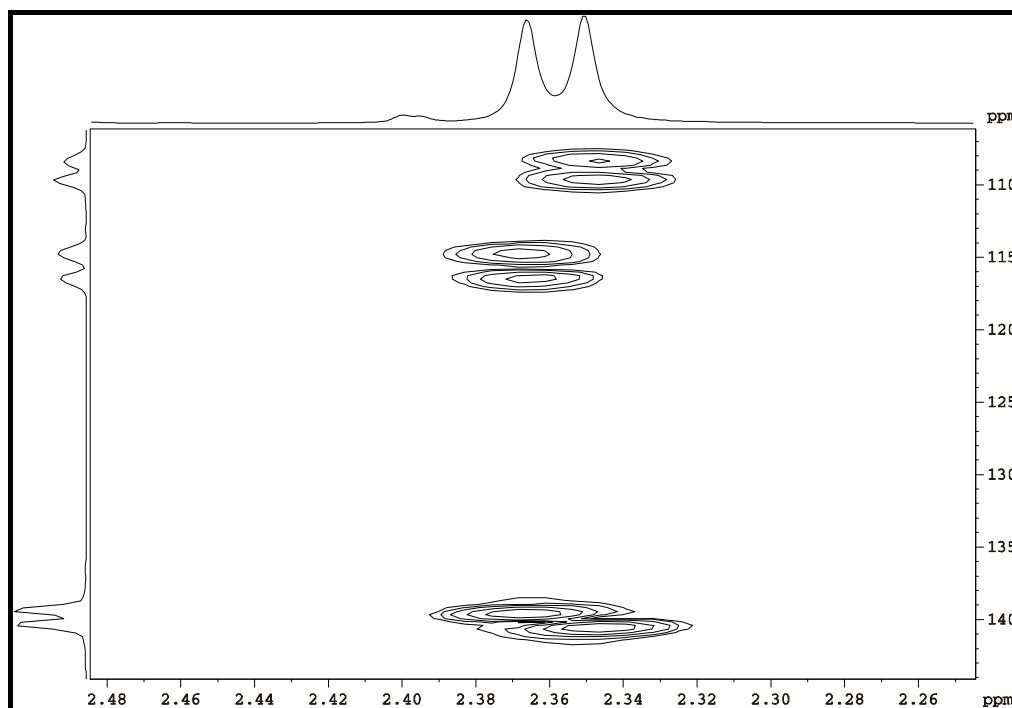


FIGURA 4.104: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Ptinc** – ampliação 1.

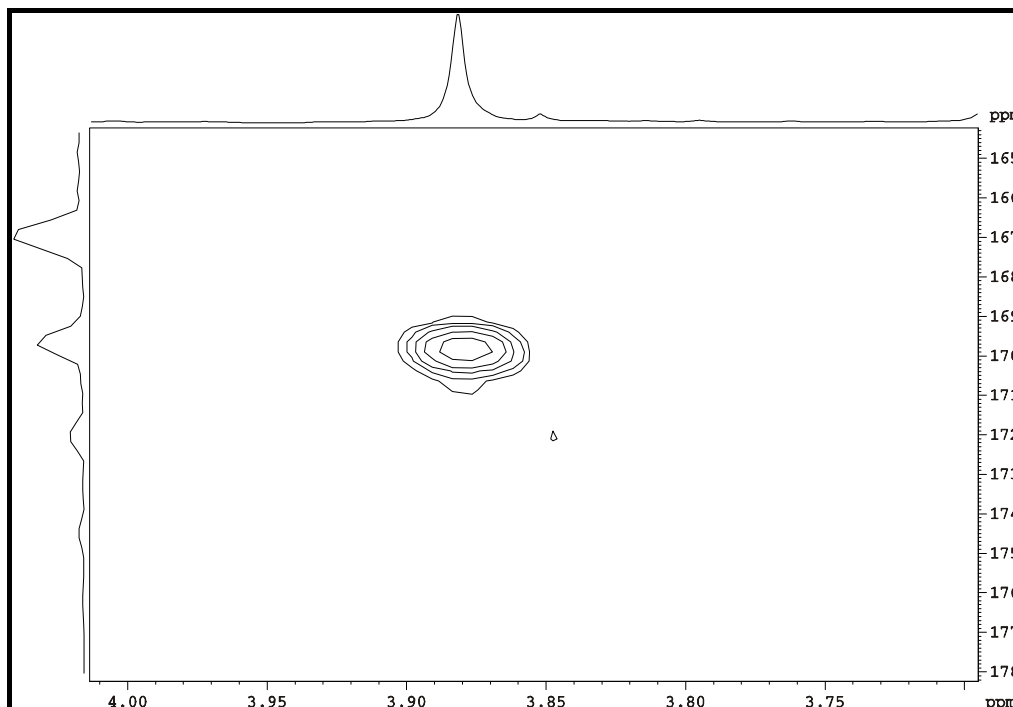


FIGURA 4.105: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Ptinc** – ampliação 2.

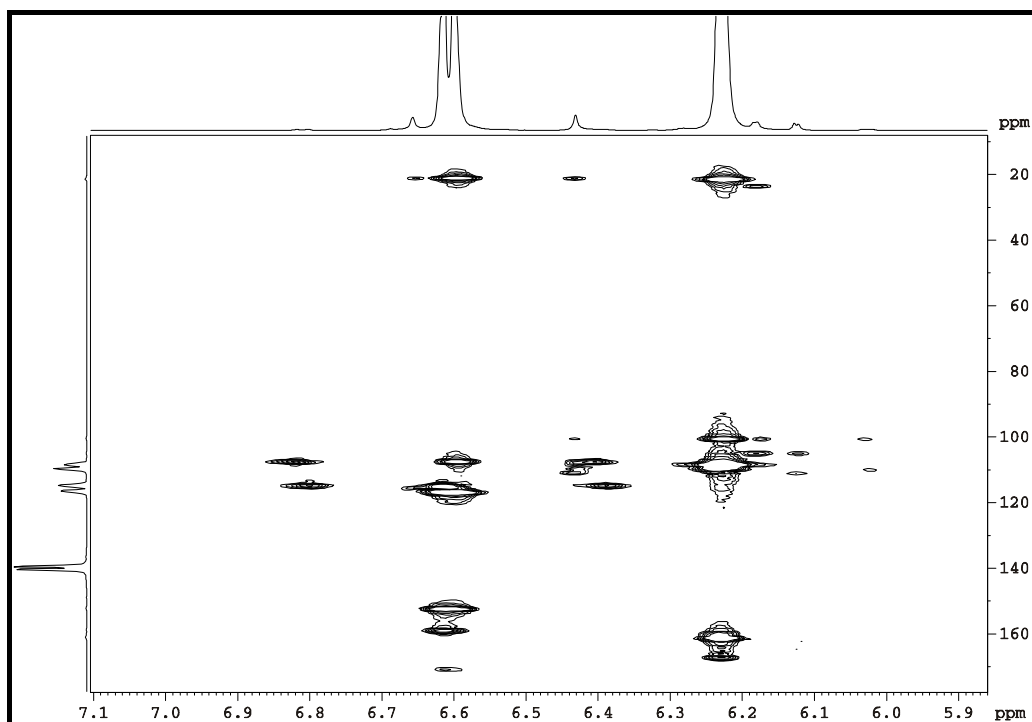


FIGURA 4.106: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Ptinc** – ampliação 3.

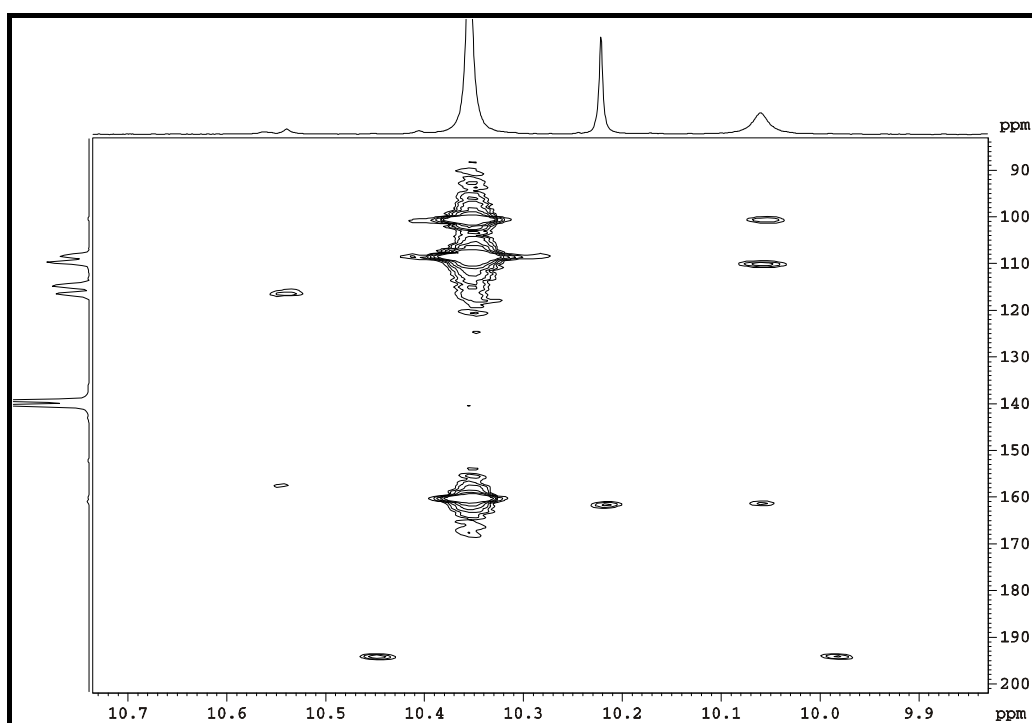


FIGURA 4.107: Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (DMSO- d_6 , DRX400 Bruker 9,4 T), da amostra **Ptinc** – ampliação 4.

4.3.2 - Análise quimiométrica dos dados de RMN de amostras em solução

Na análise quimiométrica foram excluídas as regiões espectrais referentes ao sinal da água, do solvente (DMSO- d_6) e da acetona (proveniente do processo de extração), a fim de evitar que esses sinais, não intrínsecos às amostras, auxiliassem na sua discriminação. A matriz gerada a partir da região espectral com exclusões possui 11 amostras e 3829 variáveis. A visualização de todos os espectros encontra-se destacada na figura 4.108.

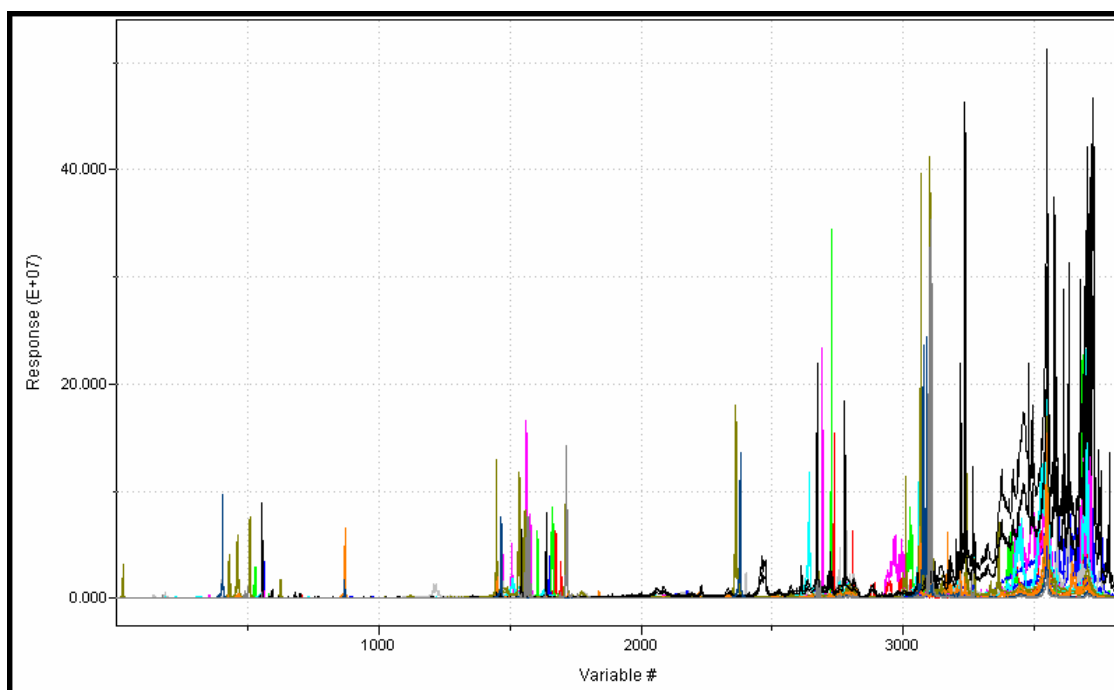


FIGURA 4.108: Visualização de todos os espectros de RMN dos extratos (análise de RMN em solução) empregados na análise quimiométrica.

4.3.2.1 – Análise exploratória

a) Todas as amostras de líquens (Famílias Physciaceae e Parmeliaceae)

Na análise de componentes principais de todos os extratos de líquens, pode-se observar que a RMN em solução, diferentemente da RMN HR-MAS, não discriminou as duas famílias estudadas, embora uma tendência para os líquens da família Physciaceae tenha sido observada em valores mais negativos de PC1 (vide elipses em vermelho na figura 4.109). O gráfico de scores de PC2xPC3 (Figura 4.109), com 19,4% de informação total do sistema, é o que melhor representa o comportamento de todas as amostras. Nessa análise de PCA de todas as amostras,

analisadas por RMN em solução, o posto foi estimado para 6 e o percentual de informação cumulativa até PC6 foi de 61,0%.

