

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

- LIQUENS DE MATO GROSSO DO SUL-
ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA

NELI KIKI HONDA

ORIENTADOR : PROF. DR. WAGNER VILEGAS

Tese de Doutorado

-1997-

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Wagner Vilegas (Orientador)

Instituto de Química /UNESP/Araraquara.

Prof. Dr. Gilberto Luiz Pozetti

Instituto de Química/UNESP/Araraquara.

Prof^a. Dr^a. Nidia Franca Roque

Instituto de Química/USP/São Paulo.

Prof^a. Dr^a. Dionéia Camilo R. de Oliveira

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/Rib. Preto.

Prof. Dr. João Batista Fernandes

Universidade Federal de São Carlos.

A Deus, por tudo...

*Aos meus pais,
Manoel Honda (in memorian)
e Berta Honda, com imensa
gratidão.*

*À minha família, pelo apoio
e compreensão.*

*À Anézia Diniz (in memorian),
pelo respeito a este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, pela orientação deste trabalho, amizade e compreensão.

Ao Prof. Dr. Massao Yonashiro que ensejou o desenvolvimento de intercâmbio entre o Instituto de Química -UNESP de Araraquara e o Departamento de Química da UFMS, para a realização do Curso de Pós-Graduação – nível de Doutorado - em Química.

Ao Prof. Dr. Marcelo P. Marcelli, do Instituto de Botânica de São Paulo, pela identificação dos líquens.

À Prof^a. Dra. Mariana Fleig, do Departamento de Botânica da UFRGS, pela colaboração nas coletas e identificação dos líquens.

Ao Prof. Dr. Lauro Xavier Filho, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB, pelo apoio e incentivo na efetivação deste estudo.

Às Prof^{as}. Rosália de Lima e Eugênia C. Pereira, do Departamento de Antibióticos e de Botânica da UFPE, pela realização dos ensaios de atividade antitumor .

À Prof^a. Edna Scramini, do Laboratório de Botânica da UFMS, que nos indicou as áreas para coletas, possibilitando o início de nossas investigações.

À Prof^a. Maria Rita Marques e ao Prof. Dalton Nascimento, do Laboratório de Bioquímica da UFMS, pela execução dos testes de bioautografia.

Ao Prof. João Máximo de Siqueira, do Departamento de Farmácia e Bioquímica da UFMS, pelo fornecimento de material e orientação para a realização dos ensaios com *Artemia salina*.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFMS, pelo apoio na realização do presente trabalho e do curso de pós-graduação.

À Prof^a. Izilda Angélica de Assis Devincenzi, responsável pelos trabalhos de pesquisa em carboidratos de líquens, no DQI/UFMS.

Aos colegas do DQI/UFMS, Onofre (química de coordenação), Gilberto e Gláucia (eletroquímica), Dênis e Neusa (síntese orgânica/ modificação estrutural), que contribuíram para o estabelecimento de uma linha interdisciplinar de pesquisa com as substâncias líquênicas.

Aos demais colegas do Departamento de Química, especialmente às Prof^{as}. Neusa Somera e Maria Helena Costa, pelo apoio.

Aos colegas de pós-graduação, Rosenei, Nilva, Dario, Rosa, Cláudia, Joseane e Maria de Lourdes, pelo apoio e amizade.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação do Instituto de Química-UNESP de Araraquara, pela gentileza no atendimento.

Aos funcionários do DQI/UFMS, Rosa, Sebastiana, Joana, Benê, Francisco, Antonio, Luís Leonardo, Vera e Paulo César, pela disposição em colaborar.

À Ivone Riquelme, pelo auxílio nas coletas e preparação das exsiccatas.

À Fundação Banco do Brasil, pelo aporte financeiro que nos permitiu iniciar esta linha de pesquisa.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada !

RESUMO

Líquens são organismos compostos por um fungo e uma ou mais algas. Crescem lentamente e seus metabólitos secundários são principalmente depsídeos, depsídonas, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas e terpenos.

Diversos metabólitos de líquens possuem atividade biológica, como por exemplo antibiótica, antitumoral, analgésica, entre outras.

Neste trabalho, investigamos 10 espécies coletadas no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, *Parmotrema tinctorum*, *P. dilatatum*, *P. cf. delicatulum*, *P. cf. miranda*, *P. cf. flavescens*, *Pseudoparmelia hypomiltha*, *P. sphaerospora*, *Usnea meridionalis*, *Usnea sp.* e *Heterodermia microphylla*. As espécies foram extraídas com solventes orgânicos, fracionadas por métodos cromatográficos e identificadas por métodos químicos e espectrométricos.

Desses líquens, isolamos e identificamos atranorina, 5-cloroatranorina, orselinato de etila, zeorina, ácidos lecanórico, protocetrárico, salazínico, estútico, constútico, hipostútico, úsnico, difractáico e secalônico.

Esses compostos foram testados quanto à atividade fungitóxica contra *Cladosporium sphaerospermum* e quanto à atividade citotóxica frente à *Artemia salina*.

Atranorina, orselinato de etila, ácidos úsnico e difractáico inibiram o crescimento do fungo. Ácido úsnico foi o composto mais ativo frente à *Artemia salina*.

Os compostos isolados foram também testados quanto à atividade antitumor *in vitro* e *in vivo*. Ácido secalônico foi ativo em relação às células KB e o ácido salazínico inibiu os tumores sarcoma 180 e carcinoma de Erlich.

ABSTRACT

Lichens are organisms composed by a fungi and one or more algae. They are slow-growing organisms and their secondary metabolites are mainly depsides, depsidones, dibenzofurans, xantones, antraquinones and terpene derivatives.

Several metabolites have biological activities as antibiotic, antitumor, analgesic among others.

In this work, we have investigated ten species collected in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, *Parmotrema tinctorum*, *P. dilatatum*, *P. cf. delicatulum*, *P. cf. miranda*, *P. cf. flavescens*, *Pseudoparmelia hypomiltha*, *P. sphaerospora*, *Usnea meridionalis*, *Usnea sp.* and *Heterodermia microphylla*. The species were extracted with organic solvents, fractionated by chromatographic methods and identified by chemical and spectrometric methods.

From these lichens we have isolated and identified atranorine, 5-chloroatranorine, zeorine, ethyl orselinate and lecanoric, protocetraric, salazinic, stictic, constictic, hipostictic, usnic, diffractaic and secalononic acids.

These compounds were tested for fungitoxic activity against *Cladosporium sphaerospermum* and for citotoxic activity against *Artemia salina*.

Atranorin, ethyl orselinate, usnic and diffractaic acids inhibited the growth of the fungus. Usnic acid was the most active against *Artemia salina*.

The compounds isolated were tested *in vitro* and *in vivo* also for antitumor activity. Secalononic acid was active for KB cells and salazinic acid inhibited the sarcoma-180 and Erlich carcinoma tumors.

ÍNDICE GERAL

	páginas
Objetivos.....	22
1 - Introdução	
1.1 - Considerações gerais sobre líquens.....	23
Formas de crescimento.....	27
Velocidade de crescimento.....	31
Longevidade.....	32
Cor.....	32
1.2 - Química de Líquens.....	34
1.3 - Vias Biossintéticas.....	38
Biossíntese.....	42
Via do acetil-polimalonil - Ácidos graxos.....	43
Compostos aromáticos - Depsídeos e Depsidonas - Depsídeos derivados do orcinol.....	47
Depsídeos derivados do β -orcinol.....	52
meta - depsídeos.....	54
Depsidonas	57
Dibenzofuranos.....	63
Ácidos úsnicos.....	64
Cromonas, xantonas, antronas e antraquinonas.....	69
Via do mevalonato - Esteróis e terpenos.....	78
Via do ácido chiquímico - Derivados do ácido fulvínico.....	82
1.4 - Taxonomia e Quimiotaxonomia.....	84
Reações de coloração.....	85
Microcristalização.....	88
Cromatografia.....	89
1.5 - Metabólitos secundários de líquens - aplicações.....	91
1.6 - Os líquens do Estado de Mato Grosso do Sul.....	97
2 - Procedimento experimental	

2.1 - Materiais.....	98
2.2 - Equipamentos.....	98
2.3 - Métodos gerais.....	99
2.4 - Coleta e processamento das amostras.....	100
2.5 - Avaliação da atividade biológica.....	101
2.5.1 -Atividade fungitóxica.....	101
2.5.1.1 - Cultivo do fungo.....	101
2.5.2 - Atividade citotóxica.....	101
2.5.3 - Atividade antitumor.....	102
3 - Descrição da área de estudo.....	103
4 - Análise Química e Resultados.....	113
4.1 - <i>Parmotrema tinctorum</i>	113
4.2 - <i>Parmotrema dilatatum</i>	120
4.3 - <i>Parmotrema cf. delicatulum</i>	122
4.4 - <i>Parmotrema cf. miranda</i>	124
4.5 - <i>Parmotrema cf. flavescens</i>	125
4.6 - <i>Pseudoparmelia hypomiltha</i>	126
4.7 - <i>Pseudoparmelia sphaerospora</i>	132
4.8 - <i>Usnea meridonalis</i>	136
4.9 - <i>Usnea sp.</i>	140
4.10 - <i>Heterodermia microphylla</i>	142
4.11 - Testes biológicos.....	144
4.11.1 - Atividade fungitóxica.....	144
4.11.2 - Atividade citotóxica.....	144
5 - Discussão dos Resultados e Conclusões.....	145
6 - Referências Bibliográficas.....	152

ÍNDICE DE FIGURAS

	páginas
Figura 1 - Líquen crostoso sobre rocha	28
Figura 2 - Líquen crostoso sobre córtex.....	28
Figura 3 - Líquen folioso sobre córtex de árvore (<i>Parmotrema tinctorum</i>).....	29
Figura 4 - Líquen folioso (<i>Rimelia cetrata</i>) sobre rocha.....	29
Figura 5 - Líquen fruticoso do gênero <i>Usnea</i> , sobre córtex de árvore.....	30
Figura 6 - Líquen fruticoso do gênero <i>Usnea</i> , sobre córtex de árvore.....	30
Figura 7 - Líquen fruticoso do gênero <i>Ramalina</i> sobre paredão rochoso.....	31
Figura 8 - <i>Cladonia corallifera</i>	33
Figura 9 - Líquen gelatinoso do gênero <i>Leptogium</i>	34
Figura 10 - Líquen gelatinoso do gênero <i>Collema</i>	34
Figura 11 - Principais classes de metabólitos secundários de líquens de acordo com Culberson & Elix (1989).....	40
Figura 12 - Prováveis vias de biossíntese de compostos liquênicos de acordo com Culberson & Elix (1989).....	41
Figura 13 - Formação da acetoacetylSCoA a partir da condensação de 2 moléculas de acetylSCoA.....	42
Figura 14 - Reações de obtenção de γ -lactonas de ácidos alifáticos superiores...	46
Figura 15 - Reações biossintéticas de formação de ácido orselínico e fluoroacetofenona por condensação de acetylSCoA e malonilSCoA..	49
Figura 16 - Biossíntese do ácido girofórico por condensação de acetylSCoA e malonilSCoA marcado com ^{14}C	50
Figura 17 - Formação de depsidonas acoplamento fenólico de benzofenonas...	59
Figura 18 - Reações de obtenção de m-depsídeos e depsidonas a partir da hidroxilação e rearranjo de p-depsídeos.....	60
Figura 19 - Reação entre 3 metil-ácido orselínico e ácido fumárico.....	61
Figura 20 - Reação de formação do ácido fumarprotocetrárico por esterificação do grupo CH_2OH da posição 3' do ácido	

	protocetrário com ácido fumárico.....	62
Figura 21 -	Biossíntese do ácido úsnico [1] a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato e $[2-^{14}\text{C}]$ malonato.....	66
Figura 22 -	Utilização alternativa de metilfluoroacetofenona e fluoroacetofenona na biossíntese de ácido úsnico [1]	67
Figura 23 -	Reação biossintética de obtenção de ácido úsnico [1] a partir de fluoroacetofenona e formato radioativos	67
Figura 24 -	Reações envolvidas na biossíntese do ácido úsnico [1] a partir de metilfluoroacetofenona via radicais livres.....	68-69
Figura 25 -	Representação das reações envolvidas na biossíntese de rupicolina [58] a partir de acetilSCoA e malonilSCoA.....	69
Figura 26 -	Reações envolvidas na biossíntese de sifulina [59] a partir de acetilSCoA e malonilSCoA.....	70
Figura 27 -	Reações envolvidas na biossíntese de xantonas, antronas e antraquinonas a partir de acetilSCoA e malonilSCoA.....	71
Figura 28 -	Reações envolvidas na biossíntese de xantonas.....	72
Figura 29 -	Reações biossintéticas de formação do ácido mevalônico.....	80
Figura 30 -	Reações de formação de pirofosfato de isopentenila a partir de pirofosfato de malonina.....	81
Figura 31 -	Reação de uma depsidona com KOH.....	85
Figura 32 -	Reação de formação de base de Schiff entre o ácido baeeomicésico [38] e p-fenilenodiamina.....	87
Figura 33 -	Parte do mapa de Mato Grosso do Sul, mostrando a localização das Vilas Palmeiras e Piraputanga.....	103
Figura 34 -	Vista da estrada que dá acesso à área de estudo na região das Vilas Palmeiras e Piraputanga-MS.....	103
Figura 35 -	Vista da entrada que acessa a área escolhida para coletas na região da Vila Piraputanga.....	104
Figura 36 -	Vista da entrada que acessa a área escolhida para coletas, mostrando a vegetação de cerrado entremeada por espécies típicas da caatinga.....	104
Figura 37 -	A foto mostra as aflorações rochosas sem cobertura vegetal.....	105

Figura 38 -	Líquens crostosos e foliosos sobre rocha.....	106
Figura 39 -	Líquens fruticosos sobre rocha.....	106
Figura 40 -	Líquens foliosos sobre córtex de árvore.....	107
Figura 41 -	Líquens fruticosos sobre córtex de árvore.....	107
Figura 42 -	A foto mostra a presença de briófitas junto aos líquens.....	108
Figura 43 -	Vista parcial do morro localizado ao N do primeiro ponto de coleta.....	109
Figura 44 -	A foto mostra a vegetação típica de morro na Vila Piraputanga..	109
Figura 45 -	Líquens sobre paredões rochosos em morro próximo ao primeiro ponto de coleta na Vila Piraputanga-MS.....	110
Figura 46 -	Líquens fruticosos, foliosos e crostosos, sobre paredões rochosos em morro da Vila Piraputanga-MS.....	111
Figura 47 -	Líquens fruticosos, foliosos e crostosos, sobre paredões rochosos em morro da Vila Piraputanga-MS.....	111
Figura 48 -	Líquens sobre rocha, em morro da Vila Piraputanga-MS.....	112
Figura 49 -	<i>Parmotrema tinctorum</i> sobre córtex de árvore.....	113
Figura 50 -	<i>Parmotrema dilatatum</i> sobre córtex de árvore.....	120
Figura 51 -	<i>Parmotrema cf. delicatulum</i> coletado sobre rocha.....	122
Figura 52 -	<i>Parmotrema cf. miranda</i> coletado sobre rocha.....	124
Figura 53 -	<i>Parmotrema cf. flavescens</i> coletado sobre rocha.....	125
Figura 54 -	<i>Pseudoparmelia hypomilta</i> coletado sobre córtex de árvore.....	126
Figura 55 -	<i>Pseudoparmelia sphaerospora</i> coletado sobre córtex de árvore....	132
Figura 56 -	<i>Usnea meridionalis</i> sobre córtex de árvore	136
Figura 57 -	<i>Usnea sp.</i> sobre córtex de árvore.....	140
Figura 58 -	<i>Heterodermia microphylla</i> coletado sobre rocha.....	142

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I -	Estruturas, ponto de fusão e rotação ótica dos isômeros A, B, C, D, E, F e G do ácido secalônico.....	130
Quadro II -	Composição química de 10 (dez) espécies liquênicas coletadas no Mato Grosso do Sul.....	151-152

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I -	Valores de deslocamentos químicos expressos em ppm apresentados por Phyp. em piridina-d ₅	129
Tabela II -	Atividades fungitóxica, citotóxica e antitumor apresentadas por 09 substâncias liquênicas.....	145

**ÍNDICE DE ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS
(ordem numérica)**

	páginas
[1] Ácido rodocladônico.....	33
[2] Ácido úsnico.....	35, 66, 67, 69
[2a] (+) - (12R) - ácido úsnico.....	64
[2b] (-) - (12S) - ácido úsnico.....	64
[2c] (+) - (12R) - Ácido isoúsnico.....	65
[2d] (-) - (12S) - Ácido isoúsnico.....	65
[3] Atranorina.....	35, 53, 115
[3a] 5-Cloroatranorina.....	53, 115
[3b] Atranorina marcada.....	53
[4] Liquexantona.....	35, 71, 77
[5] Hemaventosina.....	35, 73
[6] Ácido norstítico.....	35
[7] Ácido vulpínico.....	35, 82
[8] Ácido taminólico.....	36
[9] Ácido perlatólico.....	36
[10] Ácido psorômico.....	37
[11] Ácido picrolíquênico.....	37
[12] Ácido lecanórico.....	38, 47, 86 , 119
[12a] Ácido lecanórico marcado.....	53
[13] Ácido 2-decilcítico.....	43
[14] Ácido caperático.....	43
[15] Ácido agarístico.....	43
[16] Ácido rocélico.....	43
[17] Ácido rangifórmico.....	43
[18] Ácido norangifórmico.....	43
[19] Ácido acaranólico.....	44

[20]	Ácido acarenóico.....	44
[21]	Ácido liquesterínico.....	44
[22]	Ácido nefrosterânico.....	44
[23]	Ácido nefrosterínico.....	44
[24]	Ácido protoliquesterínico.....	44, 46
[25]	Ácido criptoclorofeico.....	47
[26]	Ácido orselínico.....	49
[27]	Fluoroacetofenona.....	49
[28]	Ácido girofórico.....	50, 86
[29]	Ácido umbilicário.....	50
[30]	Ácido evérnico.....	50
[31]	2,, 2', 2'', 4-tetrametoxigiroforato de metila.....	51
[32]	Benzoato de fenila.....	51
[33]	Ácido m-digálico.....	51
[34]	Ácido planáico.....	51
[35]	Ácido confluêntico.....	52
[36]	Ácido divaricático.....	52, 56
[37]	Ácido difractáico.....	53, 142
[38]	Ácido obtusático.....	53
[39]	Ácido baeomicésico.....	53
[40]	m-escrobiculina.....	55
[41]	p- escrobiculina.....	55
[42]	Ácido sequicáico.....	56
[43]	Ácido hemataminólico.....	56
[44]	Ácido hipotaminólico.....	56
[45]	Ácido decarboxitaminólico.....	57
[46]	Ácido dissético.....	57
[47]	Ácido fisódico.....	57, 58
[48]	Ácido variolário.....	58
[49]	Ácido olivetórico.....	58, 86
[50]	Ácido fumarprotocetrário.....	61, 62
[51]	Ácido protocetrário.....	62, 121

[52]	Ácido salazínico.....	63, 85, 123
[53]	Ácido estítico.....	66, 85, 137
[54]	Ácido panárico.....	63
[55]	Ácido chizopéltico.....	63
[56]	Ácido dídímico.....	64
[57]	Ácido hipostrepisílico.....	64
[58]	Rupicolina.....	69
[59]	Sifulina.....	70
[60]	Emodina antrona.....	71
[61]	Emodina antraquinona.....	71
[62]	Ácido secalônico.....	72, 127
[63]	Ácido quiodectônico.....	73
[64]	Canariona.....	73
[65]	Parietina ou fisciona.....	73
[66]	Hematomona.....	74
[67]	Ácido norsorolínico.....	74
[68]	Sordidona.....	74
[69]	Ácido leprárico.....	75
[70]	Oxisifulina.....	75
[71]	Protosifulina.....	75
[72]	Rocelina.....	76
[73]	Molina.....	76
[74]	Galapagina.....	76
[75]	Norliquexantona.....	76
[76]	Eritromona.....	76
[77]	Turigiona.....	77
[78]	Ácido tiofânico.....	77
[79]	Ácido tiofanínico	77
[80]	Artotelina.....	77
[81]	2,4-dicloronorliquexantona.....	77
[82]	2,7-dicloronorliquexantona.....	77
[83]	Divaricatinato de peroxi ergosterila.....	78

[84]	Zeorina.....	79, 143
[85]	Leucotilina.....	79
[86]	Ácido ursólico.....	79
[87]	Taraxeno.....	79
[88]	Friedelina.....	79
[89]	Calicina.....	82
[90]	Epanorina.....	82
[91]	Ácido leprapínico.....	82
[92]	Ácido polipórico.....	83
[93]	Ácido telefórico.....	83
[94]	Ácido anziáico.....	86
[95]	Panarina.....	93
[96]	1'- Cloropanmarina.....	93
[97]	Ácido fisodálico.....	94
[98]	Orselinato de etila.....	116
[99]	Ácido secalônico A.....	130
[100]	Ácido secalônico B.....	130
[101]	Ácido secalônico C.....	130
[102]	Ácido secalônico D.....	131
[103]	Ácido secalônico E.....	131
[104]	Ácido secalônico F.....	131
[105]	Ácido secalônico G.....	132
[106]	Ácido hipostítico.....	135
[107]	Ácido constítico.....	138
[108]	Ácido megaziáico.....	139
[109]	Ácido criptostítico.....	139
[110]	Ácido isolecanórico.....	146

ÍNDICE DE ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS
ordem alfabética

	páginas
Ácido acaranóico [19].....	44
Ácido acarenóico [20].....	44
Ácido agarícico [15].....	43
Ácido anziáico [94].....	86
Ácido baeomicésico [39].....	53
Ácido caperático [14].....	43
Ácido chizopéltico [55]	63
Ácido confluêntico [35].....	52
Ácido constítico [107].....	138
Ácido criptoclorofeico [25]	47
Ácido criptostítico [109]	139
Ácido decarboxitaminólico [45]	57
Ácido 2-decilcítico [13]	43
Ácido dídimico [56]	64
Ácido difractáico [37]	53, 142
Ácido <i>m</i> -digálico [32]	51
Ácido divaricático [36]	52, 56
Ácido dissético [46]	57
Ácido estítico [53]	63, 85, 137
Ácido evérnico [30]	50
Ácido fisodálico [97]	94
Ácido fisódico [47]	57, 58
Ácido fumarprotocetrárico [50]	61, 62
Ácido girofórico [28]	50, 86
Ácido hemataminólico [43]	56
Ácido hipostítico [106]	135
Ácido hipostrepsílico [57]	64
Ácido isolecanórico [110]	146

Ácido (+) (12 <i>R</i>) - isoúsico [2c].....	65
Ácido (-) (12 <i>S</i>) - isoúsico [2d]	64
Ácido lecanórico [12]	38, 47, 86, 119
Ácido lecanórico marcado [12a]	53
Ácido leprapínico [91]	82
Ácido leprárico [69]	75
Ácido liquesterínico [21]	44
Ácido megaziáico [108].....	139
Ácido nefrosterânico [22]	44
Ácido nefrosterínico [23]	44
Ácido norangifórmico [18]	43
Ácido norsorolínico [67]	74
Ácido norstítico [6]	35
Ácido obtusático [38]	53
Ácido olivetórico [49]	58, 86
Ácido orselínico [26]	49
Ácido panárico [54]	63
Ácido perlatólico [9]	36
Ácido picrolíquênico [11]	37
Ácido psorômico [10]	37
Ácido planáico [34]	51
Ácido polipórico [92]	83
Ácido protocetrárico [51]	62, 121
Ácido protoliquesterínico [24]	44, 46
Ácido quiodectônico [63]	73
Ácido rangifórmico [17]	43
Ácido rocélico [16]	43
Ácido rodocladônico [1]	33
Ácido salazínico [52]	63, 85, 123
Ácido secalônico [62]	72, 127
Ácido secalônico A [99]	130
Ácido secalônico B [100]	130

Ácido secalônico C [101]	131
Ácido secalônico D [102]	131
Ácido secalônico E [103]	131
Ácido secalônico F [103]	131
Ácido secalônico G [104]	132
Ácido sequicáico [42]	56
Ácido taminólico [8]	36
Ácido telefórico [93]	83
Ácido tiofânico [78]	77
Ácido tiofanínico [79]	77
Ácido umbilicárico [29]	50
Ácido ursólico [86]	79
Ácido úsnico [2]	35, 66, 67, 69
(+) - (12R) - ácido úsnico [2a]	64
(-) - (12S) - ácido úsnico [2b]	64
Ácido variolárico [48]	58
Ácido vulpínico [7]	35, 82
Artotelina [80]	77
Atranorina [3]	3, 3, 115
Atranorina marcada [3b]	53
Benzoato de fenila [32]	51
Calicina [89]	82
Canariona [64]	73
5-Cloroatranorina [3a]	3, 115
1'-Cloropanmarina [96]	93
Divaricatinato de peroxi ergosterila [83]	78
2,4-dicloronorliquexantona [81].....	77
2,7-dicloronorliquexantona [82].....	77
Emodina antrona [60]	71
Emodina antraquinona [61]	71
Epanorina [90]	82
Eritromona [76]	76

m-Escrobiculina [40].....	55
p-Escrobiculina [41]	55
Fisciona ou Parietina [65]	73
Fluoroacetofenona [27]	49
Friedelina [88]	79
Galapagina [74]	76
Hemaventosina [5].....	35, 73
Hematomona [66]	74
Leucotilina [85]	79
Liquexantona [4]	31, 71, 77
Molina [73]	76
Norliquexantona [75]	76
Orselinato de etila [98]	116
Oxisifulina [70]	75
Panarina [95]	93
Parietina ou fisciona [65]	73
Protosifulina [71]	75
Rocelina [72]	76
Rupicolina [58]	69
Sifulina [59]	70
Sordidona [68]	74
Taraxeno [87]	79
2,2',2'',4- tetrametóxiroforato de metila [31].....	51
Turigiona [77]	77
Zeorina [84]	79, 143

1 - OBJETIVOS

Líquens são organismos bastante estudados sob o ponto de vista taxonômico, químico, farmacológico e como bioindicadores de poluição ambiental. Esses estudos têm sido realizados principalmente por pesquisadores da Europa e do Japão. No Brasil são poucos os trabalhos realizados com esses organismos sob o enfoque químico e/ou farmacológico. Considerando a importância dos compostos liquênicos e o número reduzido de informações sobre líquens brasileiros, especialmente aqueles de cerrados, este trabalho teve como objetivos a determinação da composição química em termos de metabólitos secundários de 10 (dez) espécies liquênicas coletadas no Mato Grosso do Sul e a avaliação das atividades fungitóxica e citotóxica dos compostos isolados.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LIQUENS

Define-se líquens como organismos simbióticos compostos por um fungo (micobionte) e um ou mais participantes fotossintéticos (fotobionte), que podem ser uma alga verde ou uma cianobactéria (Nash, 1996a).

A natureza da simbiose líquênica está sendo bastante discutida frente a conceitos mais recentes relativos às interações entre micobionte e fotobionte. Enquanto alguns consideram os líquens como um caso clássico de mutualismo onde os organismos envolvidos (micobionte e fotobionte) se beneficiam da associação, outros os consideram como um exemplo de parasitismo controlado, pois o fungo parece ser mais beneficiado e o fotobionte pode crescer mais lentamente no estado liquenizado do que na condição de organismo de vida livre (Ahmadjian, 1993). Além dessas, outras considerações são discutidas, como aquelas envolvendo perspectivas genéticas e evolucionárias, ecológicas, e diferenças no grau de liquenização (Fahselt, 1996; Honegger, 1996).

Independente da natureza da relação entre fotobionte e micobionte nos líquens, esses se encontram em íntima integração fisiológica, sendo a condição de simbiose a mais considerada.

Calcula-se que existam 13.500 espécies (aproximadamente 600 gêneros) de fungos liquenizados, o que corresponde a 20% dos fungos conhecidos (Hawksworth et al., 1984; Smith et al., 1987). A grande maioria (98%) dos fungos líquênicos são Ascomicetos e 46% desses são liquenizados, de modo que a liquenização é uma grande regra e não uma exceção nesse grupo de fungos. Os Deuteromicetos ou fungos imperfeitos são representados por apenas uma dezena de gêneros, ou pouco mais. Os Basidiomicetos formam diversas associações semelhantes a líquens em regiões tropicais e são encontrados com algas azuis; algumas espécies do gênero *Dictyonema* ocorrem como Basidiomiceto liquenizado (Hawksworth et al., 1984).

As algas mais comuns encontradas na associação são as clorofíceas e destas a mais freqüente é uma espécie de *Trebouxia*, em aproximadamente 70% dos gêneros de

liquens. Além dessa, ocorrem também espécies de *Coccomyxa* e *Trentepohlia*. Entre as algas verde-azuladas (cianofíceas), as mais comuns são a *Nostoc* e *Scytonema* (Ahmadjian, 1967).

Nos liquens, as algas constituem, com raras exceções, uma parte muito pequena do talo variando entre 5-10% da massa ou volume e são completamente envolvidas pelos tecidos do fungo nos talos. Portanto, toda a organização do talo liquênico se deve ao fungo. As algas podem, ou não, estarem restritas a uma camada especial do talo e responsabilizam-se totalmente pela fotossíntese (Smith et al., 1987).

O micobionte (geralmente dominante) é um organismo heterotrófico que obtém sua fonte de carbono do fotobionte. A liquenização pode ser considerada uma estratégia, na qual o fungo pode satisfazer sua necessidade de carboidrato para respiração e crescimento (Hawksworth et al., 1984).

Sabe-se, hoje, que polióis em liquens com algas verdes e glucose em liquens com cianofíceas são passados do fotobionte para o micobionte (Smith et al., 1987). No estado liquenizado, a parede celular do fotobionte se torna mais permeável à perda de carboidratos, resultando em benefício para o micobionte (Richardson, 1988). Além disso, em cianoliquens o micobionte ganha uma fonte de nitrogênio (Nash, 1996b).

Com relação à alga, as vantagens não estão associadas a ganhos metabólicos em si, mas a benefícios, de alguma maneira, relativos à hidratação, evitando dessecação. Além disso, as hifas opacas protegem a alga de alta intensidade luminosa, e a liquenização é um mecanismo que permite ao fotobionte se desenvolver em ambientes de alta luminosidade (Nash, 1996c).

Como resultado da simbiose, tanto fotobionte e micobionte têm se espalhado em muitos habitats, das regiões tropicais às polares, onde separadamente, na condição de organismos de vida livre, não existiriam, ou seriam raros. Por exemplo, as algas de vida livre e cianofíceas, em sua maioria, ocorrem em ambientes aquáticos ou bastante úmidos, mas como parte de liquens ocorrem abundantemente em habitats que são freqüentemente secos (Galloway, 1996; Kappen, 1973).

Os liquens são encontrados desde o nível do mar até as montanhas mais altas. Porém, são relativamente raros em altitudes acima de 5000 m e em matas excessivamente escuras. Podem ser encontrados desde os desertos onde a temperatura é bastante variável, até nas regiões polares, com temperatura extremamente baixa; seu limite de tolerância às oscilações climáticas é superior a qualquer outro vegetal (Kappen, 1973).

Desenvolvem-se sobre os mais variados substratos, sendo que muitos não apresentam especificidade: existem espécies que somente se desenvolvem sobre córtex de árvores, outras sobre folhas e outras sobre rochas alcalinas ou ácidas, necessitando ou não das características físicas como rugosidade, porosidade, dureza, exposição à luz; há outras, ainda, mais exigentes quanto ao pH do substrato, presença de partículas no ar, umidade, ventos e temperatura. Portanto, a presença de líquens nos mais variados habitats e microhabitats depende da disponibilidade de fatores físicos e climáticos que proporcionem as condições necessárias para desenvolverem. Dessa forma, cada região pode apresentar uma comunidade líquênica com componentes específicos próprios em resposta às condições ambientais (Brodo, 1973).

Em ambientes secos de desertos, ou com mudanças climáticas bruscas, regiões polares ou alpinas, encontram-se com mais frequência comunidades onde os talos crostosos predominam por serem mais resistentes às adversidades e comportam-se comumente como pioneiros. As espécies com talos mais desenvolvidos, como as de hábito folioso ou fruticoso, exigem melhores condições de substrato e/ou qualidade do ar. Assim, tem-se os líquens saxícolas (de rochas), corticícolas (de córtex), lignocícolas (de lignina), muscícolas (briófitas), terrícolas (solo), e folícolas (folhas) (Brodo, 1973).

Dos vários fatores que afetam o desenvolvimento de líquens sobre um dado substrato, a umidade e o pH são os mais estudados e discutidos.

Kershaw et al. (1971) estudaram os efeitos da umidade e luz na distribuição de líquens e concluíram que a distribuição vertical de *Parmelia caperata* sobre troncos de árvores era determinada pela disponibilidade de água e não pela luz. Outros autores (Harris, 1971; Smith, 1962) concluíram que a umidade do substrato age na hidratação dos talos, influenciando a velocidade de fotossíntese e respiração do líquen.

Ao discutir as relações de umidade do córtex, há dois elementos a considerar : a umidade do córtex originada das atividades metabólicas das árvores e a umidade originada do meio ambiente externo, tais como chuvas, neves e neblinas. Estas últimas são consideradas a mais importante fonte de água para os líquens. É lógico que os córtices de diferentes densidades, porosidades, texturas e estruturas internas diferem em suas capacidades de absorver e reter água (Brodo, 1973; Hale, 1983).

Com relação a rochas e solos, é sabido que absorvem e liberam água em diferentes velocidades e em diferentes graus. Assim por exemplo, areia retém menos água e

por um período de tempo mais curto que uma mistura de areia e humus, ou mesmo argila. O problema de relacionar a vegetação liquênica à umidade de tipos de rochas e solos é difícil, devido às variações quanto aos nutrientes disponíveis de um tipo de substrato a outro. Isso também é verdadeiro para córtex, mas possivelmente em menor grau dentro de cada espécie de árvore (Brodo, 1973).

É sabido que a distribuição dos líquens nos diversos habitats é afetada pelo meio químico. Embora os líquens absorvam e acumulem minerais, sua composição mineral nem sempre reflete precisamente a composição de seus substratos (Brodo, 1973). Dormaar (1968) verificou que o espectro de infravermelho dos minerais presentes nos líquens diferia daquele das rochas sobre as quais os líquens se desenvolviam. Encontrou, por exemplo, que um espécime de *Caloplaca* crescendo sobre dolomita não apresentava magnésio nem carbonato em sua composição, porém apresentava quantidades razoáveis de cálcio. Isso demonstrou que *Caloplaca* tinha preferência por cálcio e não por magnésio na dolomita. Concluiu que os líquens obtêm pelo menos parte de seus minerais do substrato. Outros autores (Jenkins et al., 1966) encontraram íntima correlação entre os minerais nos líquens e minerais depositados do ar, e fraca correlação entre os minerais dos líquens e de seus substratos.

A acidez ou alcalinidade do substrato pode agir sobre o talo do líquen de várias maneiras. Vários minerais e substâncias orgânicas sofrem variações químicas sob diferentes condições de pH: alguns se tornam mais disponíveis que outros; a velocidade de difusão pode variar em diferentes pH; algumas substâncias são tóxicas sob condições ácidas e inócuas, quando em meio neutro. Qualquer que seja o mecanismo de influência, observa-se que a distribuição de alguns líquens e comunidades de líquens é fortemente correlacionada ao pH do substrato (Brodo, 1973).

O papel da nutrição orgânica na distribuição dos líquens não está ainda totalmente definido. Há muito é conhecido que açúcares e outros carboidratos são constituintes do córtex de várias espécies. Muitos líquens produzem uma variedade de enzimas extracelulares, especialmente próximas aos seus pontos de fixação, sugerindo que o substrato é usado como uma fonte nutricional (Moiseeva, 1961 apud Brodo, 1973). Durante anos suspeitou-se que líquens poderiam entrar em uma espécie de semi-parasitismo com substratos vivos, tais como árvores jovens e musgos, ou pelo menos poderiam viver como saprófitas. Estudos relacionados às ligações físicas de líquens a seus substratos, revelaram

que muitas espécies, especialmente os líquens crostosos, invadem tecidos vivos, o que poderia favorecer a absorção e utilização de substâncias orgânicas aí encontradas. Líquens associados com córtex de árvores morrem ou deixam de dispersar esporos, após a morte das mesmas. Isto foi atribuído à possível formação de substâncias tóxicas na árvore após sua morte. Uma outra causa, também poderia ser a ausência de umidade devido à morte da árvore e não à falta de nutrição (Brodo, 1968; Johnson, 1940). Por isso os líquens não são considerados parasitas.

Como ocorre com outros grupos vegetais, as regiões tropicais e subtropicais do planeta são mais ricas em espécies do que as regiões frias. Existem muitas espécies que são restritas a determinadas regiões, outras são cosmopolitas e outras endêmicas, com ocorrência mais restrita.

Formas de crescimento

Líquens são tradicionalmente classificados dentro de três formas de crescimento: crostosos, foliosos e fruticulosos.

Cada forma de crescimento é caracterizada por um arranjo particular de tecido - cortical, algal ou medular - e por diferentes formas de fixação (Hale, 1983).

- *Líquens crostosos*

São aqueles que normalmente estão em contacto íntimo com o substrato, sendo difícil a sua separação sem que ocorram lesões ao substrato. Desenvolvem-se sobre solos, rochas ou casca de árvores e se fixam ao substrato através das hifas da medula (Jahns, 1973).

Entre os crostosos, encontram-se os líquens mais primitivos, como é o caso das espécies endolíticas e endofloídais, que não apresentam córtex superior, e os seus simbiontes acham-se inseridos no substrato entre os cristais das rochas ou no córtex das árvores, ficando na superfície apenas os ascocarpos (Hale, 1983).

Na superfície das folhas de arbustos, samambaias ou árvores de áreas tropicais a subtropicais são encontrados líquens folícolas também em forma crostosa (Hale, 1974; 1983). As figuras 1 e 2 mostram líquens crostosos desenvolvidos sobre rocha e sobre córtex.

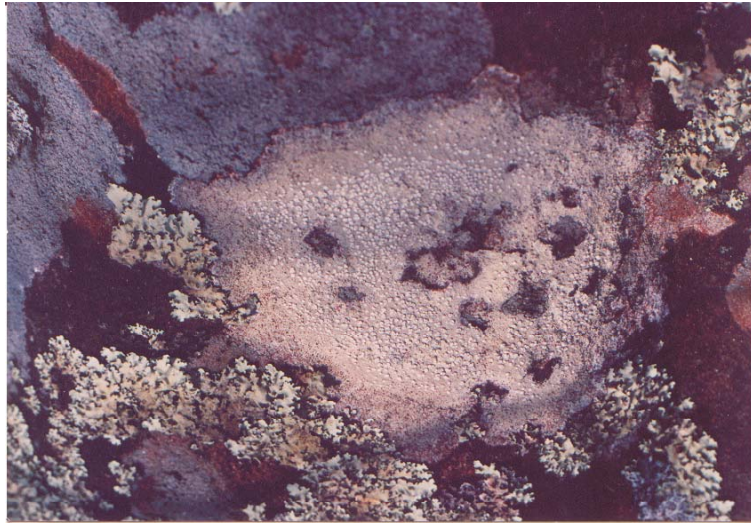


Figura 1 - Líquen crostoso sobre rocha.