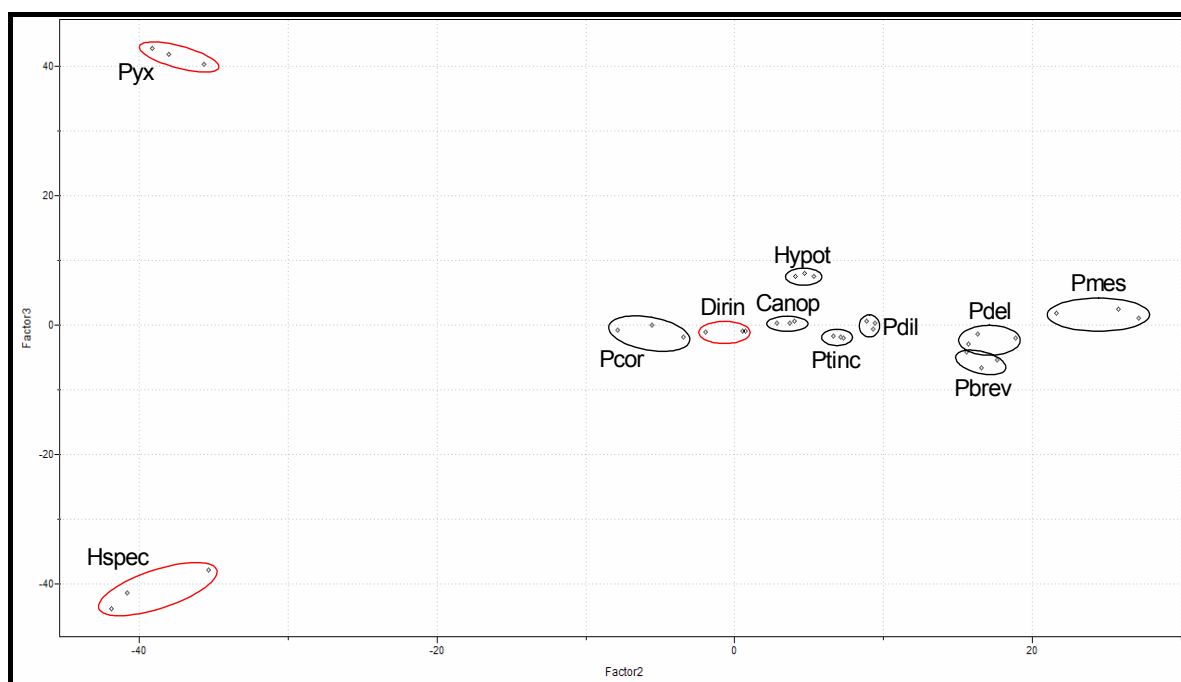


FIGURA 4.109: Gráfico de *scores* de todas as amostras de líquens – análise RMN em solução (PC2 x PC3, 10,7 e 8,7%, respectivamente) – família Physciaceae destacada nas elipses em vermelho.

Em todas as análises de PCA dos dados de RMN em solução, similar aos de RMN HR-MAS, as melhores condições foram:

- Pré-processamento: autoescalamento.
- Transformação: 1ª derivada e normalização dos espectros;

b) Família Physciaceae

A excelente discriminação entre os três gêneros da família Physciaceae (*Heterodermia*, *Dirinaria* e *Pyxine*) está apresentada no gráfico de *scores* de PC1xPC2 abaixo (Figura 4.110), o qual descreve 69,3% do sistema, com 76,9% de informação cumulativa para o posto 3, e apresenta um ótimo agrupamento das replicatas.

A discriminação entre os gêneros da família Physciaceae, apresentada na figura 4.110, deve-se aos metabólitos secundários majoritários em cada amostra,

visto que os três gêneros apresentaram o depsídeo atranorina. Nas amostras **Pyx** e **Hspec**, ambas em valores mais positivos de PC2, os constituintes majoritários correspondem a terpenos não identificados. Já na amostra **Dirin**, a qual foi alocada em valor mais negativo de PC2, o constituinte majoritário é o depsídeo ácido divaricático.

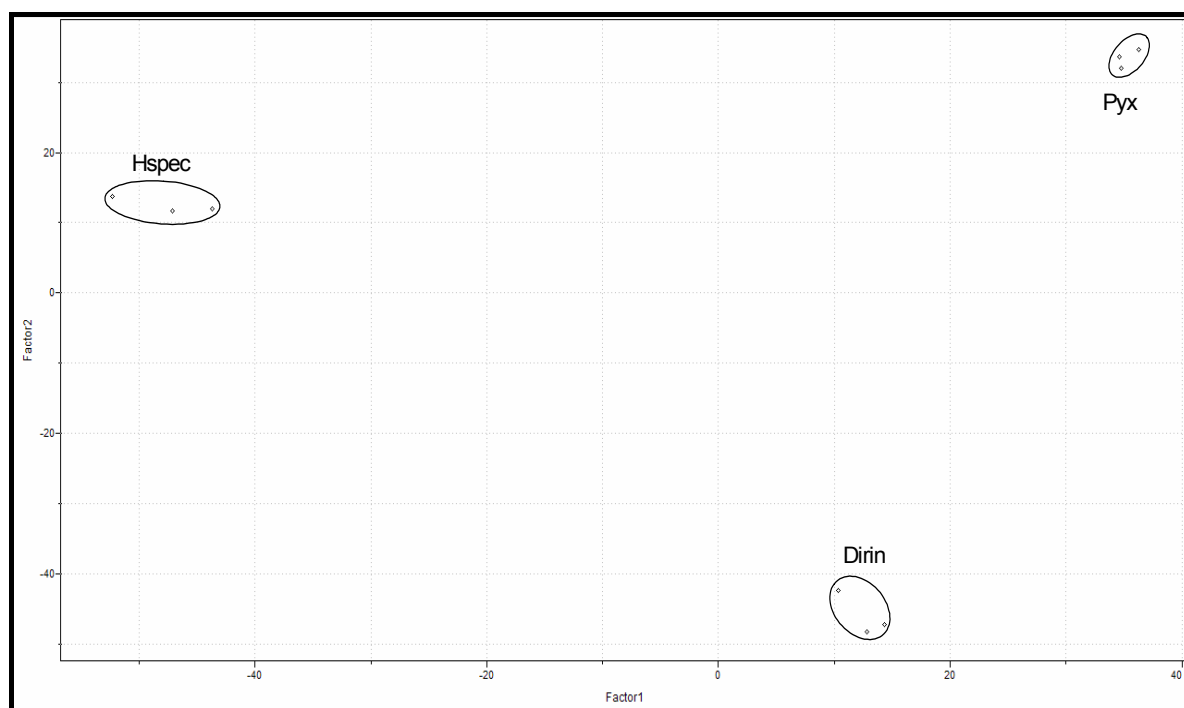


FIGURA 4.110: Gráfico de *scores* das amostras de líquens da família Physciaceae – análise de RMN em solução (PC1 x PC2, 36,1 e 33,2%, respectivamente).

c) Família Parmeliaceae

A análise quimiométrica da família Parmeliaceae também foi muito satisfatória, apresentando a discriminação dos três gêneros (*Parmotrema*, *Hypotrachyna* e *Canoparmelia*), bem como o agrupamento das seis espécies de líquens *Parmotrema*, destacadas dentro do retângulo tracejado, em valores mais positivos de PC2, como mostra a figura 4.111. O gráfico de PC1xPC2, com 35,9% de informação foi extraído da análise de PCA, com posto igual 6 e porcentagem cumulativa de 72,6%.

Acompanhando a discriminação apresentada na figura 4.111, ao longo de PC2, podemos destacar a importância estrutural na distinção entre as amostras.

Em valores mais negativos de PC2, onde encontram-se os gêneros *Canoparmelia* e *Hypotrachyna*, observa-se que em **Hypot** foram identificadas duas depsidonas (ácido colensóico e norcolensóico), e em **Canop**, além do depsídeo ácido criptoclorofeico, destaca-se a presença do ácido caperático (ácido graxo). A única amostra que apresentou ácido graxo em sua composição majoritária é o líquen **Pmes** (contendo o ácido protoliquesterínico), e este também apresentou a triplicata com comportamento mais distante, observados em valores mais positivos de PC2. Os demais líquens da família Parmeliaceae, os quais possuem alguns depsídeos e depsidonas como constituintes majoritários, encontram-se em valores intermediários de PC2. A amostra **Pcor**, mais distante no eixo de PC1, contém além do depsídeo atranorina, metabólitos não identificados os quais indicam ser os responsáveis por tal discriminação.

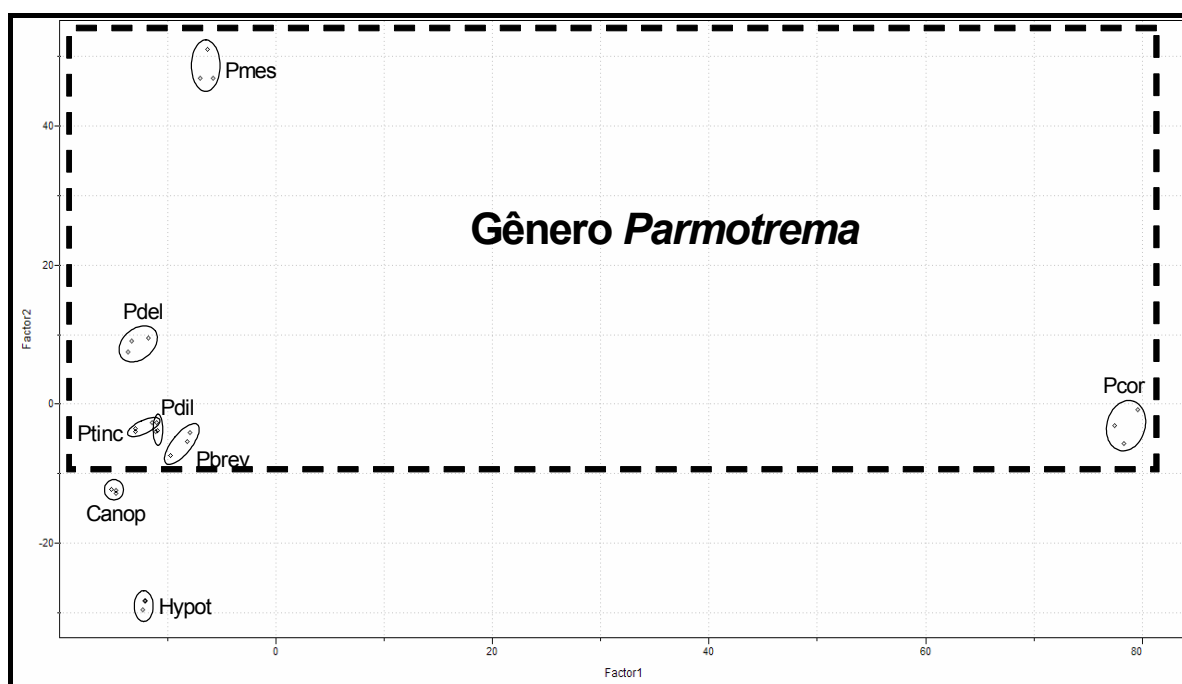


FIGURA 4.111: Gráfico de scores das amostras de líquens da família Parmeliaceae – análise de RMN em solução (PC1 x PC2, 24,1 e 11,8%, respectivamente).

d) Gênero Parmotrema

Na análise das seis espécies do mesmo gênero (*Parmotrema*) por RMN em solução também foi possível a discriminação entre elas. O posto da matriz foi estimado como sendo 6, com 73,2% de informação cumulativa. No gráfico de

scores de PC1xPC2 (42,9%), há uma ótima distinção entre as espécies (Figura 4.112), sobretudo o agrupamento das replicatas foi melhor do que o das análises por RMN HR-MAS (Figura 4.24, página 51).

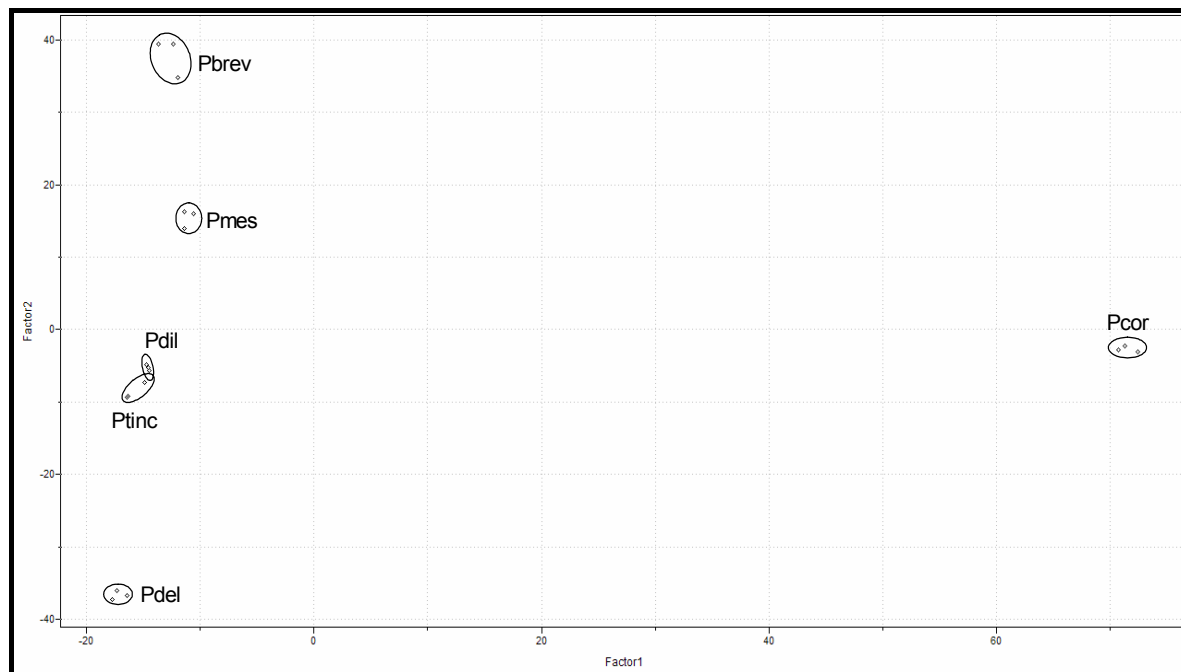


FIGURA 4.112: Gráfico de scores das amostras de líquens do gênero *Parmotrema* – análise de RMN em solução (PC1 x PC2, 28,4 e 14,5%, respectivamente).

O poder de discriminação dos espectros de RMN da análise líquida, avaliados na figura 4.113, indica quais as regiões mais importantes para a análise quimiométrica dos dados, onde os sinais mais intensos correspondem à intensidade de informação daquela região para a discriminação das amostras e não à intensidade do próprio sinal de RMN de ^1H . Como pode ser observado, devido aos extratos apresentarem composições químicas diferentes referentes aos metabólitos das espécies estudadas, praticamente toda a região espectral com sinais foi relevante para a análise quimiotaxonômica de líquens. Todavia, as regiões das metoxilas (δ 3,6-4,0), hidrogênios metilênicos ($\sim\delta$ 4,8), aromáticos (δ 6,0-7,5) e hidrogênios carbinólicos, aldeídicos e carboxílicos quelados (δ 10,0-10,8) foram àquelas que apresentaram uma maior quantidade de informação.

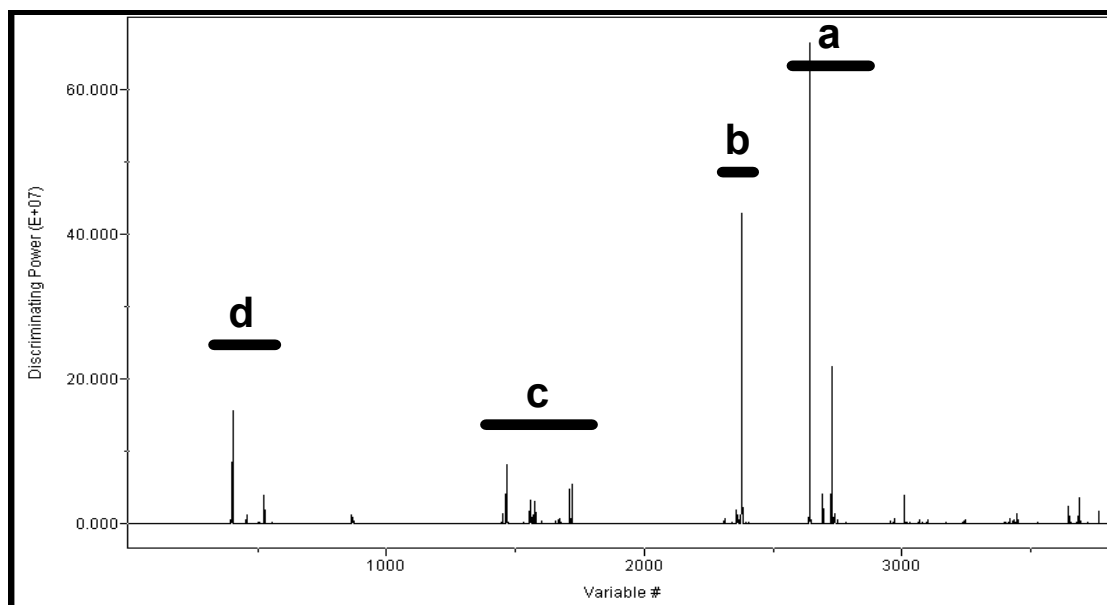


FIGURA 4.113: Gráfico mostrando o poder discriminante dos sinais de RMN das amostras em solução, com destaque às regiões mais relevantes na análise quimiométrica: a) metoxilas (δ 3,6-4,0); b) hidrogênios metilênicos ($\sim\delta$ 4,8); c) aromáticos (δ 6,0-7,5) e d) hidrogênios carbinólicos, aldeídicos e carboxílicos quelados (δ 10,0-10,8).

4.3.2.2 – Classificação de amostras desconhecidas

Para a construção de um modelo de classificação de amostras desconhecidas foram empregadas todas as amostras padrões. O modelo foi construído com um número de três vizinhos, pois com esse valor não houve nenhum erro de predição, conforme mostra a figura 4.114.

Um conjunto de vinte e sete amostras desconhecidas a esse modelo, correspondentes a nove classes em triplicata, foi submetida à classificação. A porcentagem de acerto do modelo foi de 88,9% (Tabela 4.15), destacando apenas três erros (replicatas da amostra **Pcor**) em vinte e sete amostras, ou seja, um melhor potencial de classificação que a técnica de RMN HR-MAS. O excelente percentual de acerto comprova que a classificação via RMN de Líquidos é bastante promissora no que se refere à análise sistemática de líquens, podendo ser estendida em outras matrizes.

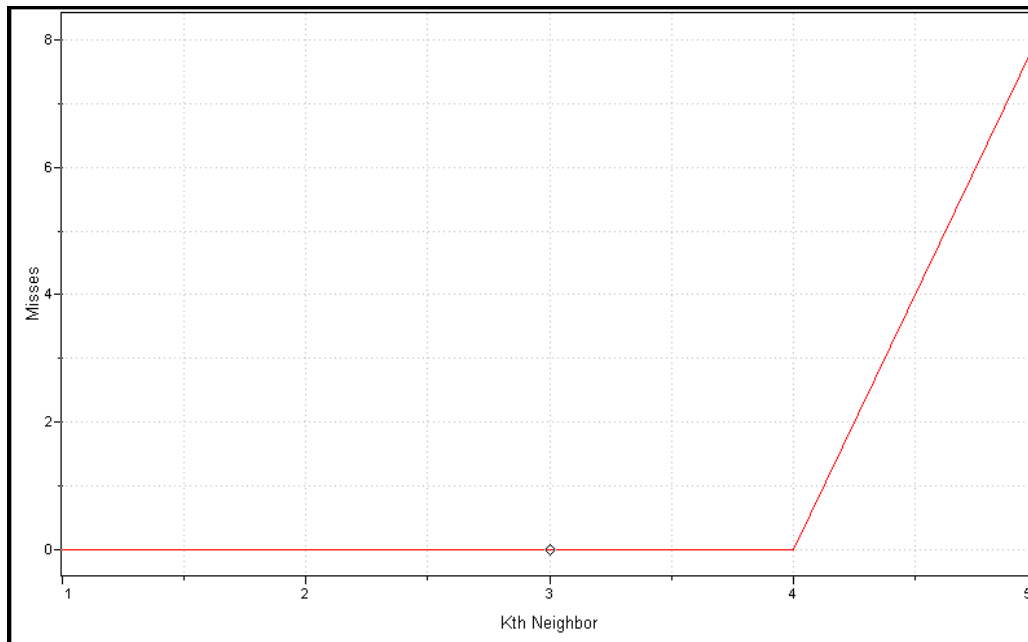


FIGURA 4.114: Gráfico mostrando os erros do modelo de predição de amostras em solução (RMN em solução) em função do número de vizinhos empregados na análise por KNN.

TABELA 4.15: Classificação de amostras desconhecidas através da análise de RMN em solução.

Amostras desconhecidas	Classificação por KNN	Classificação correta?
Samp1a	Canop	✓
Samp1b	Canop	✓
Samp1c	Canop	✓
Samp2a	Dirin	✓
Samp2b	Dirin	✓
Samp2c	Dirin	✓
Samp3a	Pbrev	✓
Samp3b	Pbrev	✓
Samp3c	Pbrev	✓
Samp4a	Pmes	não (Pcor)
Samp4b	Pmes	não (Pcor)
Samp4c	Pmes	não (Pcor)
Samp5a	Pdel	✓
Samp5b	Pdel	✓

Samp5c	Pdel	✓
Samp6a	Pdil	✓
Samp6b	Pdil	✓
Samp6c	Pdil	✓
Samp7a	Pmes	✓
Samp7b	Pmes	✓
Samp7c	Pmes	✓
Samp8a	Ptinc	✓
Samp8b	Ptinc	✓
Samp8c	Ptinc	✓
Samp9a	Pyx	✓
Samp9b	Pyx	✓
Samp9c	Pyx	✓

4.4 – Análise das Amostras Intactas por Espectroscopia de Infravermelho (IV)

4.4.1 – Os espectros de IV

As análises de IV apresentaram perfil espectral similar em todas as amostras de líquens (Figuras 4.115 e 4.116), com variação apenas nas intensidades de algumas absorções. Os espectros de IV foram obtidos em absorbância para a aplicação da quimiometria, pois a transmitância não varia linearmente com a concentração, enquanto os métodos quimiométricos são desenvolvidos para considerar essa variação.

As absorções foram avaliadas e identificadas mediante comparação com dados da literatura (SILVERSTEIN e WEBSTER, 1998). A absorção na região de 3014-3660 cm^{-1} , deve-se à vibração de estiramento de O-H em ligação de hidrogênio e corresponde à água adsorvida na amostra, visto que as pastilhas não foram submetidas à secagem em luz de alta potência para evitar a degradação do material. Em 2850 e 2920 cm^{-1} , duas absorções foram detectadas correspondentes à vibração de estiramento de CH ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ 2870; $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$ 2960, $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ 2926; $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ 2853). A maioria dos espectros de IV apresentou três absorções intensas de estiramento de C=O em 1724, 1645 e 1620 cm^{-1} , seguidas de absorções de menor intensidade em 1450-1350 cm^{-1} , correspondentes à vibração de deformação de CH de grupos metila ($\delta_{\text{s}}\text{CH}_3$ 1375 e $\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$ 1450, respectivamente) ou até mesmo de deformação de OH (geralmente entre 1420-1330 cm^{-1}) e de absorções de média intensidade em 1315 e 1257 cm^{-1} .

As absorções na região de 1100-1300 apresentaram grande variação de intensidade nas espécies analisadas, as quais compreendem as vibrações de estiramento de C-O, correspondentes a álcoois, em 1260-1000 cm^{-1} , ou de cetais ou acetais, visto que dados da literatura apontam a existência de três absorções de 1050-1150 cm^{-1} para esses casos (SILVERSTEIN e WEBSTER, 1998). Os espectros de IV também apresentaram uma absorção de baixa intensidade próxima a 780 cm^{-1} e uma absorção larga na região de 730-420 cm^{-1} .

Devido à grande similaridade entre os espectros das diferentes espécies de líquens, a análise quimiométrica foi empregada.

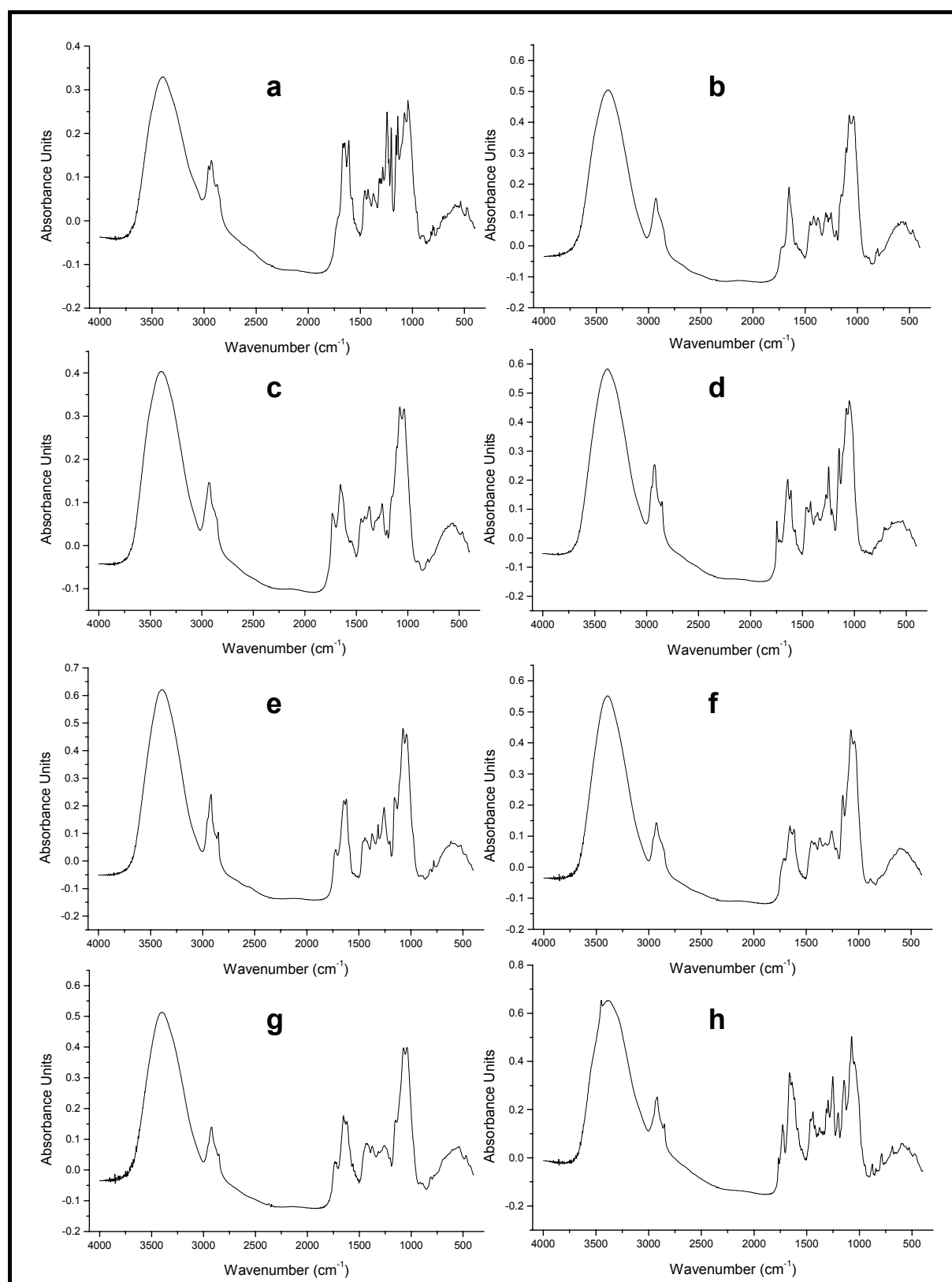


FIGURA 4.115: Espectros de infravermelho das amostras de líquens, região de 4000-400 cm⁻¹: a) **Dirin**; b) **Hspec**; c) **Pyx**; d) **Hypot**; e) **Canop**; f) **Pbrev**; g) **Pcor** e h) **Pdel**.