Figura 2 - Líquen crostoso sobre córtex de árvore.

- *Líquens foliosos*

Talos foliosos apresentam lobos distintos lembrando uma folha. Crescem mais ou menos horizontalmente sobre o substrato, fixando-se por pontos, de maneira firme ou frouxa, através de rizinas ou tomento. Apresentam córtex superior e inferior bem definidos, podendo este último estar ausente em algumas espécies. A forma de crescimento é bem

estruturada, permitindo vários tamanhos do talo, que normalmente se ramificam em lobos largos ou estreitos, mais ou menos independentes um do outro, contíguos ou justapostos (Hale, 1983). As figuras 3 e 4 mostram líquens foliosos corticícolas e saxícolas, respectivamente.



Figura 3 - Líquen folioso (*Parmotrema tinctorum*) sobre córtex de árvore.



Figura 4 - Líquen de talo folioso (*Rimelia cetrata*) sobre rocha.

- *Líquens fruticosos*

São espessos, arbustiformes, com râmulos distintamente formados, muito longos e pendentes, ou curtos e mais ou menos erectos, ou ainda finos filamentos formando um emaranhado semelhante à cabeleira. Fixam-se ao substrato por um grampo situado na base do eixo principal ou por vários pontos ao longo dos ramos (Hale, 1983). As figuras 5 e 6

mostram exemplos de líquens fruticosos corticícolas e a figura 7 mostra um líquen fruticososaxícola.



Figura 5 - Líquen fruticoso do gênero *Usnea* sobre córtex de árvore.



Figura 6 - Líquen fruticoso do gênero *Usnea* sobre córtex de árvore.



Ramalina celastri

Figura 7 - Líquen fruticoso do gênero *Ramalina* sobre paredão rochoso.

Velocidade de crescimento

Líquens crescem muito lentamente. O crescimento depende da divisão celular e expansão, tanto do micobionte quanto do fotobionte e naturalmente do metabolismo de carbono do fotobionte, além de condições apropriadas de umidade, temperatura e luz. Embora o crescimento seja um processo tridimensional, as medidas são expressas de modo linear (mm.ano^{-1}). Para espécies foliosas e crostosas, o crescimento é expresso como aumento do raio, e para líquens fruticulosos como aumento do comprimento (Nash, 1996c). O aumento anual em diâmetro raramente ultrapassa 1 a 3cm para algumas espécies foliosas de crescimento mais rápido. A média é de 1 a 6mm por ano, exceto para os crostosos, que é de 0,5 a 2,5mm por ano. (Hale, 1974).

A maior parte dos talos liquênicos pode ser medida em centímetros, sendo comum exemplares crostosos e foliosos com 1 até 30cm de diâmetro ou mais, e as longas barbas-de-velho, com até 4m de comprimento. Existem também talos adultos de poucos milímetros vivendo em frestas de troncos ou rochas (Hale, 1973).

Longevidade

Da mesma forma que outros organismos, o ciclo de vida dos líquens inclui um período inicial de rápido crescimento, um outro de maturação e um estágio final degenerativo. A duração de cada período e a extensão do crescimento é variável para cada líquen. Talos jovens (aqueles de 0,1 - 0,7mm) de um espécime saxícola de *Parmelia baltimorensis* no leste dos Estados Unidos, crescem aproximadamente $2,0\text{mm.ano}^{-1}$, o que corresponde à metade da velocidade de crescimento de talos maduros, que crescem em velocidade linear de aproximadamente 5mm.ano^{-1} . Talos em degeneração (aqueles que chegam a 14cm e se desintegram no centro) têm velocidade de crescimento menor ($3,0\text{mm.ano}^{-1}$). O tempo de vida desse líquen é estimado em 25-30 anos (Lawrey, 1979; Armstrong, 1976).

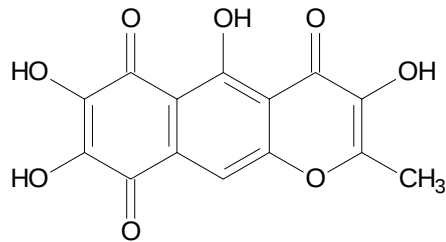
Embora a relação entre o diâmetro de um talo liquênico e a velocidade de crescimento não seja uma medida adequada, a idade de vários líquens citados na literatura foi avaliada através desse parâmetro. Assim, a idade dos seguintes líquens foi avaliada com base em observações conduzidas em média de 6 anos de crescimento : *Parmelia centrifuga* 50-80 anos, *P. olivaceae* 50-60 anos, *P. physodes* 30-40 anos (Hale, 1973).

Mais recentemente, o método denominado Liquenometria está sendo aplicado para determinação da idade de líquens ou de seus substratos. O método baseia-se na análise de fotografias de um dado líquen, obtidas durante vários anos. O líquen *Rhizocarpon geographicum*, o mais freqüentemente estudado na região do Ártico é de 15-20 mm/100 anos. Isso significa que uma colônia de 150mm pode ter idade de 1000 anos, considerando valor médio de 15 mm de crescimento / 100 anos (Hale, 1983).

Cor

A cor básica da maioria dos líquens portadores de algas verdes varia entre o branco e o cinza com um toque de verde devido à clorofila das algas. Quando o talo é umedecido, as células do fungo ficam achatadas e mais translúcidas. Por essa razão, a cor verde das algas se torna mais evidente e o talo adquire coloração viva, que vai do verde claro ao escuro. Esse é o motivo pelo qual os líquens são muito mais visíveis e bonitos após as chuvas. Por outro lado, alguns fungos liquênicos produzem substâncias coloridas que tanto

podem estar espalhadas por todo o talo, como estar restritas a certas estruturas internas ou externas. Nesses casos, todo o talo ou partes dele podem adquirir cores como amarelo, amarelo-ouro, laranja, rosa e vermelho (Jahns, 1973). Na figura 8 podem ser vistos os apotécios vermelhos de *Cladonia corallifera*. A cor vermelha é devida à presença de ácido rodocladônico[1].



Ácido rodocladônico [1]

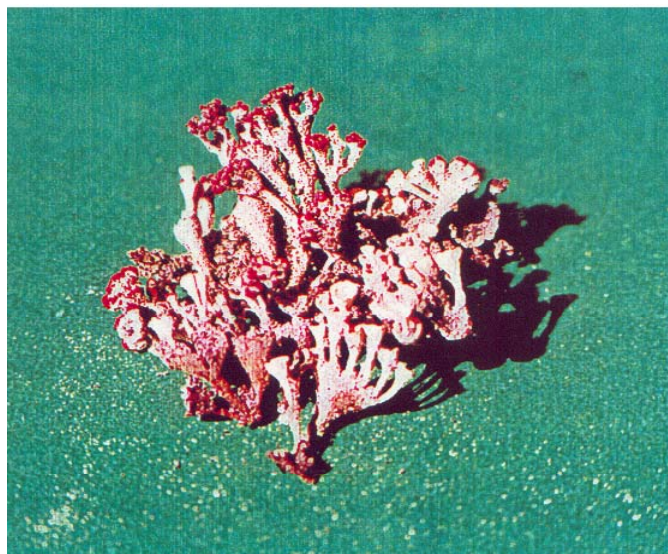


Figura 8 - *Cladonia corallifera* . A cor vermelha dos apotécios se deve à presença de ácido rodocladônico[1].

As outras cores dos líquens são variações do preto, marrom e cinza-chumbo. Líquens com essas cores são portadores de cianobactérias (Jahns, 1973). As figuras 9 e 10 mostram exemplares de líquens com cianobactérias.



Figura 9 - Líquen gelatinoso do gênero *Leptogium* (contém cianobactéria).



Figura 10 - Líquen gelatinoso do gênero *Collema* (contém cianobactéria).

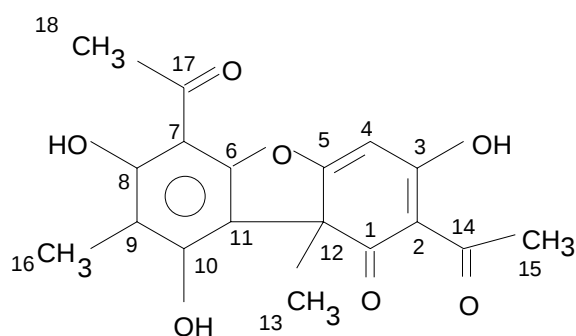
1.2 - QUÍMICA DE LIQUENS

As substâncias químicas produzidas por líquens são agrupadas, de acordo com a localização no talo, em produtos intracelulares e extracelulares. Sendo o talo liquênico uma estrutura composta, alguns produtos são sintetizados pelo fungo, outros pela alga (Hale, 1983).

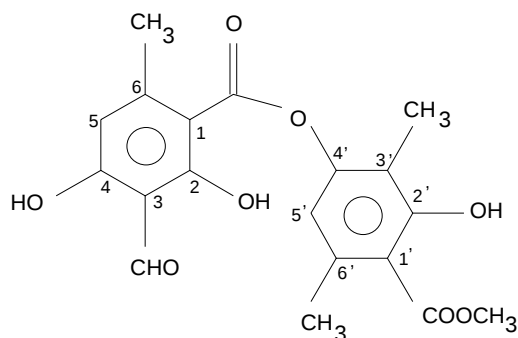
Os produtos intracelulares (carboidratos, carotenóides e vitaminas, aminoácidos e proteínas) estão ligados na parede celular e no protoplasto. São freqüentemente solúveis em água e podem ser extraídos com água quente. Esses compostos ocorrem não-somente em líquens, mas em fungos e algas de vida livre e em plantas superiores (Hale, 1983).

Os produtos extracelulares, freqüentemente chamados metabólitos secundários, são encontrados na medula ou no córtex, raramente em ambas as camadas. Substâncias que apresentam cor, como a maior parte das antraquinonas, derivados do ácido

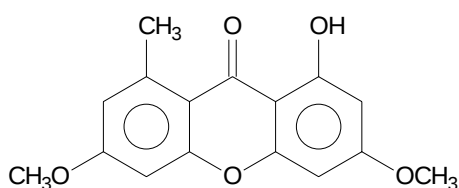
pulvínico e ácido úsnico [2], outras incolores como atranorina [3] e liquexantona [4] são exemplos típicos de substâncias presentes no córtex. A maior parte de depsídeos e depsidonas é encontrada somente na medula (Hale, 1983). Entretanto, pode ocorrer que as substâncias químicas estejam localizadas também em outras partes do líquen. Nos apotécios de *Haematoma ventosum* está presente a hemaventosina [5], que é um pigmento vermelho escuro (Hawksworth et al., 1984); em *Letraria columbina* os apotécios contêm ácido norstítico [6] e no talo estão presentes atranorina [3] e ácido vulpínico [7]. O ácido taminólico [8] ocorre nos apotécios, e o ácido perlatólico [9] no talo de *Icmadophila ericetorum* (Hale, 1983).



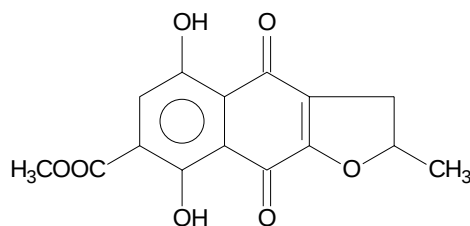
Ácido úsnico [2]



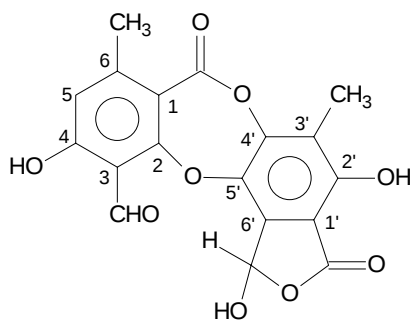
Atranorina [3]



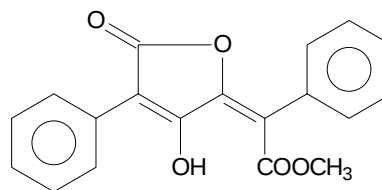
Liquexantona [4]



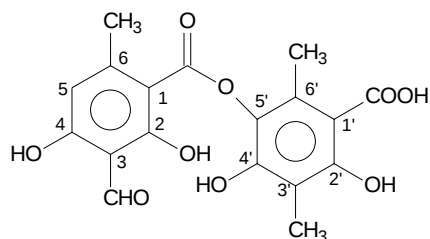
Hemaventosina [5]



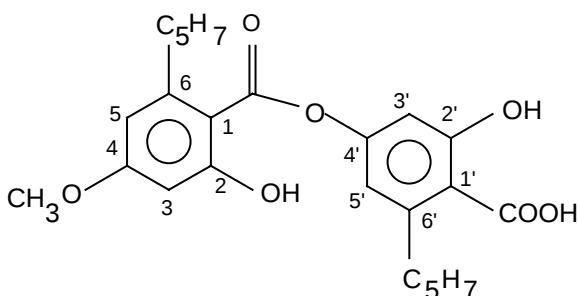
Ácido norstítico [6]



Ácido vulpínico [7]



Ácido taminólico [8]



Ácido perlatólico [9]

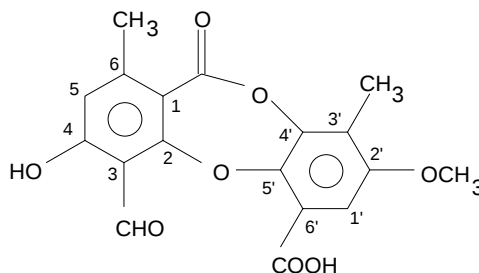
Em geral, em um espécime pode ocorrer de um a vários compostos resultantes do metabolismo secundário. Entretanto, há exceções, como *Pseudocyphellaria impressa* da Nova Zelândia que apresenta 41 diferentes depsídeos, depsidonas, derivados do ácido pulvínico e 17 triterpenos (Hale, 1983).

Os derivados fenólicos não estão presentes em todas as espécies líquênicas. Muitas espécies em que o fotobionte é uma cianobactéria não produzem esses derivados (Galun et al., 1988).

Atualmente, são conhecidos aproximadamente 630 compostos provenientes do metabolismo de líquens. São ácidos alifáticos, *meta*- e *para*-depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico. Embora muitos desses compostos sejam também produzidos por fungos de vida livre e por plantas superiores (50-60), a maior parte é considerada exclusiva de líquens (Elix, 1996).

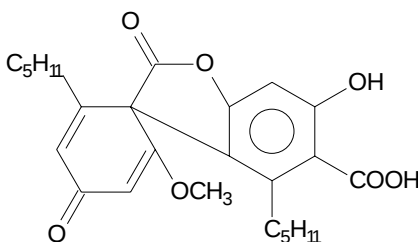
Com o advento das técnicas modernas de RMN e Espectrometria de Massas, muitos metabólitos secundários adicionais, estruturalmente relacionados àqueles principais, estão sendo identificados mais rapidamente.

A concentração de metabólitos secundários pode variar de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo líquênico, embora em alguns casos a concentração possa ser mais alta, como em *Pentagenella fragillima* Daib., que tem 30% de seu peso em ácido psorômico [10] (Hale, 1983; Huneck, 1973; Galun et al., 1988).



Ácido psorômico [10]

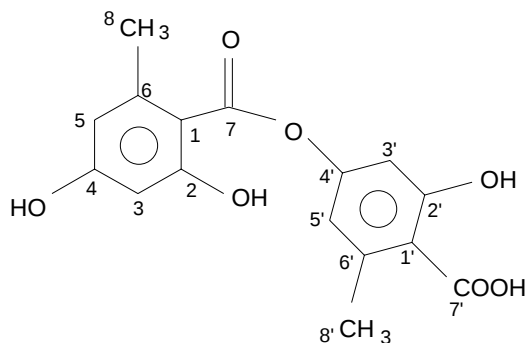
O estudo sistemático das substâncias químicas resultantes do metabolismo secundário de líquens teve início com os trabalhos de Bebert em 1831, Alms em 1832, Knopp em 1844 que isolaram os ácidos vulpínico [7], picrolíquênico [11] e úsnico [2], respectivamente, de algumas espécies líquênicas (Huneck et al., 1996).



Ácido picrolíquênico [11]

Gmelin, em 1858, publicou a primeira revisão sobre substâncias líquênicas (Huneck et al., 1996). Entretanto, o marco inicial da Lichenologia foi estabelecido com os trabalhos de Zopf e de Hesse. Zopf (Friedrich Wilhelm Zopf) era botânico e produziu em 1907, uma das mais importantes obras na área de Lichenologia. O livro “Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung ” é uma compilação de trabalhos que foram por ele publicados e descreve fórmulas empíricas, propriedades e ocorrência de 150 compostos. O químico Hesse, no período de 1861 a 1905, publicou inúmeros trabalhos sobre substâncias líquênicas. O mais importante deles, “Flechtenstoffe”, foi editado em 1912 (Huneck et al., 1996).

O ácido lecanórico [12] foi o primeiro depsídeo de líquen sintetizado em laboratório por Emil Fischer em 1913 (Hale, 1974; 1983).



Ácido lecanórico [12]

Durante o período de 1930, Asahina, químico japonês, determinou fórmulas moleculares de um número de substâncias líquênicas mais comuns e estabeleceu a base para pesquisas posteriores desses compostos (Hale, 1983).

Em 1954, Asahina e Shibata, no Japão, publicaram um outro clássico da liquenologia, o livro “Chemistry of Lichen Substances”. Essa obra é uma compilação de seus trabalhos e contém as estruturas elucidadas de numerosos compostos, suas sínteses, os métodos de isolamento e purificação e algumas propriedades físicas (Asahina et al., 1954; Huneck et al., 1996). Nesse trabalho incluíram também a determinação de substâncias líquênicas por microcristalização e descreveram a ação antibiótica de vários compostos.

A primeira classificação das substâncias líquênicas foi proposta por Zopf e depois modificada por Asahina e Shibata em 1954.

1.3 - VIAS BIOSINTÉTICAS

É bastante significativo o número de trabalhos sobre a biossíntese de compostos líquênicos, por observações diretas em líquens intactos, usando compostos marcados. Entretanto, freqüentemente são propostas também vias hipotéticas com base no conhecimento que se tem da biossíntese de produtos análogos de fungos. Até há pouco tempo, todos os dados químicos eram provenientes de estudos diretos em líquens, isto porque em culturas de líquens os fungos crescem muito lentamente e não apresentam todos os produtos característicos de talos maduros do líquen. A maioria dos metabólitos secundários presentes em líquens é derivada da via do acetil-polimalonil; outros são derivados da via do

ácido chiquímico e outros da via do ácido mevalônico (Culberson et al., 1989, apud Elix 1996).

Um dos mais recentes desenvolvimentos na biossíntese de derivados fenólicos de líquens é a atribuição aos *para*-depsídeos da função de precursores ou intermediários biossintéticos dos *meta*-depsídeos, depsonas, éteres difenólicos, depsidonas e dibenzofuranos (Culberson et al., 1989, apud Elix, 1996).

Asahina e Shibata dividiram as substâncias liquênicas em alifáticas e aromáticas. Na série alifática incluíram os ácidos graxos, polióis e triterpenos e na série aromática os derivados do ácido tetrônico (ácido fulvínico), depsídeos, depsidonas, quinonas, dibenzofuranos e derivados da dicetopiperazina (Asahina et al., 1954). O sistema de classificação das substâncias liquênicas proposto por Asahina e Shibata foi baseado em conhecimentos estruturais e vias biossintéticas que lhes dão origem (Hale, 1973). Esse sistema vem sendo modificado de tempos em tempos, à medida que novas informações se tornam disponíveis (Elix, 1996).

O sistema de classificação mais recente é aquele proposto por Culberson & Elix (1989), em que as substâncias são ordenadas de acordo com sua provável origem biossintética. Na figura 11 estão representadas as principais classes de compostos de cada via biossintética e a indicação do número de compostos atualmente conhecidos. A figura 12 mostra as interrelações entre as vias metabólicas na produção de compostos liquênicos.

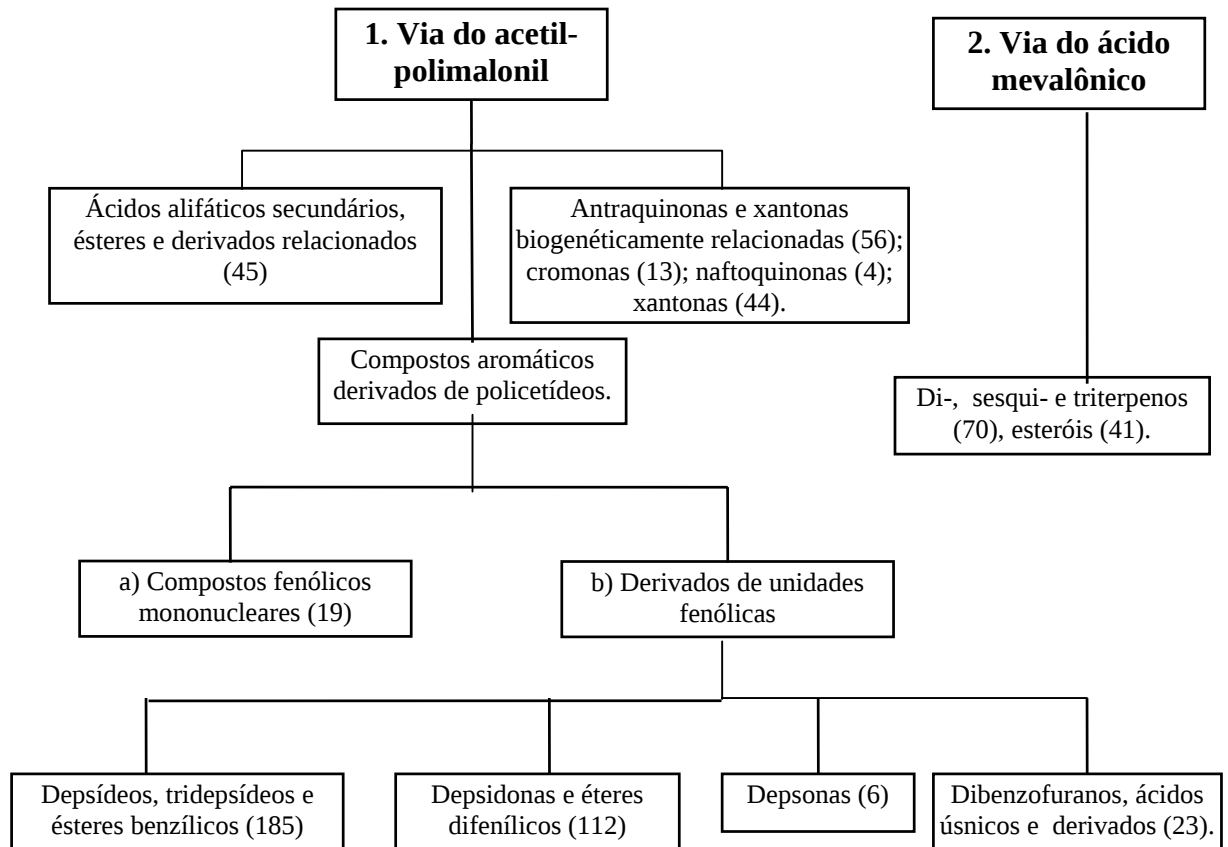


Fig. 11 - Principais classes de metabólitos secundários de líquens e o número de compostos atualmente conhecidos (Elix ,1996).

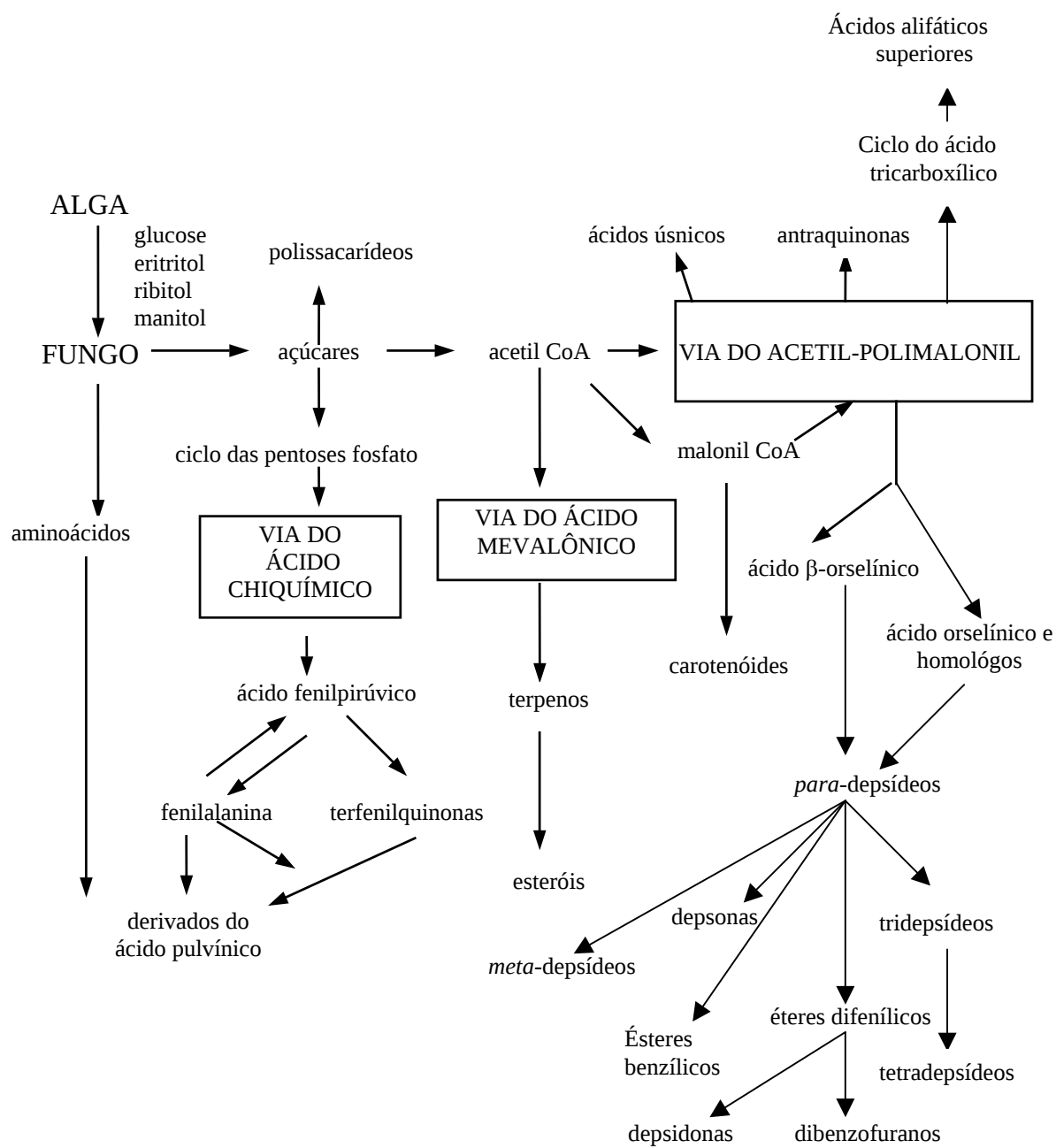


Figura 12 - Prováveis vias de biossíntese de compostos liquênicos de acordo com Culberson & Elix (1989).

- BIOSÍNTESE

A maior parte dos metabólitos secundários de líquens são compostos oriundos da via do acetil-polimalonil. O ácido acético sob forma de éster com a coenzima A (acetilSCoA) é a unidade básica de importância fundamental em duas vias biossintéticas: a do acetil-polimalonil e a do ácido mevalônico.

A via do acetil-polimalonil conduz à formação de compostos alifáticos, como os ácidos graxos de cadeia longa e as substâncias aromáticas do tipo ácidos fenólicos.

A acetilSCoA pode sofrer ativação de átomos de hidrogênio α do grupo metila por ação do sítio de caráter básico presente na enzima que toma parte no processo sintético. A ativação desenvolve caráter básico na molécula pela remoção de um próton. O carbono α pode então, por um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico eletrofílico de outra molécula de acetilSCoA, formar o derivado acetoacetilSCoA por condensação tipo Claisen (Geissman et al., 1969). (Figura 13).

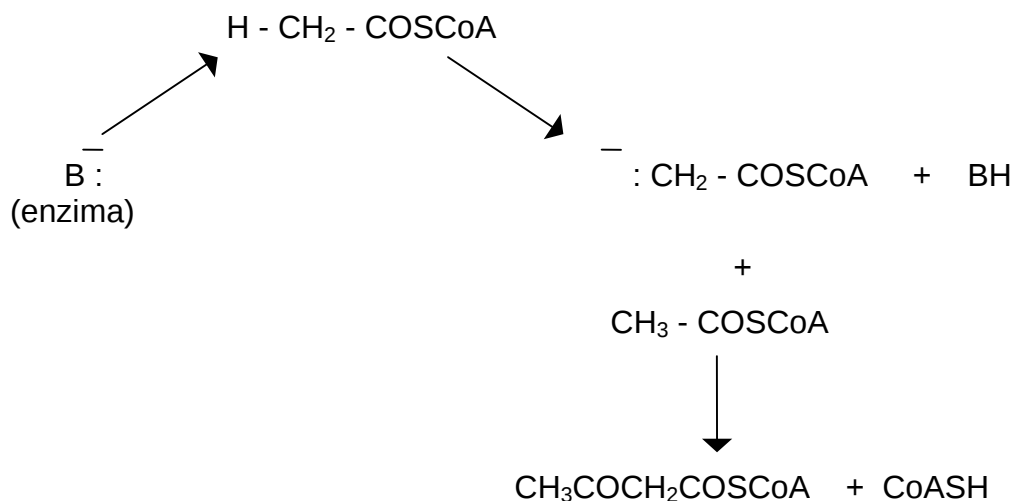
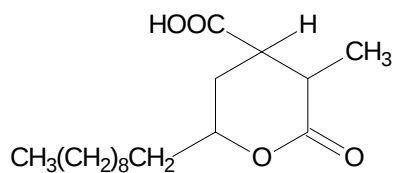
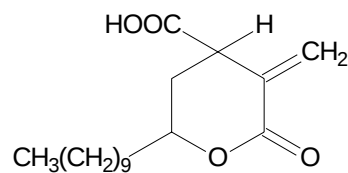


Figura 13 - Formação do acetoacetilSCoA a partir da condensação de 2 moléculas de acetilSCoA.

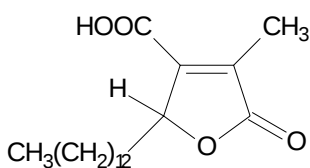
A formação do β ceto-éster é o ponto de partida para a síntese de terpenos pela via do ácido mevalônico. O β ceto-éster obtido pode também, por redução e repetidas



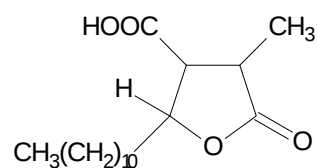
Ácido acaranoico [19]



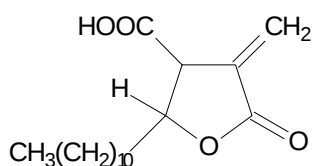
Ácido acarenóico [20]



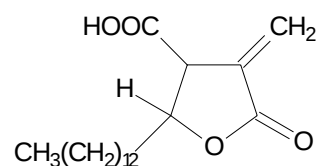
Ácido liquesterínico [21]



Ácido nefrosterânico [22]



Ácido nefrosterínico [23]



Ácido protoliquesterínico [24]

Ácidos hidroxilados como 9, 10, 12, 13-tetraidroxieneicosanóico e 9, 10, 12, 13-tetraidroxi-eicosanóico são freqüentes em líquens. Até 1973, ácidos graxos de cadeia longa, como oleico e linoleico não tinham sido citados como componentes de líquens (Huneck, 1973). Mais recentemente, Dembitsky et al. analisaram cinco espécies de líquens da subclasse *Gymnocarpeae* (1992a), três espécies do gênero *Parmelia* (1992b), três espécies da ordem *Lecanolares* (1992c) e identificaram, através da análise por CG-MS, ácidos de cadeia longa, como palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico, além de outros ácidos de cadeia mais longa que esses e de estruturas variadas. *Xantoria parietina* apresenta ácidos graxos que variam de 10 a 20 carbonos e, entre esses, os ácidos insaturados palmitoleico, oleico, linoleico, linolênico e cis-cis-11,14-eicosadienóico (Piervittori et al., 1994). Ácidos palmítico, esteárico, láurico, linoleico, oleico e araquídico também foram identificados em *Collema leptosporum* (Devincenzi et al., 1993).

Embora a acetilSCoA é consideravelmente mais reativa que os ésteres comuns em reações de condensação de Claisen, não é suficientemente reativa para ser utilizada pelo complexo ácido graxo sintase na síntese de ácidos graxos.

A ativação do carbono α é conduzida pela carboxilação da acetilSCoA na presença da enzima acetilSCoA carboxilase, ATP e biotina. O produto obtido, malonilSCoA, contém um grupo metileno muito mais facilmente convertido em carbono α nucleofílico que aquele da acetilSCoA, e como consequência o processo biossintético inicia-se com a condensação de 1 mol de acetilSCoA e 1 mol de malonilSCoA resultando em acetoacetilSCoA. O processo de condensação se repete várias vezes pela introdução de 2 unidades de C em cada etapa. Essas etapas de condensação envolvem uma série de derivados do complexo ácido graxo-sintase denominados proteínas acil-transportadoras (ACP).

As proteínas ACP têm-se revelado como um complexo oligomérico formado por 7 monômeros de funções precisas, dentro de toda a série de transformações:

- 1) sub-unidade para transferência do resíduo do malonil;
- 2) sub-unidade para transferência do resíduo acil;
- 3) sub-unidade para reação de condensação;
- 4 e 5) duas unidades, ambas para reduções;
- 6) sub-unidade responsável pela desidratação;
- 7) sub-unidade para transferência do grupo palmitil ou estearil, produtos finais da cadeia.

A repetição das etapas 2 a 7 conduz ao aumento da cadeia carbônica e o processo se encerra quando se atinge 16 ou 18 carbonos, resultando em ácido palmítico ou esteárico, respectivamente. Ácidos graxos insaturados são resultantes do processo de dessaturação que ocorre na presença de oxigênio molecular, flavoproteína, NADPH e uma mono-oxigenase específica. O mecanismo desse processo ainda não é bem compreendido (Geissman et al., 1969; Luckner, 1990; Mosbach, 1973; Torsell, 1989; Vicente et al., 1988).

São poucas as informações disponíveis sobre a biossíntese das lactonas dos ácidos alifáticos de cadeia longa. A biossíntese do ácido protoliquesterínico [24] foi estudada por Blomer et al. (1969) que suplementaram talos de *Cetraria islandica* com glucose e [1- 14 C]acetato de sódio. Os autores sugeriram que a biossíntese do ácido protoliquesterínico deve envolver um intermediário de 3 C como o piruvato, ou de seus precursores (como o oxalacetato) da via glicolítica, que se condensa com o grupo α metileno de uma longa cadeia alcanoilSCoA como o palmitoilSCoA. Os autores indicaram, ainda, que os carbonos a,b e c indicados na estrutura do ácido protoliquesterínico são derivados de uma unidade de 3 carbonos (figura 14).

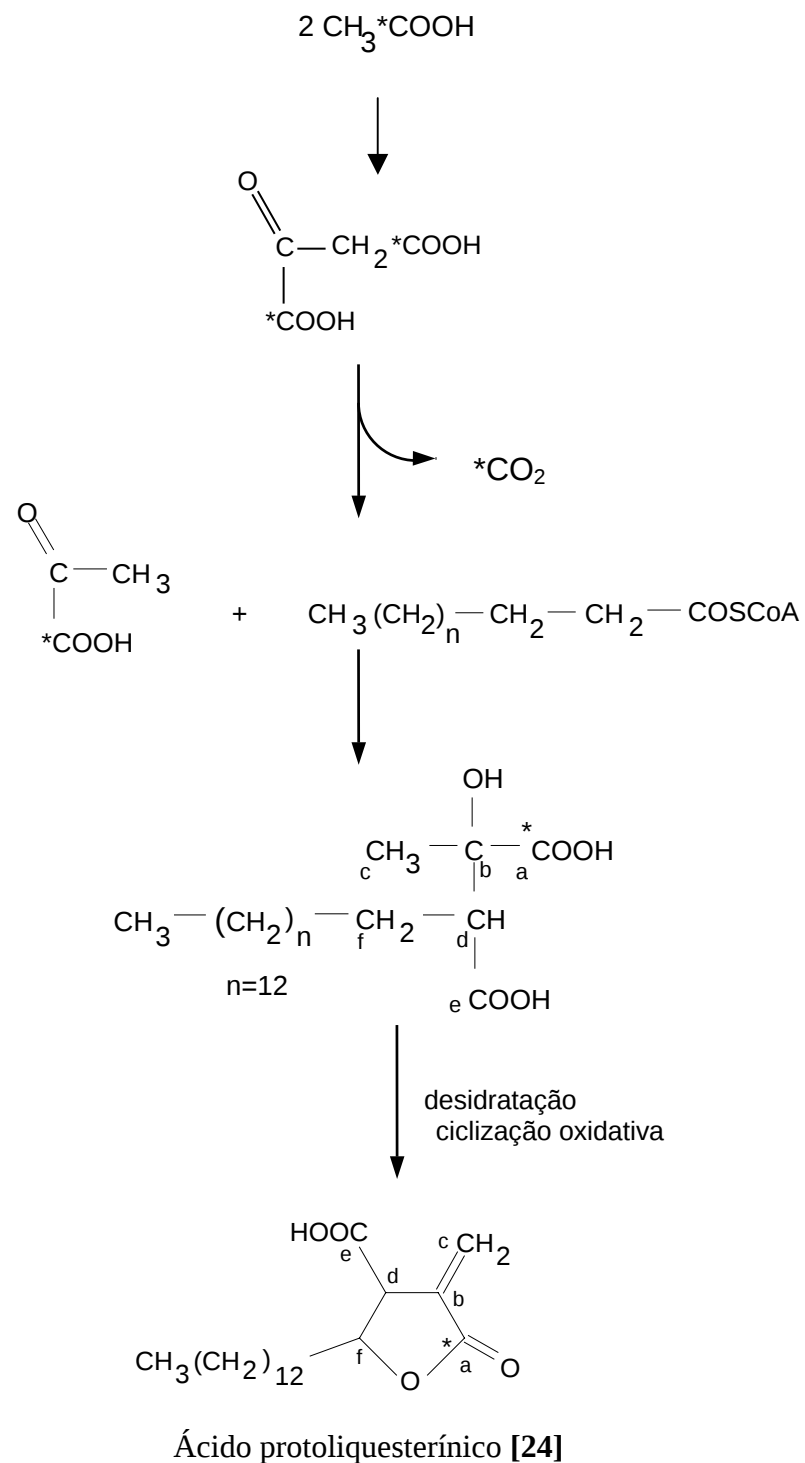


Fig. 14 - Reações de obtenção de γ -lactonas de ácidos alifáticos superiores de acordo com Blomer et al. (1969).

Compostos aromáticos

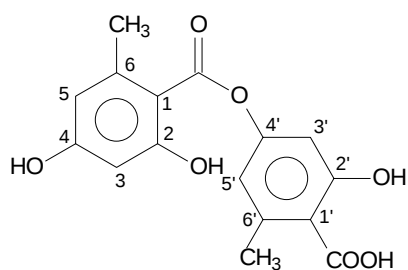
Depsídeos e depsidonas

- Depsídeos derivados do orcinol

Embora muitos dos compostos aromáticos isolados de líquens sejam exclusivos desse grupo vegetal, alguns podem ser encontrados também em fungos de vida livre ou em plantas superiores.

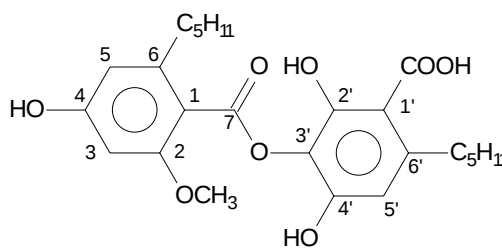
Os compostos aromáticos mais comumente presentes em líquens são formados pela esterificação de duas ou ocasionalmente três unidades fenólicas, como por exemplo, derivados do ácido orselínico.

Duas unidades fenólicas sem substituintes na posição 3 podem formar compostos denominados depsídeos. Esses compostos são formados pela esterificação da carboxila da posição 1 da primeira unidade com a hidroxila da posição 4' ou da posição 3' da segunda unidade. Os compostos resultantes são *para*-depsídeos e *meta*-depsídeos da série do orcinol como o ácido lecanórico [12] e o ácido criptoclorofoico [25] (Vicente, 1975).



para-depsídeo

Ácido lecanórico [12]



meta-depsídeo

Ácido criptoclorofoico [25]

Tridepsídeos são resultantes da esterificação de três unidades fenólicas.

Biossíntese de derivados fenólicos

O ácido orselínico [26] é a unidade fundamental da biossíntese de depsídeos e depsídonas. O processo biossintético inicia-se, como no caso dos ácidos graxos com a condensação de 1 mol de acetilSCoA e 1 mol de malonilSCoA. A acetoacetilSCoA, resultante da condensação da acetilSCoA com malonilSCoA, pode condensar com duas outras moléculas de malonilSCoA em etapas sucessivas, dando formação a um policetídeo de 8 carbonos. Este último pode ciclizar através de dois processos distintos. Um deles produz ácido orselínico [26] e o outro, floroacetofenona [27] (figura 15).

A reação biossintética de formação de ácido orselínico é catalisada pela enzima ácido orselínico sintase. O mecanismo de formação desse ácido não requer qualquer reação de desidratação, ao contrário do que acontece na biossíntese do ácido 6-metilsalicílico característico de fungos de vida livre. A reação de obtenção do ácido 6-metilsalicílico é catalisada pela enzima ácido aromático sintase. A enzima ácido orselínico sintase catalisa uma desidratação final, promovendo a ciclização da cadeia para formar ácido orselínico. O complexo enzimático ácido orselínico sintase contém duas atividades transacetilases, uma proteína transportadora de grupos acil, uma enzima de condensação, uma de ciclização e uma atividade hidrolase. Embora os líquens produzam ácido orselínico em concordância com essa via, o sistema multienzimático não está ainda totalmente elucidado (Vicente et al., 1988).

O ácido orselínico é o precursor de depsídeos derivados do orcinol. A formação desses compostos ocorre por esterificação entre unidades derivadas desse ácido. Várias esterases podem estar envolvidas nesse processo. Entretanto, essas enzimas não foram ainda isoladas (Vicente, 1991).

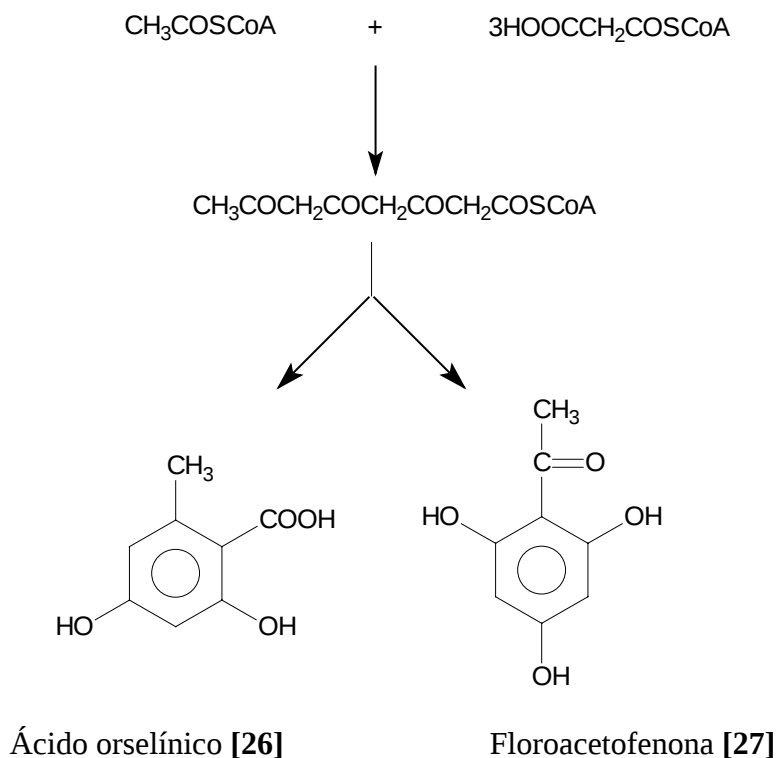


Figura 15 - Reações biossintéticas de formação de ácido orselínico e floroacetofenona por condensação de acetilSCoA e malonilSCoA.

Mosbach, em 1964, iniciou estudos sobre a biossíntese de fenóis em líquens mantidos sob condições de laboratório. Quando se administrava $\text{HOO}^{14}\text{CCH}_2^{14}\text{COSCoA}$ a talos jovens de *Umbilicaria pustulata*, verificava que, após 60 horas de incubação, aparecia uma série de compostos marcados, os quais podiam ser separados por cromatografia. Um dos compostos isolados, foi o ácido girofórico [28]. A radioatividade estava incorporada nas posições 2 e 4 e no grupo carboxila da ligação éster (figura 16).

Mosbach demonstrou que *Umbilicaria pustulata* contém uma esterase capaz de hidrolisar alguns depsídeos, separando as unidades fenólicas dos ácidos girofórico [28], umbilicárico [29] e evérnico [30], porém não tem ação sobre derivados, como o tetrametóxi giroforato de metila [31] e outros compostos, como benzoato de fenila [32] e o ácido *m*-digálico [33]. Todas as reações catalisadas por esterases são reversíveis, e a descrição de uma esterase desse tipo esclarece em grande parte o mecanismo pelo qual duas ou três unidades fenólicas se unem constituindo um depsídeo. Essa enzima é uma proteína termoestável, permanecendo ativa após 10 minutos a 57°C e o pH ótimo é de 6,2 (Vicente et al., 1988).

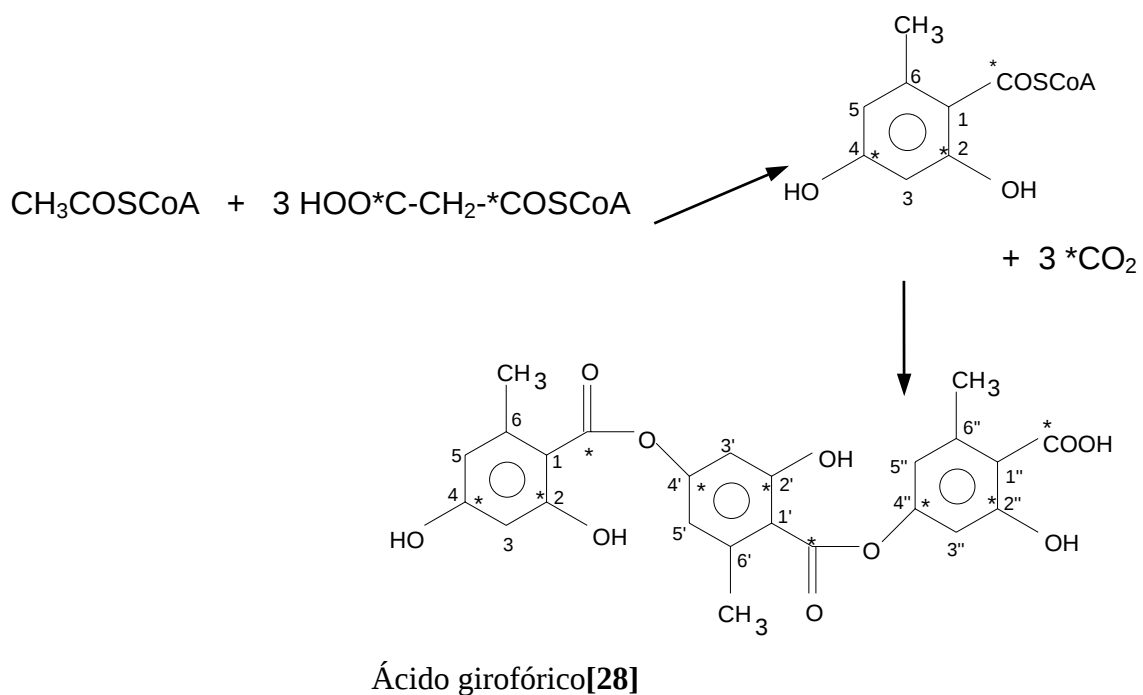
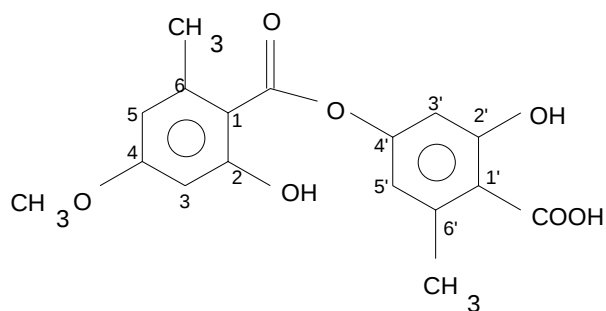
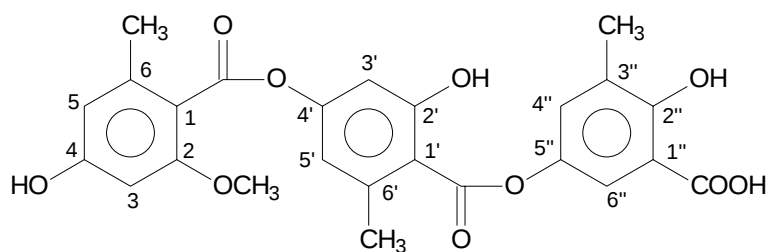
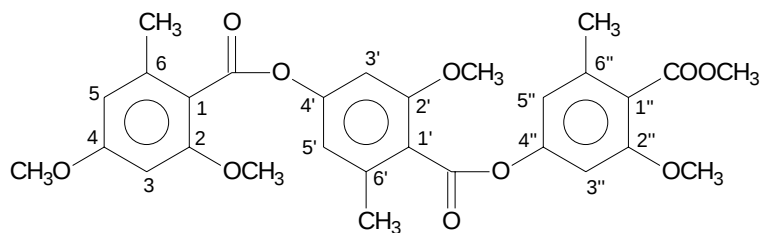
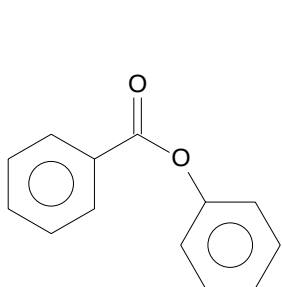


Figura 16 - Biossíntese do ácido girofórico por condensação de acetilSCoA e malonilSCoA marcado com ^{14}C .

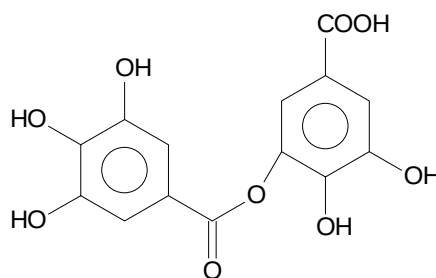




2,,2',2'', 4-tetrametóxi giroforato de metila [31]

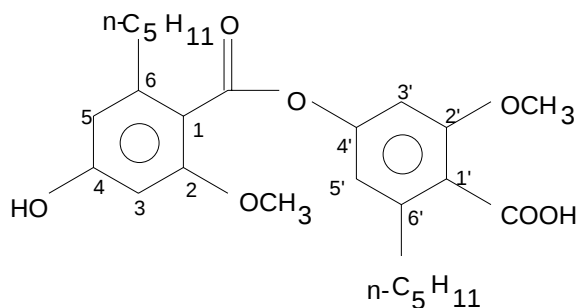


Benzoato de fenila [32]

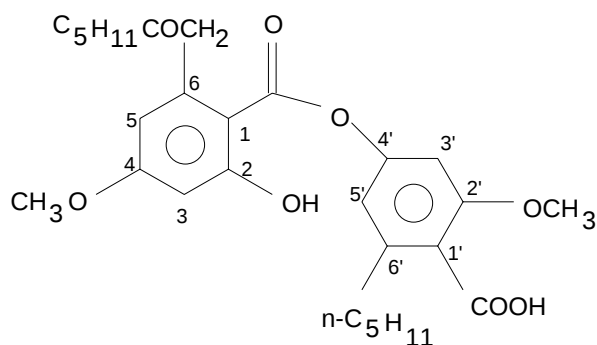
Ácido *m*-digálico [33]

A alga *Trebouxia*, que é o ficobionte de *U. pustulata*, pode produzir essa esterase, quando cresce isolada em um meio líquido contendo glucose e sob iluminação. Não se descarta a hipótese de que o micobionte possa também produzi-la. Porém, as atividades obtidas a partir da alga isolada são suficientemente significativas em comparação àquelas encontradas no líquen. Isso leva a pensar seja a hidrólise uma das funções que essas algas desempenham com eficiência (Vicente et al., 1988).

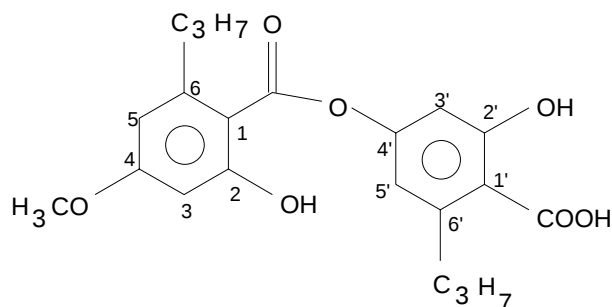
Os *para*-depsídeos da série do orcinol apresentam hidroxilas substituintes nas posições 2 e 4 do primeiro anel e 2' do segundo anel, exceto o ácido planáico [34] em que 2 e 2' se encontram metoxiladas. No ácido confluêntico [35] as metoxilas se encontram nas posições 4 e 2', enquanto que no ácido divaricático [36] a metoxila se encontra na posição 4.



Ácido planáico [34]



Ácido confluêntico [35]



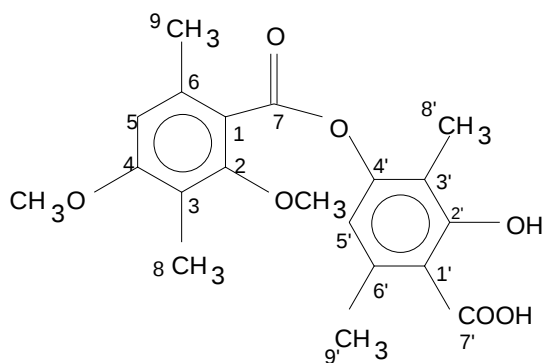
Ácido divaricático [36]

Um número de depsídeos derivados do orcinol contém outros grupos substituintes ligados às unidades de ácido orselínico. Esses depsídeos são biossinteticamente derivados do ácido 6-alkil-2,4-diidróxibenzóico ou do ácido 6-alkil- β -ceto-2,4-diidróxibenzóico. Devido às variações da cadeia alquila nas unidades do ácido orselínico, o número de depsídeos é bastante elevado (Mosbach, 1973).

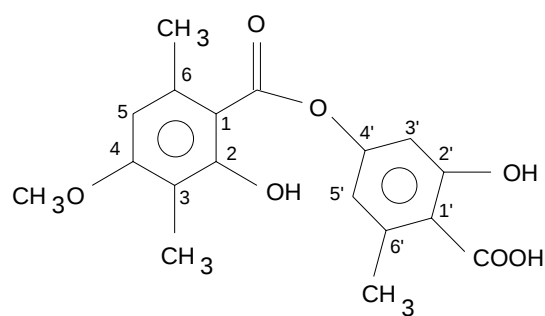
Cadeias laterais de um ou mais carbonos ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}_5\text{H}_{11}$, $-\text{C}_7\text{H}_{15}$) localizam-se nas posições 6 e 6'. Pode ocorrer que a cadeia lateral apresente grupo cetônico na posição β , como no ácido confluêntico [35].

- Dpsídeos derivados do β orcinol

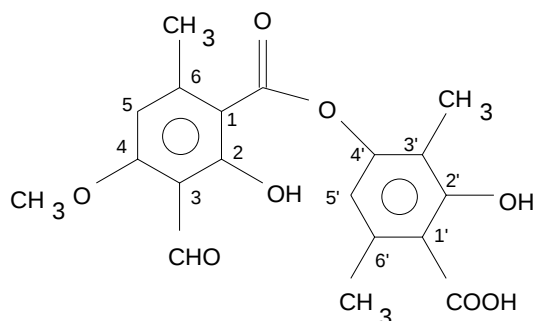
Além dos depsídeos derivados do orcinol (ácido orselínico), ocorrem outros derivados do β orcinol (ácido β -metil-orselínico), como por exemplo os ácidos difractáico [37], atranorina [3], obtusático [38] e baeomicésico [39].



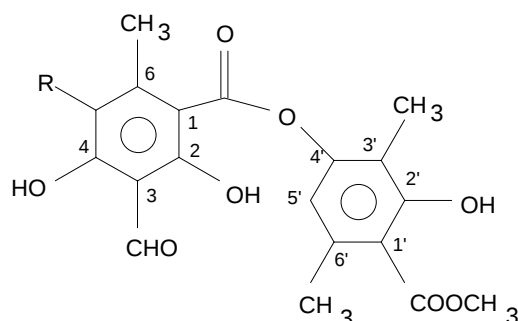
Ácido difractáico [37]



Ácido obtusático [38]



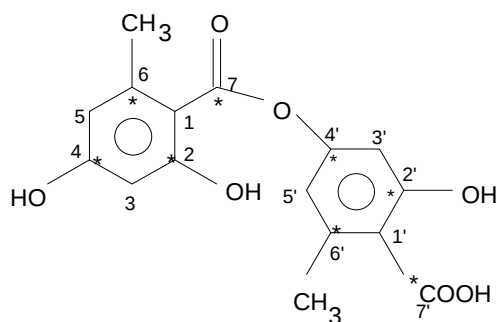
Ácido baeomicésico [39]



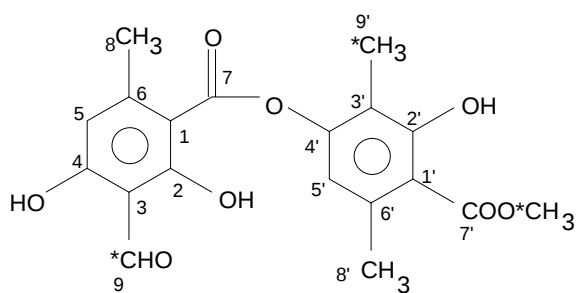
R = H Atranorina [3]

R = Cl 5- Cloroatranorina [3a]

Experimentos, utilizando talos de *Parmotrema tinctorum*, que produzem ácido lecanórico [12] e atranorina [3], foram suplementados com acetato marcado com ^{14}C no C-1. O ácido lecanórico [12a] obtido estava marcado nos carbonos 2, 4, 6, 2', 4' e 6', no carbono carbonílico da ligação éster, e no grupo carboxila. A atranorina [3] não incorporou ^{14}C . Quando os experimentos foram realizados suplementando os talos com formato marcado, a atranorina [3b] incorporou radioatividade.



Ácido lecanórico [12a]



Atranorina [3b]

Quando o ácido orselínico marcado com ^{14}C foi suplementado aos talos de *P. tinctorum*, somente o ácido lecanórico **[12a]** apresentou-se radioativo. A ausência da atranorina **[3b]** conduziu à conclusão de que a introdução de unidades de 1 carbono ocorre antes da ciclização do policetídeo (Geissman et al., 1969 ; Mosbach, 1973 ; Vicente et al., 1988).

Nos *para*-depsídeos derivados do β -orcinol, a posição 3 (anel A) apresenta substituinte de uma unidade de carbono que pode ser $-\text{CH}_3$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOH}$, e na posição 3' o substituinte é sempre $-\text{CH}_3$. As posições 6 e 6' estão sempre metiladas, e a carboxila da posição 1' está na forma de éster metílico somente na atranorina **[3]** e na 5-cloroatranorina **[3a]**.

- *Meta*-depsídeos

As unidades fenólicas da série do orcinol, que intervém na formação de depsídeos, não possuem hidroxila na posição 3'. Em princípio, não se poderia pensar em uma reação de esterificação para a formação do *meta*-depsídeo. A ligação éster se estabelece entre a posição 1 do anel A e a posição 3' do anel B.

Quimicamente existem 3 possibilidades distintas :

- a) A ligação éster ($-\text{COO}-$) pode se estabelecer em posição meta do anel B por reagrupamento de um *para*-depsídeo, que atuaria como precursor;
- b) A $-\text{COOH}$ da primeira unidade fenólica pode transformar-se em radical carboxilato, a qual poderia formar a ligação entre as unidades por ataque direto sobre o C-3' do anel B;
- c) A segunda unidade fenólica (anel B) pode ser hidroxilada previamente como unidade mononuclear no carbono 3' e a formação do *meta*-depsídeo segue os passos normais de esterificação, como no caso dos *para*-depsídeos;

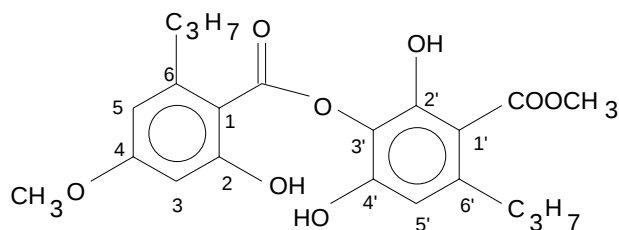
Na primeira hipótese, o reagrupamento consistiria em uma hidroxilação secundária do carbono formador da ligação éster no *meta*-depsídeo (C3'), quebra da ligação éster do *para*-depsídeo seguida de um giro de 60° do anel B, de modo que a nova ligação se formaria na posição 3', ficando uma hidroxila regenerada na posição 4' (Vicente, 1975).

A segunda hipótese consiste em um ataque direto do grupamento carboxílico da primeira unidade fenólica (anel A) sobre a posição 3' da segunda unidade (anel B). Quimicamente o sistema é possível, dada a alta reatividade da espécie ArCOO^- . Mesmo

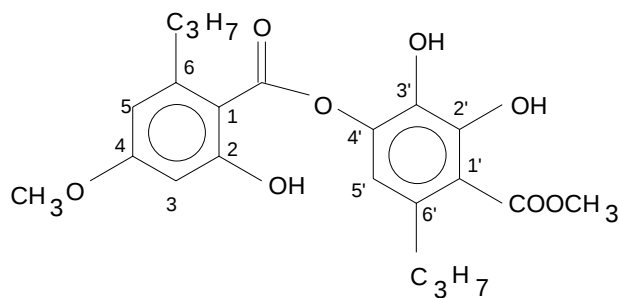
considerado do ponto de vista biológico, deve haver reações enzimáticas que realizam mais facilmente a formação da ligação.

A terceira hipótese é a mais aceita atualmente. Baseia-se na hidroxilação prévia da posição 3 do anel B (para os derivados do orcinol, 5 para os derivados do β -orcinol) e estabelecimento da ligação éster.

Elix et al. (1986) forneceram evidências de que os *meta*-depsídeos podem se originar por hidroxilação do C 3' de *para*-depsídeos seguida de rápido rearranjo à forma termodinamicamente mais estável. Essas conclusões foram obtidas a partir de estudos realizados com uma mistura de compostos isolados de *Lobaria escrobiculata*. A mistura consistia de *meta*-escrobiculina, ácido úsnico, ácidos estítico, nortístico e constítico. Verificaram por ccd que *meta*-escrobiculina sempre estava acompanhada de um composto relacionado de Rf levemente maior. A análise cromatográfica e os dados espectroscópicos do composto isolado por ccd preparativa indicaram que se tratava de uma mistura em equilíbrio dinâmico de *meta*-escrobiculina com seu isômero *para*-escrobiculina. Para verificar a consistência dessas observações, os autores procederam à síntese de *para*-escrobiculina e concluíram que a hidroxilação do *para*-depsídeo é seguida por rápido rearranjo intermolecular ao *meta*-depsídeo termodinamicamente mais estável.

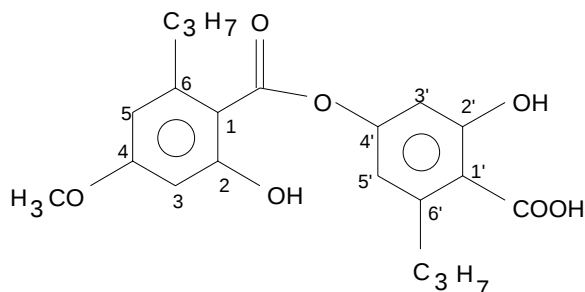


meta-escrobiculina [40]



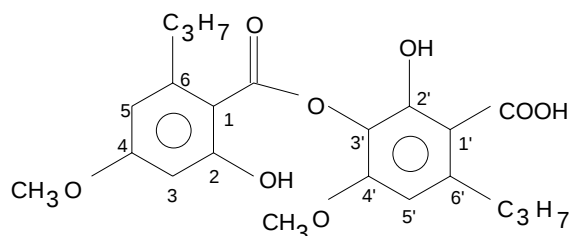
para-escrobiculina [41]

A co-ocorrência de ácido divaricático[36] e ácido sequicáico [42] em várias espécies de *Ramalina* fornecem evidências para essa proposta.



Ácido divaricático [36]

para-depsídeo

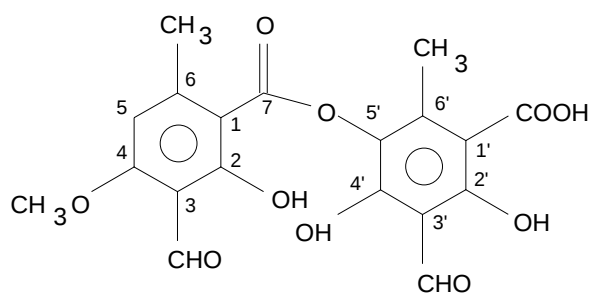


Ácido sequicáico [42]

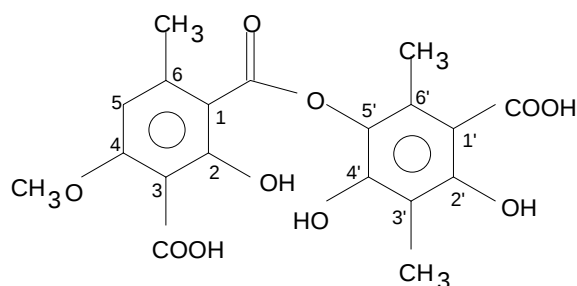
meta-depsídeo

Os *meta*-depsídeos apresentam cadeias laterais de mais de 1 carbono, como no caso dos *para*-depsídeos porém, com a diferença que as cadeias são absolutamente reduzidas. Estes substituintes se encontram sempre nas posições 6 do anel A e 6' do anel B. No primeiro caso o substituinte no C 6 é -C₃H₇ exceto no ácido criptoclorofeico [25] que é -C₅H₁₁. A cadeia lateral na posição 6' é sempre -C₅H₁₁, exceto no *meta*- e *para*-escrobiculina [40] e [41] e no ácido sequicáico [42] que é -C₃H₇ (Mosbach, 1973; Vicente, 1975).

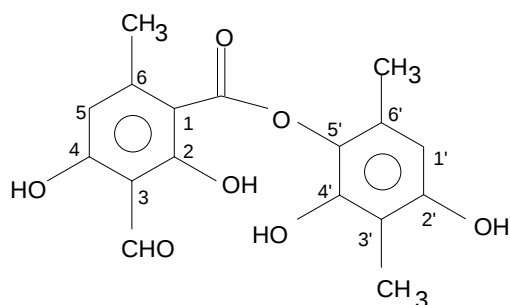
Os *meta*-depsídeos da série do β-orceinol são menos abundantes na natureza, sendo conhecidos os ácidos hemataminólico [43], hipotaminólico [44], taminólico [8] e decarboxitaminólico [45]. Este último é considerado por alguns autores como sendo um artefato resultante da descarboxilação do ácido taminólico [8] na posição 1' durante os processos de extração, não sendo, portanto, um produto natural (Vicente, 1975). Recentemente Elix et al., (1996) isolaram de *Heterodermia dissecta*, um novo *meta*-depsídeo derivado do β-orceinol que foi denominado ácido dissético [46].



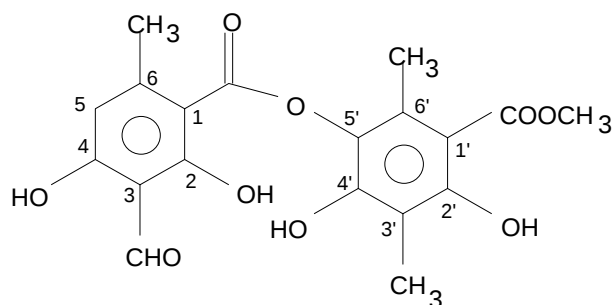
Ácido hemataminólico [43]



Ácido hipotaminólico [44]



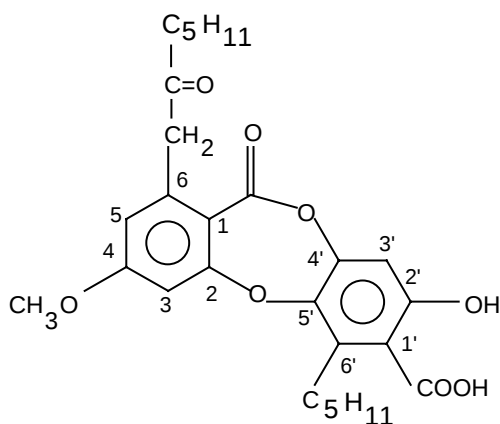
Ácido decarboxitaminólico [45]



Ácido dissético [46]

- Depsidonas

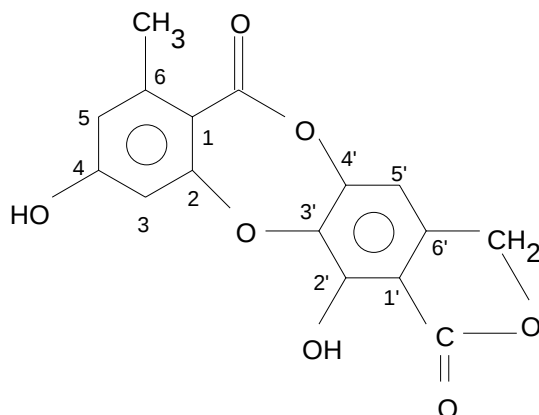
Representam um grupo de compostos estruturalmente relacionados aos depsídeos, sendo estes considerados seus precursores. Além de ligação éster presente nos depsídeos, as depsidonas apresentam também um heterocíclico adicional, resultante de uma ligação éter, geralmente entre as posições 2 e 5', como no ácido fisódico [47].



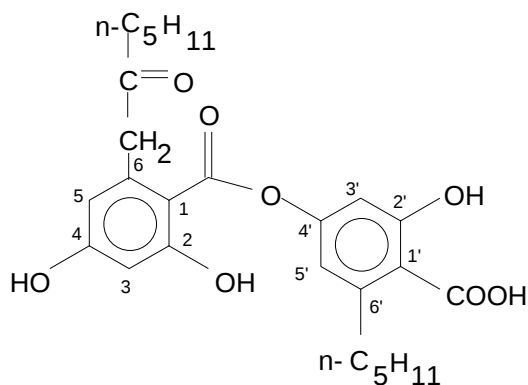
Ácido fisódico [47]

Entretanto, no ácido variolárico [48] a ligação éter está entre as posições 2 e 3', sendo este o único caso conhecido.

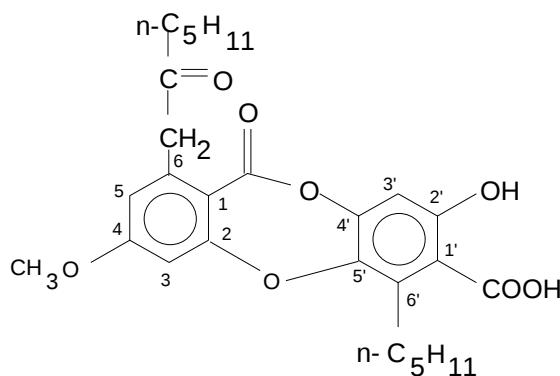
Embora a origem biossintética das depsidonas ainda não esteja esclarecida, a existência de depsídeos e depsidonas estruturalmente relacionados no mesmo líquen, indicam que esses compostos podem ter relação biogenética (Culberson, 1964). Como exemplos os ácidos olivetórico [49] e fisódico [47] isolados de *Cetraria ciliaris*.



Ácido variolário [48]



Ácido olivetórico [49]



Ácido fisódico [47]

Nesse caso, a formação de depsidonas, tendo *para*-depsídeos como precursores, ocorre por uma ciclização oxidativa. A hidroxila da posição 2 do anel A e a posição 5' não substituída do anel B dão formação à ligação éter. Entretanto, a reação é energeticamente desfavorável e não se realiza com facilidade em condições de laboratório (Culberson, 1986).

Uma outra rota possível para a biossíntese de depsidonas é aquela sugerida por Sala et al. (1981), em que as depsidonas são derivadas de depsídeos através de acoplamento fenólico de benzofenonas, tendo como intermediário espirobenzofurano-3-ona. Entretanto, nenhum desses intermediários ocorrem naturalmente em liquens, embora seja um processo energeticamente favorável (fig. 17)(Sala et al., 1981, Culberson, 1986).

Embora não sejam conhecidos *para*-depsídeos contendo uma cadeia lateral oxidada no anel B, ocorrem alguns exemplos desse tipo de substituinte ligado ao anel A, como é o caso do *para*-depsídeo ácido olivetórico [49] (Elix et al. 1984). Se essa oxidação

ocorre na posição 3, subseqüentes rearranjos do *para*-depsídeo formado conduzem à *meta*-depsídeos por migração do grupo acila (Elix et al., 1986). Se ocorrer oxidação na posição 5' seguida por uma migração de acila, e subseqüente rearranjo tipo Smiles do *meta*-depsídeo formado, poderá conduzir às correspondentes depsidonas derivadas do orcinol (figura 18) (Elix et al., 1987). Os autores consideraram que tal rota poderia estar envolvida na biossíntese desses compostos.

Diferenças estruturais entre depsídeos e depsidonas não necessariamente ocorrem após ciclização. Por exemplo, o ácido fumarprotocetrárico [50] pode ter originado por inserção do ácido fumárico na posição 3 do ácido orselínico (na forma de 3-metil-ácido orselínico) dando origem ao anel B do ácido fumarprotocetrárico (figura 19), ou por esterificação direta do ácido fumárico ao grupo $-CH_2OH$ do anel B do ácido protocetrárico [51] (figura 20) (Vicente et al., 1989).

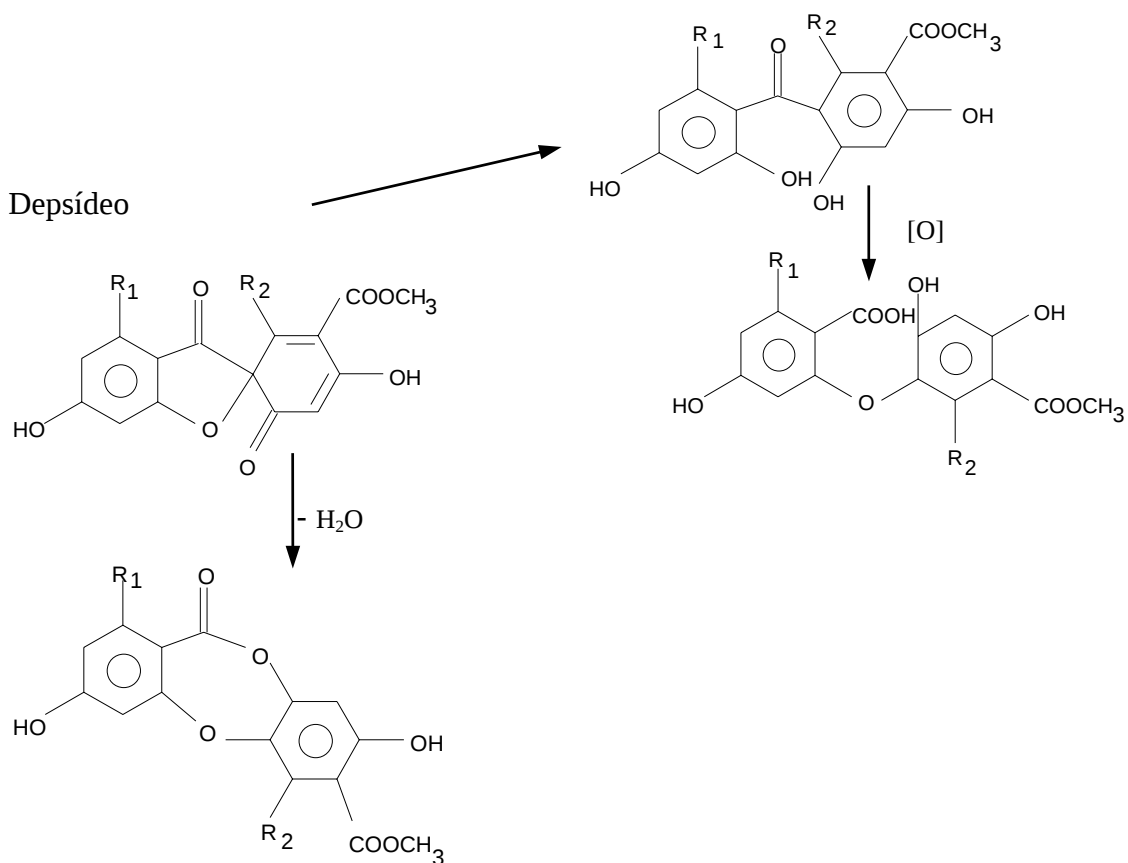


Figura 17 - Formação de depsidonas a partir de depsídeos por acoplamento fenólico de benzofenonas, segundo Sala et al. (1981).