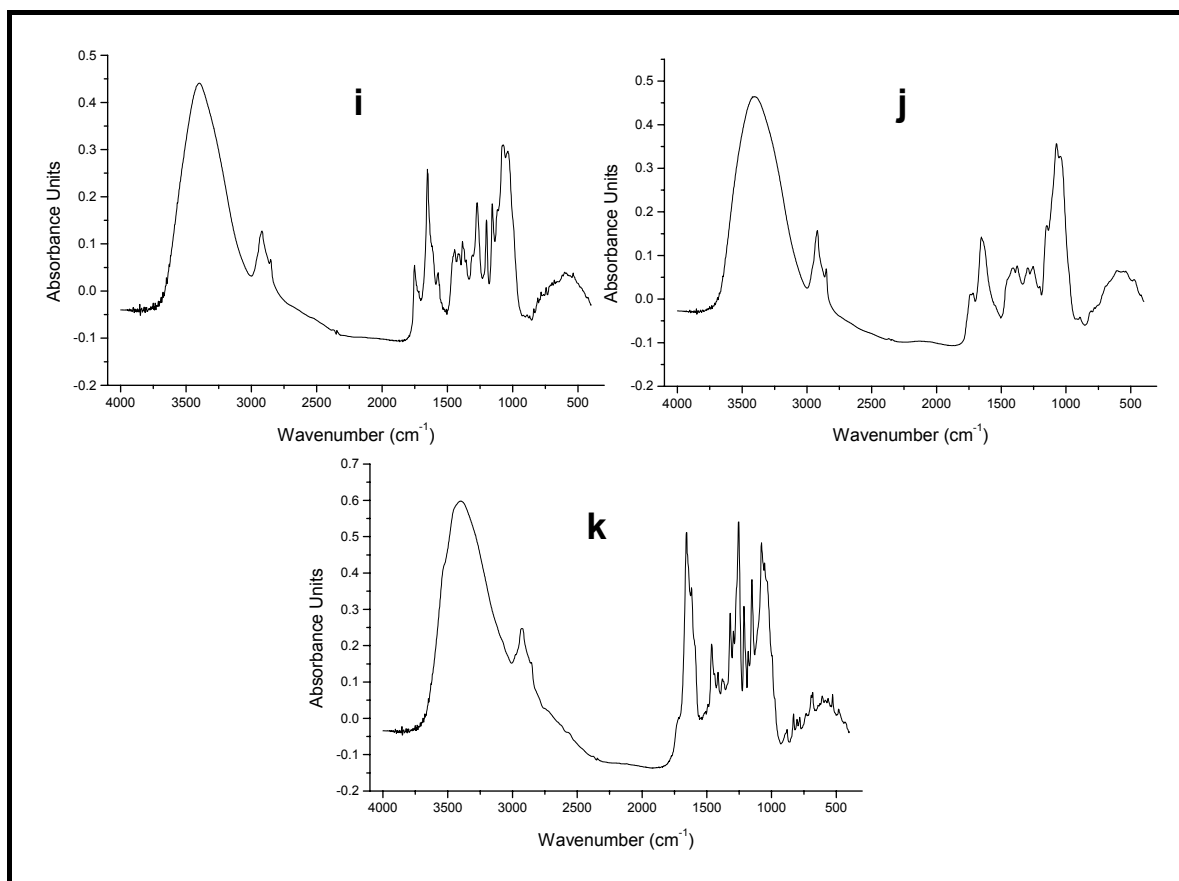


FIGURA 4.116: Espectros de infravermelho das amostras de líquens, região de 4000-400 cm⁻¹: i) Pdil; j) Pmes; k) Ptinc.

4.4.2 - Análise quimiométrica dos dados de IV

Na análise quimiométrica foram excluídas as regiões espectrais referentes à absorção de OH (3000-4000 cm⁻¹), proveniente principalmente da água residual adsorvida, visto que após o preparo das pastilhas, para se evitar a decomposição do material, as mesmas não foram submetidas à secagem sob uma luz de alta potência. Ruídos nas regiões de 400-910 cm⁻¹ e 1810-2800 cm⁻¹ também foram excluídos.

A matriz gerada a partir da região espectral com as exclusões continha 11 amostras e 518 variáveis. A visualização de todos os espectros encontra-se destacada na figura 4.117B, onde a região sombreada foi excluída para as análises quimiométricas (Figura 4.117A).

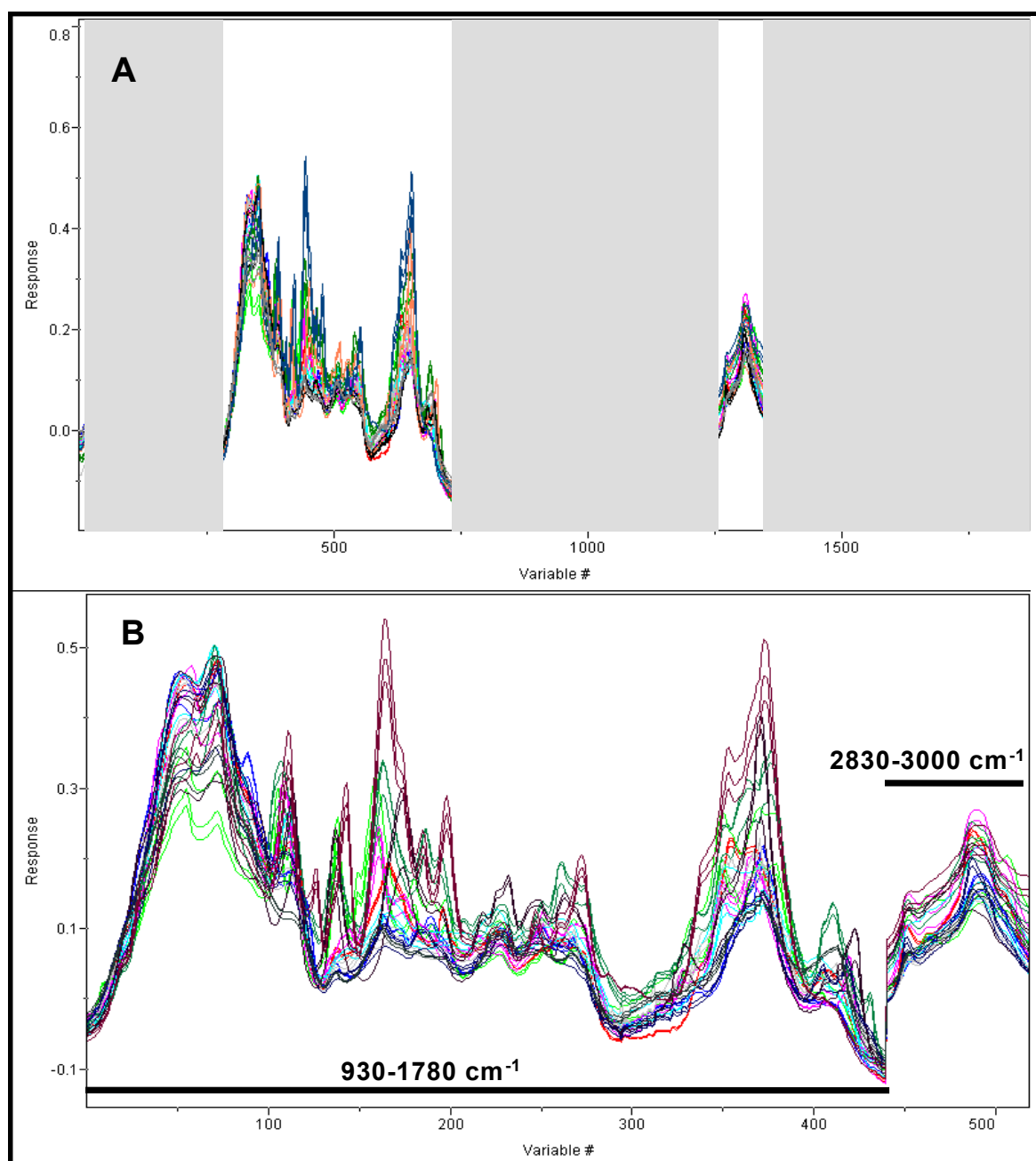


FIGURA 4.117: Visualização de todos os espectros de IV que, após a exclusão da região sombreada (A), foram empregados na análise quimiométrica (B).

4.4.2.1 – Análise exploratória

a) Todas as amostras de líquens (Famílias Physciaceae e Parmeliaceae)

Na análise de PCA de todas as amostras analisadas por IV não foi observada a distinção entre os líquens das famílias Physciaceae e Parmeliaceae (Figura 4.118). O gráfico de PC1xPC2 de todas as amostras representa que 40,7% da informação do sistema está contida nessas duas componentes principais, onde o

posto da matriz foi estimado como sendo 7, com uma informação total de 89,4%. Em todas as análises de PCA dos dados de IV, as melhores condições foram:

- Pré-processamento autoescalamento;
- Transformação: 1ª derivada.

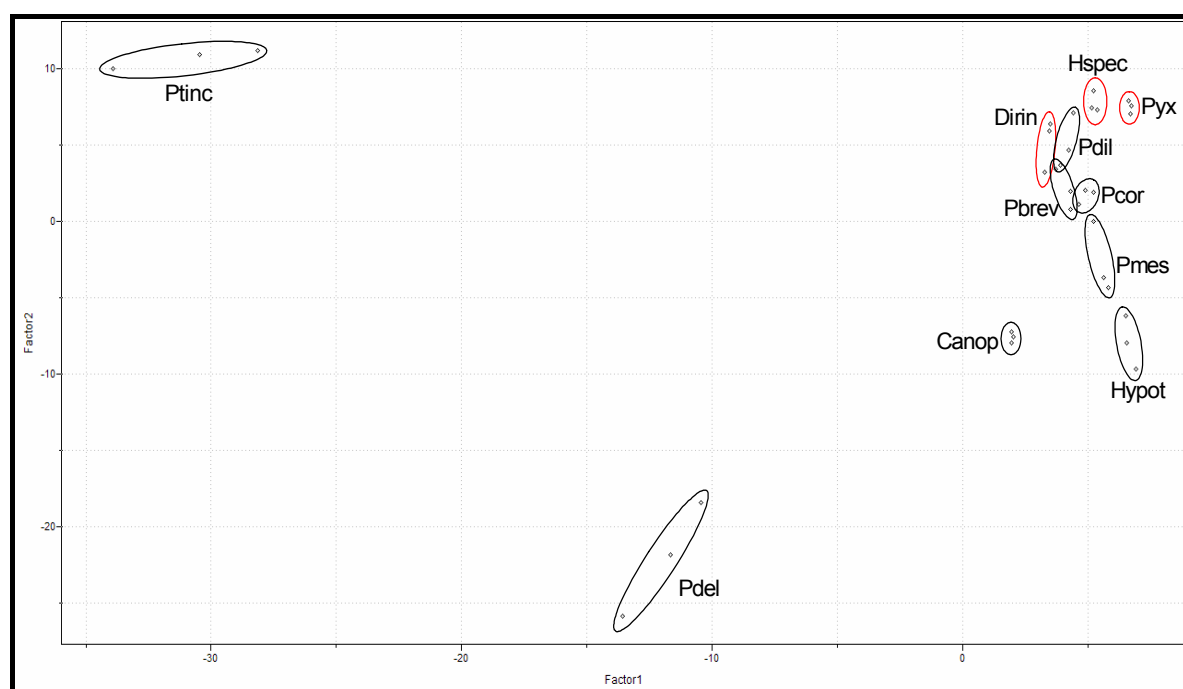


FIGURA 4.118: Gráfico de scores de todas as amostras de líquens analisadas por IV (PC1 x PC2, 23,9 e 16,8%, respectivamente) – família Physciaceae destacada nas elipses em vermelho.

b) Família Physciaceae

Os três gêneros da família Physciaceae foram discriminados no gráfico de scores de PC1xPC2 (Figura 4.119), o qual contém 85,2% de informação do sistema. Para a discriminação dos gêneros da família Physciaceae, o posto foi estimado para 4, com 99,1% de informação cumulativa, e as mesmas condições de tratamento quimiométrico foram empregadas.