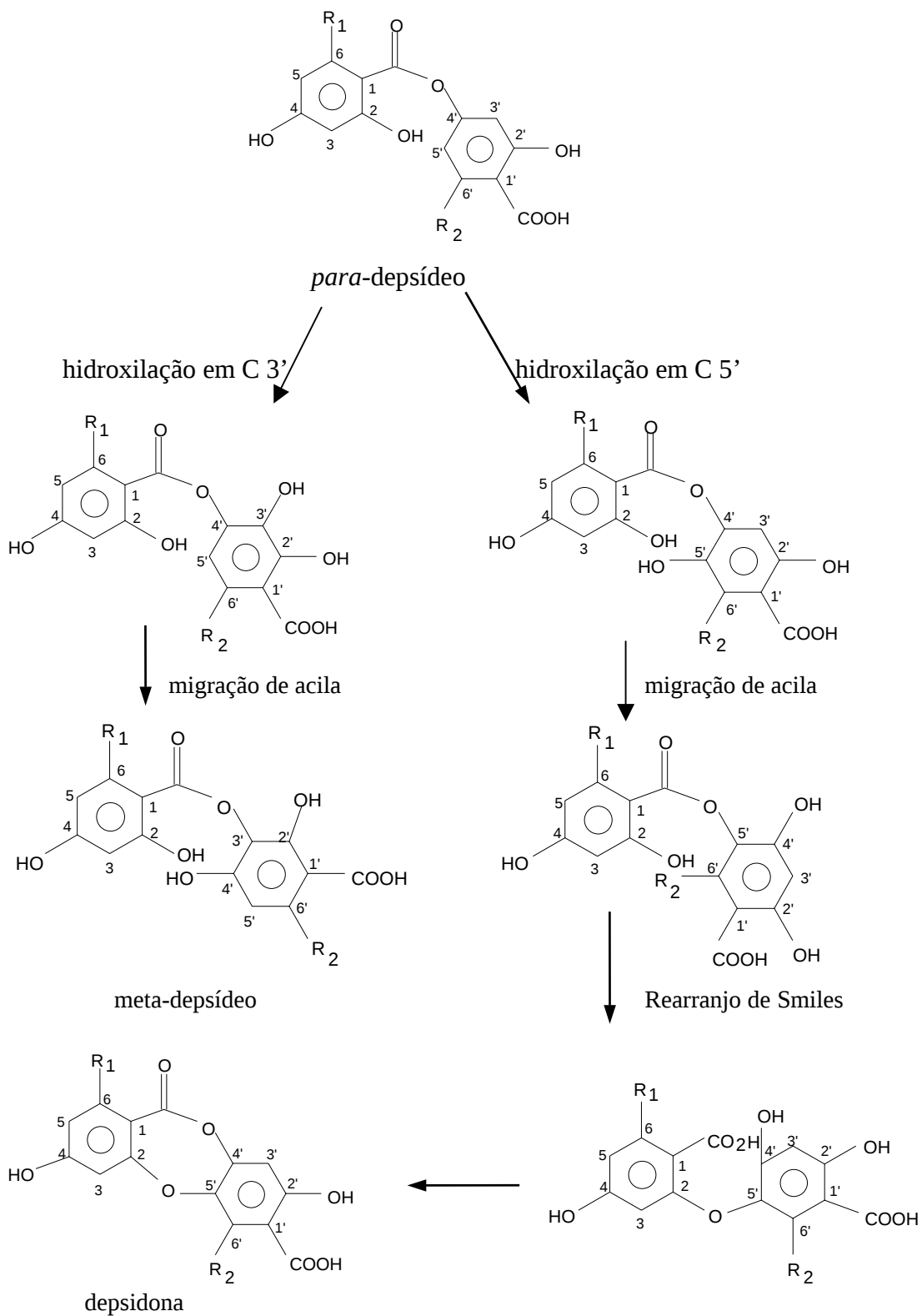


Figura 18 - Reações de obtenção de *meta*-depsídeos e depsidonas a partir da hidroxilação e rearranjo de *para*-depsídeos (Elix et al. 1987).

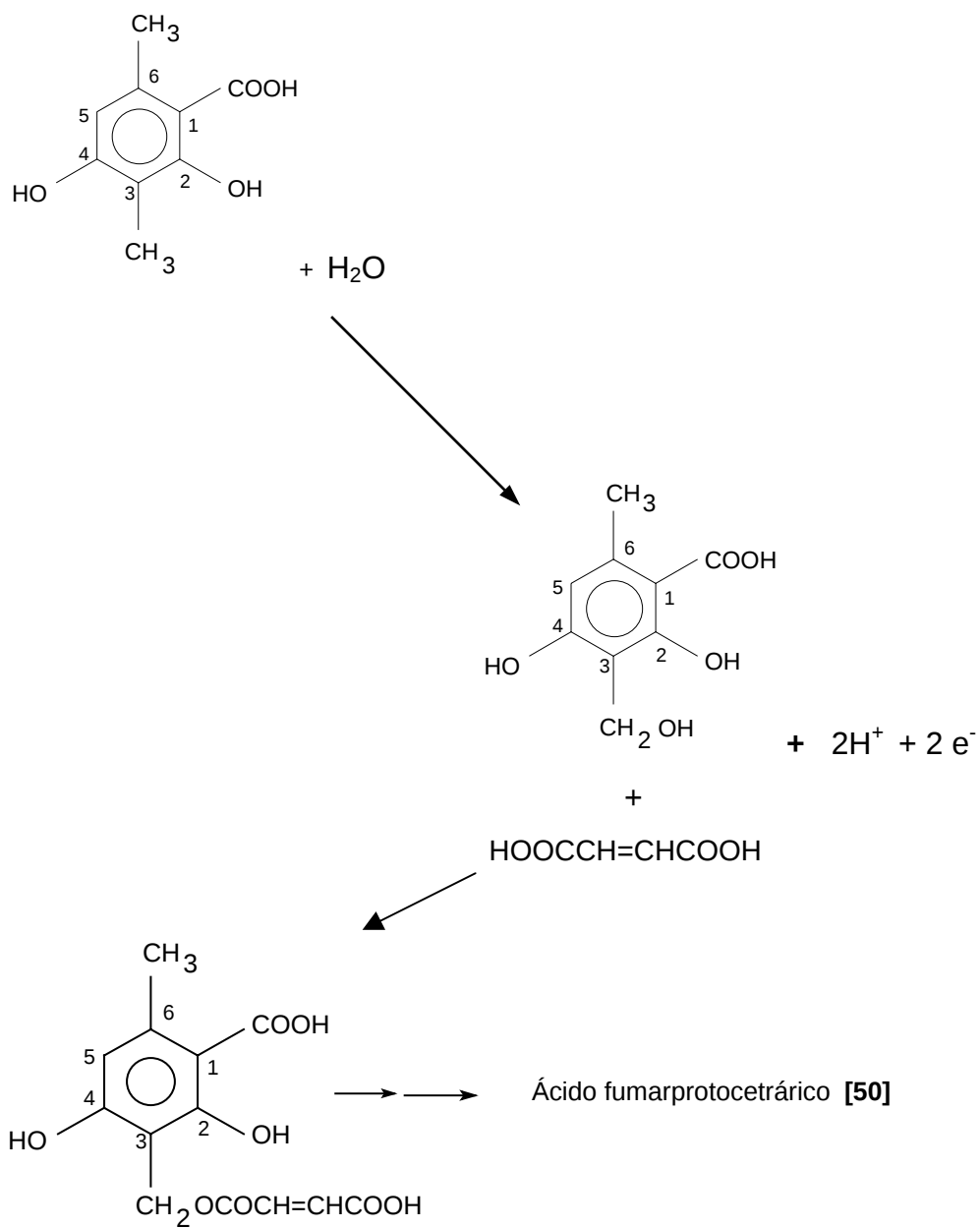


Figura 19 - Reação entre 3-metil ácido orselínico e ácido fumárico para obtenção do ácido fumarprotocetrário [50].

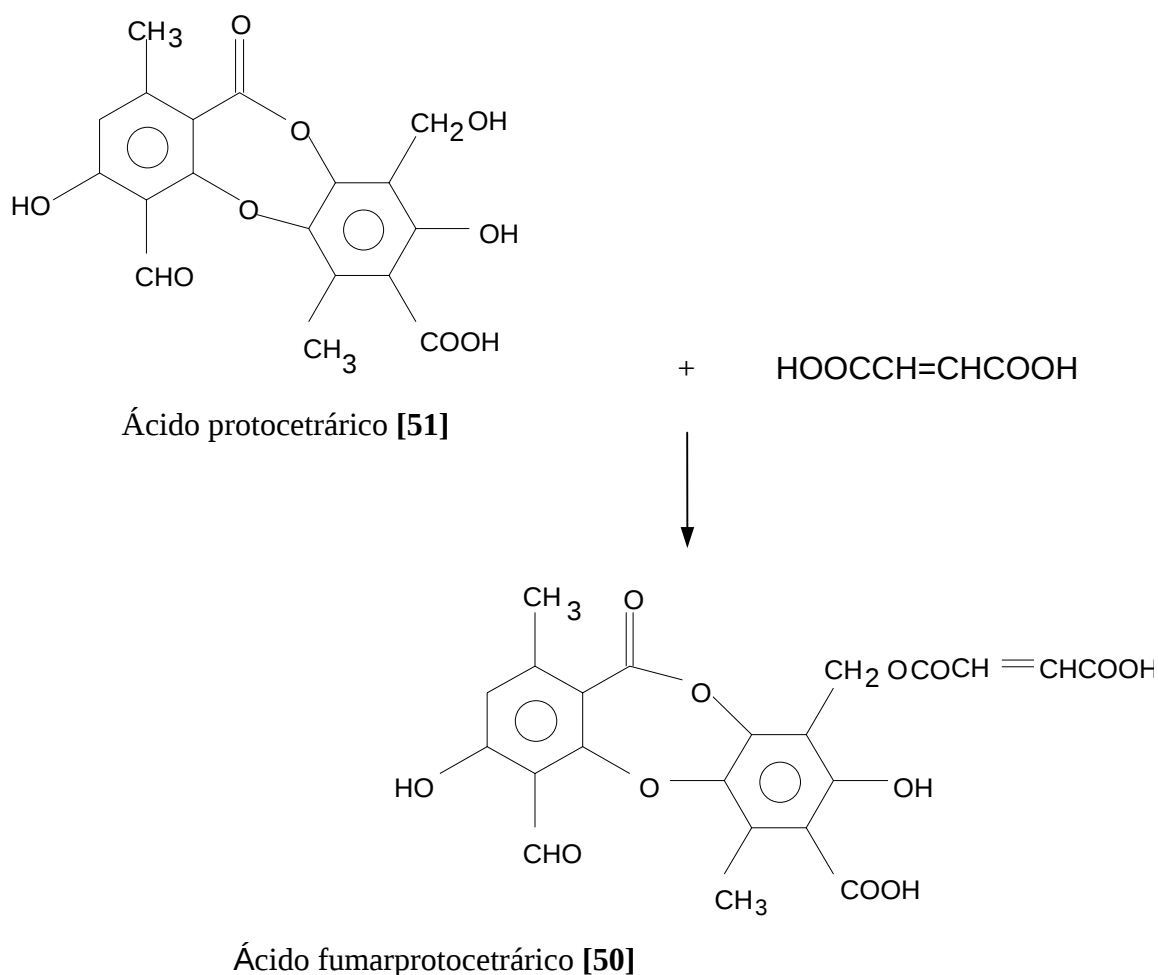
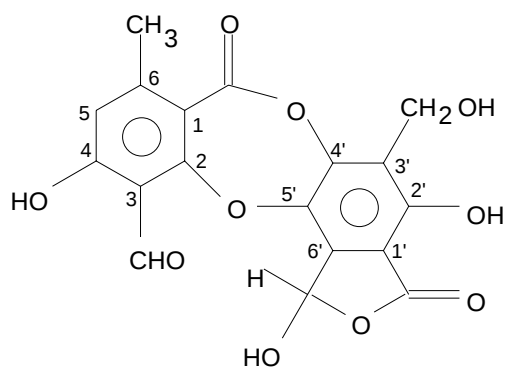
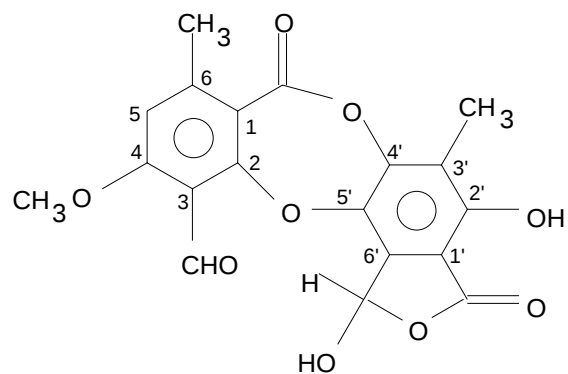


Figura 20 - Reação de formação do ácido fumarprotocetrário por esterificação do grupo CH₂OH da posição 3' do ácido protocetrário com ácido fumárico.

As depsidonas originárias do β-orcinol são mais complexas do que aquelas derivadas do orcinol. Pode ocorrer em alguns compostos um anel heterocíclico com oxigênio entre os substituintes das posições 1'e 6', se estes forem grupamentos carboxila e aldeído, respectivamente. Esse tipo de ciclização ocorre nos ácidos salazínico [52], estítico [53] e norstítico [6].



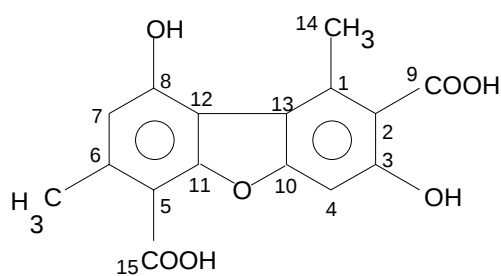
Ácido salazínico [52]



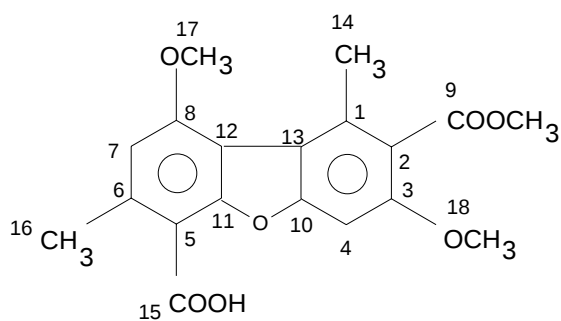
Ácido estútico [53]

Dibenzofuranos

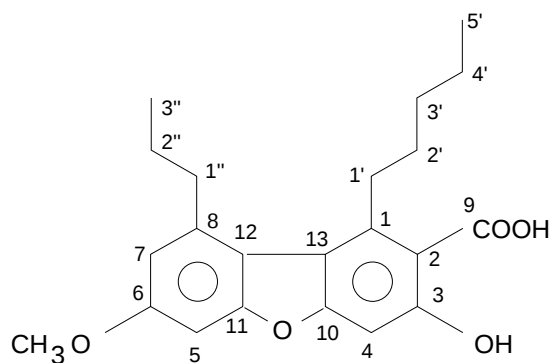
A característica estrutural desse grupo de substâncias é a ligação carbono-carbono e uma ligação éter entre duas unidades fenólicas. A ligação éter é formada a partir de grupos hidroxilas nas posições 11 e 10 da primeira e segunda unidades fenólicas, respectivamente. Os dibenzofuranos podem ser divididos em dois grupos : um deles engloba os compostos que apresentam grupo carboxila na posição 5 do primeiro anel, como os ácidos panárico [54] e chizopéltico [55], e o outro em que esse grupo não está presente nessa posição, como nos ácidos dídimico [56] e hipostrepisílico [57] (Shibata et al., 1984; Carvalho et al., 1984; Huneck et al., 1996).



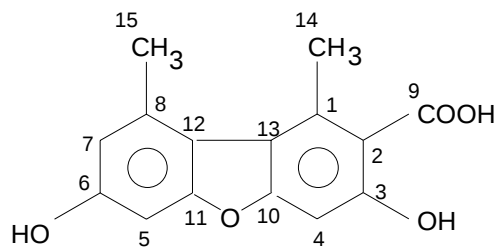
Ácido panárico [54]



Ácido chizopéltico [55]



Ácido dídímico [56]



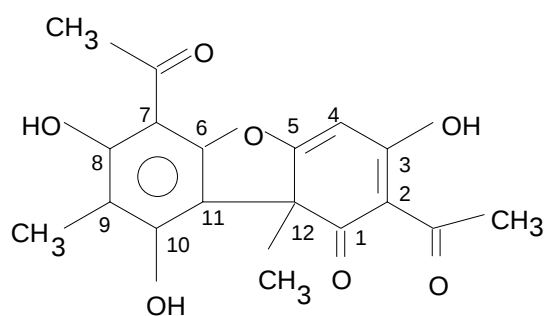
Ácido hipostrepisílico [57]

Ácidos Úsnicos

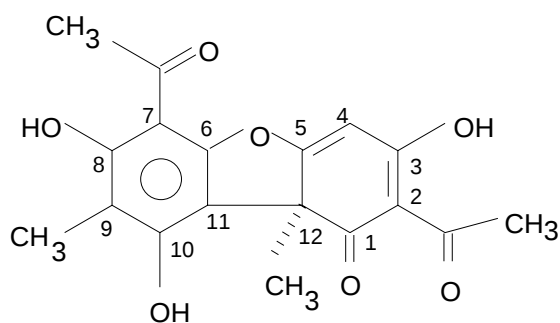
Uma das substâncias liquênicas mais conhecidas é o ácido úsnico. Foi isolado pela primeira vez de *Ramalina calicaris*, de *Usnea barbata* e de outras espécies de líquens, em 1834, por Rochleder et al. (Vicente, 1975). Apresenta-se em duas formas isoméricas: ácido D-úsnico $[\alpha]_D^{20} + 495^\circ$ e L-úsnico $[\alpha]_D^{20} - 495^\circ$.

Em 1967, Shibata et al. isolaram de *Cladonia mitis* e *Cladonia arbuscula* o ácido D-isoúsnico $[\alpha]_D^{20} + 510^\circ$ e de *Cladonia pleurosta* o ácido L-úsnico $[\alpha]_D^{20} - 490^\circ$. Os ácidos úsnicos [2a] e [2b] são largamente distribuídos em líquens, enquanto que os ácidos isoúsnicos [2c] e [2d] são de distribuição restrita (Vicente, 1975).

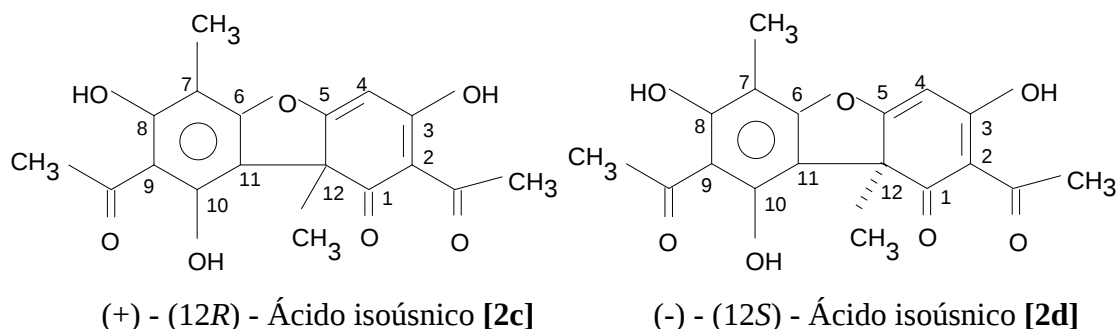
Embora muitos autores classifiquem os ácidos úsnicos como um grupo de dibenzofuranos, considera-se que sejam formados pela ciclização do tipo floroglucinol e não do tipo orselínica, típica de dibenzofuranos (Vicente, 1975; Culberson, 1969).



(+) - (12R) - Ácido úsnico [2a]



(-) - (12S) - Ácido úsnico [2b]



A cadeia poliketídica (ácido 3,5,7-tricetooctanóico ligado a uma enzima) resultante da condensação de 1 mol de acetilSCoA e 3 moles de malonilSCoA, por uma condensação do tipo Claisen, dá origem ao acetilfloroglucinol (metilfloroacetofenona), que é precursor dos ácidos úsnicos (Mosbach, 1973).

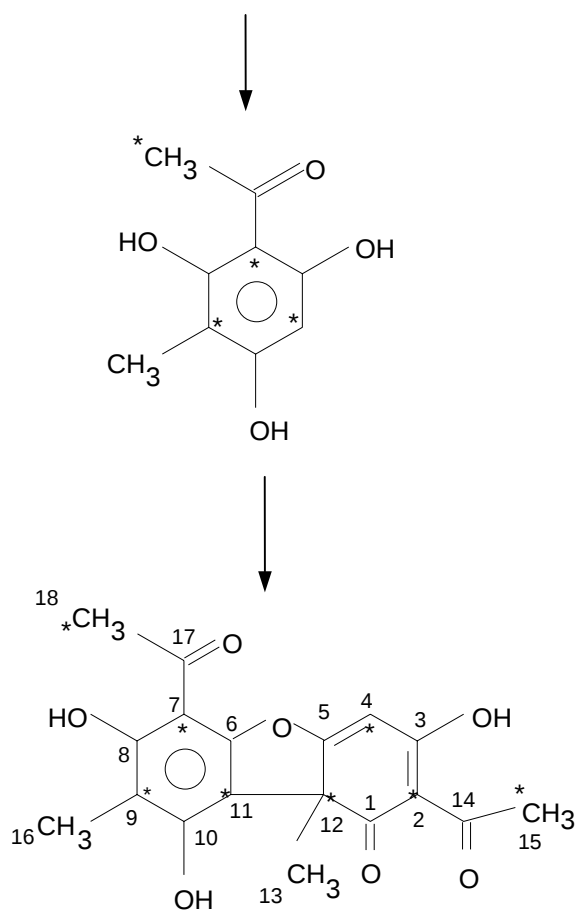
A biossíntese do ácido úsnico foi estudada por Taguchi et al. (1966), usando várias espécies líquênicas e quatro precursores marcados : [1- ^{14}C] acetato, [2- ^{14}C]malonato, $^{14}\text{CH}_3\text{-CO-fluoroacetofenona}$ e $^{14}\text{CH}_3\text{-CO-metilfluoroacetofenona}$ (figuras 21 e 22).

Quando 1- ^{14}C -acetato foi usado, o ácido úsnico incorporou radioatividade nas posições 2, 4, 7, 9, 11, 12, 15 e 17, enquanto que ao usar 2- ^{14}C -malonato os grupos metilas das posições 15 e 15' não estavam marcados. Isto significa que o grupo CO-CH_3 em cada unidade fenólica deriva do acetato (figura 21).

Resultados coincidentes com esses foram encontrados por Fox et al. (1969) para a síntese do ácido úsnico por *Cladonia sylvatica* suplementada com $^{14}\text{CO}_2$.

A utilização alternativa de floroacetofenona ou metilfloroacetofenona radioativas como precursores, resolveu outro ponto importante no quadro biossintético dos ácidos úsnicos. Quando se empregava metilfloroacetofenona $\text{-CO-}^{14}\text{CH}_3$, o ácido úsnico isolado apresentava-se marcado nos grupos CO-CH_3 das duas unidades fenólicas. Porém, quando o precursor era floroacetofenona marcada na mesma posição, o ácido úsnico isolado não era radioativo em nenhum dos seus carbonos (Figura 22) (Geissman et al. 1969).

Entretanto, quando se administrava ao líquen floroacetofenona e formato, ambos radioativos, o ácido úsnico formado apresentava radioatividade (figura 23).



Ácido úsnico [2]

Figura 21 - Biossíntese do ácido úsnico [2] a partir de [1-¹⁴C]acetato e [2-¹⁴C] malonato.

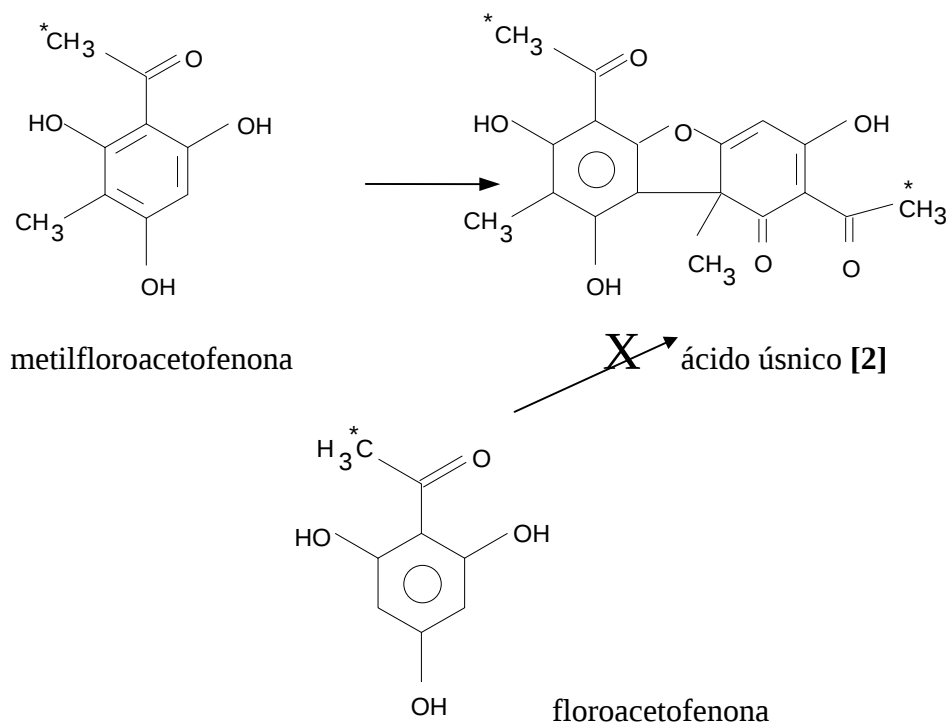


Figura 22-Utilização alternativa de metilfloroacetofenona e floroacetofenona na biossíntese de ácido úsnico [2].

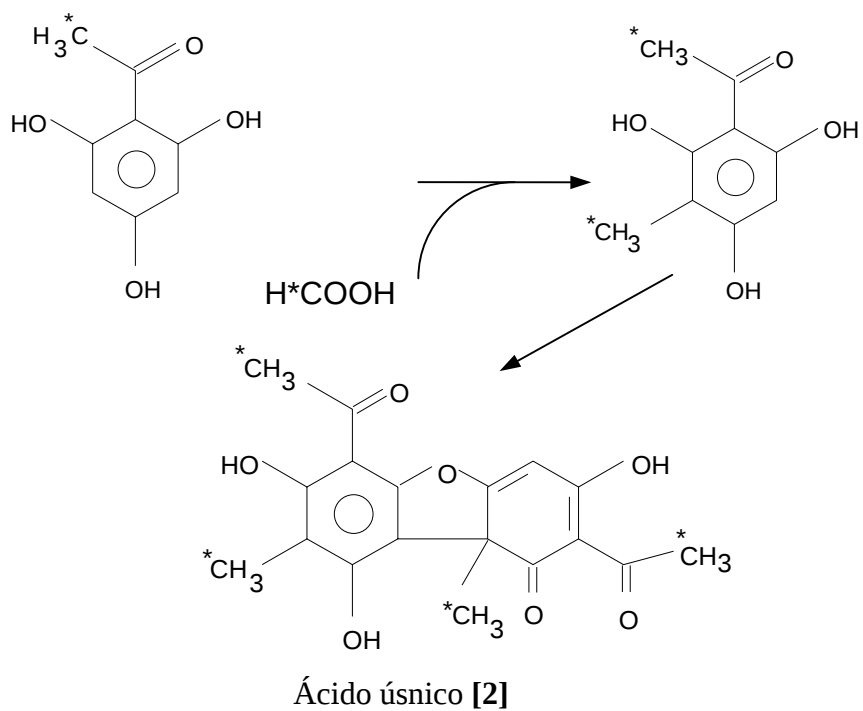
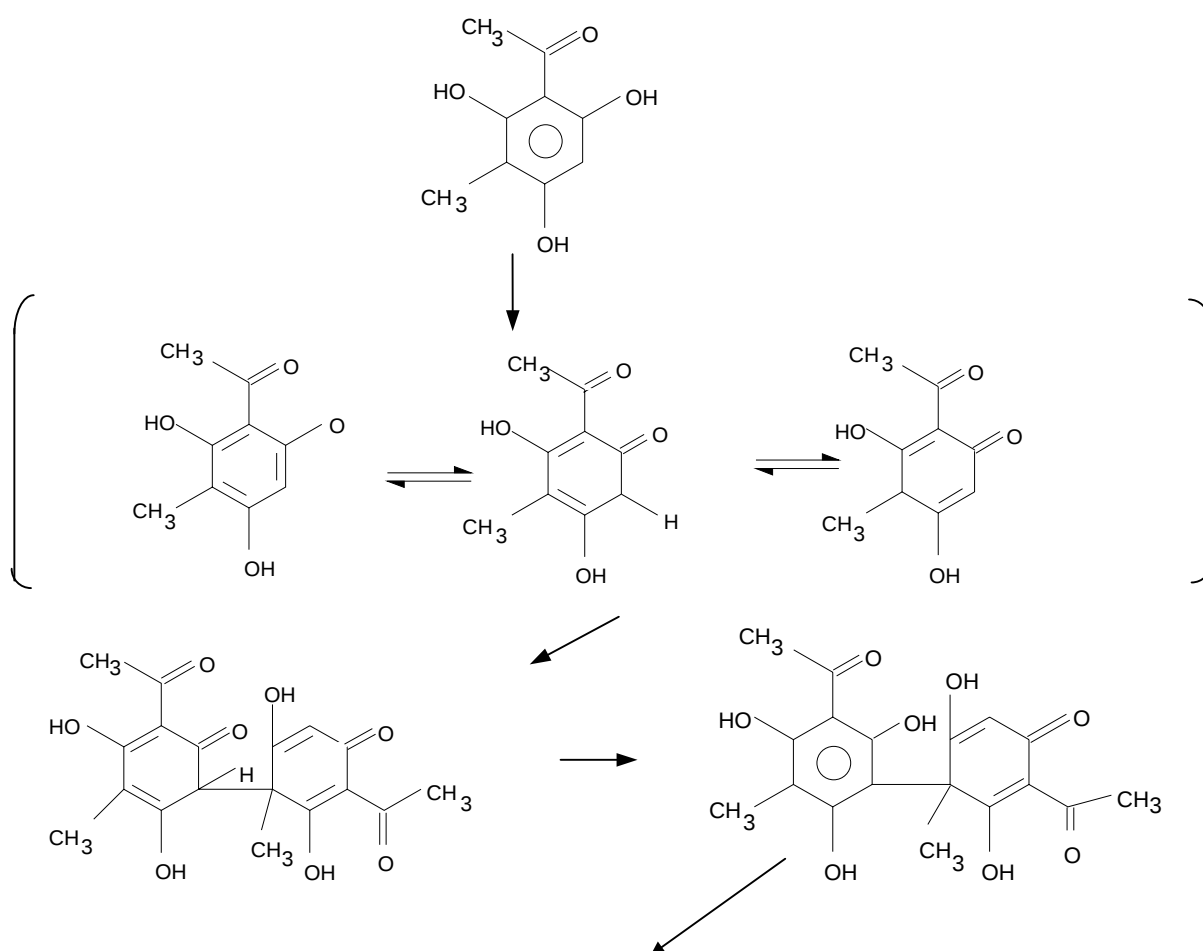


Figura 23 - Reação biossintética de obtenção ácido úsnico [2] a partir de floroacetofenona e formato radioativos.

Esse fato indicou que a formação do anel furânico entre as duas unidades fenólicas requer a adição prévia de uma unidade de 1 carbono, visto que os fenóis não substituídos não são substratos da reação enzimática de ciclização. Ambos os substituintes metila aparecem marcados nos ácidos úsnicos, quando o líquen dispõem de formato radioativo administrado de forma exógena (figura 23).

A formação da ligação C - C ocorre de maneira idêntica como na formação de outros dibenzofuranos, envolvendo possivelmente a formação de radicais livres. Uma reação subsequente de desidratação conduz à formação da ligação éter do anel furânico (Geissman et al., 1969). A reação é catalisada por fenol oxidases ou por peroxidases (Luckner, 1990) (figura 24).



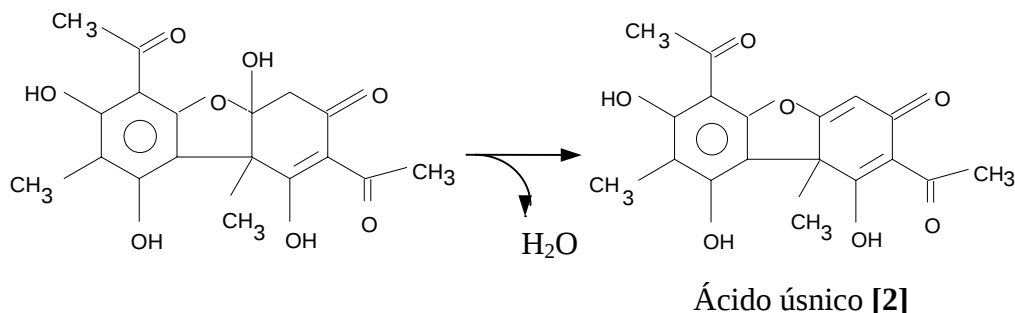


Figura 24 -Reações da biossíntese do ácido úsnico [2] a partir de metilfloroacetofenona via radicais livres.

Cromonas, xantonas, naftoquinonas, antronas e antraquinonas

Compostos pertencentes a essas classes também ocorrem em líquens, porém não são exclusivos desses organismos. São compostos freqüentemente idênticos a produtos biossintetizados por fungos de vida livre, ou por plantas superiores.

A biossíntese de compostos análogos provenientes de fungos de vida livre é bem estudada, e é possível se estabelecer um paralelo da biogênese desses compostos entre fungos liquenizados e não liquenizados (Rikkinen, 1995).

As rotas biossintéticas propostas envolvem também a formação de um policetídeo intermediário resultante da condensação de 1 mol de acetilSCoA com um número variável de moléculas de malonilSCoA. Cromonas podem ser formadas pela condensação de 1 mol de acetilSCoA com 4 ou com 8 moles de malonilSCoA, resultando rupicolina [58] e sifulina [59] (figuras 25 e 26).

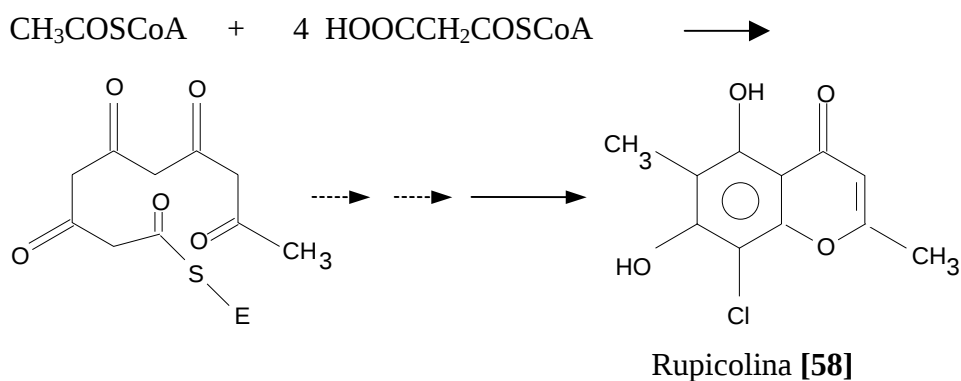


Figura 25 - Reações envolvidas na biossíntese de rupicolina [58] a partir de acetilSCoA e malonilSCoA.

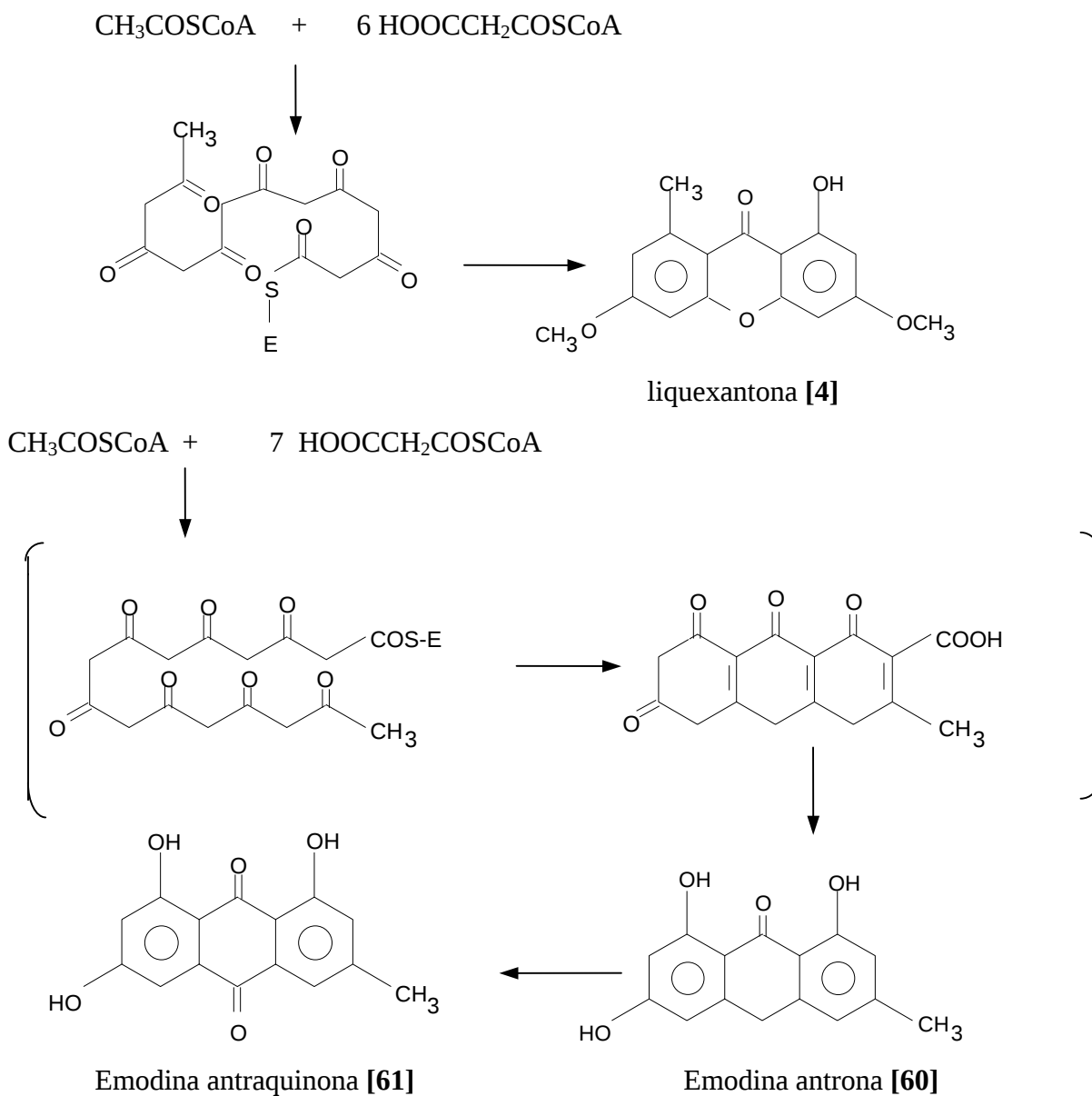
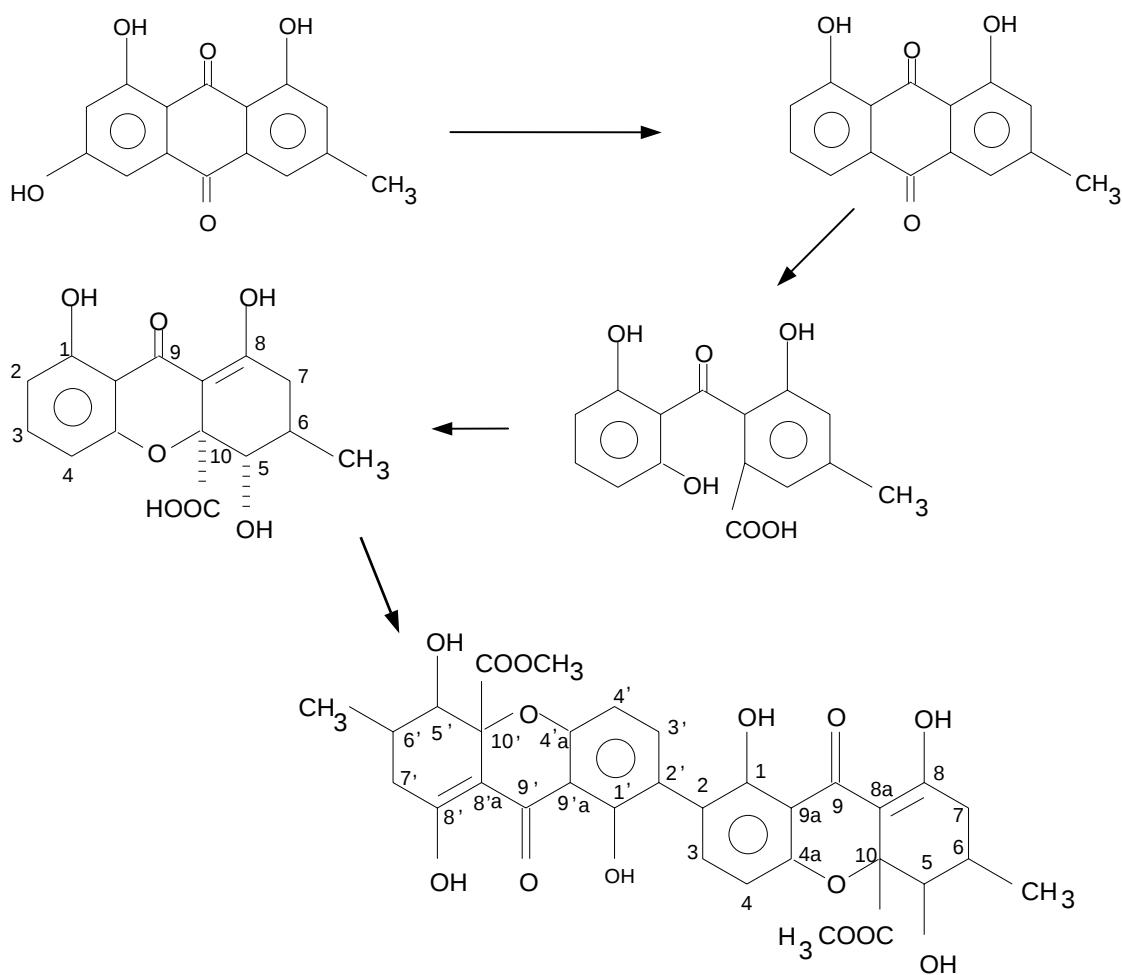


Figura 27 - Reações envolvidas na biossíntese de xantonas, antronas e antraquinonas a partir de acetilSCoA e malonilSCoA.

As antronas são facilmente oxidadas às antraquinonas. As antraquinonas e seus derivados são produtos do metabolismo de fungos (*Aspergillus* e *Penicillium* sp.), líquens, basidiomicetos e plantas superiores. Clivagens oxidativas do anel B de antraquinonas produzem derivados da benzofenona que são transformados em xantonas (Luckner, 1990).

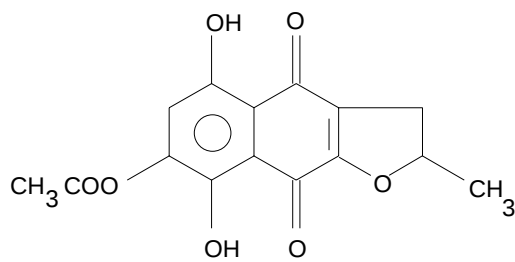
A dimerização de xantonas produzindo os ácidos secalônicos ocorre, provavelmente, via fenol oxidases, ou por radicais derivados de peroxidases (Luckner, 1990).



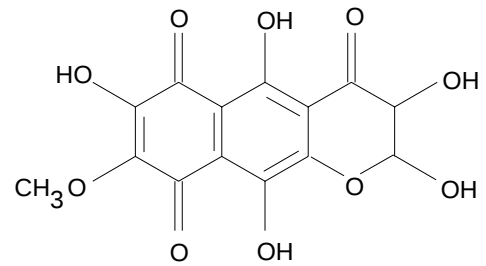
Ácido secalônico [62]

Figura 28 - Reações envolvidas na biossíntese de xantonas. A primeira etapa mostra a formação de xantonas por clivagem oxidativa do anel B de antraquinonas pela ação de deidroxilases e a segunda etapa a obtenção de ácido secalônico por dimerização de xantonas.

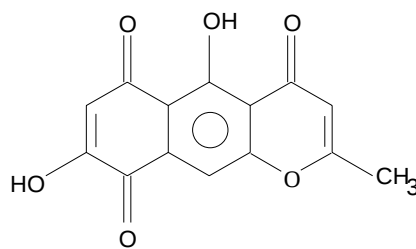
Hemaventosina [5], ácido quiodectônico [63] e canariona [64] são exemplos de naftoquinonas que ocorrem em líquens. Hemaventosina [5] é um pigmento vermelho presente nos apotécios de *Haematomma ventosum*. Ácido quiodectônico [63] e canariona [64] foram isolados de *Chiodecton sanguineum* (Sw.) Vain., e de *Usnea canariensis*, respectivamente (Huneck, 1973; Elix et al., 1984).



Hemaventosina [5]



Ácido quiodectônico [63]

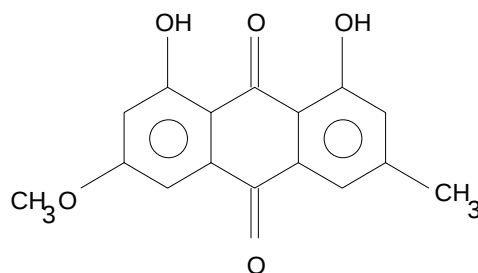


Canariona [64]

As antraquinonas são pigmentos amarelos, vermelhos ou de cor laranja encontrados em líquens, particularmente nos gêneros *Xanthoria* e *Caloplaca*.

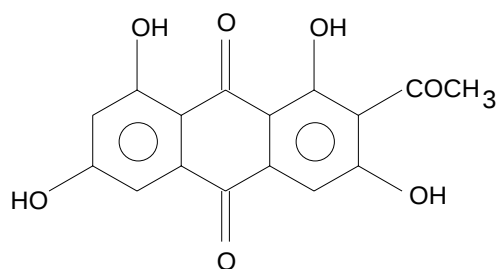
Atualmente, são conhecidas cerca de 40 antraquinonas isoladas de líquens, embora algumas ocorram também em fungos não liquenizados (Hale, 1983).

A substância mais conhecida desse grupo é a parietina ou fisciona [65], encontrada não só em líquens, mas também em fungos e em plantas superiores.

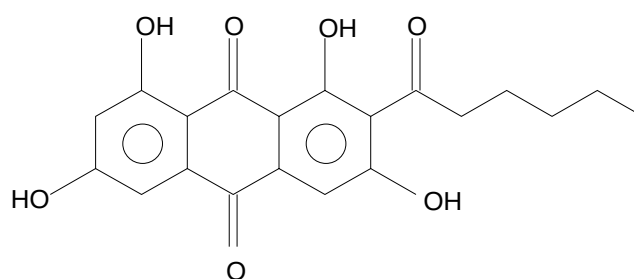


Parietina ou fisciona [65]

Recentemente, Huneck et al. (1991) isolaram dos apotécios de *Haematomma puniceum* um pigmento vermelho que foi denominado hematomona [66] e que se assemelha ao ácido norsolorínico [67].

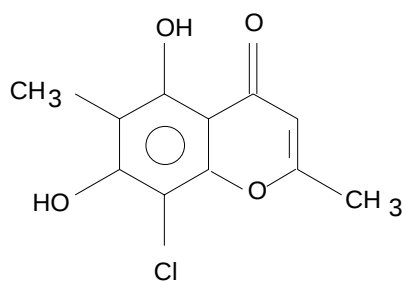


Hematomona [66]

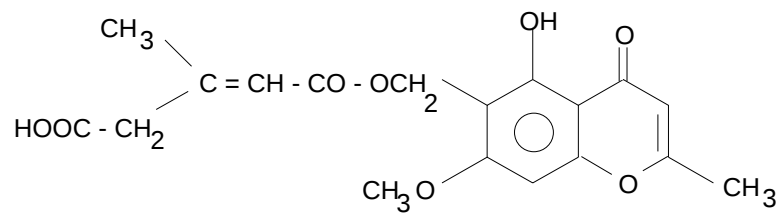


Ácido Norsorolínico [67]

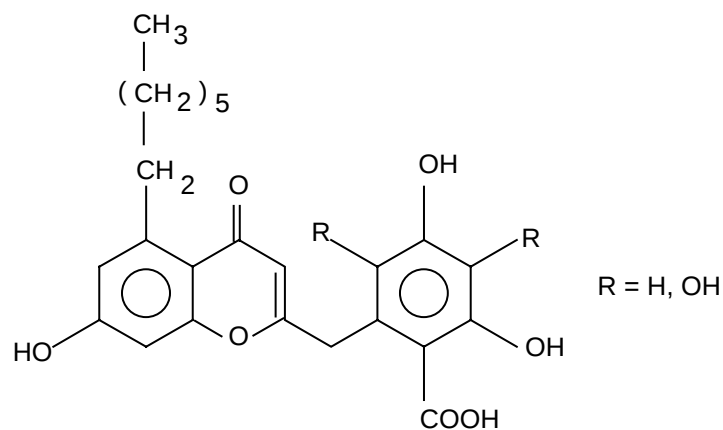
Sordidona [68], sifulina [59] e ácido leprárico [69] são as cromonas conhecidas como componentes de algumas espécies liquênicas. Sifulina apresenta dois derivados, oxisifulina [70] e protosifulina [71], que foram isolados de *Siphula ceralites* (Aberhart et al., 1969; Shimada et al., 1980).



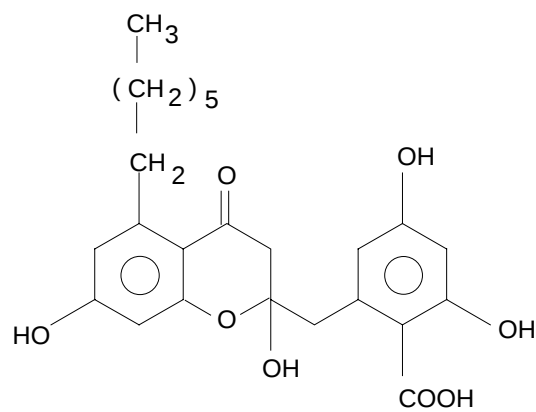
Sordidona [68]



Ácido leprárico [69]

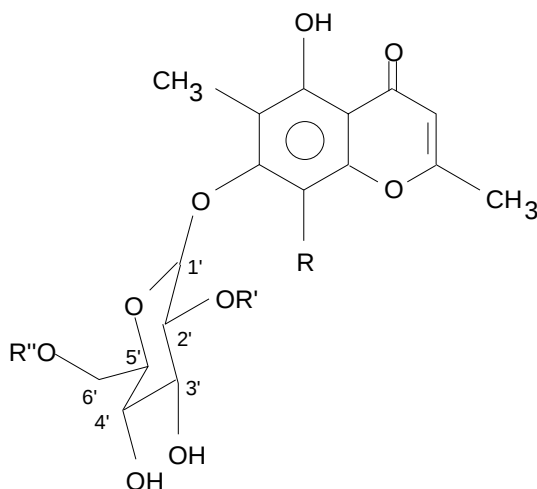


Oxisifulina [70]



Protosifulina [71]

Em líquens ocorrem também alguns glicosídeos. De *Rocellaria mollis* (Hampe) Zahlbr., *Schismatomma accedens* (Nyl.) Zahlbr. e *Rocella galepagoensis* Follm. foram isolados os glicosídeos rocelina [72], molina [73] e galapagina [74], cuja aglicona é uma cromona (Huneck, 1973).



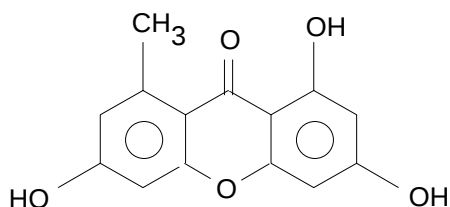
Rocelina [72] $R = H$; $R', R'' = Ac$

Molina [73] $R, R'' = H$; $R' = Ac$

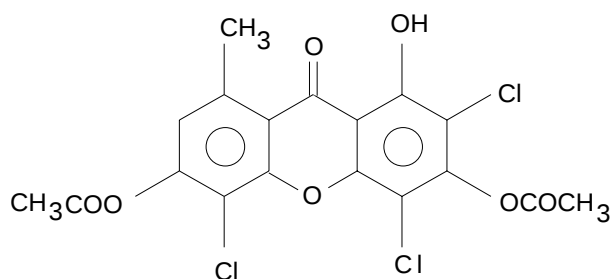
Galapagina [74] $R = CH_3$; $R' = H$; $R'' = Ac$.

As xantonas isoladas de líquens são derivadas da norliquexantona [75] (Huneck, 1973). Seis desses compostos variam somente em relação ao grupo de O-metilação e à presença de cloro no anel. Entretanto, uma delas, a eritromona [76], isolada de *Haematomma erytromma* é o primeiro exemplo de xantona líquênica O-acetilada (Elix et al., 1984).

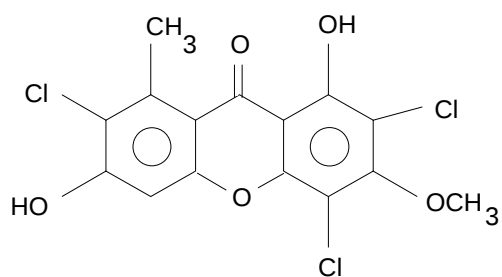
As xantonas conhecidas, além da norliquexantona [75], são a turigiona [77], ácido tiofânico [78], ácido tiofanínico [79], artotelina [80], liquexantona [4], 2,4-dicloronorliquexantona [81], 2,7-dicloronorliquexantona [82] e outras.



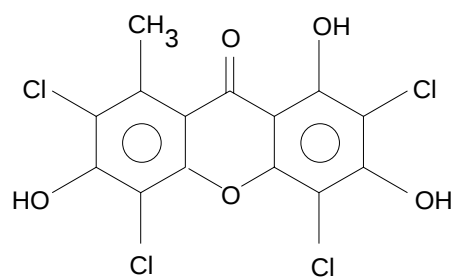
Norliquexantona [75]



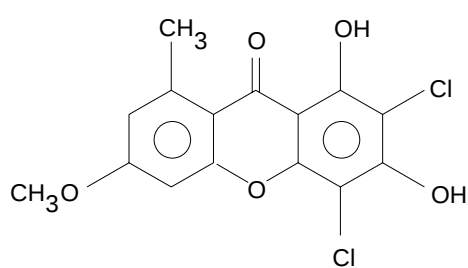
Eritromona [76]



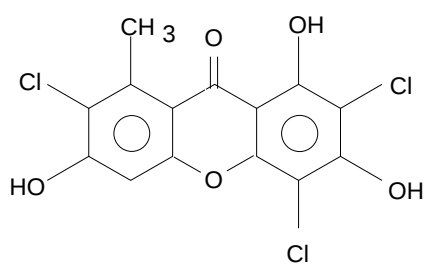
Turingiona [77]



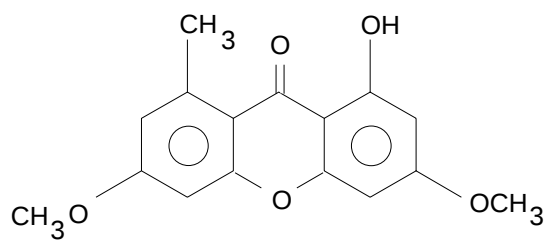
Ácido tiofânico [78]



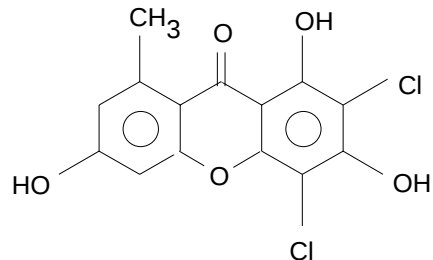
Ácido tiofanínico [79]



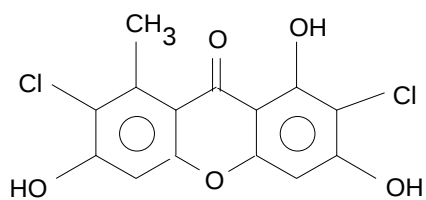
Artotelina [80]



Liquexantona [4]



2,4-dicloronorliquexantona [81]



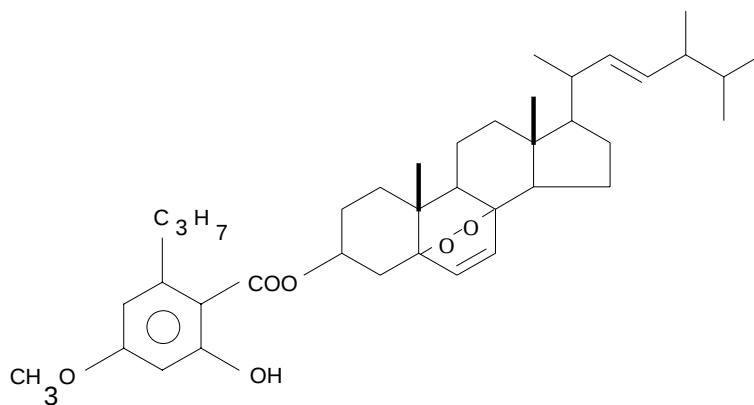
2,7-dicloronorliquexantona [82]

Derivados da via do mevalonato

Esteróis e terpenos

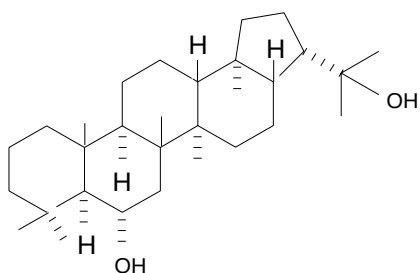
Esteróis e terpenos não são tão freqüentes em líquens quanto em plantas superiores. Ergosterol, fitosterol e β -sitosterol são exemplos de esteróis conhecidos por ocorrerem em algumas espécies de líquens. Fungisterol foi isolado de *Pseudoevernia furfuraceae* por Zellner em 1935 (Culberson, 1969).

Outros compostos derivados do ciclopentanoperidrofenantreno também são conhecidos, incluindo divaricatinato de peroxi ergosterila [83] isolado de *Haematomma ventosum* (Elix et al., 1984).

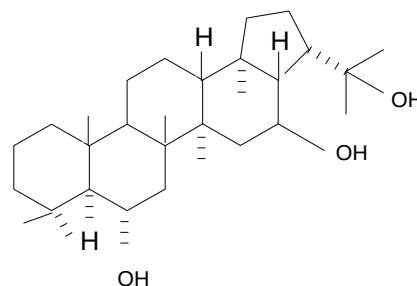


Divaricatinato de peroxi ergosterila [83]

Triterpenos constituem o maior número de compostos entre os terpenos isolados de líquens. Nesta classe de compostos estão incluídos zeorina [84], o mais conhecido triterpeno isolado de líquens, leucotilina [85], que difere da zeorina pela presença de uma hidroxila com configuração β na posição 16 e, um número de compostos derivados desses por hidroxilação, acetoxilação e oxidação do grupo metila (Elix et al. 1984).

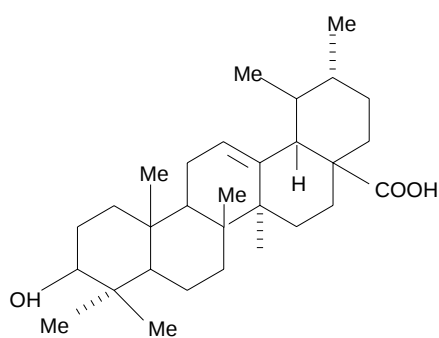


Zeorina [84]

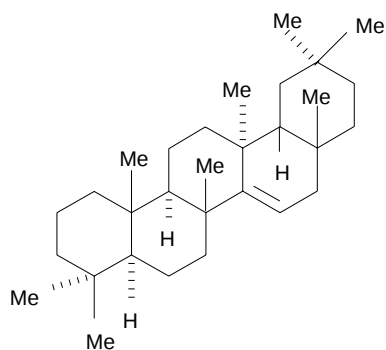


Leucotilina [85]

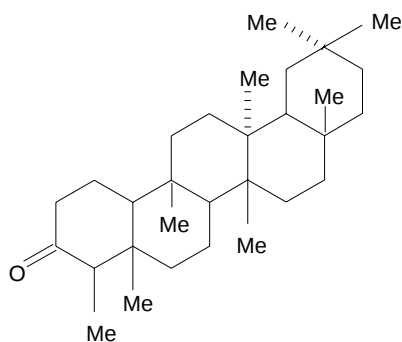
Compostos como ácido ursólico [86], taraxeno [87] e friedelina [88] ocorrem também em liquens.

Me = CH₃

Ácido ursólico [86]

Me = CH₃

Taraxeno [87]

Me = CH₃

Friedelina [88]

Embora não tenham sido relatados estudos da biossíntese desses compostos em líquens, considera-se que esse processo segue o modelo estabelecido, envolvendo a formação de ácido mevalônico a partir de 3 moléculas de acetilSCoA. Numa primeira etapa duas moléculas de acetilSCoA se condensam e origina a acetoacetilSCoA. A acetoacetilSCoA se condensa com outra molécula de acetilSCoA e dá formação ao β-hidróxi-β-metilglutarilSCoA. Este, em duas etapas sucessivas de redução pelo NADPH, dá origem ao ácido mevalônico (Geissman, 1969; Torssel, 1989). (Figura 29).

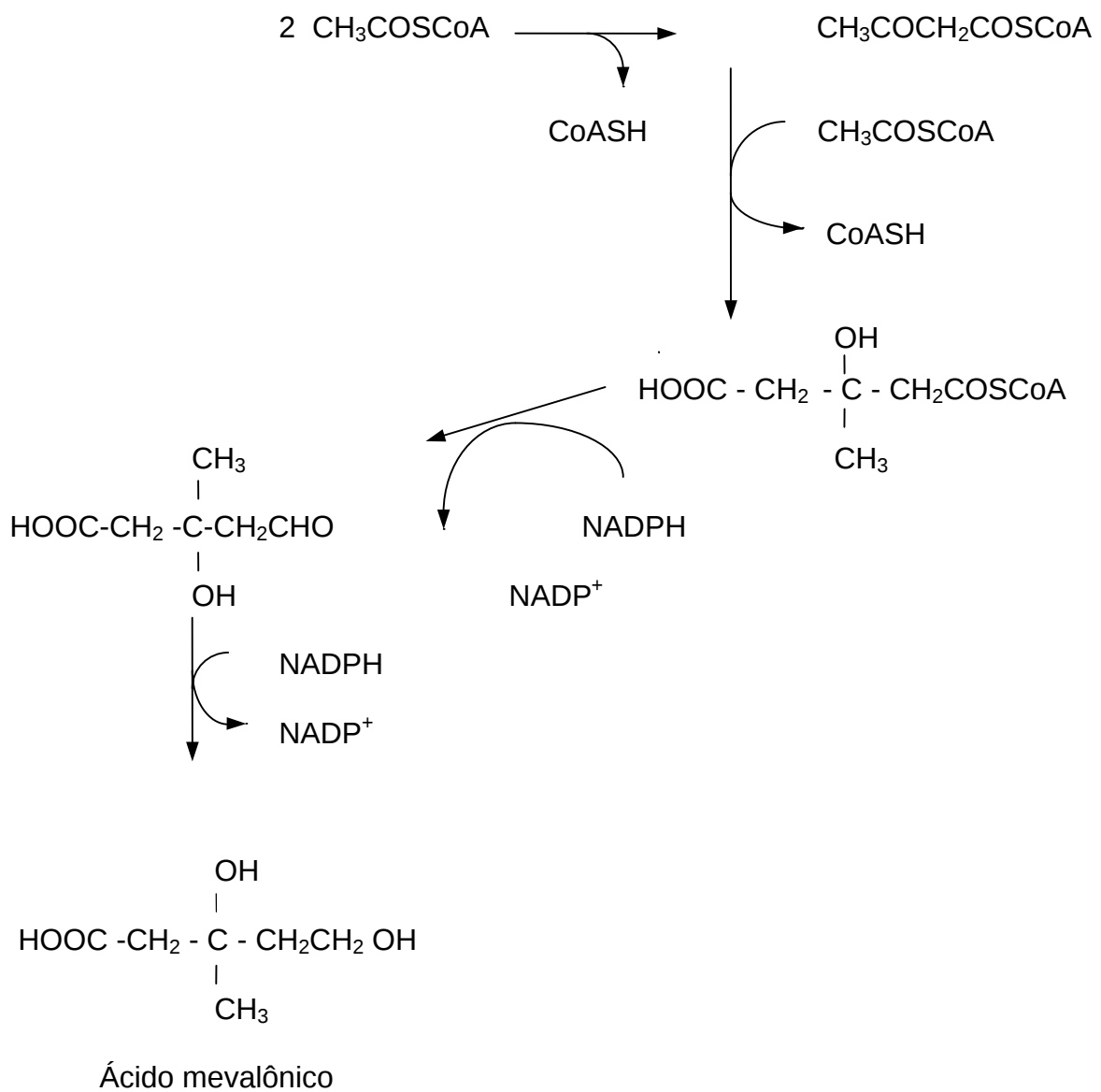


Figura 29 - Reações biossintéticas de formação do ácido mevalônico.

O ácido mevalônico é ativado pela ação de ATP em ácido mevalônico pirofosfato, e por descarboxilação e desidratação transforma-se em pirofosfato de isopentenila, precursor biossintético dos compostos derivados do isopreno (Figura 30).

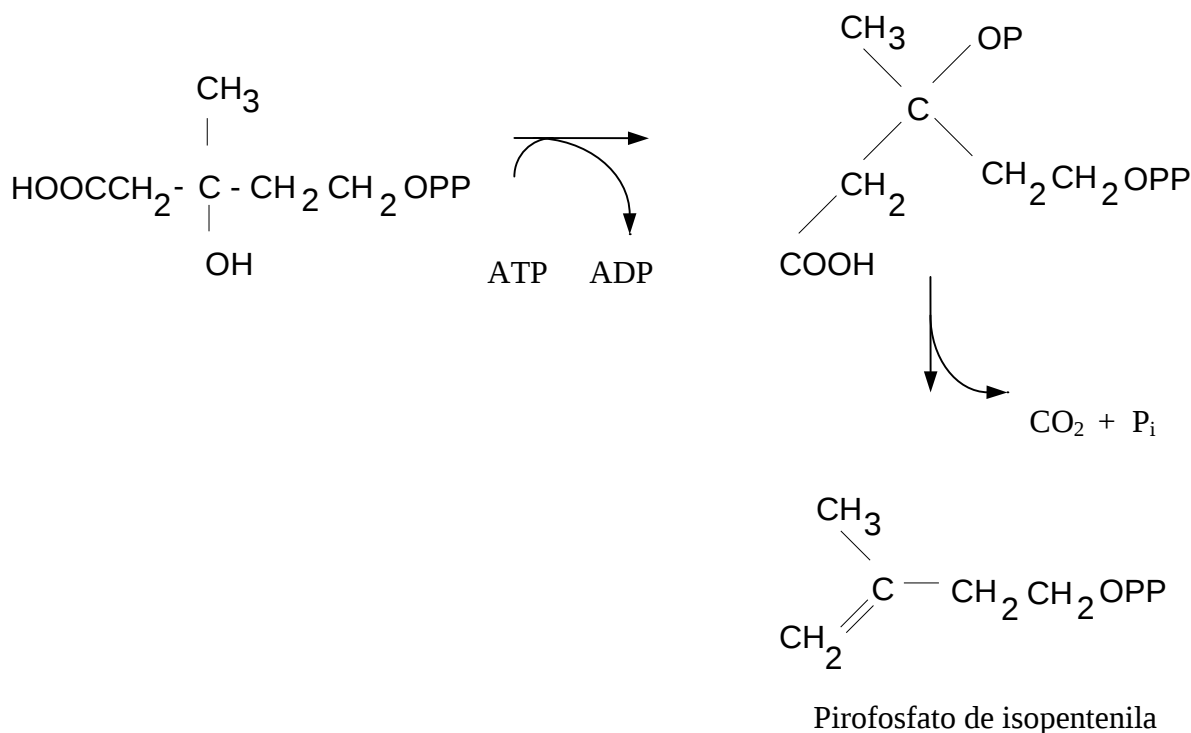


Figura 30 - Reações de formação de pirofosfato de isopentenila a partir de pirofosfato de malonila.

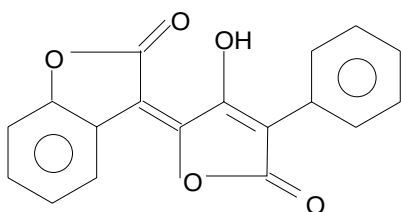
A condensação entre unidades de pirofosfato de isopentenila (isopreno) conduz à formação de monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), triterpenos (30 C) e outros (Geissman et al., 1969; Luckner, 1990; Torssell, 1989).

Até o momento, foram isolados de liquens, aproximadamente, 70 compostos derivados da via do ácido mevalônico, incluindo diterpenos, sesquiterpenos e triterpenos. Além desses, são conhecidos também 41 esteróis (Elix, 1996).

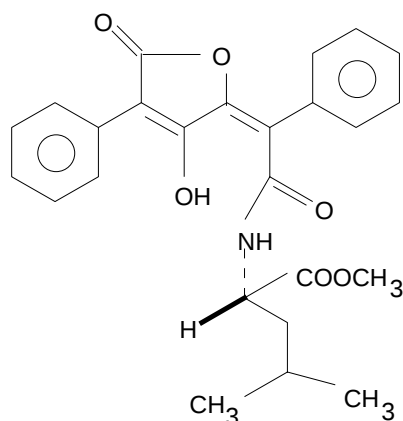
Via do ácido chiquímico

Derivados do ácido pulvínico

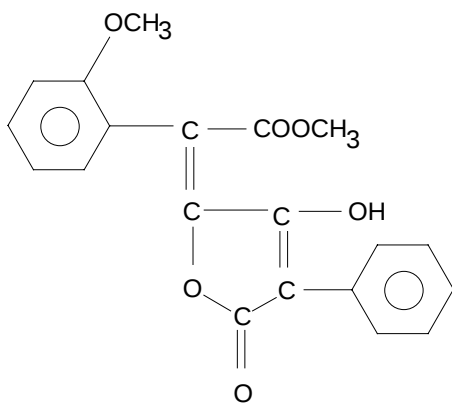
Os derivados do ácido pulvínico são pigmentos amarelos ou de cor laranja. Nesse grupo estão incluídos compostos, como calicina [89], epanorina [90], ácido leprapínico [91], ácido vulpínico [7] e outros.



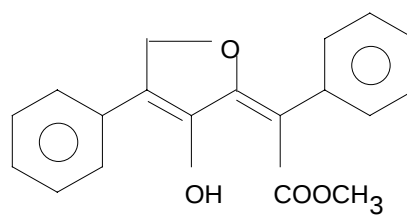
Calicina [89]



Epanorina [90]



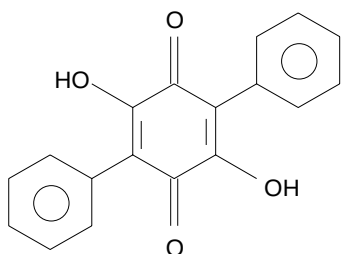
Ácido leprapínico [91]



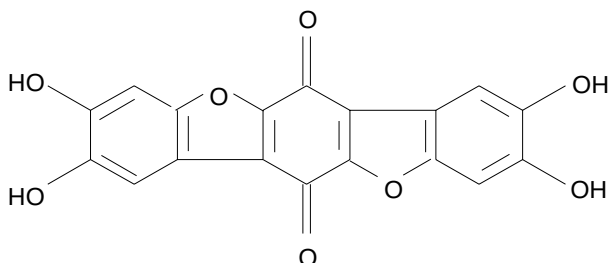
Ácido vulpínico [7]

Dos compostos obtidos de líquens, somente 02 são da classe das terfenilquinonas e 12 são derivados do ácido pulvínico. Esses compostos são biossintetizados pela via do ácido chiquímico, e seus intermediários são oriundos do fosfoenolpiruvato da via de Embden-Meyerhof, e eritrose-4-fosfato da via das pentose-fosfato. Ambos intermediários geram compostos fenilpropanóides, que se condensam, dando origem a compostos como os ácidos poliprónico [92] e telefórico [93] ou os derivados do ácido pulvínico (calicina [89],

epanorina [90], ácido leprapínico [91], ácido vulpínico [7] e outros) (Geissman et al., 1969, Rikkinen, 1995).



Ácido polipórico [92]



Ácido telefórico [93]

Os derivados do ácido pulvínico são pigmentos amarelos encontrados em alguns líquens, como em *Letraria vulpina*, *Rhizocarpum geographicum* e *Bryoria fremontii*. As terfenilquinonas são pigmentos de cor vermelha e púrpura e, até o momento, foram isolados somente de líquens da família Peltigerales (Rikkinen, 1995).

1.4 - TAXONOMIA E QUIMIOTAXONOMIA

Líquens são identificados ao nível de gêneros e espécies, por várias combinações de caracteres morfológicos de apotécios e talos.

Dados relativos apenas à análise morfológica muitas vezes, não elucidam a identificação de um dado espécime, mas aliados às informações obtidas sobre a provável composição química do espécime em estudo, podem conduzir a uma identificação mais segura.

A análise química, para fins de taxonomia, é realizada utilizando reações de coloração no talo, microcristalização, análise cromatográfica e análise por fluorescência. Dependendo da natureza do material em estudo, pode-se obter informações pelo uso de apenas uma das técnicas, ou se necessário, pelo conjunto delas. As reações de coloração no talo são as mais utilizadas pelos liquenologistas e podem, em geral, fornecer informações suficientes, que somadas àquelas de análise morfológica, conduzem à identificação de uma dada espécie.

O uso de informações químicas, para fins de taxonomia de líquens, deve-se ao fato de que esses organismos produzem muitos metabólitos secundários, os quais são em grande parte, exclusivos do referido grupo vegetal. Além desses, muitos outros compostos, tanto do metabolismo primário, quanto do secundário, são obtidos de líquens. Porém, muitos deles são comuns em fungos ou em plantas superiores.

A elucidação estrutural de compostos liquênicos resulta principalmente da combinação de métodos químicos clássicos e de técnicas espectroscópicas modernas. Entretanto, um grande número de informações disponíveis sobre a ocorrência de substâncias liquênicas é baseado em métodos microquímicos de análise (Elix, 1996).

- Reações de Coloração

Reagentes como hidróxido de potássio (K) e hipoclorito de cálcio (C), quando aplicados ao talo líquênico podem promover o desenvolvimento de cor que permite a caracterização de várias substâncias líquênicas. O uso desses reagentes em taxonomia de líquens foi iniciado em 1886, por Nylander (Elix, 1996). As reações são conduzidas aplicando a solução do reagente com um capilar a um fragmento do talo líquênico, e a variação de cor é melhor observada em microscópio estereoscópico. As colorações observadas dependem da natureza das substâncias presentes.

A ação do hidróxido de potássio é a de promover a hidrólise da ligação éster de depsídeos e de depsidonas, dando formação a compostos cujas colorações variam de amarelo a vermelho intenso (Figura 31). Além de depsídeos e depsidonas, pigmentos quinoidais presentes no líquen podem apresentar reação positiva, enquanto que derivados do ácido pulvínico, xantonas e ácido úsnico não reagem.