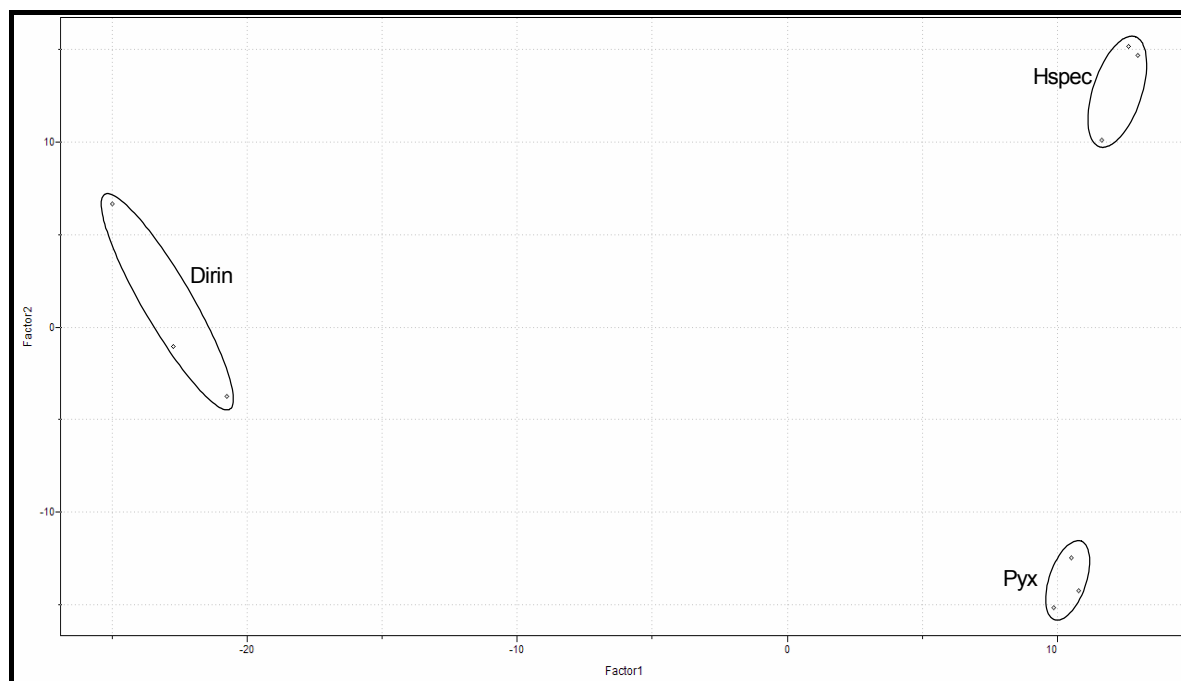


FIGURA 4.119: Gráfico de scores das amostras de líquens da família Physciaceae analisadas por IV (PC1 x PC2, 56,9 e 28,3%, respectivamente).

c) Família Parmeliaceae

A análise quimiométrica de PCA da família Parmeliaceae, com posto igual a 7 e percentual total de 94,9%, apresentou a distinção entre os gêneros *Parmotrema*, *Hypotrachyna* e *Canoparmelia*, uma vez que as espécies do gênero *Parmotrema* agruparam-se em valores mais positivos de PC3. O gráfico de scores da família Parmeliaceae, avaliada por espectroscopia de IV (Figura 4.120), foi obtido com as componentes principais PC1 e PC3. Embora a maioria dos resultados apresentados neste trabalho, contenha a informação quimiométrica explicitada nas duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), a discriminação obtida em PC1 e PC3, encontrada neste caso, contém 45,9% de informação sobre o sistema, ou seja, uma porcentagem maior até mesmo que a encontrada em análises quimiométricas de RMN HR-MAS.

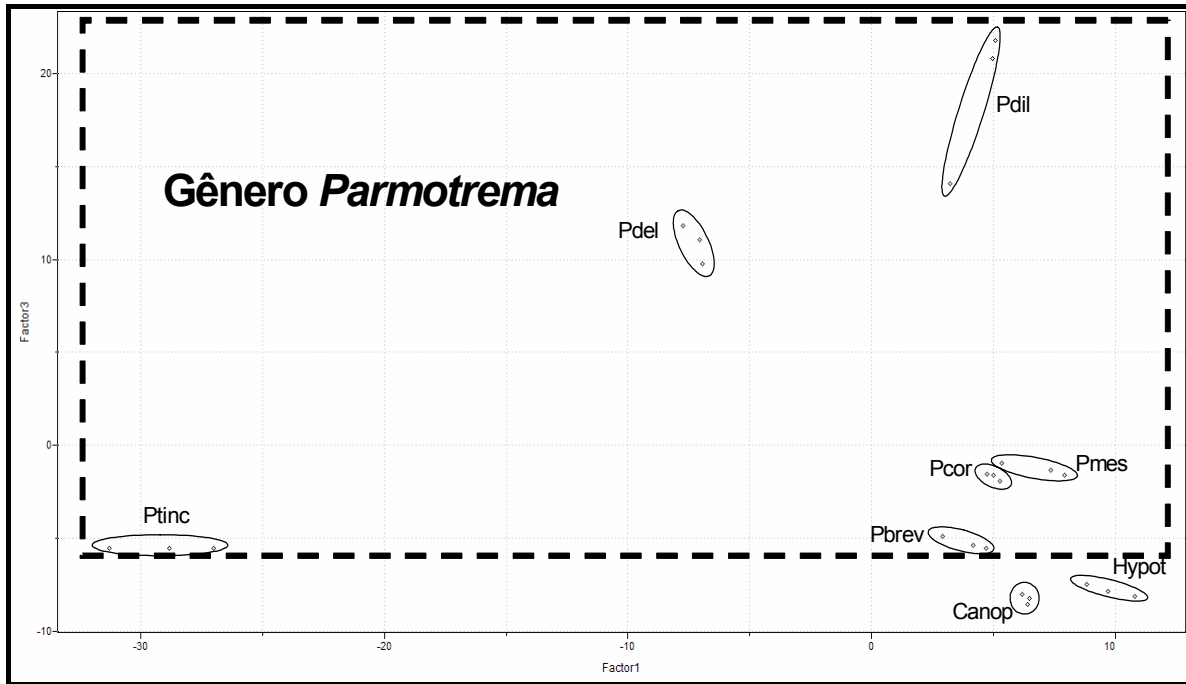


FIGURA 4.120: Gráfico de scores das amostras de líquens da família Parmeliaceae analisadas por IV (PC1 x PC3, 28,8 e 17,1%, respectivamente).

d) Gênero *Parmotrema*

Na análise das seis espécies do mesmo gênero (*Parmotrema*) por IV foi estimado o posto para 8, o qual apresentou um excelente percentual de informação total sobre o sistema de 99,5%. No gráfico de scores de PC1xPC2 (Figura 4.121), com 58,9%, foi observada a discriminação entre as seis espécies e há, sobretudo, um satisfatório agrupamento das replicatas, apesar da proximidade entre as amostras **Pbreve** e **Pcor**, o que poderia dificultar a análise de classificação.

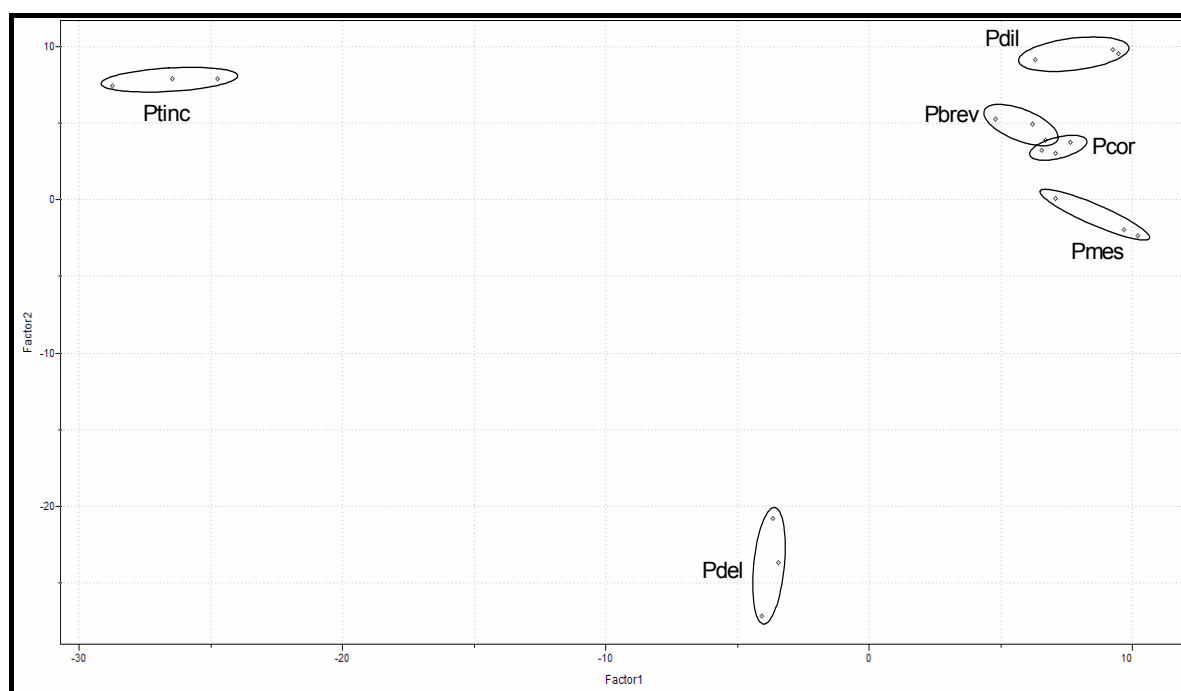


FIGURA 4.121: Gráfico de scores das amostras de líquens do gênero *Parmotrema* analisadas por IV (PC1 x PC2, 32,9 e 26,0%, respectivamente).

O poder de discriminação das absorções analisadas nos espectros de IV, visualizados na figura 4.122, indica que as regiões de absorção entre 1300-1100 cm^{-1} , correspondentes às vibrações de estiramento de C-O de álcoois ou de cetais ou acetais, apresentaram a maior intensidade de informação, ou seja, são responsáveis pelas discriminações observadas, com grande destaque à absorção em $\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$. Esse resultado, em concordância com o obtido pela análise de RMN HR-MAS, a qual prevê a importância dos polióis, corroboram a relevância dos carboidratos para a quimiotaxonomia de líquens.

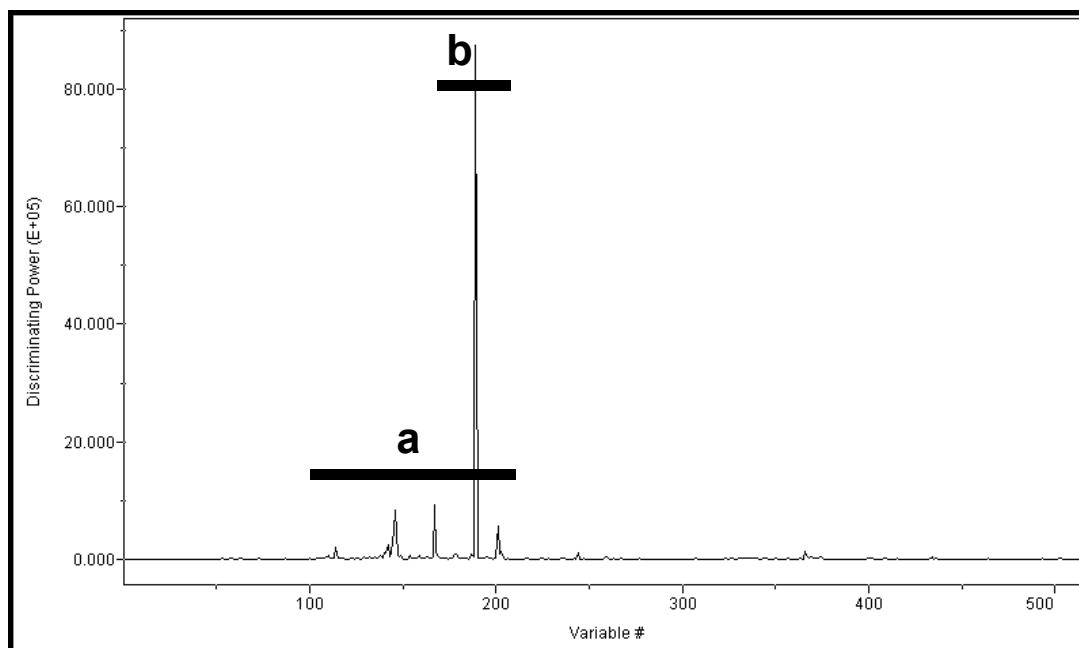


FIGURA 4.122: Gráfico mostrando o poder discriminante das absorções de IV, com destaque às regiões mais relevantes na análise quimiométrica: a) 1300-1100 cm^{-1} e b) $\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$.

4.4.2.1 – Classificação de amostras desconhecidas

Como realizado aos dois conjuntos de dados de RMN, HR-MAS e em solução, na análise por IV foi construído um modelo de classificação de amostras desconhecidas. Para a construção desse modelo foi empregado o número de três vizinhos mais próximos, pois com esse valor o erro de predição é nulo (Figura 4.123).