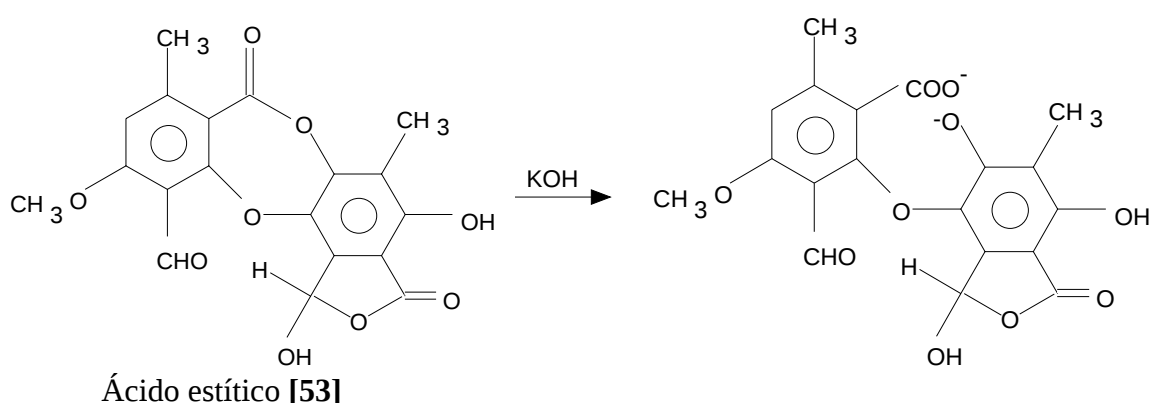
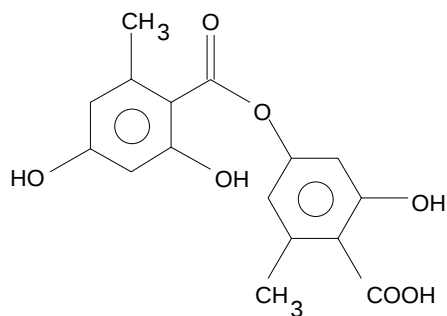


Figura 31 - Reação de uma depsidona com KOH.

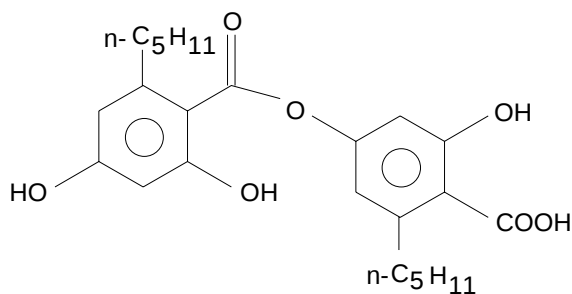
A reação com hipoclorito de cálcio é positiva com compostos que apresentam configuração *meta*-diidróxi. A ação de oxidantes moderados sobre compostos *meta*-diidróxi promove a formação de derivados orto ou *para*-quinoidais. A cor apresentada pelas quinonas, laranja e vermelho vivo, é provavelmente modificada pela presença de outros grupamentos ligados ao anel aromático, como no 3,5-diclorolecanorato de metila e outras substâncias que apresentam reações positivas com hipoclorito de cálcio (Hale, 1983).

Depsídeos derivados do orcinol, como os ácidos lecanórico [12], anziáico [94], girofórico [28] e olivetórico [49], dão aparecimento à coloração vermelha intensa pela

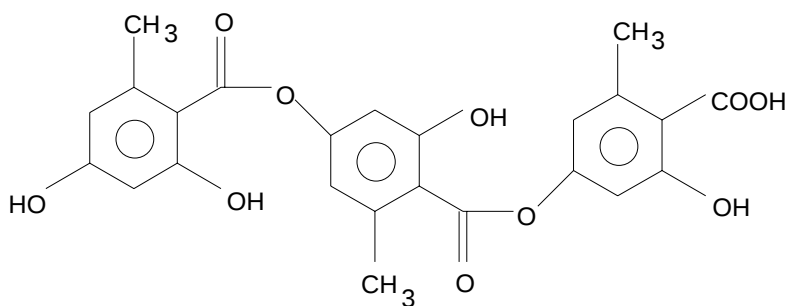
ação de hipoclorito. Esse procedimento permite separar os depsídeos em dois grupos, um deles derivados metaidroxilados, que reagem positivamente com hipoclorito, e outro, meta-substituídos metoxilados, que em sua maior parte dão reação negativa (Hale, 1983).



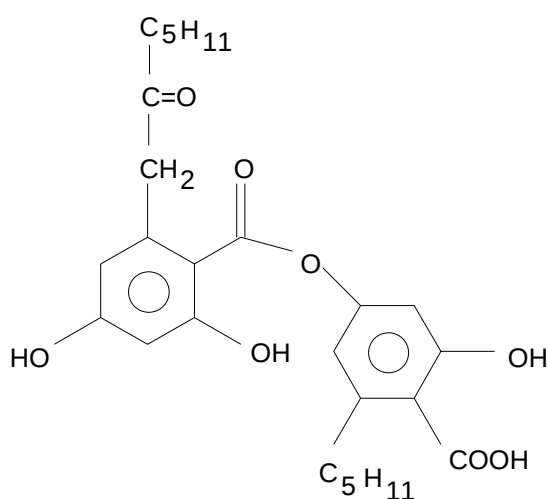
Ácido lecanórico [12]



Ácido anziáico [94]



Ácido girofórico [28]



Ácido olivetórico [49]

As depsidonas não apresentam reação com hipoclorito de cálcio. No entanto, esses compostos podem apresentar reação positiva com esse reagente, se forem tratados

inicialmente com KOH. A reação combinada desses reagentes (KC) sobre depsídonas pode dar aparecimento à coloração vermelha (Santesson, 1973).

Além desses, podem ser utilizados outros reagentes para detecção de outros grupos funcionais, como por exemplo grupamento aldeído. Soluções de benzidina, *p*-fenilenodiamina, anilina, *orto*-toluidina e outras podem ser utilizadas para detecção de grupo aldeído. A reação ocorre pela formação de bases de Schiff de coloração amarela, laranja ou vermelha (Figura 32).

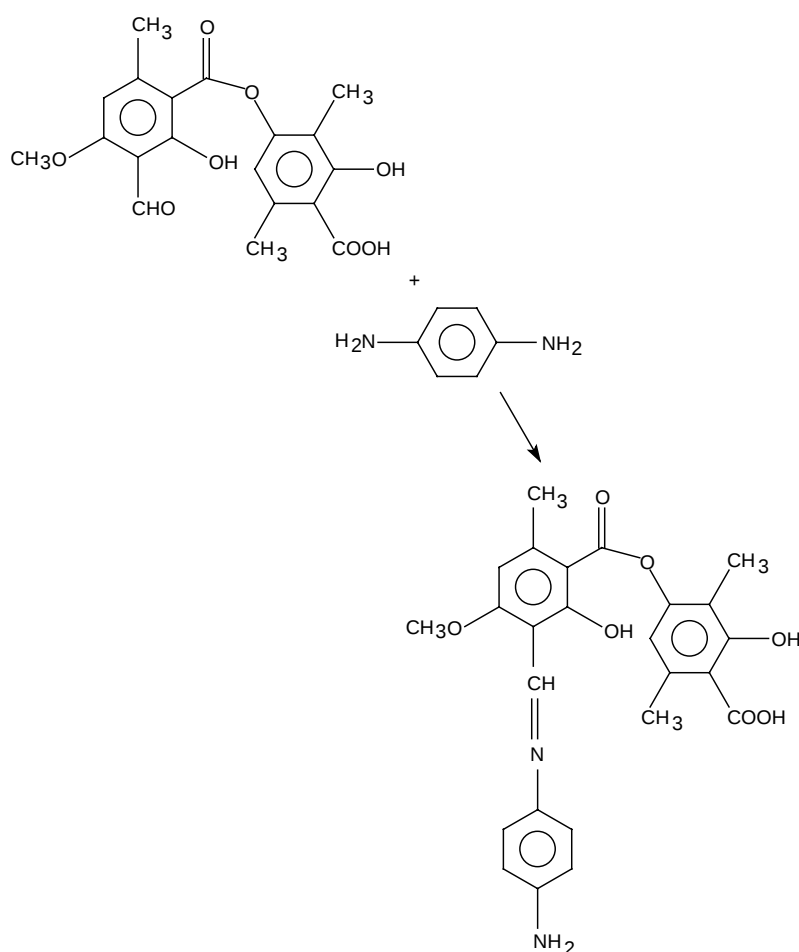


Figura 32 - Reação de formação de base de Schiff entre o ácido Baeomicésico [39] e *p*-fenilenodiamina.

As reações, em que se utilizam hidróxido de potássio, hipoclorito de cálcio e *p*-fenilenodiamina, são empregadas amplamente pelos liquenólogos em trabalhos de

taxonomia. Entretanto, não são reações específicas no sentido de permitir a identificação precisa dos componentes presentes no líquen. Isto porque diferentes substâncias podem apresentar os mesmos grupamentos químicos, que ao reagirem produzem a mesma variação de cor, não sendo possível distinguí-las quando se encontram em mistura. Também, muitos ácidos liquênicos não produzem qualquer variação de cor pela ação desses reagentes, requerendo portanto, a utilização de outras técnicas de detecção dessas substâncias.

Além desses reagentes, outros também são usados, como por exemplo, solução de Cloramina T e de Cloreto de Titânio para detecção de ácido úsnico, reagente de Dimroth para xantonas (Santesson, 1973).

- Microcristalização

A técnica de microcristalização permite a identificação de várias classes de compostos provenientes do metabolismo secundário de líquens. Esses compostos em condições adequadas de cristalização apresentam formas cristalinas características, que observadas ao microscópio permitem a identificação quando comparadas à padrões, ou, a dados da literatura (Hale, 1973; Taylor 1967a, 1967b; Huneck et al. 1996).

Um pequeno fragmento do líquen é extraído com um solvente orgânico (clorofórmio ou acetona ou sequencialmente clorofórmio e acetona). O extrato obtido é colocado sobre uma lâmina de microscópio de maneira a formar uma mancha contendo o resíduo após evaporação do solvente. Sobre esse resíduo se coloca uma gota da solução para cristalização e a mistura é coberta com uma lamínula. Algumas misturas são aquecidas mais intensamente (GE e GAW) e outras levemente. Soluções para cristalização contendo derivados nitrogenados exigem pouco ou nenhum aquecimento.

Dependendo da substância, a formação de estruturas cristalinas pode ocorrer imediatamente, após alguns minutos, ou após algumas horas. Em alguns casos as formas cristalinas podem ser melhor observadas após 24 horas. As formas cristalinas são visualizadas em microscópio e a identificação dos compostos é feita por comparação com substância padrão tratada nas mesmas condições e por comparação com fotos mostradas na literatura (Hale, 1973; Taylor 1967a, 1967b, Huneck et al., 1996).

Asahina, em 1936, desenvolveu essa técnica para identificação de ácidos liquênicos. O método foi gradativamente aperfeiçoado e continua sendo utilizado pelos liquenólogos em trabalhos de taxonomia (Santesson, 1973).

As soluções usadas para cristalização podem conter compostos nitrogenados como em GAoT que contém *o*-toluidina, GAQ, quinolina, GAA_n, anilina, GWP_y, piridina e outras. A formação de estruturas cristalinas pelo uso dessas soluções depende da formação de sais e, no caso da presença de grupos aldeído no ácido liquênico, pode ocorrer formação de base de Schiff. GE e GAW são misturas que não promovem qualquer reação, sendo apenas meios de cristalização.

Além das misturas já mencionadas, o uso de certos reagentes inorgânicos, tais como, soluções de hidróxido de bário, carbonato de potássio e hidróxido de potássio, podem conduzir à identificação de ácidos liquênicos pela observação dos cristais dos sais formados (Santesson, 1973).

Pelo uso da técnica de microcristalização é possível identificar um grande número de ácidos liquênicos das séries dos depsídeos, depsidonas e dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos alifáticos (ácidos caperático [14], protoliquesterínico [24], rangifórmico [17], rocélico [16] e outros) e terpenos (friedelina [88], leucotilina [85], ácido ursólico [86], zeorina [84] e outros), que também formam estruturas cristalinas nas condições citadas (Huneck et al., 1996).

- Cromatografia

A cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas na identificação de substâncias liquênicas.

Wachtmeister (1952) e Mitsuno (1953) foram os primeiros a utilizar a cromatografia em papel para a detecção e identificação de substâncias liquênicas. Entretanto, a cromatografia em camada fina tem sido mais extensivamente usada não só pela aplicabilidade geral, como também por ser uma técnica sensível, rápida e simples.

Numerosos trabalhos foram publicados sobre a separação de substâncias liquênicas por cromatografia em camada fina (Culberson et al., 1970; Culberson, 1972a; Culberson et al., 1976, 1981; Walker et al., 1980; White et al., 1985). Tabulações de dados e referências são encontrados nos trabalhos de Huneck (1968) e Santesson (1973).

Embora a cromatografia em camada fina (ccd) seja uma técnica mais sensível para detecção de substâncias liquênicas que a cromatografia em papel, nem sempre permite identificar todos os compostos presentes num dado extrato. Cromatografia de extratos liquênicos utilizando placas de hptlc tem permitido detectar com mais precisão um número de compostos presentes nos extratos devido à maior sensibilidade do método (Arup et al., 1993).

O emprego da cromatografia gasosa para análise de misturas de substâncias liquênicas é de uso limitado devido à baixa volatilidade e labilidade térmica da maioria dos compostos conhecidos.

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) permite analisar compostos de baixa volatilidade ou baixa estabilidade térmica. Culberson (1972b) foi a primeira a empregar esta técnica na análise de ácidos liquênicos.

A grande versatilidade da cromatografia líquida de alta resolução está na possibilidade de separar compostos pertencentes às várias classes químicas, não só as de baixo peso molecular, como também aquelas de peso molecular elevado como os polissacarídeos e proteínas. Podem ser usados procedimentos analíticos e preparativos e o tempo de análise é relativamente curto.

Estudos sobre a composição e proporção de ácidos liquênicos em espécies do gênero *Cladonia* empregando HPLC têm sido realizados por Huovinen et al. (1982, 1985, 1986a e 1986b, 1988, 1989a e 1989b). Feige et al. (1993) analisaram por HPLC 331 compostos obtidos de líquens e Yoshimura et al. (1994) utilizaram a técnica de análise por HPLC com detector de arranjo fotodiodo. Yoshimura et al. (1994) tabelaram dados relativos a 80 diferentes compostos liquênicos e determinaram a composição de extratos de 15 espécies liquênicas.

1.5 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE LÍQUENS - APLICAÇÕES

Vários ácidos liquênicos têm sido estudados do ponto de vista farmacológico. A ação antibiótica de extratos liquênicos tem sido investigada há algumas décadas. Burkholder et al. (1944, 1945) publicaram os primeiros estudos qualitativos das propriedades antibióticas dos líquens. Foram testadas 100 espécies liquênicas em relação à *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*; 52% das espécies inibiram o crescimento de um, de outro, ou de ambos microorganismos. Com poucas exceções, os líquens estudados não tinham efeito sobre bactérias Gram-negativas. Esses compostos exercem sua ação antibiótica preferencialmente sobre bactérias Gram-positivas (Bustanza, 1951).

A atividade antibiótica está relacionada à presença de derivados fenólicos nos extratos liquênicos. Os mecanismos da ação antibiótica de ácidos liquênicos, mais precisamente de ácido úsnico [2] e seus derivados, sugerem que esses compostos modificam a estrutura das proteínas. Essas modificações resultam em alterações de certas capacidades metabólicas das células infectantes (permeabilidade de parede, permeabilidade de membrana, atividade enzimática, etc.), causando-lhes, às vezes, alterações irreversíveis e, até mesmo, conduzindo à morte celular (Vicente, 1975).

Tentativas de relacionar estrutura química e atividade antibiótica têm sido realizadas desde 1948. Shibata et al. (1948) estudaram os efeitos de substituições nos anéis A e B do ácido úsnico [2] na ação antibiótica destes. Verificaram que, esterificando as duas hidroxilas livres do primeiro anel com ácido acético, a atividade do ácido úsnico se reduz em 50% sobre *Mycobacterium tuberculosis avium*. A hidrogenação da dupla ligação, convertendo o ácido úsnico em diidroúsnico, reduz a 1/4 sua capacidade antibiótica. Essas observações indicam que as duas hidroxilas livres (C-8 e C-10) em posição meta no primeiro anel, são fundamentais como suporte da atividade antibiótica dos ácidos úsnicos. Tal conclusão é reafirmada pelo fato de que o ácido DL usnóico, resultante da oxidação da hidroxila em C-10, em função cetona, tem uma atividade 1/6 menor que a do ácido úsnico. O grau de oxidação do segundo anel é também importante na atividade antibiótica.

O ácido L-úsnico [1b] interfere nos processos de fosforilação oxidativa e, provavelmente, intervém de algum modo na estrutura das paredes bacterianas. Sabe-se, também, que esse ácido atua sobre o metabolismo do DNA em células animais inibindo a fusão nuclear (Vicente, 1975). O ácido L-úsnico [1b] atua também como agente antitumor

(Kupchan et al., 1975; Takai et al., 1979). Os ácidos úsnicos apresentam também atividade antiistamínica, espasmolítica e antiviral. São usados em cremes antissépticos encontrados no comércio europeu como “Usno” e “Evosin”. Usno é o derivado hidróxido de benzilidimetil-(2-[2(9p-1,1,3,3)-tetrametilbutilfenoxietoxi]etilamonio. Esse produto apresenta bons resultados para combater doenças da pele e em usos veterinários no tratamento de mastite em vacas . Na Alemanha são encontrados os produtos, Evosin I e Evosin II. O primeiro contém ácidos úsnico e evérnico e o segundo ácidos úsnico, fisódico e fisodálico. (Vartia, 1973).

Dibenzofuranos estruturalmente relacionados aos ácidos úsnicos também possuem atividade antibiótica frente à uma ampla gama de bactérias. O ácido dídimico [56] mostra atividade quando na presença de *Staphylococcus aureus* e *M. tuberculosis*.

Cain (1961, 1963, 1964, 1966) estudou a ação do ácido polipórico [92] e seus derivados como agentes antitumor, e Hirayama et al. (1980) testaram extratos de líquens, ácidos liquênicos e seus produtos de degradação, quanto à atividade antitumor frente aos carcinomas ascite e de Erlich. Verificaram que os ácidos nefrosterínico [23] e protoliquesterínico [24] foram efetivos contra o carcinoma de Erlich. Essas substâncias são exemplos de lactonas metilênicas, um grupo de compostos com muitos outros representantes que exibem atividade antitumor, como é o caso de vernolepin e elefantopin, que são lactonas sesquiterpênicas (Richardson, 1988).

Ácido vulpínico [7] , ácidos secalônicos e seus derivados são metabólitos altamente tóxicos. O ácido vulpínico é o princípio tóxico de *Letharia vulpina* e foi usado tradicionalmente no norte da Europa como veneno para lobos. É um metabólito não-somente venenoso para carnívoros, mas também para insetos e moluscos. Entretanto, não causa o mesmo efeito em coelhos e ratos (Elix, 1996).

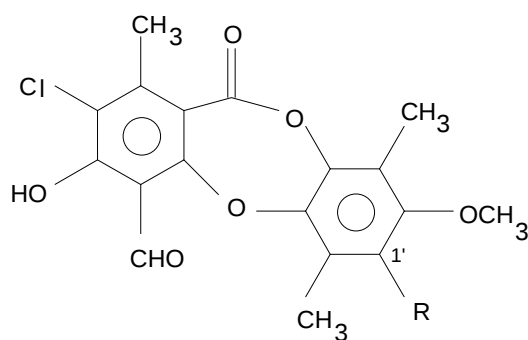
O ácido secalônico D [102] , um metabólito teratogênico, é inibidor da proteína quinase C e proteína quinase dependente de AMP cíclico. Inibidores dessas proteínas podem interferir no desenvolvimento normal (Wang et al., 1996).

Harada et al. (1974) observaram que o ácido secalônico A [99] causa peritonite em ratos, e verificaram que o aumento da permeabilidade vascular na cavidade abdominal dos mesmos, é comparável àquela causada pelo ácido acético, porém , difere quanto ao tempo de duração do processo inflamatório .

Wennester (1979) estudou o comportamento de 13 diferentes substâncias liquênicas quanto às suas capacidades de induzir lesões foto-oxidativas de membranas,

confirmando que os compostos liquênicos investigados têm capacidade de induzir a fotossensibilização. Atranorina e ácido estético são capazes de fotossensibilizar a pele humana, sendo, portanto, alérgenos de contacto (Hale, 1983; Richardson, 1988).

Hidalgo et al. (1994) investigaram a atividade antioxidante de atranorina [3], ácido divaricático [36], panarina [95] e 1'-cloropanmarina [96], empregando como sistemas modelos a auto-oxidação de homogenato de cérebro de rato e β -caroteno em uma suspensão de ácido linolênico. Dos compostos testados, 1'-cloropanmarina [96] foi o mais ativo, seguido de panarina [95]. Atranorina [3] e ácido divaricático [36] foram menos ativos em relação aos dois primeiros.



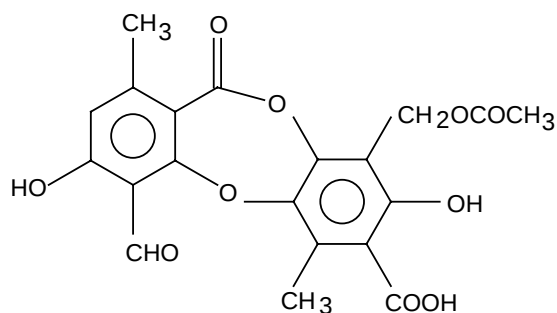
Panarina [95] R = H

1'-Cloropanmarina [96] R = Cl

Essas observações são de interesse, considerando que as substâncias liquênicas (ácidos liquênicos) estão geralmente presentes nos líquens em concentrações relativamente altas e, devido à atividade antioxidante, é provável que contribuam às defesas antioxidantes desses organismos (Hidalgo et al., 1994).

Shibamoto et al. (1984) testaram os ácidos úsnico [2] e fisodálico [97] quanto à mutagenicidade no teste de Ames: o último exibiu mutagenicidade dose dependente.

Os ácidos úsnico [2] e difractáico [37] apresentam também atividade analgésica e antipirética quando testados em ratos (Okuyama et al., 1995).



Ácido fisodálico [97]

Um dos mais importantes usos de líquens, hoje, é na indústria de perfumes. Duas espécies: *Evernia prunastri* e *Pseudevernia furfuraceae* são colhidas no sul da França, Marrocos e Iugoslávia, em grandes quantidades, na faixa de 8.000 a 10.000 toneladas/ano. O líquen é misturado com a casca das árvores, subseqüentemente extraído com um solvente orgânico e tratado com etanol. O concentrado dessa solução contém uma mistura de óleos essenciais e derivados de depsídeos (produtos de degradação). O extrato final com seu odor característico de musgo é usado como fixador de alguns perfumes. A identidade precisa do aroma é um segredo de marca. A maior parte é constituída de borneol, cineol, geraniol, citronelol, cânforas, naftaleno, orcinol, ésteres do orselinato e seus homólogos (Richardson, 1988).

Os ácidos liquênicos freqüentemente contém grupos polares em posição orto, tais como : OH e COOH, OH e CHO, que favorecem a complexação de cátions (Syers, 1969). A complexação de metais por ácidos liquênicos tem significado importante em processos de desgaste de minerais e rochas que atuam como substrato de líquens. Devido a isso, os líquens podem extrair de seus substratos de crescimento os minerais que são necessários ao seu metabolismo. Os cátions inorgânicos podem ser provenientes não-somente de substratos de crescimento, mas, também, da contribuição atmosférica e de precipitações. Essas três fontes de elementos são de importância e variam entre sítios, entre espécies de líquens e entre elementos. Entretanto, a maior parte dos oligoelementos são necessários em concentrações catalíticas, como cofatores de enzimas, ou como integrantes de metaloproteínas, ou, ainda, de cromóforos. A excessiva concentração de íons pode ser prejudicial ao líquen, conduzindo em alguns casos à diminuição do tamanho do talo e, em outros, a malformações (Vicente, 1975).

Devido à capacidade dos líquens em acumular minerais em níveis superiores às suas necessidades, ao fato de que muitas espécies têm larga distribuição geográfica, e a constatação de que a morfologia não varia de maneira marcante ao longo das estações, esses organismos são usados como bioindicadores de poluição (Boonpragob et al., 1989; Prussia et al., 1991).

Tem sido sugerido, também, que as propriedades antimicrobianas apresentadas pelos ácidos liquênicos envolvem um mecanismo de complexação de metais, em face à forte correlação que existe entre propriedades antibacterianas e a capacidade de complexação de metais em compostos orgânicos sintéticos (Syers et al., 1973).

Uma outra hipótese considera que os ácidos liquênicos, à semelhança de taninos e flavonóides nas fanerógamas, se comportam como agentes inativantes de enzimas com funções metabólicas primárias nos organismos invasores (Vicente et al., 1975).

Estudos relacionados à atividade da urease, enzima de origem estritamente vegetal, difundida tanto em bactérias, algas e fungos, como em fanerógamas, indicam que os ácidos liquênicos bloqueiam grupos SH na proteína e promovem inibição impedindo a formação do complexo enzima-substrato. Além disso, polimerizam a proteína sendo que a solubilidade do polímero formado decresce inversamente ao peso molecular. Isto significa que existem ao menos duas classes de sítios ligantes de fenóis na molécula da urease (Vicente et al., 1975). A enzimologia de líquens foi pioneira na biotecnologia de enzimas e células imobilizadas. Mosbach et al. (1966) descreveram uma técnica simples de fixação de enzimas e células de líquens usando matriz de poliacrilamida. Verificaram que a enzima ácido orselínico descarboxilase produzia orcinol sem qualquer perda significativa de atividade, após 14 dias a 20°C. Quando células de líquens eram fixadas nos grânulos, elas retinham parte de sua atividade descarboxilase após 3 meses a 20°C. Com esse método é possível fixar enzimas de uma dada seqüência biossintética e isolar intermediários em grandes quantidades. Esse processo é importante para a produção de substâncias de interesse químico e bioquímico (Vicente et al., 1988). Estudos relacionados à imobilização de células de líquens e enzimas para bioprodução de metabólitos vêm sendo realizados por Vicente et al. (1992, 1995) e Pereira et al. (1995a, 1995b). A bioprodução de metabólitos de líquens tem sido desenvolvida, também, através de cultura de células de líquens ou de células do micobionte (Hamada et al., 1987; Hamada, 1989; Culberson et al., 1992).

Muitos compostos liquênicos apresentam potencial alelopático, ou seja, podem agir como moléculas mensageiras, afetando não-somente líquens, mas outras espécies. Nesse sentido, tem-se observado a inibição do crescimento de micorrizas; inibição do desenvolvimento de outros líquens, e musgos vizinhos que seriam os competidores. Embora existam demonstrações experimentais da potência de vários compostos liquênicos, as interações alelopáticas em ecossistemas não são ainda bem compreendidas (Fahselt, 1996; Lawrey, 1996).

Substâncias cíclicas com grupos -OH livres são geralmente tóxicas para os seres vivos (Ahmadjian, 1967) e as substâncias liquênicas (ácidos liquênicos) estão incluídas nesse grupo (Airaksinem et al., 1986).

Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses e essa atividade apresentada por substâncias isoladas, ou por extratos vegetais, pode ser monitorada através de ensaios de letalidade utilizando organismos simples (Hamburger et al., 1991).

Procedimentos de triagem de agentes anti-câncer potenciais incluem ensaios de citotoxicidade com culturas de células, o que exige condições especializadas para execução. Vários bioensaios simples têm sido desenvolvidos, visando obter informações sobre as atividades de compostos isolados ou de extratos. Entre esses, o uso do microcrustáceo *Artemia salina* Leach foi proposto como procedimento de baixo custo que substitui ensaios de citotoxicidade. Ensaios com esse organismo têm sido realizados na procura de compostos com atividade antitumoral e pesticida. A vantagem desse ensaio sobre outros é a rapidez (24 horas), além do baixo custo e não-exigência de condições assépticas (Hamburger et al., 1991).

A pesquisa de drogas antifúngicas tem recebido ultimamente mais atenção devido à crescente incidência de micoses associadas primariamente com AIDS e o tratamento com drogas imunossupressivas. Existem poucos agentes antifúngicos e de eficácia limitada indicados para o tratamento de micoses sistêmicas. A detecção de agentes antifúngicos pode ser feita por vários procedimentos. O método de bioautografia combina tlc com um bioensaio *in situ* e, portanto, permite a localização de constituintes ativos em uma mistura complexa (Hamburger et al., 1991).

1.6 - OS LÍQUENS DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL

O Estado de Mato Grosso do Sul apresenta uma flora bastante rica e diversificada, destacando-se a vegetação de cerrado, as matas e o complexo do pantanal.

O estudo das espécies vegetais aí encontradas tem se tornado objetivo de diversos grupos de pesquisa, envolvendo levantamentos taxonômicos, ecologia floral e estudo químico de espécies de interesse medicinal e/ou tóxico, dentre outros.

Até recentemente, as pesquisas relacionadas à flora sul-mato-grossense se restringiam a vegetais superiores. Entretanto, a partir de 1990 iniciamos estudos sobre a flora líquênica da região.

Do levantamento florístico por nós realizado no período de 1990-1992, nas regiões de Vilas Palmeiras e Piraputanga, em Mato Grosso do Sul, foram coletadas 365 amostras, sendo 315 identificadas, dessas 275 em nível de espécie, 50 em nível de gênero e 40 estão para serem confirmadas. As amostras identificadas foram classificadas em 28 famílias, 50 gêneros e 89 espécies. Líquens foliosos pertencentes aos gêneros *Parmotrema* e *Pseudoparmelia* apresentaram-se amplamente distribuídos na área de estudo e alguns espécimens foram encontrados em proporções que possibilitaram a coleta para análise química. Líquens de talo fruticoso representaram 10% do total de amostras coletadas.

Há bem pouco tempo o estudo dos líquens de Mato Grosso do Sul se limitava a aspectos taxonômicos de espécimens coletados por Gustav Malme (1902, 1924, 1925, 1926, 1927, 1928, 1934 e 1936) e Klaus Kalb (1987). Mais recentemente, Fleig et al. (1991), publicaram parte dos resultados do levantamento florístico realizado nas Vilas Palmeiras e Piraputanga-MS, no período de 1990-1991.

No Brasil, o estudo químico de líquens tem sido pouco explorado, quando comparado com o de plantas superiores.

O estudo químico dos líquens, da mesma forma que o estudo de plantas superiores, reveste-se de importância na medida em que as substâncias isoladas são estruturalmente conhecidas e avaliadas quanto à atividade biológica.

2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 - MATERIAIS

Os solventes usados nos processos de extração, quando de procedência comercial, foram destilados em laboratório. As análises por HPLC foram realizadas com solventes grau HPLC e nos processos de purificação, cristalização e cromatografia (camada fina e coluna) foram usados solventes de grau de pureza P.A.

2.2 - EQUIPAMENTOS

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Uniscience do Brasil, mod. 498, e não foram corrigidos.

As estruturas cristalinas foram observadas em microscópio marca Zeiss.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em aparelho Perkin Elmer, mod. 783, usando pastilhas de KBr.

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em 60 MHz (UFSC), 200 e 300 MHz e ^{13}C em 50 e 75 MHz em espectrômetro Bruker, na Central Analítica do Instituto de Química da USP e na UFMS, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 , DMSO- d_6 , CD_3COCD_3 , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ e os deslocamentos químicos foram registrados em valores de δ (ppm), usando TMS como padrão interno, e as constantes de acoplamento foram expressas em Hz. As áreas relativas foram determinadas por integração dos respectivos sinais.

Os espectros de massas foram obtidos na Central Analítica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB e as análises elementares (C, H) foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

A rotação ótica foi determinada em polarímetro Perkin-Elmer, mod. 341, usando comprimento de onda de 589 nm.

2.3 - MÉTODOS GERAIS

As análises cromatográficas em camada fina (ccd) foram realizadas utilizando sílica gel G, sílica gel HF₂₅₄₊₃₆₆, sílica gel PF₂₅₄₊₃₆₆ em placas de 5 x 20 e 20 x 20 cm, preparadas em laboratório e placas de sílica gel G de procedência Merck e Sigma. Para visualização dos componentes, foram usadas lâmpadas ultravioleta (254 e 366 nm) e nebulização com metanol, contendo 10% de ácido sulfúrico concentrado e *p*-anisaldeído/ácido sulfúrico, com posterior aquecimento em chapa elétrica a 100° C, até não mais ocorrer qualquer variação de cor das manchas.

As colunas cromatográficas foram preparadas com gel de sílica (0,063-0,200 mm). As misturas eluentes utilizadas na cromatografia em camada fina foram : (I) tolueno : acetato de etila : ácido acético glacial (6 : 4 : 1 v/v) ; (II) benzeno : dioxano : ácido acético glacial (90 : 25 : 4 v/v); (III) tolueno : clorofórmio (1 : 1 v/v) , (IV) tolueno : clorofórmio (3 : 2 v/v) e V) Clorofórmio : Metanol (24: 1 v/v).

As análises por HPLC foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu, mod. LC6AD, com detetor UV-ViS Shimadzu, mod. SPD-6AV, coluna Shim-pack CLC-ODS (M) 4,6 x 250 mm, à temperatura de 25°C. As leituras foram efetuadas em 254 nm. Foi utilizada a mistura metanol : água como fase móvel, iniciando com mistura a 50% e elevando gradativamente a concentração de metanol. As análises foram realizadas com velocidade de fluxo de 0,9 mL/min. Os extratos foram dissolvidos em metanol e os volumes injetados variaram de 10 20 µL. Ácido benzóico foi usado como padrão interno.

A microcristalização dos extratos e das substâncias isoladas foi realizada com as misturas , GAoT, GAW e GE. Quando necessário, foram utilizadas misturas GAAn, GAQ, GWPY e ainda soluções de K₂CO₃ a 10% e solução saturada de Ba(OH)₂ conforme técnica descrita por Taylor (1967a, 1967b), Thompson (1968) e Hale (1974).

Os critérios de pureza adotados foram a obtenção de uma única mancha na cromatografia em camada fina e a observação do ponto de fusão.

Os solventes foram evaporados à pressão reduzida em rotavapor.

2.4 - COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas, no período de 1991-1993, na Vila Piraputanga (MS). A seleção de material para análise química teve como critério a ocorrência de espécimens em quantidades que permitissem, após coleta, manter no ambiente proporção considerável para desenvolvimento e propagação dos mesmos.

Foram coletadas as seguintes espécies : *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale, *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale, *Parmotrema cf. delicatulum* (Vain.) Hale, *Parmotrema cf. miranda* (Hale) Hale, *Parmotrema cf. flavescens* (Krempplh.) Hale, *Pseudoparmelia hypomiltha* (Fée) Hale, *Pseudoparmelia sphaerospora* (Nyl.) Hale, *Usnea meridionalis* Zahlbr., *Usnea sp.* e *Heterodermia microphylla* (Kurok.) Scorepa .

P. dilatatum, *P. tinctorum*, *Pseudoparmelia hypomiltha*, *Pseudoparmelia sphaerospora*, *Usnea sp.* e *Usnea meridionalis* foram coletados sobre córtex ; *P. cf. flavescens*, *P. cf. delicatulum*, *P.cf. miranda* e *Heterodermia microphylla* sobre rocha.

Cada exemplar coletado foi colocado num envelope de jornal, numerado e registrados os dados do substrato, condições e local de coleta. Os exemplares coletados foram levados ao laboratório, feitas a triagem e análise, com auxílio de microscópio estereoscópio, e separadas amostras para herbário. Essas foram dessecadas, herborizadas e, por último, transferidas para envelopes de papel craft, devidamente etiquetadas. O material coletado foi enviado à Prof^a. Dra. Mariana Fleig, do Departamento de Botânica da UFRGS, e ao Prof. Dr. Marcelo Marcelli, do Instituto de Botânica de São Paulo, para identificação. As exsiccatas estão depositadas em nosso laboratório de pesquisa, no Departamento de Química da UFMS.

A homogeneidade das amostras para análise química foi garantida mediante observação cuidadosa através de lupa. Após remoção de substratos e outros resíduos que acompanhavam as amostras, estas foram secas ao ar à temperatura ambiente e em seguida, trituradas em moinho. O pó obtido de cada amostra foi tratado com solventes, em Soxhlet, de modo exaustivo, ao abrigo da luz. Após cada extração, o extrato obtido foi concentrado à vácuo em rotavapor e o processo foi repetido até praticamente não permanecer qualquer resíduo no balão de evaporação, após eliminar todo o solvente.

2.5 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

2.5.1 - ATIVIDADE FUNGITÓXICA

Foram realizados testes de bioautografia, qualitativos e quantitativos, dos compostos puros cromatografados em camada fina de sílica gel (Merck), no eluente I, utilizando o fungo revelador *Cladosporium sphaerospermum* Penzig. As placas foram nebulizadas com uma suspensão de esporos do fungo em solução salina contendo glicose e incubadas por 48 horas, na ausência de luz e em câmara úmida a 30° C (Homans et al. 1970).

A avaliação qualitativa da atividade fungitóxica foi feita observando-se o aparecimento de zonas de inibição do desenvolvimento do fungo.

Para a avaliação quantitativa, foram preparadas soluções das substâncias ativas e aplicadas sobre placas de sílica gel nas concentrações de 10, 5, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 µg. Padrão de anfotericina B foi preparado e aplicado nas mesmas concentrações das substâncias liquênicas.

2.5.1.1 - CULTIVO DO FUNGO

O fungo *Cladosporium sphaerospermum* foi cultivado em meio de BDA a 28°C e na ausência de luz até esporulação adequada. A manutenção dos inóculos foi feita em água destilada estéril, segundo Figueiredo et al. (1975).

2.5.2 - ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os compostos liquênicos puros foram testados quanto à toxicidade na presença de larvas de *Artemia salina*, de acordo com Solis et al. (1993). Foram realizados ensaios, utilizando diversas concentrações (1,0 a 600 ppm) de substância teste, para se determinar a concentração mínima capaz de causar efeito tóxico às larvas. Para comparação, foi utilizado um padrão de sulfato de atropina. O teste foi realizado em triplicata em frascos contendo em média 10 larvas de *A. salina* recém-eclodidas em solução salina. Após 24 horas, foi determinado o número de larvas mortas em cada frasco para o estabelecimento da DL₅₀ (dose letal 50%). Os resultados foram analisados em programa que utiliza método probitos de análise com intervalo de confiança de 95% (Finney, 1971).

2.5.3 - ATIVIDADE ANTITUMOR

Os compostos puros foram também testados quanto à atividade anti-tumor *in vivo* e *in vitro*. Os testes foram realizados no Departamento de Antibióticos da UFPE, sob a responsabilidade das Prof^{as}. Rosália de Lima e Eugênia C. Pereira. Os ensaios *in vitro* foram realizados em células KB (carcinoma nasofaríngeo), em fase exponencial de crescimento, com 24 horas de repicadas. A avaliação da citotoxicidade foi feita pelo método das proteínas totais, segundo o protocolo do N.C.I. (National Cancer Institute). As substâncias nas doses de 10, 5, 2,5 e 1,25 µg/mL foram solubilizadas em dimetilsulfóxido. A DI₅₀ (dose que inibe 50% da proliferação celular) foi calculada graficamente numa curva de porcentagem de inibição na abcissa versus o logaritmo da dose na ordenada. Os testes *in vivo* foram realizados com tumores sólidos sarcoma 180 e carcinoma de Erlich, implantados subcutaneamente em camundongos albinos suíços, variação *Mus musculus*, com 60 dias de idade e 20 a 25 gramas de peso. Após 24 horas do implante, foi iniciada a quimioterapia utilizando a décima parte da DL₅₀ (dose letal média), previamente estabelecida por 7 dias consecutivos. A inibição tumoral foi avaliada tomando o grupo controle, como referência.

3 - DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A área delimitada para estudo situa-se a, aproximadamente, 70 km de Campo Grande e compreende a região de morrarias próxima ao Município de Aquidauana, Estado de Mato Grosso do Sul, abrangendo as Vilas Palmeiras, Piraputanga e Coronel Camisão. Está localizada a 20°27'S e 55°29'W com aproximadamente 200 m de altitude. O acesso à área se dá por estrada vicinal não-pavimentada, que liga a Vila Palmeiras à Piraputanga (Figuras 33 e 34).

A região particulariza-se por apresentar litologia de arenitos da formação Aquidauana, com solos de textura média e arenosa, raramente com textura argilosa. Ocorre vegetação característica de Savana (Savana Arbórea Densa/Savana Arbórea Aberta) e Pastagem (Russi, 1975).



Figura 33 - Parte do mapa do Estado de Mato Grosso do Sul, mostrando a localização das Vilas Palmeiras e Piraputanga.



Figura 34 - Vista da estrada que dá acesso à área de estudo na região da Vila Piraputanga.



Figuras 35 e 36 - Vista da entrada que acessa a área escolhida para coletas mostrando a vegetação de cerrado entremeada por espécies típicas da caatinga.

Os pontos escolhidos para as coletas destacam-se por possuir fisionomia distinta das demais circundantes, sendo marcante as aflorações rochosas sem cobertura vegetal ou com solos rasos. Os afloramentos apresentam-se modificados por ações erosivas, o que confere ao ambiente a característica de mosaico rochoso, com vegetação própria de cerrado entremeada por espécies típicas da caatinga, como por exemplo do gênero *Cereus* (Figuras 35 a 37).



Figura 37 - A foto mostra as aflorações rochosas sem cobertura vegetal.

A partir da margem da estrada, percebe-se diferenças na vegetação, a qual é constituída por arbustos e árvores esparsas de médio porte, além de trepadeiras e principalmente ervas, com predominância de gramíneas. A presença de vegetais de maior porte se faz notar num declive próximo aos morros. Nos afloramentos rochosos a vegetação é mais pobre e muitas vezes danificada pelas condições do meio. Sobre as rochas e arbustos há muitos líquens crostosos e foliosos, e em alguns pontos mais degradados das rochas e com substrato propício, há maior quantidade de líquens, briófitas e pteridófitas, formando verdadeiros tapetes; ocorrem também bromeliáceas, cujas raízes servem de substrato aos líquens. As figuras 38 e 39 mostram líquens crostosos, foliosos e fruticosos sobre rochas; 40 e 41 líquens foliosos e fruticosos sobre córtex; e a 42 mostra a presença de briófitas junto aos líquens.



Figura 38 - Liquens crostosos e foliosos sobre rocha.



Figura 39 - Liquens fruticosos sobre rocha.



Figura 40 - Líquens foliosos sobre córtex de árvore.



Figura 41 - Líquens fruticosos sobre córtex de árvore.



Figura 42 - A foto mostra a presença de briófitas junto aos líquens.

A presença de vegetais de maior porte ocorre mais próxima à estrada e para dentro da mata, após a faixa de afloramentos rochosos .

Para coletas, foi escolhida uma área no morro, localizada ao N do primeiro ponto (Figuras 43 e 44).



Figuras 43 e 44 – A primeira, mostra vista parcial do morro localizado ao N do primeiro ponto de Coleta, e a Segunda, a vegetação típica de morro na Vila Piraputanga.

A vegetação difere pouco daquela presente nos afloramentos rochosos, com vegetais de médio porte, ervas, muitos líquens, principalmente nos paredões rochosos e nos troncos (Figuras 45 a 48).



Figura 45 - Líquens sobre paredões rochosos em morro próximo ao primeiro ponto de coleta na Vila Piraputanga-MS.





Figuras 46 e 47 - Líquens fruticosos, foliosos e crostosos, sobre paredões rochosos, em morro da Vila Piraputanga-MS.



Figura 48 - Líquens sobre rocha, em morro da Vila Piraputanga-MS.

Na parte baixa do morro, as rochas são menos cobertas por vegetação e ocorrem principalmente líquens crostosos saxícolas e corticícolas. Na parte média, há maior presença de árvores de pequeno porte; nelas se desenvolvem líquens foliosos, os quais, em

certos pontos, também recobrem as rochas. Na parte alta ou topo do morro, a vegetação é mais esparsa; ocorrem algumas espécies de líquens foliosos e fruticosos e muitas espécies de líquens crostosos.

4 - ANÁLISE QUÍMICA E RESULTADOS

4.1 - *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale



Figura 49 - *Parmotrema tinctorum* desenvolvido sobre córtex de árvore (Vila Piraputanga-MS).

O líquen foi coletado sobre córtex e, após limpeza e remoção de fragmentos do substrato, foi triturado em moinho, obtendo-se 40,0 g de pó. A extração dos componentes foi realizada de modo exaustivo em Soxhlet, utilizando benzeno e em seguida acetona.

O extrato benzênico, após secagem, pesou 0,246 g (0,615% em relação ao peso do líquen). A cromatografia desse extrato em camada fina de sílica gel no eluente I indicou a presença de apenas um componente, enquanto que no eluente III mostrou a presença de dois componentes principais. A análise qualitativa por HPLC, também indicou a

presença de mais de um componente. Devido à presença de substâncias de natureza graxa e pigmentos, foi realizada cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando como eluente a mistura III. Foram coletadas 27 frações de 12 mL e, após evaporação do solvente, cada fração foi tratada com etanol à temperatura ambiente e o sobrenadante removido. Os resíduos foram dissolvidos em clorofórmio e cromatografados em camada fina de sílica gel. As frações semelhantes foram reunidas e novamente cromatografadas. Tentativas de separação dos componentes, por cristalização fracionada, não conduziram a resultados satisfatórios. Foi realizada, então, a cromatografia preparativa utilizando o eluente IV. As frações foram eluídas com clorofórmio e cristalizadas em clorofórmio/etanol. Uma das frações (codificada como PtB₁) apresentou-se como cristais brancos em forma de agulhas. Essa fração fundiu em 196-198°C. A outra fração (PtB₂) apresentou-se ainda em mistura com PtB₁ e, devido à pequena proporção isolada, não foi possível proceder à análise espectral da amostra.

Para a classe de compostos liquênicos, a banda em 1660 cm⁻¹ no espectro de infravermelho sugere a presença de grupo OH livre em posição orto ao grupo carbonila da ligação éster. Na ausência de grupo OH livre, o grupo carbonila de éster absorve em 1750 cm⁻¹. Da mesma forma, a banda em 1580 cm⁻¹ é indicativa de carbonila de grupo aldeído quelada com grupo OH vizinho (Huneck, 1968).

As estruturas cristalinas apresentadas por PtB₁, quando tratada com GAOT, são comparáveis àquelas descritas para o depsídeo atranorina [3] (Taylor 1967b; Thompson 1968; Hale 1974). Os dados espectrais apresentados pela fração PtB₁, comparados com dados da literatura (Sudholm et al., 1981; Huneck et al., 1996), permitem atribuir a essa fração a estrutura do depsídeo atranorina [3].

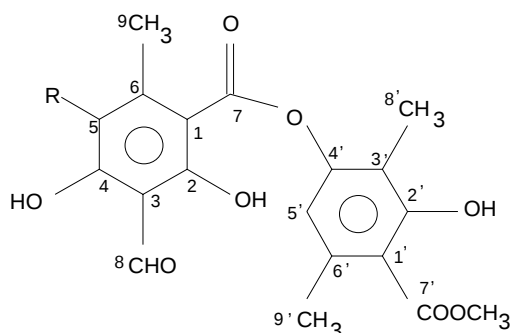
Da fração PtB₁ foram obtidos os seguintes dados espectrais :

IV(KBr) $\nu_{\text{máx.}}$ cm⁻¹ : 3200-2950, 1660, 1580, 1440, 1405, 1380, 1355, 1285, 1270, 1195, 1165, 1105, 1070.

RMN¹ H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 2,07 (3H, s, ArCH₃ C-8'), 2,52 (3H, s, ArCH₃ C-9'), 2,67 (3H, s, ArCH₃ C-9), 3,96 (3H, s, ArOCH₃ C-7'), 6,38 (1H, s, H-5), 6,49 (1H, s, H-5'), 10,33 (1H, s, ArCHO), 11,94 (1H, s, ArOH).

RMN¹³ C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 9,34 (C-8'), 24,0 (C-9), 25,5 (C-9'), 52,3 (C-7' COOCH₃), 102,79 (C-1), 108,49 (C-3), 110,21 (C-3') 112,8 (C-5), 116,0 (C-5'), 116,74 (C-

1'), 139,85 (C-6'), 151,94 (C-4'), 152,42 (C-6), 162,84 (C-4), 167,44 (C-2'), 169,06 (C-2), 169,67 (C-7), 172,18 (C-7'), 193,82 (C-8).



R = H Atranorina [3]

R = Cl 5-Chloroatranorina [3a]

O comportamento cromatográfico e as estruturas cristalinas resultantes do tratamento da fração PtB₂ com GAoT, comparados a dados da literatura (Ahmann et al. 1967), sugerem que o componente principal presente nessa fração é o depsídeo 5-cloroatranorina [3a].

O extrato acetônico, após remoção do solvente, pesou 10,8 g (27% em relação ao pó do líquen) e foi tratado de acordo com o método descrito por Ahmann et al. (1967), visando ao isolamento e purificação dos componentes. O extrato acetônico seco foi dissolvido em éter etílico e a solução obtida foi extraída, várias vezes, com solução aquosa de NaHCO₃ a 5%.

O extrato aquoso foi tratado com solução de ácido sulfúrico 1 M até pH ácido. O precipitado flocoso foi separado por filtração simples e lavado com água até remoção total do ácido. O resíduo obtido foi dissolvido em acetona e cromatografado. Observou-se a presença de apenas um componente (PtAcI). Este composto foi obtido em pequena quantidade (3 mg) e sua estrutura ainda não foi elucidada.

O extrato etéreo obtido do fracionamento foi concentrado e cristalizado sucessivamente em acetona. O componente obtido, codificado como PtAcII, apresentou-se como cristais transparentes em forma de agulhas. Cristalizado em acetona, fundiu em 134-135°C e apresentou os seguintes dados espectrais:

IV (KBr) $\nu_{\text{máx. cm}^{-1}}$: 3305, 2930, 1640-1610, 1560, 1500, 1445, 1390, 1328, 1325, 1310.

RMN ^1H (Acetona- d_6 , 300 MHz) δ (ppm): 1,39 (3H, t, J 7,1 Hz, CH_2CH_3), 2,47 (3H, s, ArCH_3), 4,38 (2H, q, J 7,1 Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 6,23 e 6,28 (2H, d, J= 2,1 Hz, ArH).

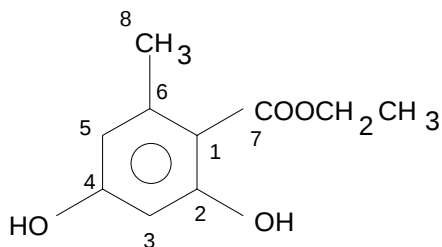
RMN ^{13}C (Acetona- d_6 , 75 MHz) δ (ppm): 13,3 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23,3 (ArCH_3), 60,8 (ArCOOCH_2), 100,5 (C-3), 104,3 (C-5), 111,2 (C-1), 143,3 (C-6), 162,1 (C-2), 165,3 (C-4), 171,4 (C-7).

EM m/z : $[\text{M}]^+$ 196 (1%).

Os sinais no espectro de RMN ^1H em 1,39 e 4,38 ppm indicam a presença de um grupamento $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, que deve estar na estrutura de PtAcII na forma de éster alquil-aril.

A análise desses dados e a comparação com a literatura (Pouchert et al. 1993) permitem sugerir a estrutura de orselinato de etila [98] para o composto codificado como PtAcII.

O espectro de massas do componente PtAcII apresenta padrão de fragmentação compatível com a estrutura proposta de orselinato de etila [98].

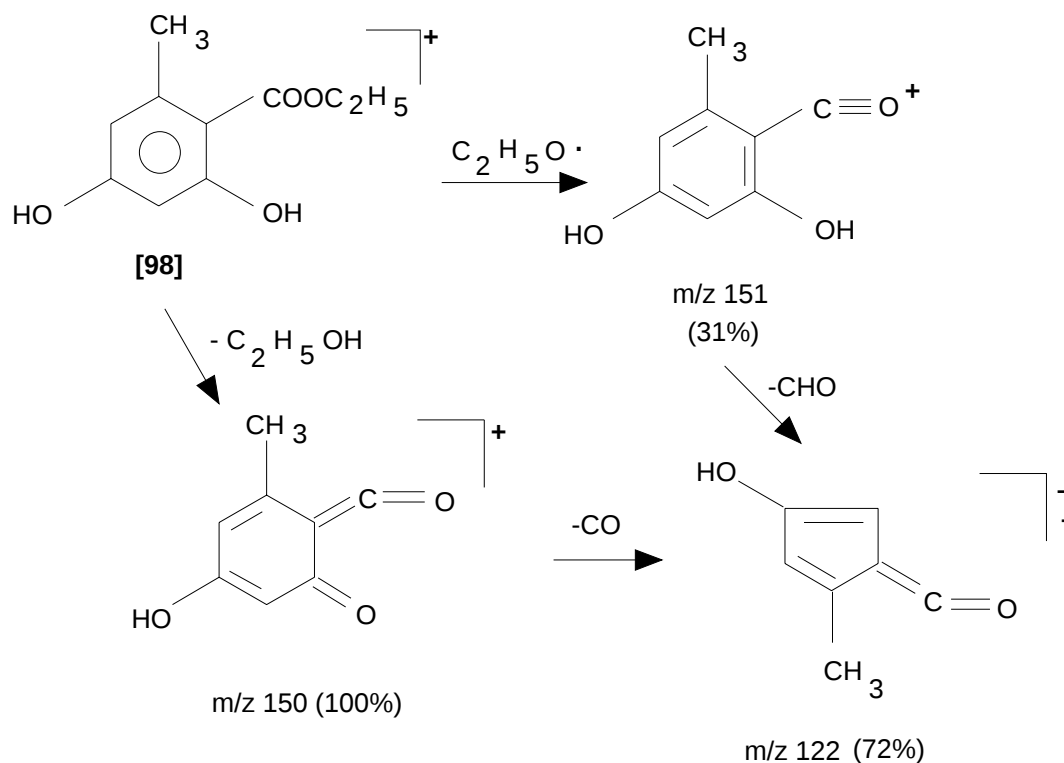


Orselinato de etila [98]

Esse composto pode ser um artefato de técnica resultante do tratamento do líquen com solventes, contendo traços de etanol. O ácido orselínico pode resultar da hidrólise da ligação éster entre as duas unidades aromáticas do ácido lecanórico [12].

Para testar essa possibilidade, uma amostra (120 mg) de ácido lecanórico foi tratada com etanol sob refluxo durante 6 horas. Após evaporação do solvente, o resíduo obtido foi cromatografado em uma coluna de gel de sílica e a eluição foi realizada com clorofórmio e misturas de clorofórmio/ acetona. O composto eluído com clorofórmio-acetona 2% foi cristalizado em acetona e fundiu em 134-135°C. Os espectros de RMN ^1H e de ^{13}C foram coincidentes com aqueles apresentados por orselinato de etila (PtAcII) e com dados da

literatura para esse composto, mostrando que PtAcII pode ser um produto de degradação do ácido lecanórico (Pouchert et al., 1993).



Uma outra alternativa, é que PtAcII seja produto de decomposição dos depsídeos originais presentes no líquen em estudo, pois a amostra de *P. tinctorum* analisada foi coletada em local próximo a uma área que havia sido queimada.

Visando obter maiores informações sobre a composição em termos de metabólitos secundários do espécime de *P. tinctorum* de Mato Grosso do Sul, foram efetuadas novas coletas do líquen em outras áreas, porém, na mesma região escolhida para a realização do presente trabalho.

Uma das amostras (A-I) foi coletada sobre arbusto em zona de escarpa na parte média da morraria; outra (A-II) foi coletada sobre rocha na parte alta do morro; a terceira amostra (A-III) foi coletada sobre córtex na beira do mato próximo à parte média do morro.

Após limpeza, as amostras foram trituradas em moinho e o pó (A-I - 17,0 g; A-II - 13,0 g e A-III - 25,0 g) de cada amostra foi submetido a extrações exaustivas em Soxhlet com benzeno e acetona. Os extratos obtidos foram concentrados em rotavapor. A

cromatografia em camada fina de sílica gel indicou semelhança de composição entre as 3 amostras.

O extrato benzênico de cada amostra foi tratado com acetona para remoção de pigmentos. O resíduo de cor branca (PtB) foi dissolvido em clorofórmio e cromatografado em camada fina de sílica gel no eluente III. A revelação com metanol/ácido sulfúrico e com p-anisaldeído/ácido sulfúrico indicou a presença de dois componentes, com valores de Rf 0,57 e 0,42. A microcristalização de PtB em GAoT sugeriu a presença de atranorina [3] e 5-cloroatranorina [3a], sendo o primeiro composto em maior proporção que o segundo.

O extrato acetônico concentrado foi dissolvido em éter etílico e tratado com solução de bicarbonato de sódio a 5% (3 vezes) em banho de gelo. Após esse tratamento, a fase etérea foi tratada com água até pH neutro e a seguir com sulfato de sódio anidro. Por cromatografia em camada fina de sílica gel, verificou-se que esse extrato continha somente pigmentos. À solução de bicarbonato de sódio, juntamente com as águas de lavagens, foi adicionado ácido sulfúrico 1 N até pH ácido. O precipitado branco flocoso obtido foi extraído por dissolução em éter, e a solução etérea tratada com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente, o resíduo obtido (PtAc) foi cristalizado em acetona. A análise dessa fração por ccd de sílica gel indicou a presença de um único componente com Rf 0,52 e 0,49 nos eluentes I e II, respectivamente. O ponto de fusão de PtAc cristalizado em acetona foi $> 300^{\circ}\text{C}$.

Quanto ao rendimento, verificou-se diferenças entre as amostras analisadas : PtAc (A-I) 2,4%; PtAc (A-II) 5,3% e PtAc (A-III) 10,2%. O rendimento de cada extrato foi calculado em relação ao pó do líquen.

O comportamento cromatográfico, e as estruturas cristalinas resultantes da microcristalização em GAoT do componente PtAc, são também comparáveis aos dados da literatura para o ácido lecanórico [12] (Culberson 1972; Culberson et al. 1981; White et al. 1985; Taylor 1967a e 1967b).

Para elucidação estrutural, foram obtidos os espectros de IV, RMN ^1H , ^{13}C e massas.

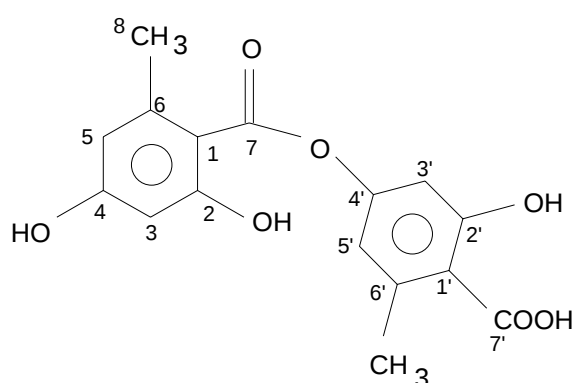
IV (KBr) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$: 3540, 3460 , 2980, 1658 , 1640, 1618, 1585, 1490, 1460, 1412, 1320, 1290, 1260, 1215, 1180 e 1152.

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm) : 2,33, 2,35 (6H, s, ArCH $_3$), 6,21 (2H, sl, ArH), 6,59 (2H, sl, ArH), 10,02 (1H, sl, ArOH), 10,48 (1H, sl, ArOH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm) : 21,0 (C 8), 21,4 (C 8'), 100,5 (C 3), 107,45 (C 3'), 108,26 (C-1), 109,9 (C 5), 114,8 (C 5'), 116,6 (C 1'), 139,56 (C-6'), 140,43 (C-6), 152,3 (C 4'), 158,8 (C 2'), 160,2 (C 2), 161,2 (C 4), 167,2 (C 7), 170,7 (C 7').

EM m/z : 318 (M 1%), 168 (47), 151 (49), 150 (100), 124 (39), 123 (34), 122 (96).

Os valores de δ apresentados nos espectros de RMN de PtAc são compatíveis àqueles citados por Sakurai et al. (1987) para o ácido lecanórico [12].



Ácido lecanórico [12]

A análise química de *P. tinctorum* coletado em Mato Grosso do Sul indicou a presença de atranorina [3], 5-cloroatranorina [3a] e ácido lecanórico [12].

Orselinato de etila [98] pode ser considerado um artefato de técnica resultante dos processos de isolamento e purificação do ácido lecanórico [12].

4.2 - *Parmotrema dilatatum* (Vain.)Hale



Figura 50 - *Parmotrema dilatatum* sobre córtex de árvore (Vila Piraputanga-MS).

O líquen coletado sobre córtex, resultou em 33,0 g de pó que foi submetido a extrações exaustivas com benzeno e acetona. Do extrato benzênico concentrado, após repouso, sedimentou um sólido de cor branca e aspecto cristalino. A purificação dessa fração (Pd01) foi conduzida por tratamento com acetona à temperatura ambiente. A cromatografia em ccd de sílica gel nos eluentes I e II, após cristalização em clorofórmio, indicou a presença de apenas um componente. O ponto de fusão foi 194-195°C. Os dados espectrais de IV e RMN ^1H de Pd01 comparados àqueles citados na literatura (Huneck, 1968; Hylands, 1985) permitem atribuir a estrutura do depsídeo atranorina [3] ao componente Pd01. As estruturas cristalinas resultantes do tratamento de Pd01 com GAOT são comparáveis àquelas descritas para o depsídeo atranorina [3] (Taylor, 1967b; Thompson, 1968; Hale, 1974).

A cromatografia em ccd de sílica gel do extrato benzênico, após remoção da atranorina [3], indicou a presença de um componente com as características cromatográficas do ácido úsnico [2] (Rf 0,72 no eluente I, colorações amarelo pálido, quando revelado com metanol/ácido sulfúrico e violeta com p-anisaldeído/ácido sulfúrico). A microcristalização do extrato em GE apresentou formas cristalinas características desse ácido (Thompson, 1968;

Taylor , 1967b). Devido à pequena proporção desse componente no extrato, não foi possível o isolamento e análise estrutural.

Do extrato acetônico concentrado, foi separado um sólido branco amorfo. Após tratamento com acetona e acetona/água a 80%, obteve-se 3,36 gramas de uma fração que foi codificada como Pd02 (rendimento 10,2%). A cromatografia em ccd no eluente (I) mostrou a presença de apenas um componente.

A fração purificada fundiu em 220°C e apresentou os seguintes dados espectrais.

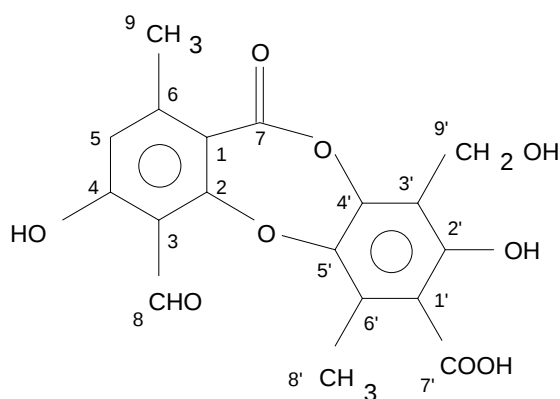
IV(KBr) $\nu_{\text{máx.}}$ cm^{-1} : 3408 (OH), 2905 (CH), 1758 (C=O), 1655 (aldeído), 1448 e 1388 (CH_3).

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm) : 2,38 e 2,40 (6 H, s, 2 x CH_3), 4,61 (2H, s, - CH_2OH), 6,83 (1H, s, ArH) (Espectro 09).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm) : 14,5 (C 9), 21,5 (C 8'), 54,3 (C 9'), 111,9 (C 3), 112,4 (C 3'), 112,5 (C 1), 116,6 (C 1'), 117,1 (C 5), 129,5 (C 6'), 141,4 (C 5'), 144,7 (C 4'), 152,1 (C 6), 154,6 (C 2'), 161,3 (C 7), 163,9 (C 4), 164,0 (C 7'), 170,3 (C 2), 191,8 (C 8).

EM m/z : $[\text{M}]^+$ 374 (2%) .

A análise dos dados espectrais e comparação com dados da literatura (Huneck, 1969; Sudholm et al., 1981; Huneck et al., 1996) permite atribuir à fração Pd02 a estrutura do ácido protocetrário [51]. O comportamento cromatográfico e as estruturas cristalinas desenvolvidas em GAOt são compatíveis com dados da literatura para esse ácido (Culbertson et al., 1970; Taylor, 1967b; Thompson, 1968; White, 1985).



Ácido protocetrário [51]

4.3- *Parmotrema cf. delicatulum* (Vain.)Hale



Figura 51 - *Parmotrema cf. delicatulum* coletado sobre rocha (Vila Piraputanga-MS).

Esse líquen foi coletado sobre rocha na morraria da Vila Piraputanga. Após limpeza, resultou 11,0 g de pó que foi submetido a extrações exaustivas em Soxhlet, com benzeno e acetona. O extrato benzênico concentrado foi tratado com etanol para remoção de pigmentos. Desse tratamento resultou um resíduo amarelo, que foi purificado por dissolução em HCCl_3 e precipitação pela adição de etanol em excesso, e apresentou rendimento de 1,69% (0,186 gramas). A fração purificada fundiu em 202°C e apresentou comportamento cromatográfico idêntico a um padrão de ácido úsnico [2]. A fração desenvolve estruturas cristalinas em sistemas de microcristalização compatíveis com aquelas descritas para o ácido úsnico (Taylor, 1967b; Thompson, 1968; White et al., 1985).

Do extrato acetônico concentrado, sedimentou uma fração sob a forma de pó branco (1,15 gramas, 10,5% em relação ao pó do líquen). A fração (PdelAc) foi tratada com acetona e acetona/água a 80% e seu ponto de fusão é igual a $264\text{-}265^\circ\text{C}$. Foram obtidos os seguintes dados espectrais :

IV (KBr) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$: 3590 (OH livre), 3300 (OH ligado), 1772, 1630, 1558, 1497, 1450, 1380, 1300, 1260, 1215, 1200.

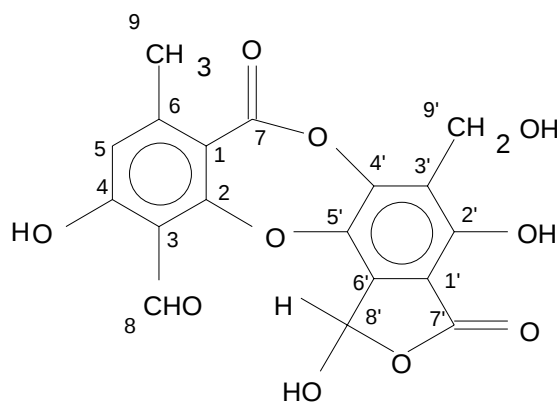
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm) : 2,41 (3 H, s, ArCH_3), 4,65 (2H, s, ArCH_2OH), 6,80 (1H, sl, ArH), 6,87 (1H, s, lactol), 8,29 (1H, sl, OH lactol).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm): 21,6 (C 9), 52,9 (C 9'), 95,3 (C 8'), 109,8 (C 1'), 110,7 (C 3), 112,0 (C 1), 117,4 (C 5), 123,4 (C 3'), 137,3 (C 6'), 138,1 (C 5'), 148,1 (C 4'), 152,3 (C 2'), 153,0 (C 6), 160,4 (C 7), 163,7 (C 7'), 164,2 (C 2), 166,0 (C 4), 192,9 (C 8).

EM m/z (%) : 388 (M^+ , 9), 370 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$, 68%).

Análise elementar : determinado - C 55,88%, H 3,13%; O 40,99 % , $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_{10}$ Mol 388,29 calculado : C 55,66%, H 3,12% , O 41,22% ; p.f. 264-265°C (acetona- H_2O).

O conjunto desses dados, bem como a comparação com dados da literatura (Sudholm et al., 1981; Huneck et al., 1996), permitiram identificar a amostra como sendo o ácido salazínico [52], uma depsidona derivada do β -orcinol contendo anel lactol.



Ácido salazínico [52]

Reações de coloração realizadas em espécimens de herbário e coletadas por Vainio em 1885, indicaram atranorina [3], ácido salazínico [52] e ácido úsnico [2] como componentes de *P. delicatulum* (Hale 1965). A análise química de *P.cf. delicatulum* coletado em Mato Grosso do Sul, indicou a presença de ácido úsnico e ácido salazínico. Não foi detectada a presença de atranorina.

4.4 - *Parmotrema cf. miranda* (Hale) Hale

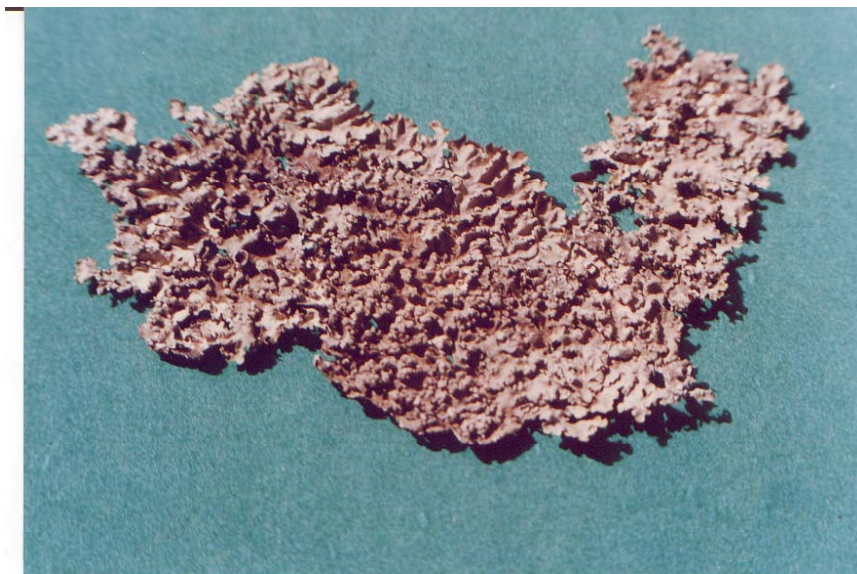


Figura 52 - *Parmotrema cf. miranda* coletado sobre rocha (Vila Piraputanga-MS).

O líquen foi coletado sobre rocha na morraria de Vila Piraputanga e, após limpeza, resultou em 22,5 g de pó, o qual foi extraído exaustivamente em Soxhlet com benzeno e depois com acetona. O extrato benzênico concentrado foi tratado com etanol para remoção de pigmentos, e o resíduo obtido foi purificado, por dissolução em clorofórmio e precipitação pela adição de etanol em excesso. A fração P.mir.B foi identificada como ácido úsnico, com base no comportamento cromatográfico e em reações de microcristalização comparados a um padrão (Rendimento : 0,188 gramas - 0,836%).

Do extrato acetônico concentrado, sedimentou um componente de cor branca que foi purificado por tratamento com acetona e acetona/H₂O a 80% (P.mir.Ac.) (Rendimento : 1,57 gramas - 7%). O comportamento cromatográfico em ccd de sílica gel nos eluentes I e II, bem como os dados espectrais de IV e RMN ¹ H apresentados por P. mir.Ac., são coincidentes com aqueles apresentados anteriormente para o ácido salazínico [52] isolado de *P. delicatulum*.

Os resultados obtidos da análise de *P. miranda* coletado em Mato Grosso do Sul, estão de acordo com os descritos por Hale (1965) para esse espécime. Hale (1965), através de reações de coloração no talo, identificou ácido úsnico e ácido salazínico em espécimens de *P. miranda* coletado no México.

4.5 - *Parmotrema cf. flavescens* (Krempelh.) Nyl.

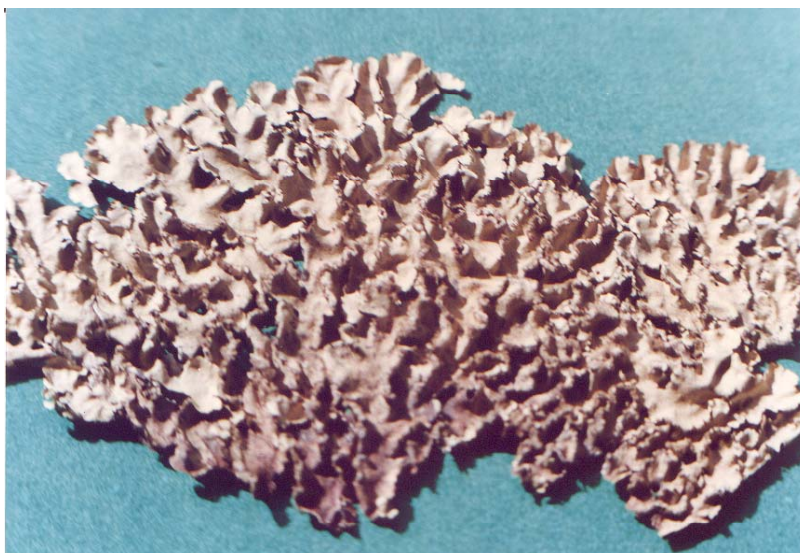


Figura 53 - *Parmotrema cf. flavescens* coletado sobre rocha (Vila Piraputanga-MS).

O líquen foi coletado sobre rocha na morraria de Vila Piraputanga e resultou em 24,0 g de pó, o qual foi submetido a extrações exaustivas com benzeno e acetona em Soxhlet. Os extratos obtidos foram concentrados e submetidos aos mesmos tratamentos já citados em 4.3 e 4.4. Do extrato benzênico obteve-se 0,27 gramas (1,12%) de ácido úsnico [2] identificado por ccd em sílica gel e pelo comportamento em microcristalização comparado a padrão.

Do extrato acetônico, obteve-se 2,26 gramas (9,42%) de ácido salazínico [52] identificado através do comportamento cromatográfico, observação dos microcristais obtidos em GAOT e pela análise dos espectros de IV e RMN¹H comparados a padrão.

Hale (1965) descreveu os resultados de reações de coloração realizados em espécimens de herbário coletados na América Central, América do Sul e México. Os resultados indicaram a presença de ácido úsnico, atranorina e ácido salazínico.

De *P. flavescens* coletado em Mato Grosso do Sul, foram isolados ácido úsnico e ácido salazínico. Não foi detectada a presença de atranorina no espécime analisado.

4.6- *Pseudoparmelia hypomiltha* (Fée) Hale



Figura 54 - *Pseudoparmelia hypomiltha* coletado sobre córtex (Vila Piraputanga-MS).

O líquen coletado sobre córtex resultou em 25,0 g de pó, que foi extraído com acetona em Soxhlet. O processo de extração foi repetido quatro vezes e, após evaporação do solvente, os extratos foram cromatografados. Os extratos da 1^a, 2^a e 3^a extrações apresentaram comportamento cromatográfico semelhante, tendo sido reunidos. A fração resultante (2,9 g - 11,6%) foi codificada como Phyp. O extrato da 4^a extração com acetona apresentou diferença de composição em relação aos anteriores, tendo sido mantido separado. Essa fração foi codificada como AcIV e pesou 0,131 gramas (0,52%).

A fração Phyp. foi submetida a tratamento com etanol à temperatura ambiente, para a remoção de pigmentos. A cromatografia em camada fina de sílica gel da fração Phyp. indicou que a mesma era constituída de um componente principal acompanhado de outros, em menor proporção, e, estes na revelação cromatográfica, apresentaram características de substâncias de natureza graxa. A purificação de Phyp. foi realizada por cromatografia preparativa em camada fina de sílica gel impregnada com ácido oxálico 0,1 N, utilizando-se inicialmente a mistura eluente (V). O componente principal foi eluído com acetona e, após evaporação do solvente, cristalizou-se sob forma de agulhas amarelas em clorofórmio/acetona fundindo em 264-265°C.

Foram obtidos os espectros de IV, RMN ¹ H, RMN ¹³ C e de massas da fração Phyp.

IV (KBr) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$: 3500 (OH), 2925, 2915, 1780-1760, 1730 (COOCH₃), 1610 (C=O), 1585 e 1560 (aromático), 1435, 1330, 1230, 1160, 1130, 1075, 1035, 985.

RMN ¹H (piridina-d₅ 300 MHz) δ (ppm): 1,25 (6H, d J 6,0 Hz, 2 x CH₃), 2,4 (2 H, dd J 11 e 12 Hz), 2,72 (1 H, d J 6,0 Hz), 2,78 (3 H sl), 3,55 (6H, s, 2 x -COOCH₃), 4,17 (2H, d, J 10,7 Hz, 2 x CH₂OH), 6,73 (2H, d J 8,5 Hz), 7,61 (2H, d J 8,5 Hz).

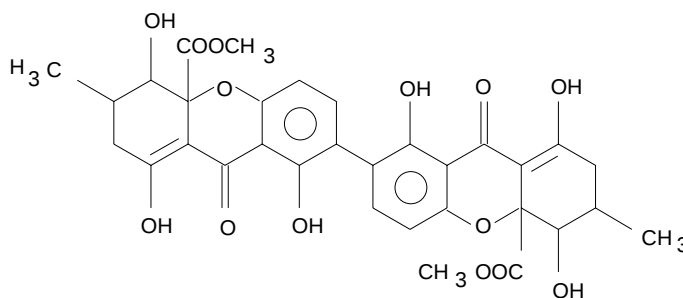
RMN ¹³C (Piridina-d₅ 75 MHz) δ (ppm) : 18,43 (C 11), 19,21 (C 11'), 30,56 (C 6, C 6'), 36,71 (C 7 C 7'), 52,75 (C 13, C 13'), 76,50 (C 5, C 5'), 86,24 (C 10, C 10'), 102,62 (C 9a, C 9'a), 107,5 (C 4), 107,84 (C 4'), 140,57 (C 3, C 3'), 159,95 (C 4a C 4a'), 171,17 (C 12, C 12'), 178,5 (C 8, C 8') e 187,88 (C 9, C 9').