Um conjunto de vinte e quatro amostras desconhecidas ao modelo, correspondentes a nove classes em triplicata, foi submetida à classificação. A porcentagem de acerto do modelo foi de 100% (Tabela 4.16), ou seja, a melhor predição encontrada. Este resultado indica a espectroscopia de IV como a técnica em maior potencial para a análise de líquens, pois embora na análise de componentes principais tenhamos proximidades entre grupos, como observado na figura 4.121, o excelente agrupamento de replicatas propicia a classificação correta de 100% das amostras.

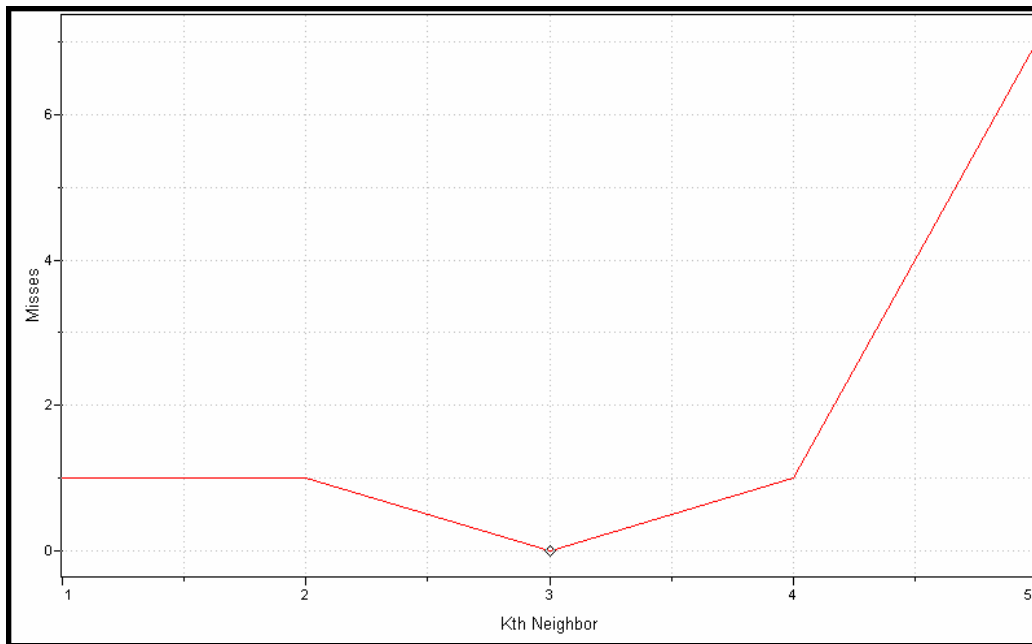


FIGURA 4.123: Gráfico mostrando os erros do modelo de predição de amostras intactas (análise por IV) em função do número de vizinhos empregados na análise por KNN.

TABELA 4.16: Classificação de amostras desconhecidas através da análise de IV.

Amostras desconhecidas	Classificação por KNN	Classificação correta?
IV1a	Hspec	✓
IV1b	Hspec	✓
IV1c	Hspec	✓
IV2a	Dirin	✓
IV2b	Dirin	✓
IV2c	Dirin	✓
IV3a	Pbrev	✓
IV3b	Pbrev	✓
IV3c	Pbrev	✓
IV4a	Pcor	✓
IV4b	Pcor	✓
IV4c	Pcor	✓
IV5a	Pdil	✓
IV5b	Pdil	✓
IV5c	Pdil	✓

IV6a	Pmes	✓
IV6b	Pmes	✓
IV6c	Pmes	✓
IV7a	Ptinc	✓
IV7b	Ptinc	✓
IV7c	Ptinc	✓
IV8a	Pyx	✓
IV8b	Pyx	✓
IV8c	Pyx	✓

Os resultados obtidos por IV e quimiometria, comparados aos apresentados com o emprego da RMN HR-MAS de ^1H e em solução, revelam a espectroscopia na região do IV como uma possível técnica para a análise quimiotaxonômica de líquens, uma vez que os dados são obtidos de forma rápida e com satisfatória discriminação entre as amostras.

A comparação dos resultados de IV somente com os de RMN HR-MAS de ^1H , ambos obtidos a partir do material vegetal intacto, revelam que apesar da grande similaridade nas discriminações das espécies, há um maior potencial de discriminação entre as famílias quando a análise é realizada com a RMN HR-MAS de ^1H , embora nesse caso, o agrupamento das replicatas seja menos eficiente. Todavia, partindo-se para a classificação, os resultados obtidos por IV são muito melhores, destacando-se como a mais promissora ferramenta na análise quimiotaxonômica de líquens, principalmente devido ao baixo custo e rapidez da análise.

4.5 – Análise quimiométrica comparativa entre as técnicas espectroscópicas de RMN e IV

As técnicas de RMN e IV foram analisadas concomitantemente para a avaliação comparativa da relevância de cada uma das técnicas para a discriminação quimiotaxonômica de líquens. Para essa análise, foi construída uma nova matriz de dados em que as colunas correspondem às componentes principais PC1, PC2 e PC3 de cada técnica. A análise de componentes principais (PCA) foi então efetuada a partir desse novo conjunto de dados. A seguir, são apresentadas as análises comparativas expressadas pelo gráfico de *scores* e *loadings* (mais fáceis de serem visualizados devido ao reduzido número de variáveis).

4.5.1 – Todas as amostras de líquens (Famílias *Physciaceae* e *Parmeliaceae*)

Na análise de componentes principais de todas as amostras, empregando-se todas as técnicas em questão, foi observada a tendência à distinção entre as famílias, com o agrupamento das amostras **Dirin**, **Pyx** e **Hspec** em valores mais positivos em PC1 e mais negativos em PC2, conforme está apresentado no gráfico de *scores* (Figura 4.124A).

A análise do gráfico de *loadings* permite atribuir essa discriminação entre famílias à técnica de RMN HR-MAS, mais especificamente à primeira componente principal de HR-MAS (PC1-HR), como está destacado na figura 4.124B, onde PC1-HR é a variável que se apresenta em valores mais positivos de PC1 e negativos de PC2. Como já apresentado na análise intacta por RMN HR-MAS (seção 4.2), esta foi a única técnica que apresentou a separação dos líquens em famílias.

Em todas as análises comparativas de PCA, as melhores condições foram:

- Pré-processamento: autoescalamiento.
- Transformação: nenhuma

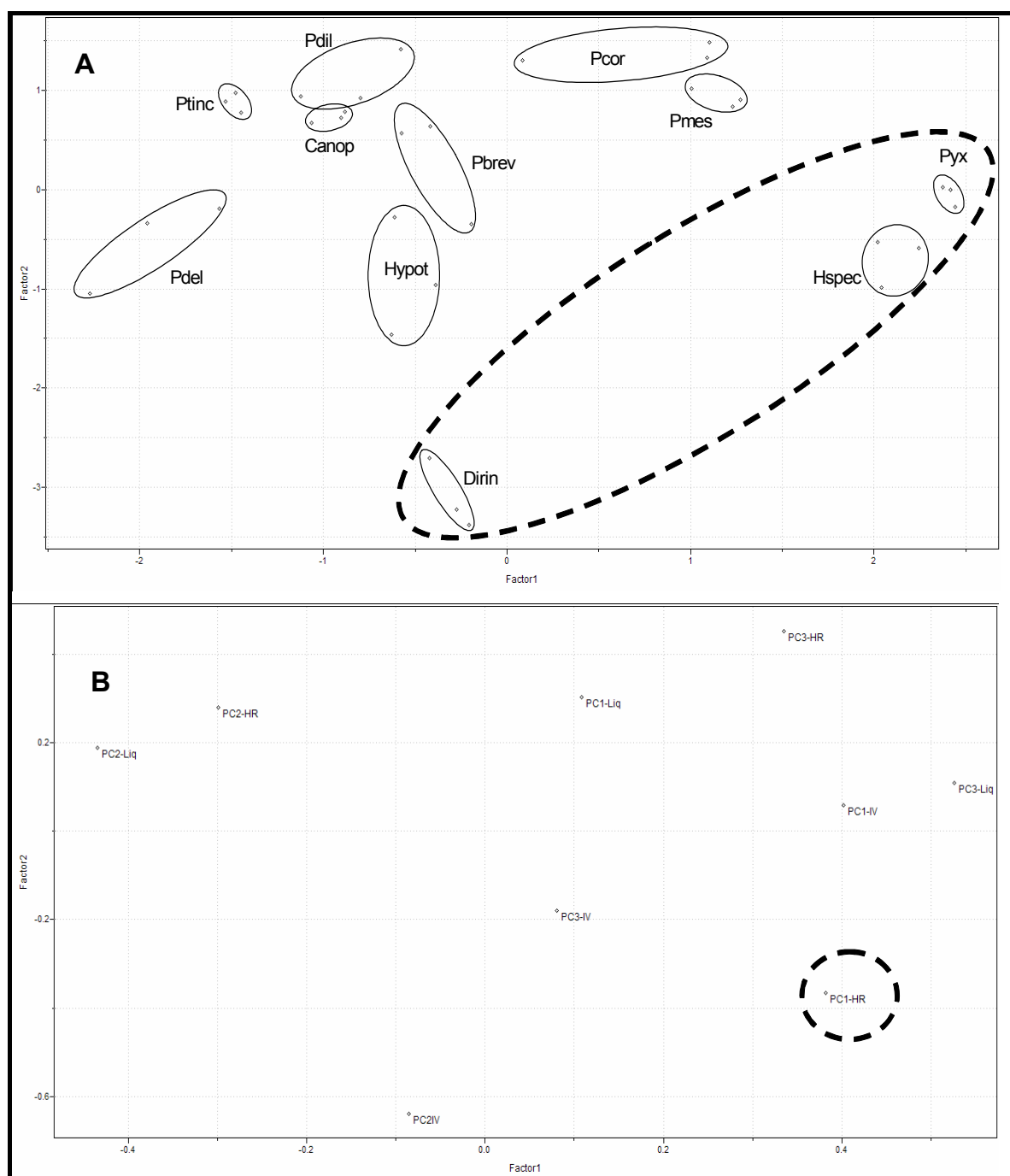


FIGURA 4.124: Gráfico de *scores* (A) e *loadings* (B) de todas as amostras de líquens avaliadas com as técnicas de RMN e IV, comparativamente (PC1 x PC2, 21,6 e 18,1%, respectivamente).

4.5.2 – Família Physciaceae

A análise comparativa entre as técnicas, aplicada às amostras da família Physciaceae, apresentou excelente discriminação entre os gêneros (Figura 4.125A), assim como foi observado em cada técnica separadamente. Como o

gráfico de *loadings* (Figura 4.125B) expressa a contribuição de cada variável para a separação, a avaliação somente a primeira componente principal de cada técnica (PC1-HR, PC1-Liq e PC1-IV), as quais possuem a maior quantidade de informação, mostra a contribuição de cada técnica para a localização de um dado gênero numa posição do gráfico de scores (Figura 4.125A), confirmando a importância das três técnicas nesse conjunto de dados.

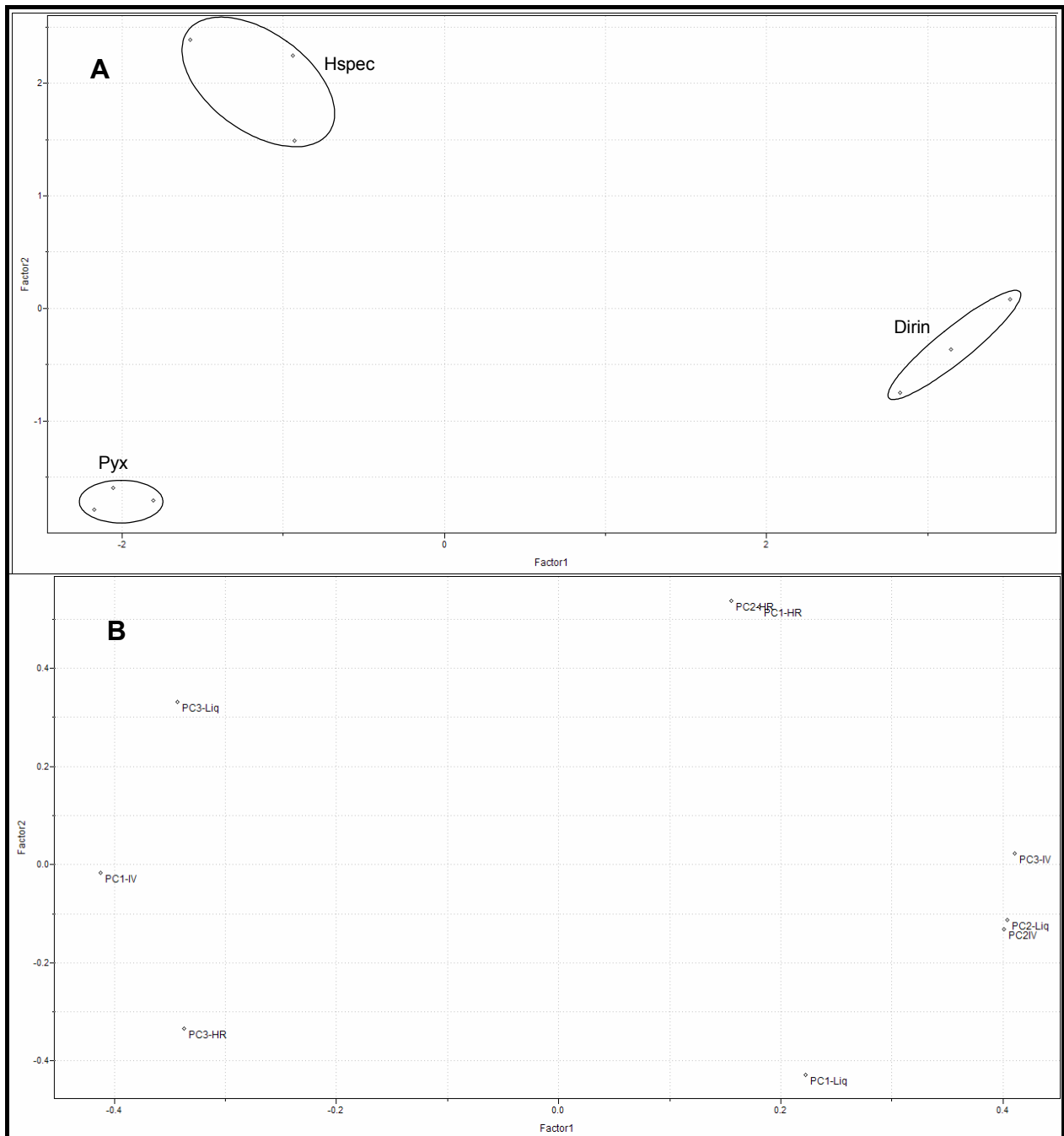


FIGURA 4.125: Gráfico de *scores* (A) e *loadings* (B) das amostras da família Physciaceae avaliadas com as técnicas de RMN e IV, comparativamente (PC1 x PC2, 64,9 e 31,0%, respectivamente).

4.5.3 – Família Parmeliaceae

A família Parmeliaceae não foi discriminada em gêneros na análise comparativa das técnicas, embora haja uma tendência das espécies do gênero *Parmotrema* agruparem-se em valores mais negativos de PC3 (Figura 4.126A), exceto para a amostra **Pcor**. Na análise dos *loadings*, as variáveis PC3-IV e PC2-Liq são as de maior peso em PC3, pois apresentam-se em valores negativos (Figura 4.126B). Desta forma, comparando-se com os resultados obtidos para cada técnica separadamente, onde os gêneros foram discriminados em PC3 na análise de IV (Figura 4.120, página 136) e PC2 na análise de RMN em solução (Figura 4.112, página 126), os resultados encontram-se em plena concordância.

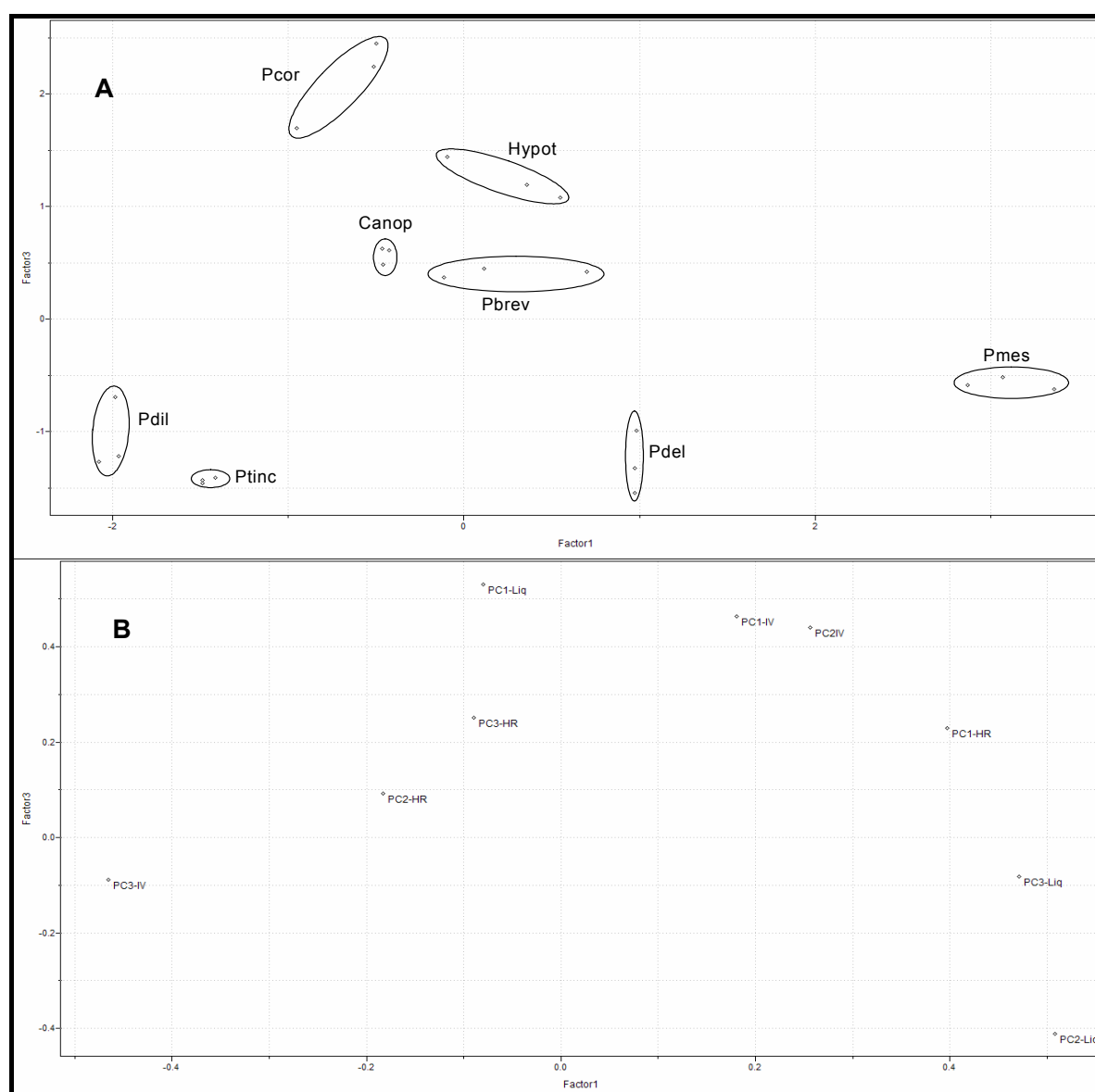


FIGURA 4.126: Gráfico de *scores* (A) e *loadings* (B) das amostras da família Parmeliaceae avaliadas com as técnicas de RMN e IV, comparativamente (PC1 x PC3, 25,8 e 17,4%, respectivamente)

4.5.4 – Gênero *Parmotrema*

Similarmente à análise comparativa entre as técnicas aplicada à família Physciaceae, as seis espécies do gênero *Parmotrema* foram discriminadas e os *loadings* apresentam todas as técnicas como relevantes à separação (Figura 4.127)

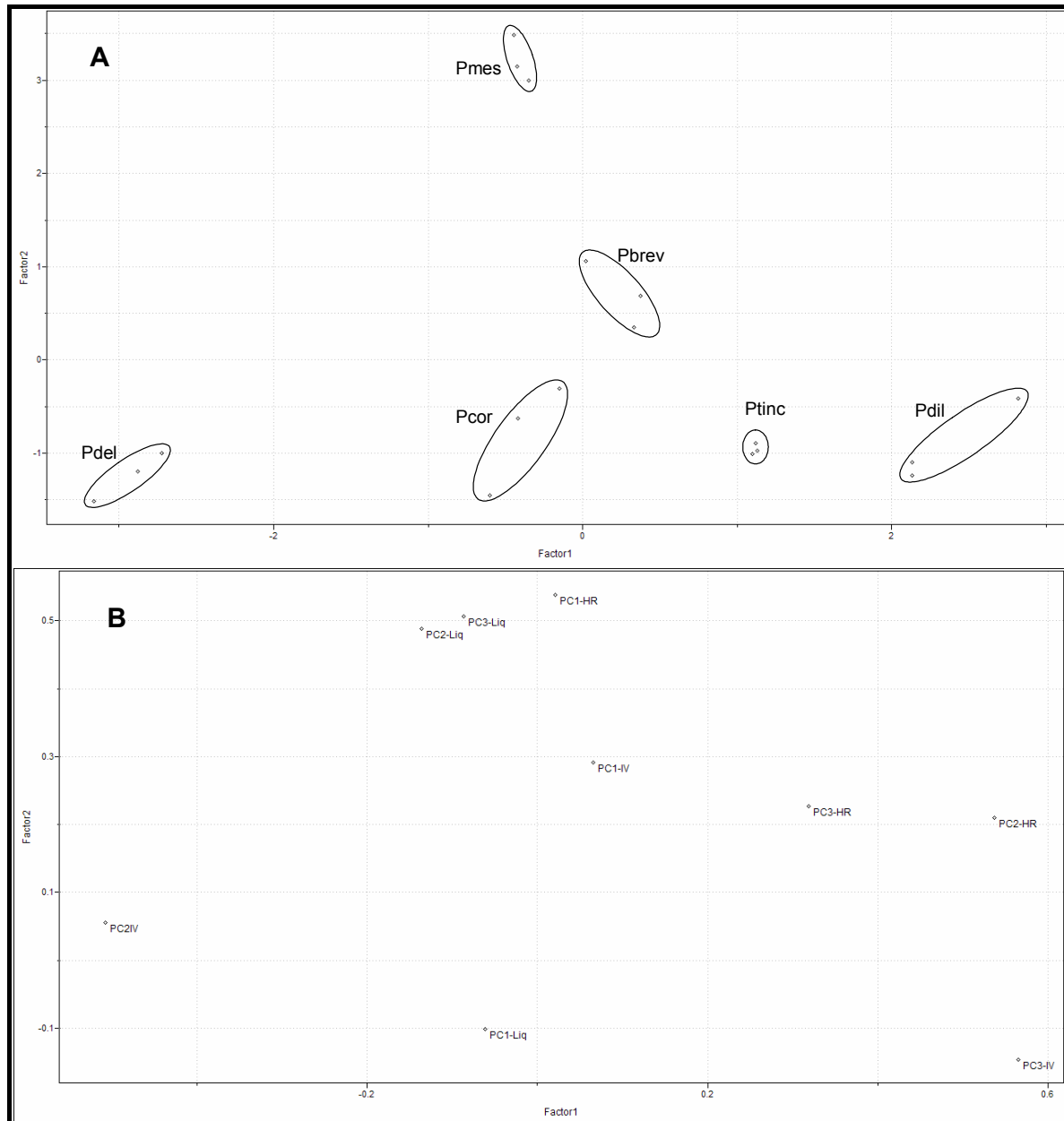


FIGURA 4.127: Gráfico de *scores* (A) e *loadings* (B) das amostras do gênero *Parmotrema* avaliadas com as técnicas de RMN e IV, comparativamente (PC1 x PC2, 31,3 e 29,9%, respectivamente).

CONCLUSÃO

5 – CONCLUSÃO

A quimiotaxonomia de líquens via RMN e IV mostrou-se viável, todavia, pode-se observar que o uso de ferramentas estatísticas como a quimiometria é imprescindível para a realização desse trabalho, já que o grande número de informação contida nos espectros, isoladamente, não fornece dados conclusivos.

A sonda HR-MAS, muito útil para a análise de alimentos e tecidos animais, mostrou-se também um excelente instrumento para a quimiotaxonomia de líquens, com a caracterização da importância dos carboidratos de líquens (polióis) para a sua identificação. Do mesmo modo, a análise por RMN em solução dos extratos líquênicos forneceu uma excelente discriminação entre os gêneros e espécies, baseada na avaliação dos seus metabólitos secundários, embora os dados da HR-MAS sejam indubitavelmente mais interessantes, principalmente porque se trata de um método simples, que dispensa o pré-tratamento das amostras e evita o consumo de tempo e reagentes para a extração, além de outros inconvenientes correlacionados, como por exemplo a decomposição das amostras. Outro aspecto importante observado foi a reprodutibilidade da sonda HR-MAS, a qual mesmo sendo menor que a reprodutibilidade da sonda de líquidos, apresentou um bom agrupamento das replicatas via tratamento quimiométrico e uma resolução espectral muito boa.

A identificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos acetônicos, sem nenhum processo de purificação, apresentou resultados importantes, com maior esclarecimento de multiplicidades e constantes de acoplamento. Treze substâncias foram identificadas em mistura, aplicando-se um grande conjunto de técnicas de RMN, juntamente com as simulações de espectros e comparações com dados da literatura.

Aliado aos dados de RMN (HR-MAS e em solução), a espectroscopia na região do infravermelho (IV) mostrou resultados muito interessantes (dados não encontrados na literatura), assim como os resultados já observados com o emprego da RMN HR-MAS no que diz respeito à importância dos carboidratos na análise quimiotaxonômica de líquens. O destaque à técnica de IV deve-se à excelente classificação de amostras desconhecidas ao modelo, fator relevante quando se compara a reprodutibilidade da RMN HR-MAS, ambos obtidos a partir do material vegetal intacto.

Desta forma, a espectroscopia na região do IV, aliada à quimiometria, apresentou-se como a ferramenta em maior potencial para as análises quimiotaxonômicas de líquens, tanto pelos resultados obtidos na classificação quanto pela rapidez e baixo custo da técnica. Todavia, uma análise objetivando-se a elucidação estrutural só é alcançada dispondo-se de ferramentas mais poderosas, como é o caso da RMN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMENDOLIA, S. R.; DOPPIU, A.; GANADU, M. L.; LUBINU, G. "Classification and quantitation of ^1H NMR spectra of alditols binary mixtures using artificial neural networks". *Analytical Chemistry*, **70**: 1249-1254, 1998.

AMIX-VIEWER[®], Manual do software, versão 3.1. Bruker, Karlsruhe, 2002.

ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. *Chemistry of lichen substances*. Japan Society for the Promotion of Science, Ueno, 1954, 240 pp.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. *Chemometrics: A Practical Guide*, John Wiley & Sons, New York, 1998, p. 348.

BELTON, P. S., COLQUHOUM, I. J., KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I., ROMA, P., DENNIS, M. J., SHARMAN, M., HOLMES, E., NICHOLSON, K., SPRAUL, M. "Application of chemometrics to the ^1H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties". *Food Chemistry*, **61** (2): 207-213, 1998.

BOONPRAGOB, K.; NASH III, T. H.; FOX, C. A. "Seasonal deposition patterns of acidic ions and ammonium to the lichen *Ramalina menziesii* tayl. in southern California". *Environmental and Experimental Botany*, **29** (2): 187-197, 1989.

BRETERON, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, John Wiley & Sons, Chichester, 2003, 528 pp..

BRESCIA, M. A., DI MARTINO, G., FARES, C., DI FONZO, N., PLATANI, C., CHELLI, S., RENIERO, F. SACCO, A. "Characterization of Italian durum wheat semolina by means of chemical analytical and spectroscopy determinations". *Cereal Chemistry*, **79** (2): 238-242, 2002a.

BRESCIA, M. A.; CALDAROLA, V.; DE GIGLIO, A.; BENEDETTI, D.; FANIZZI, F. P.; SACCO, A. "Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations". *Analytica Chimica Acta*, **458** (1): 177-186, 2002b.

BROBERG, A.; KENNE, L.; PEDERSEN, M. "In-situ identification of major metabolites in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Planta*, **206** (2): 300-307, 1998.

BROBERG, A.; KENNE, L. "Use of High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy for *in situ* studies of low-molecular compounds in red algae". *Analytical Biochemistry*, **284**: 367-374, 2000.

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; STUELP, P. M.; GORIN, P. A. J.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; IACOMINI, M. "Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes". *FEMS Microbiology Letters*, **194** (1): 65-69, 2001.

CARBONERO, E. R.; MONTAI, A. V.; STUELP, P. M.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. "Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp.: significance as chemotypes". *Phytochemistry*, **61**: 681-686, 2002.

CARBONERO, E. R. *Polissacarídeos de fungos liquenizados contendo diferentes fotobiontes*. Curitiba, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, 2005, Tese de Doutorado.

CARBONERO, E. R.; MONTAI, A. V.; MELLINGER, C. G.; ELIASARO, S.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. "Glucans of lichenized fungi: significance for taxonomy of the genera *Parmotrema* and *Rimelia*". *Phytochemistry*, **66**: 929-934, 2005a.

CARBONERO, E. R.; MELLINGER, C. G.; ELIASARO, S.; G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. "Chemotypes significance of lichenized fungi by structural characterization of heteropolysaccharides from the genera *Parmotrema* and *Rimelia*". *FEMS Microbiology Letters*, **246**: 273-278, 2005b.

CARVALHO, M. G.; CARVALHO, G. J. A.; BRAZ-FILHO, R. "Chemical constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of atranorin and its new acetyl derivative". *Journal of Brazilian Chemical Society*, **11** (2): 143-147, 2000.

CHENG, L. L.; CHANG, I.; SMITH, B. L.; GONZALEZ, R. G. "Evaluation human breast ductal carcinomas with High-Resolution Magic Angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy". *Journal of Magnetic Resonance*, **135**: 194-202, 1998.

CLARIDGE, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Series, Volume 19, Oxford, Pergamon, 1999, 382 pp.

DEFERNEZ, M., COLQUHOUN, I. J. "Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ^1H NMR spectra". *Phytochemistry*, **62**: 1009-1917, 2003.

DE PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A., PILÓ-VELOSO, D.; DEMUNER, A. J., HOWARTH, O. "Constituintes químicos da casca de *Ochroma lagopus swartz* (Bombacaceae)". *Eclética Química*, **23**: 45-57, 1998.

DEROME, A. E. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Organic Chemistry Series, v. 6, London, Pergamon Press, 1987, 280 pp.

DUARTE, I., BARROS, A., BELTON, P. S., RIGHELATO, R., SPRAUL, M., HUMPFER, E., GIL, A. M. "High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 2475-2481, 2002.

EIFLER-LIMA, V. L.; SPERRY, A.; SINBANDHIT, S.; BOUSTIE, J.; TOMASI, S.; SCHENKEL, E. "NMR spectral data of salazinic acid isolated from some species of *Parmotrema*". *Magnetic Resonance in Chemistry*, **38**: 472-474, 2000.

ELIX, J. A.; FERGUSON, B. A.; SARGENT, M. V. "The structure of alectronic acid and related lichen metabolites". *Australian Journal of Chemistry*, **27**: 2403-2411, 1974.

ELIX, J. A. "Biochemistry and secondary metabolites". IN: *Lichen Biology*. NASH III, T. H. 1st ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1996, p. 154-180.

FERREIRA, M. M. C.; 2006. Disponível em <http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/downloads/Introducao.pdf>, acessado em 06/12/2006.

FERREIRA, M. M. C.; 2006. Disponível em <http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/downloads/CLASSIFICACAO.pdf>, acessado em 06/12/2006.

FISCHER, G.; BRAUN, S.; THISSEN, R.; DOTT, W. "FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification an intra-species characterization of airborne filamentous fungi". *Journal of Microbiological Methods*, **64**: 63-77, 2003.

FOMSC3 – First Order Multiplet Simulator 3, 2006, disponível em <http://artemis.ffclrp.usp.br/NMR.htm>).

FOX, C. H.; KLEIN, E.; HUNECK, S. "Colensoinsäure, ein neues depsidon aus *Stereocaulon Colensoi*". *Phytochemistry*, **9** (12): 2567-1571, 1970.

FRISVAD, J. C. "Chemometrics and chemotaxonomy: a comparison of multivariate statistical methods for the evaluation of binary fungal secondary metabolite data". *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **14** (1-3): 253-269, 1992.

GARROD, S., HOLMES, E., HUMPFER, E., SPRAUL, M. "HR-MAS: A new tool for semisolid samples". *Report Bruker*, 146, p. 18-19, 1998.

GIL, A. G.; DUARTE, I. F.; DELGADILLO, I.; COLQUHOUN, I. J.; CASUSCELLI, F.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. "Study of the compositional changes of mango during ripening by use of Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **48**: 1524-1536, 2000.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T. "Proton magnetic resonance – An aid in identification and chemotaxonomy of yeasts". *Advances in Applied Microbiology*, **17** (1): 25-89, 1970.

HALE JR, M. E. The biology of lichens, A series of student text in Contemporary Biology, 3rd Ed., London, Edward Arnold, 1983, p. 12-17.

HIMMELREICH, U.; SOMORJAI, R. L.; DOLENKO, B.; LEE, O. C.; DANIEL, H.; MURRAY, R.; MOUNTFORD, C. E.; SORRELL, T. C. "Rapid identification of *Candida* species by using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and a statistical classification strategy". *Applied and Enviromental Microbiology*, **69** (8): 4566-4574, 2003.

- HONDA, N. K., VILEGAS, W. "A química de líquens". *Química Nova*, **21** (6): 110-125, 1998.
- HUNECK, S., YOSHIMURA, I. *Identifications of Lichen Substances*, Berlin, Springer-Verlag, 1996, 493 pp.
- KAPPEN, L. "In the climatic Oases of Antarctic ice desert. Plant life under extreme conditions". *Report DFG*, p. 25-28, 1988.
- KEETON, J. F.; KEOGH, M. F. "Caperatic acid from *Usnea Alata*". *Phytochemistry*, **12** (3): 721-722, 1973.
- 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 Chemica Scandinavica* **7** (4): 591-595, 1953.
- LINDSAY, D. C. "The role of lichens in Antarctic ecosystems". *Bryologist*, **81** (2): 268-276, 1978.
- LUGINBÜHL, W.; JIMENO, J.; ZEHNTNER, U. "Identification of seven species of the *Lactobacillus acidophilus* group". *LWT – Food Science and Technology*, **39**: 152-158, 2006.
- MANNINA, L., SOBOLEV, A. P., SEGRE, A., "Olive oil as seen by NMR and chemometrics", *Spectroscopy Europe*, **15** (3): 6-14, 2003.
- MANNINA, L.; CRISTINZIO, M.; SOBOLEV, A. P.; RAGNI, P.; SEGRE, A. "High-Field Nuclear Magnetic Resonance (NMR) study of truffles (*Tuber aestivum vittadini*)". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **52**: 7988-7996, 2004.
- MARTINICHEN-HERRERO, J. C., CARBONERO, E. R., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. "Anticoagulant and antihrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of lichen *Parmotrema mantiqueirensis* Hale". *Carbohydrate Polymers*. **60**: 7-13, 2005.
- MATULOVÁ, M.; HRICOVÍNIOVÁ, Z. "NMR studies of molybdate complexes of D-erythro-L-manno-octose and D-erythro-L-gluco-octose and their alditols". *Carbohydrate Research*, **337**: 1745-1256, 2002.
- NARUI, T.; SAWADA, K.; TAKATSUKI, S.; OKUYAMA, T.; CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L.; SHIBATA, S. "NMR assignments of depsides and tridepsides of the lichen family Umbilicariaceae". *Phytochemistry*, **48** (5): 815-822, 1998.
- NASH III, T. H. *Lichen Biology*. 1st ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1996. p.1.
- NISHIKAWA, Y.; MICHISHITA, K.; KURONO, G. Studies on the water soluble constituents of lichens. I. Gas chromatographic analyses of low molecular weight carbohydrates. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **21** (5): 1014-1019, 1973.

OLAFSDOTTIR, E. S., INGÓLFSDOTTIR, K. "Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity". *Planta Medica*, **67**: 199-208, 2001.

PIROUETTE[®], Manual do software, versão 3.02. Infometrix, Woodinville, 1990-2001.

QUILHOT, W.; LIGHTON, G., FLORES, E., FERNANDES, E., PENA, W., GUZMAN, G. "Factores exógenos y endógenos determinantes de la acumulación de ácido usnico en líquenes". *Acta Farmacéutica Boraenense*, **6** (1): 15-22, 1987.

RASHID, M. A.; MAJID, M. A.; QUADER, M. A. "Complete NMR assignments for (+)-usnic". *Fitoterapia*, **70**: 113-115, 1999.

REID, L.M.; O'DONNELL, C.P.; DOWNEY, G. "Recent technological advances for the determination of food authenticity". *Trends Food Science & Technology*, **17**: 344-353, 2006.

SACCO, A. BOLSI, I. N., MASSINI, R., SPRAUL, M., HUMPFER, E., CHELI, S. "Preliminary investigation on the characterization of durum wheat flours coming from some areas of South Italy by means of ¹H High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 4242-4249, 1998.

SAIKI, M., HORIMOTO, L. K., VASCONCELLOS, M. B. A., MARCELLI, M. P., COCCARO, D. M. B. "Survey of elemental concentrations in lichen samples collected from São Paulo State". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **249** (2): 317-320, 2001.

SANDERS, J. K. M.; HUNTER, B. *Modern NMR Spectroscopy, a guide for chemists*, Oxford University Press, 1st edition, 1987, 308 pp.

SCHNEIDER, R.; CHARRIER, F.; MOUTOUNET, M.; BAUMES, R. "Rapid analysis of grape aroma glycoconjugates using Fourier-transform infrared spectrometry and chemometric techniques". *Analytica Chimica Acta*, **513**: 91-96, 2004.

SCHULZ, H.; OZKAN, G.; BARANSKA, M.; KRUGER, H.; OZCAN, M. "Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Ramam spectroscopy". *Vibrational Spectroscopy*, **39**: 249-256, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, LCT – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 6^a ed., 1998, 460 pp.

SOUZA, A. A.; LAVERDE JR., A. "Aplicação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY". *Química Nova*, **25** (6): 1022-1026, 2002.

TAKAHASHI, H., KON, T., YOKOTA, I., SHIBATA, S. "Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens: polysaccharides of stereocaulaceous lichens". *Carbohydrate Research*, **89** (1): 166-173, 1981.

TEIXEIRA, A. Z. A., IACOMINI, M., GORIN, P. A. J. "Chemotypes of mannose-containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification". *Carbohydrate Research*, **266** (2): 309-314, 1995.

VIZZOTTO, L. *Estudo e aplicações das técnicas de RMN HR-MAS e DOSY em plantas e extratos de plantas da ordem Rutales*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004, Tese de Doutorado.

WARD, J. L.; HARRIS, C.; LEWIS, J.; BEALE, M. H. "Assessment of ^1H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Aradopsis thaliana*". *Phytochemistry*, **62**: 949-957, 2003.

WARRASS, R.; LIPPENS, G. "Quantitative monitoring of solid phase organic reactions by High-Resolution Magic Angle Spinning NMR spectroscopy". *Journal of Organic Chemistry*, **65**: 2946-2950, 2000.

XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. *Biologia de liquens*. Rio de Janeiro, Âmbito Cultural, 2006, 619 pp.

YOKOTA, I., SHIBATA, S., SAITÔ, H. "A ^{13}C -n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens". *Carbohydrate Research*, **69**: 252-258, 1979.