EM, m/z (%) : 638 (M⁺, 14), 620 (M⁺ - H₂O, 1), 579 (M⁺ - COOCH₃, 100), 260 (M⁺/2-COOCH₃, 16). $[\alpha]_D -197,5^\circ$ a 23°C ($\leq 0,2$ piridina).

O espectro de massas apresentou M⁺ 638 (14%) com fórmula molecular C₃₂ H₃₀ O₁₄. Para substâncias liquênicas, esses pesos e fórmulas moleculares sugerem a presença de substâncias diméricas. O espectro de RMN de ¹³C mostrou a presença de apenas 16 sinais, indicando tratar-se de um dímero.

O espectro DEPT 135 (espectro 17) indicou, por comparação com o espectro normal, a presença de um grupo CH₃ alifático, um grupo CH₃ em ligação éster, um grupo CH₂ e 4 grupos CH para cada unidade do dímero. Os espectros bidimensionais HMQC e COSY ¹H/¹H forneceram as correlações diretas ¹H/¹³C e ¹H/¹H, permitindo atribuir cada proton a seu respectivo átomo de carbono (Tabela I).

A análise dos dados espectrais obtidos e comparação destes com a literatura (Yosioka et al., 1972) indica que Phyp. apresenta estrutura correspondente ao ácido secalônico [62].



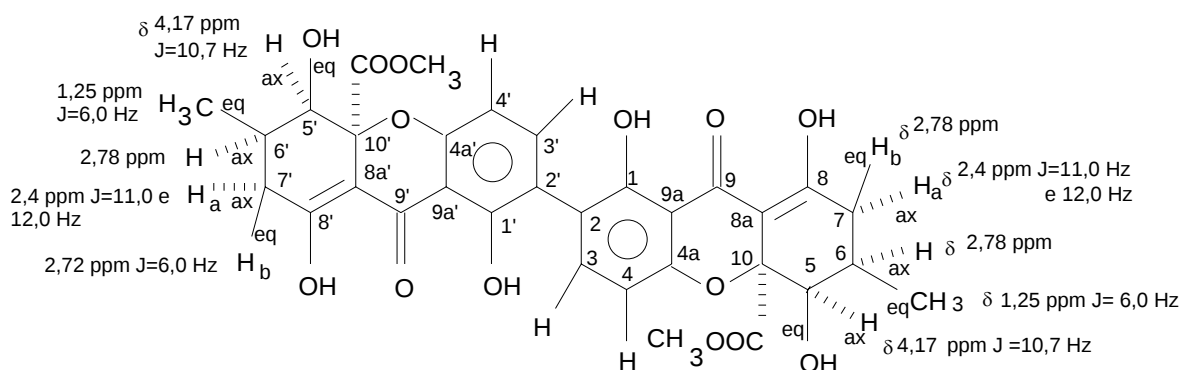
Ácido Secalônico [62]

O ácido secalônico é conhecido como metabólito de fungos e atualmente são conhecidos sete isômeros desse ácido : A, B, C, D, E, F e G (Budavari 1989) (Quadro I). Entretanto, tem sido isolado também de algumas espécies de líquens. O ácido secalônico A foi isolado de *Parmelia entotheiochroa* Hue, e o ácido secalônico C foi isolado de *Cetraria ornata* Müll. Arg., (Yosioka et al. 1968, 1972).

Pela análise do espectro de HMQC e ^1H - ^1H -COSY o próton metínico em C5 e C5' (δ 4,17 ppm, $J=10,7$ Hz) se encontra em posição trans diaxial com o próton em C6 e C6' (2,78 ppm, $J=10,8$ Hz). O grupo carboximetil em C10 e C10' possivelmente ocupa a posição trans em relação ao grupo OH em C5 devido ao impedimento estérico.

A constante de acoplamento do grupo metila (1,25 ppm, $J=6,0$ Hz) indica acoplamento vicinal com o próton em C6. Observam-se ainda um acoplamento axial-axial entre H6 e H_a com $J\sim 11,0$ Hz e um acoplamento axial-equatorial entre H6 e H_b (~ 6 Hz). Esses dados reforçam que o grupo metila em C6 ocupa a posição equatorial.

O espectro de infravermelho apresenta bandas de média intensidade em 3560 (OH não ligado) e 3480 cm^{-1} (OH ligado) que indicam a disposição dos grupos OH e carboximetil em C5 e C10 e em C5' e C10'. Assim sendo, os um dos grupos OH (C5 e C5') devem estar em posição trans em relação ao grupo carboximetil (C10 ou C10').



Comparando a estrutura acima proposta para Phyp. com aquelas dos 7 isômeros conhecidos de ácido secalônico (A [99], B [100], C [101], D [102], E [103], F [104], e G [105]), (Quadro I), verifica-se que, a disposição de grupos atribuída para Phyp. não coincide com nenhum dos isômeros.

Para se definir com mais precisão a disposição dos grupos ligados aos centros assimétricos da molécula do ácido secalônico isolado de *P. hypomiltha*, está sendo obtido o difratograma de RX e estão sendo realizados estudos de modelagem molecular.

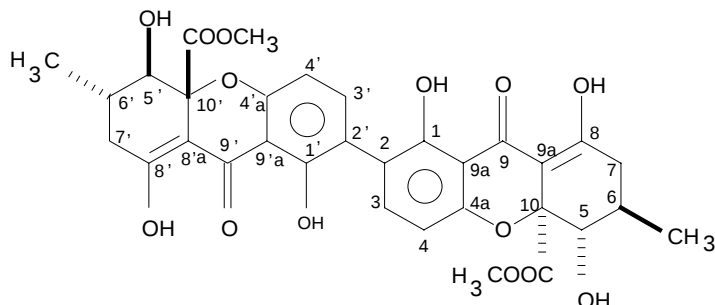
Posição	RMN ¹³ C	DEPT	RMN ¹ H
1, 1'	160,07		
2, 2'	118,19		
3, 3'	140,82	CH	6,73 (d, 8,5 Hz)
4	107,50	CH	7,61 (d, 8,5 Hz)
4'	107,84	CH	7,61 (d, 8,5 Hz)
4a, 4a'	159,95		
5, 5'	76,50	CH	4,17 (d, 10,7 Hz)
6, 6'	30,56	CH	2,78
7a, 7a'	36,71	CH ₂	2,40 (dd, 11Hz)
7b, 7b'	36,71	CH ₂	2,72 e 2,78
8, 8'	178,52		
9, 9'	187,88		
9a, 9a'	102,62		
10, 10'	86,24		
11	18,43	CH ₃	1,25 (d, 6,0 Hz)
11'	19,21	CH ₃	1,25 (d, 6,0 Hz)
12, 12'	171,17		
13, 13'	52,75	CH ₃	3,55 (s)

Tabela I - Valores de deslocamentos químicos expressos em ppm apresentados por Phyp. em piridina-d₅. O espectro ¹ H foi obtido em 300 MHz e ¹³ C em 75 MHz. TMS foi usado como referência interna.

O quadro I mostra as estruturas , ponto de fusão e rotação ótica de 7 isômeros conhecidos do ácido secalônico.

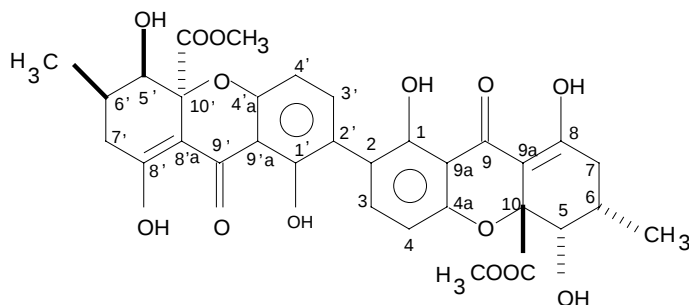
Quadro I - Estruturas dos ácidos secalônicos e dados de ponto de fusão e rotação ótica.

Ácido Secalônico A [99]



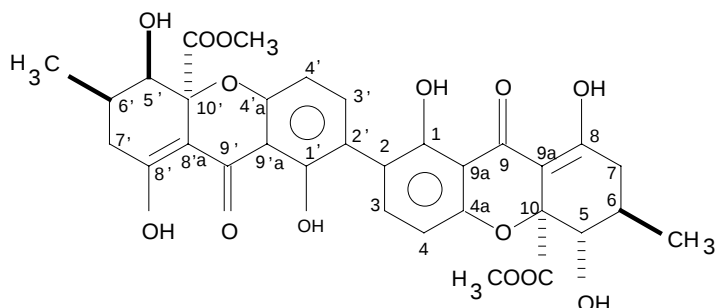
p.f. : 260° C (CHCl₃/EtOH) ; [α]_D -73° (CHCl₃) (Yosioka et al. 1968); 243° C (Acetona) ; 248° C (CHCl₃) (Yosioka et al. 1971); 208-209° (CCL₄/CH₂Cl₂) ; [α]_D -264° (C₀,24 piridina) (Howard et al. 1973); 246-248° ; [α]_D -75° (CHCl₃), - 202° (piridina) , EM m/z : 638 (M, 30%), 579 (M - COOCH₃, 100%) (Steyn, 1970).

Ácido Secalônico B [100]



p.f. : 254-256° C (dec.) ; $[\alpha]_D + 194^\circ$ (piridina) (Aberhart 1965), 259-262° C (Steyn 1970), $[\alpha]_D + 212^\circ$ (c 0,41 piridina) (Howard et al. 1973).

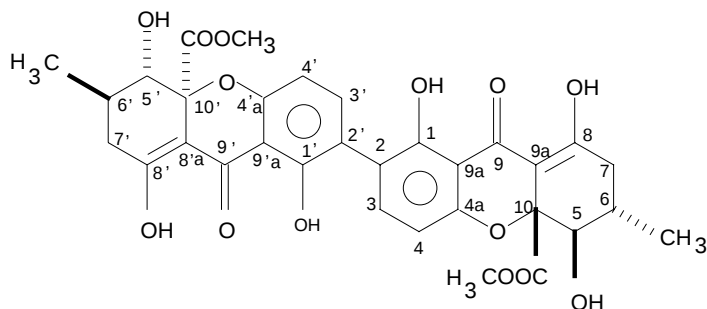
Ácido Secalônico C [101]



p.f. : 154-160°C (C₆H₆/C₆H₁₀); [α]_D + 25° (CHCl₃); + 0,7 +- 0,3 (piridina) (Yosioka et al. 1972). EM (m/z %) : 638,0 (M, 20%), 579 (M-COOCH₃, 100).

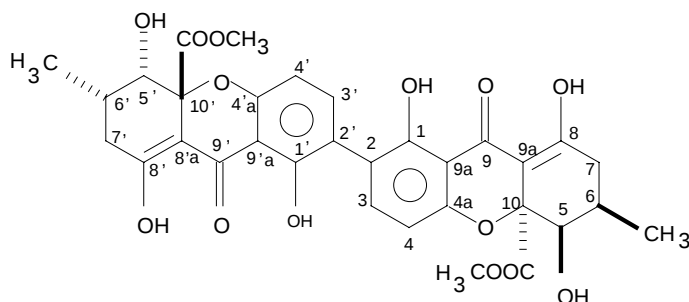
continuação do quadro 1

Ácido Secalônico D [102]



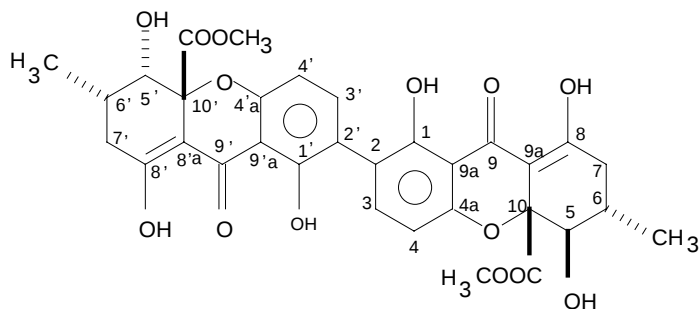
p.f. : 255-259°C (CCl₄/CHCl₃); $[\alpha]_D + 64^\circ$ ($\leq 0,14$ CHCl₃) (Andersen et al. 1977), 253-255°C (CHCl₃); $[\alpha]_D + 82^\circ$ (CHCl₃); + 192° (piridina) (Steyn 1970).

Ácido Secalônico E [103]



p.f. : 206-208°C ; $[\alpha]_D -212^\circ$ ($\leq 0,41$ piridina) (Howard et al. 1973), EM (m/z) : 638,0 (M); 579 (M-COOCH₃), (proporção entre as intensidades relativas igual a 1:1).

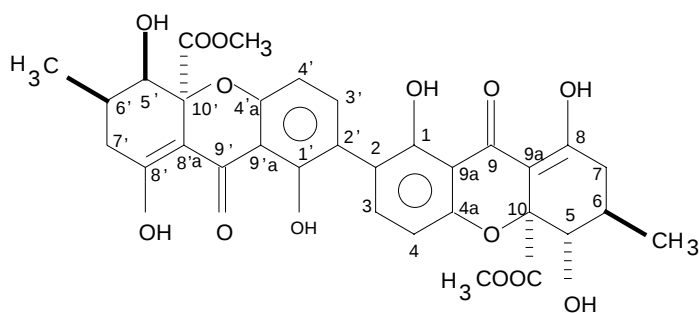
Ácido Secalônico F [104]



p.f. : 218-221° (placa aquecida), 253-256° (capilar à vácuo); $[\alpha]_D + 202^\circ$ (piridina)(Andersen et al. 1977). EM (m/z %) : 638,0 (M, 20), 579 (M-COOCH₃, 100).

continuação do quadro I

Ácido Secalônico G [105]



p.f. : 206-207° C (Etanol); $[\alpha]_D$ -106,9° (c 1,055 CHCl₃); -201,6° (c 1,105 piridina)(Kurobane et al. 1978).

4.7 -*Pseudoparmelia sphaerospora* (Nyl.) Hale



Figura 55 - *Pseudoparmelia sphaerospora* coletado sobre córtex de árvore (Vila Piraputanga-MS).

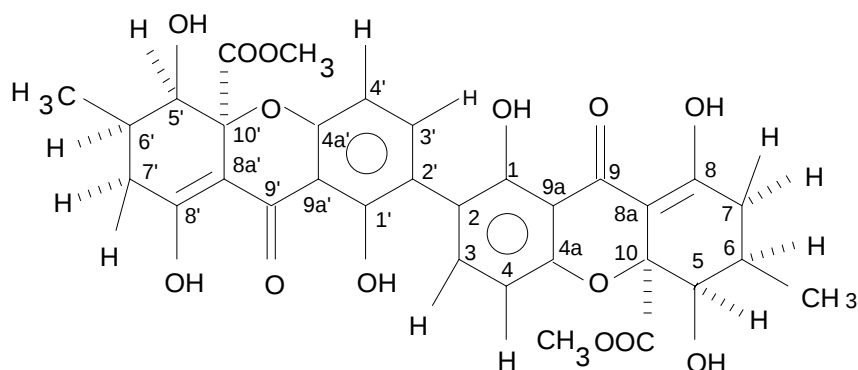
O líquen coletado sobre córtex, após limpeza, resultou em 33,0 g de pó, que foi submetido a extrações exaustivas em Soxhlet, ao abrigo da luz. As extrações foram realizadas com benzeno (5,6 L) e acetona (5,3 L). Os extratos obtidos em cada etapa do

processo de extração foram concentrados em rotavapor sob pressão reduzida. Do extrato benzênico, resultaram 4,3 g de resíduo (13,2 %) e do extrato acetônico 3,5 g (10,6%).

Após secagem, as frações resultantes da extração com benzeno foram tratadas com clorofórmio na tentativa de separar os componentes presentes por diferença de solubilidade. Esse procedimento permitiu a separação parcial de um sólido branco, após adição de acetona à solução clorofórmica. O sólido branco codificado como PsphA., foi purificado por tratamentos sucessivos com acetona. Visando à separação dos dois componentes principais presentes no extrato benzênico (um deles um pó branco e o outro, pó amarelo), foi feita a cromatografia em coluna de gel de sílica. Foi aplicado à coluna 1,0 g de resíduo do extrato benzênico e a eluição foi conduzida usando gradiente de polaridade com hexano, clorofórmio, acetona e metanol. Foram coletadas 96 frações de 125 mL. As frações foram concentradas em rotavapor sob pressão reduzida e cromatografadas em camada fina de sílica gel no eluente II. A análise das primeiras frações indicou a presença de substância de natureza graxa e pigmentos. As demais frações continham os componentes branco e amarelo, que não se separaram por esse processo. Devido às dificuldades de purificação dos componentes presentes nas frações eluídas da coluna, essas foram novamente reunidas.

Várias tentativas foram realizadas visando à separação dos componentes por solubilidade em diversos solventes, porém os resultados não foram satisfatórios. O processo que apresentou resultado satisfatório, para separação do componente amarelo, foi a cromatografia preparativa em sílica gel impregnada com ácido oxálico 0,1 N. A cromatografia foi realizada no eluente III. Após eluição do componente amarelo com acetona, o solvente foi evaporado e o resíduo (PsphB) foi cristalizado em clorofórmio/acetona. Os cristais em forma de agulhas amarelas fundiram em 256-258°C. A rotação ótica apresentada por PsphB foi $[\alpha]_D -204^\circ$ (c 0,2 piridina). PsphB está presente na amostra analisada numa proporção aproximada de 6,6%.

Os dados espectrais obtidos de PsphB (IV, ^1H , ^{13}C e massas) são coincidentes com aqueles apresentados pela fração Phyp.



Ácido secalônico
(PsphB)

Do extrato acetônico concentrado, foi separado um componente que se apresentou como pó branco. A purificação foi feita por tratamento com acetona e acetona/água a 80%. Esse componente foi codificado como PsphAc. e está presente no líquen analisado numa proporção aproximada de 10,0 %. PsphAc., fundiu com decomposição em 287°C. Pela análise cromatográfica e ponto de fusão, verificou-se que PsphAc. e PsphA. (o último isolado do extrato benzênico) apresentaram o mesmo comportamento, tratando-se, portanto, do mesmo composto. Foram obtidos os seguintes dados espectrais :

IV(KBr) $\nu_{\text{máx.}}$ cm^{-1} : 3470, 3410, 1980, 2950, 2930, 2860, 1755, 1710, 1628, 1610, 1565, 1490, 1485, 1455, 1370, 1325, 1295, 1270, 1250 e 1220.

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ (ppm) : 2,18 (3H, s, ArCH $_3$), 2,26 (3H, s, ArCH $_3$), 2,42 (3H, s, ArCH $_3$), 3,87 (3H, ArOCH $_3$), 6,68 (1H, d, J 8,0 Hz, ArH), 6,89 (1H, lactol), 8,34 (1H, OH lactol, d, J 8,0 Hz).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm) : 8,6 (C-9), 9,5 (C-9'), 20,8 (C-8), 56,2 (OCH $_3$), 95,6 (C-8'), 109,2 (C-1'), 110,9 (C-3), 112,6 (C-1), 114,6 (C-5), 120,4 (C-3'), 135,5 (C-6'), 138,0 (C-5'), 141,9 (C-6), 148,3 (C-4'), 151,3 (C-2'), 161,1 (C-7), 161,5 (C-7'), 166,5 (C-4), 167,1 (C-2).

EM m/z : 372 (M^+ , 29), 354 (43), 328 (100).

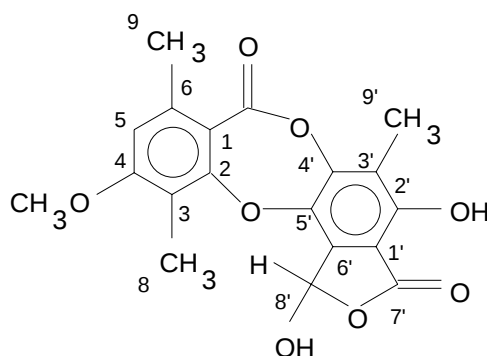
No espectro de infravermelho de PsphA, a banda aguda em 3410 cm^{-1} é característica de grupo OH não ligado (quelado), enquanto que as bandas em 1755 e 1710 cm^{-1} são características de lactonas e de depsidonas, respectivamente. A banda em 1610 cm^{-1}

¹ é indicativa de C=O com ligação intramolecular, e em 1560 cm⁻¹ característica de anel aromático.

O espectro de massas apresenta padrão de fragmentação sugerindo a presença de um grupamento OH próximo a uma carboxila, o que favorece a eliminação de uma molécula de água. Assim, o íon M⁺ 372 ao perder uma molécula de água dá origem ao íon M⁺ - H₂O (354). O íon M⁺ 328 indica a saída de um mol de CO₂ a partir do íon M⁺, dando origem ao íon M⁺ - CO₂ (328).

O espectro de RMN ¹³C não apresenta sinal correspondente a grupo aldeído livre (δ 190,0 - 197,0 ppm). A ausência desse grupamento na forma livre foi confirmada pela reação negativa com *p*-fenilenodiamina.

De acordo com os dados espectrais apresentados e comparação com dados da literatura (Keogh, 1978; Sudholm, 1981), é possível propor a estrutura de ácido hipostítico [106] para o composto PsphA.



Ácido hipostítico [106]

A análise química do espécime coletado na Vila Piraputanga - MS, permitiu o isolamento de dois componentes principais, sendo um deles um pigmento amarelo, identificado como ácido secalônico. Ao outro componente isolado, foi proposta a estrutura do ácido hipostítico. Atranorina e outros ácidos citados por Hale (1976) não foram detectados no espécime analisado.

Esse resultado está de acordo com a observação de Hale (1986) sobre a presença de um pigmento amarelo na medula de espécies do gênero *Pseudoparmelia*, ao qual atribuímos a estrutura do ácido secalônico. Esse fato tem significado quimiotaxonômico para a identificação do gênero *Pseudoparmelia*.

4.8 - *Usnea aff. meridionalis* Zahlbr.

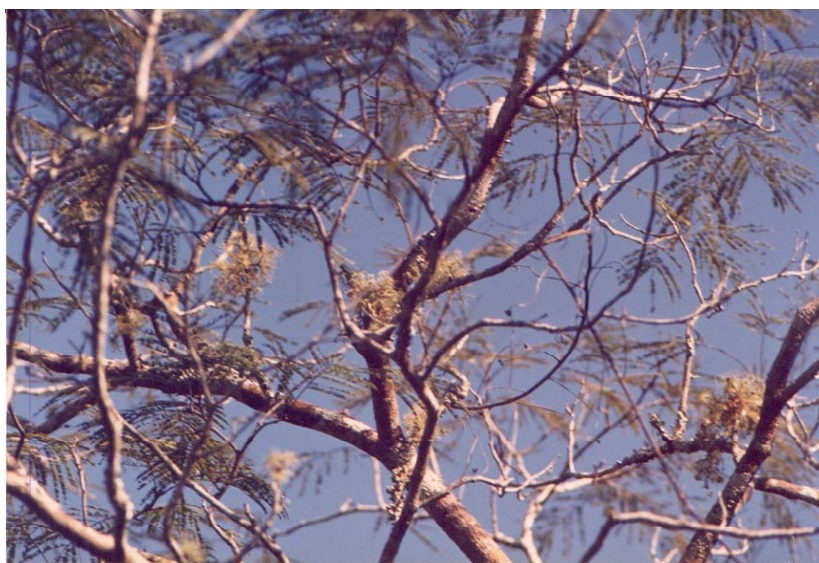


Figura 56 - *Usnea meridionalis* desenvolvido sobre córtex de árvore (Vila Piraputanga- MS)

O líquen foi coletado sobre córtex e, após os procedimentos iniciais de seleção e limpeza, foi triturado em moinho. O pó (100,0 g) foi tratado sequencialmente e de modo exaustivo com benzeno e acetona em Soxhlet. O extrato benzênico concentrado (4,7 g) foi tratado com etanol para remoção de pigmentos. A ccd em sílica gel do extrato bruto indicou a presença de apenas um componente. O extrato concentrado foi purificado por dissolução em clorofórmio e precipitação pela adição de etanol em excesso. O componente purificado (UMB) apresentou-se sob forma de cristais amarelos com p.f. 202-203°C. Foram obtidos os seguintes dados espectrais :

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,73 (3H, s, CH_3 -13), 2,08 (3H, s, CH_3 - 16), 2,65 (6H, s, CH_3 - 15, CH_3 - 18), 6,0 (1H, s, H-4).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 8,2 (C 16), 28,6 (C 13), 32,0 (C 15), 32,8 (C 18), 59,7 (C 12), 99 (C 4', C6), 101,6 (C 5), 104,0 (C 9), 105,7 (C 11), 110,0 (C 7), 155,8 (C 3), 158,1 (C 8), 163,8 (C 10), 180,0 (C 2), 198,7 (C 1), 201,0 (C 17), 202,5 (C 14).

$[\alpha]_D + 495,5^\circ$ a 23°C (CHCl_3).

A análise do comportamento cromatográfico e dos espectros de RMN ^1H e de ^{13}C e comparação com dado da literatura (Huneck et al., 1996) permitiram identificar o composto UMB, como sendo o ácido úsnico [2]. O ácido úsnico está presente no espécime em análise na proporção de 0,9%.

Após remoção do ácido úsnico, o extrato benzênico (aproximadamente 3,0 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel impregnada com ácido oxálico 0,5 N. A eluição foi conduzida utilizando gradiente crescente de polaridade com benzeno, acetona e metanol. Foram coletadas 85 frações de 125 mL. As frações 05, 06 e 07 eluídas com benzeno continham ácido úsnico. As frações 22 a 26 eluídas com benzeno /acetona 8:2 v/v apresentaram um componente principal acompanhado de pigmentos. A remoção desses foi feita por tratamento com acetona. As frações foram reunidas e resultaram em pó branco (UM2226) . A cristalização foi feita com acetona/água 80%. As frações 27 e 28 eluídas com a mesma mistura solvente (benzeno/acetona 8:2 v/v) apresentaram a mesma composição que UM2226, porém com menor grau de pureza. A fração UM2226 fundiu com decomposição em 275°C. Os dados espectrais dessa substância são os seguintes:

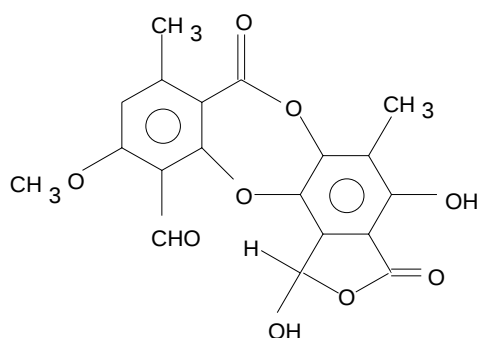
IV(KBr) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$: 3425 (OH), 1765 (lactona), 1745 (C=O depsidona), 1685 (C=O aldeído).

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ (ppm) : 2,18 (3H, ArCH $_3$), 2,48 (3H, ArCH $_3$), 3,90 (3H, ArOCH $_3$), 6,61 (1H, ArH), 7,08 (1H, lactol, -CHOH trocável com D $_2$ O), 10,17 (1H, ArOH, trocável com D $_2$ O), 10,46 (1H, ArCHO).

EM m/z (%) : 387 [M + 1] (15), 386 [M $^+$] (66), 368 (58), 340 (45), 193 (54), 191 (81).

Os dados espectrais obtidos (IV, RMN ^1H e massas) estão de acordo com aqueles obtidos por Ingolfssdottir et al. (1986) para o ácido estítico [53].

As estruturas cristalinas resultantes da microcristalização de UM2226 em GAOt são semelhantes àquelas descritas por Thompson (1968) e Taylor (1967a) para o ácido estítico [53].



Ácido estítico [53]

Do extrato acetônico concentrado, sedimentou um pó branco que foi removido por centrifugação. A fração codificada como UMAc. foi tratada com acetona para remoção de pigmentos. Seus dados espectrais estão apresentados abaixo :

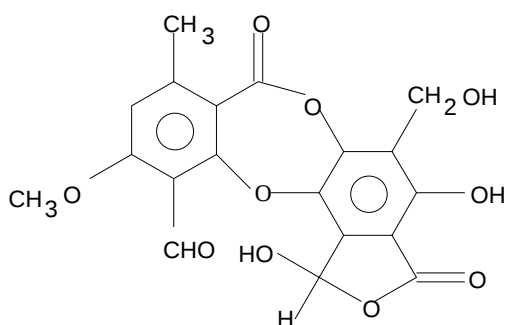
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm): 2,37, 2,40 (2 x 3H, s, ArCH $_3$), 4,59 (2H, s, -CH $_2$ OH), 6,80 (1H, s, ArH), 10,5 (1H, s, ArCHO).

O comportamento cromatográfico apresentado por UMAc, seu espectro de RMN ^1H e a comparação com dados da literatura (Sudholm et al., 1981) permitem identificá-la como sendo o ácido protocetrárioico [51].

O sobrenadante resultante da centrifugação do extrato acetônico foi cromatografado e indicou a presença de pelos menos 5 componentes; desses apenas dois estão em maior proporção ; ácido estítico e um outro componente de Rf menor . Esse último foi separado por cromatografia preparativa em ccd de sílica gel no eluente I (UMAc2). O espectro de RMN ^1H foi obtido em 60 MHz, apresentando os seguintes sinais:

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 60 MHz) δ (ppm): 2,25 (3H, ArCH $_3$), 3,67 (3H, ArOCH $_3$), 4,34 (2H, ArCH $_2$ -), 6,3 (1H, ArH), 6,8 (1H, lactol), 10,17 (1H, ArCHO) (Figura 30).

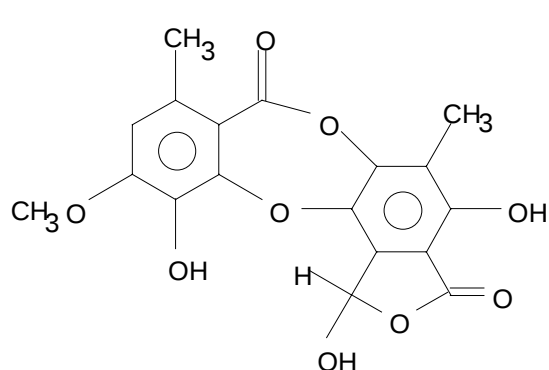
Com base nesses dados e comparação com dados da literatura (Huneck et al., 1996), é possível sugerir a estrutura de ácido constítico ao componente UMAc2.



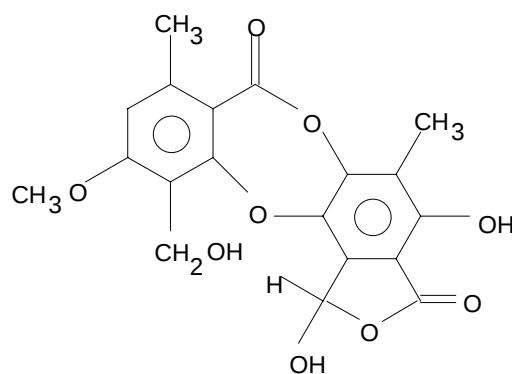
Ácido constítico [107]

O extrato acetônico restante foi cromatografado em ccd de sílica gel juntamente com padrões de ácidos nortístico [6], salazínico [52], estítico [53] e hipostítico [106] e com o extrato acetônico de *Parmotrema crinitum* (Ach.) Hale. Segundo Culberson (1981), *P. crinitum* contém atranorina [3], ácidos estítico [53], constítico [107], megaziaico [108], criptostítico [109], traços de ácidos hipostítico [106] e nortístico [6], além de outras

substâncias não identificadas. A comparação do comportamento cromatográfico (valores de R_f , cores adquiridas após a revelação) com substância padrão e com dados da literatura (Culberson 1972, Culberson et al. 1981, White et al. 1985), permite sugerir que os ácidos hipostítico [106], criptostítico [109], salazínico [52] e constítico [107] estão presentes no extrato acetônico de *U. meridionalis*, além do ácido estítico [53]. Desses ácidos, somente estítico [53] e constítico [107] estão em maior proporção nesse extrato.



Ácido megaziaico [108]



Ácido criptostítico [109]

4.9 -*Usnea* sp .



Figura 57 - *Usnea* sp. desenvolvido sobre córtex de árvore (Vila Piraputanga-MS).

O líquen foi coletado sobre córtex na Vila Piraputanga. O pó do líquen (24,0g) foi extraído com benzeno (1,5 L) e a seguir com acetona (1,2 L). Após evaporação do solvente em rotavapor, o resíduo do extrato benzênico pesou 1,6 g e o extrato acetônico 0,6 g. A cromatografia em camada fina de sílica gel indicou ausência de ácidos liquênicos no extrato acetônico.

O extrato benzênico foi fracionado preliminarmente em coluna de gel de sílica eluindo-se com diclorometano, clorofórmio, clorofórmio/acetona 1:1, acetona e metanol. As frações resultantes da eluição com clorofórmio foram reunidas, concentradas e novamente cromatografadas em gel de sílica. A eluição foi conduzida com solventes puros e gradiente crescente de polaridade, usando diclorometano, diclorometano/clorofórmio, clorofórmio, clorofórmio/acetona e acetona. As frações eluídas com clorofórmio/acetona 20 a 60% apresentaram um componente que foi identificado como ácido úsnico [2]. A identificação foi conduzida através da cromatografia comparativa com padrão, microcristalização comparativa em GE e determinação do ponto de fusão. O componente apresentou $[\alpha]_D + 494,5^\circ$ a 23°C (CHCl_3).

As frações resultantes da eluição com clorofórmio/acetona 1:1 (referente ao primeiro fracionamento) foram reunidas, concentradas e novamente cromatografadas em gel de sílica, e a eluição foi conduzida com clorofórmio e gradiente clorofórmio/acetona e acetona. As frações eluídas com clorofórmio/acetona 2% apresentaram um composto branco cristalino, que foi purificado por cristalizações sucessivas com clorofórmio/acetona. Esse componente codificado como Usp. fundiu em $194\text{--}195^\circ\text{C}$ e apresentou na microcristalização em GE estruturas cristalinas comparáveis àquelas descritas por Taylor (1967b) para o ácido difractáico. Os espectros de RMN ^1H e de ^{13}C do componente Usp. apresentam sinais que permitem atribuir ao componente Usp. a estrutura de ácido difractáico.

IV(KBr) $\nu_{\text{máx.}}$ cm^{-1} : 3060, 2980, 2820, 2620, 2560, 1745, 1645, 1625, 1580, 1500, 1470, 1452, 1400, 1395, 1325, 1195, 1140, 1065, 990, 928, 895, 850, 840, 810, 805, 790, 760, 730, 600.

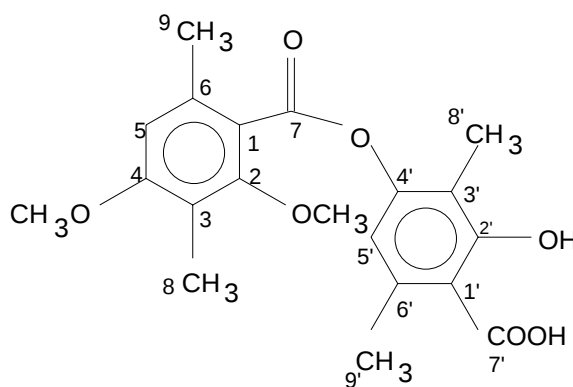
RMN ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz) δ (ppm) : 2,13 (6H, s, ArCH_3), 2,44 (3H, s, ArCH_3), 2,61 (3H, s, ArCH_3), 3,83 (3H, s, ArOCH_3), 3,89 (3H, s, ArOCH_3), 6,67 (1H, s, $\text{ArH } 5$), 6,74 (1H, s, $\text{ArH } 5'$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6 , 75 MHz) δ (ppm) : 8,7 (C 9'), 8,9 (C 9), 19,5 (C 8), 22,8 (C 8'), 55,8 (C 4 OCH_3), 61,7 (C 2 OCH_3), 107,5 (C 5), 113,4 (C 3'), 115,7 (C 5'), 116,0 (C 1'), 116,1

(C 3), 119,4 (C 1), 134,8 (C 6), 139,1 (C 6'), 152,4 (C 4'), 157,0 (C 4), 159,5 (C 2), 161,3 (C 2'), 167,5 (C 7), 173,1 (C 7').

EM m/z : 374 [M^+ , 0,2], 193 (100).

Os deslocamentos químicos apresentados pelo componente Usp. são comparáveis àqueles citados por Huneck (1968) e Sudholm (1981) para o ácido difractáico [37].



Ácido difractáico [37]

Com base nos resultados obtidos da análise química de *Usnea* sp., conclui-se que ácido úsnico e ácido difractáico são os derivados fenólicos presentes nesse espécime.

4.10 - *Heterodermia microphylla* (Kurok.) Scorepa



Figura 58 - *Heterodermia microphylla* coletado sobre rocha (Vila Piraputanga-MS).

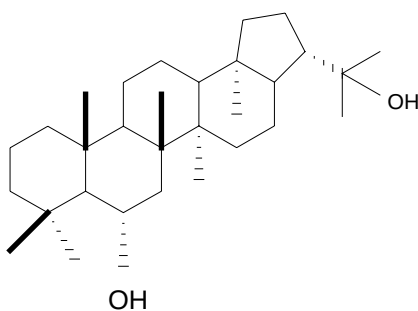
O líquen foi coletado sobre rocha e, após os procedimentos de seleção e limpeza, resultou em 4,9 g de pó, que foi extraído exaustivamente com clorofórmio e acetona em Soxhlet. O extrato clorofórmico concentrado, após remoção de pigmentos (tratamento com acetona), foi cromatografado em camada fina de sílica gel juntamente com padrões. Foram identificados o depsídeo atranorina [3] e o triterpeno zeorina [84], como componentes principais.

A microcristalização em GAoT deu aparecimento a estruturas cristalinas características de atranorina[3] e zeorina [84], confirmando os dados obtidos pela análise cromatográfica.

Por cromatografia em ccd preparativa, utilizando sílica gel impregnada com ácido oxálico 0,1 N e o eluente V, foram separados os dois compostos. Atranorina [3] foi obtido em quantidade que permitiu obtenção do espectro de RMN ¹ H, confirmando sua estrutura. O outro composto, zeorina [84], foi obtido em quantidade insuficiente para obtenção de espectros.

O extrato acetônico apresentou em sua composição apenas pigmentos, não tendo sido analisado.

De acordo com Kurokawa (1962) *Anaptychia microphylla*, atualmente *Heterodermia microphylla*, ocasionalmente contém ácidos nortístico e salazínico, juntamente com atranorina e zeorina. Swiscow & Krog (1988) e Galloway (1985) descreveram *Heterodermia microphylla* como espécime contendo atranorina e zeorina. O espécime coletado em Mato Grosso do Sul apresentou em sua composição o depsídeo atranorina [3] e o triterpeno zeorina [84], não tendo sido detectados ácidos nortístico e salazínico.



Zeorina [84]

4.11 - TESTES BIOLÓGICOS

4.11.1 - ATIVIDADE FUNGITÓXICA

Ácido úsnico [2], atranorina [3], ácido difractáico [37] e orselinato de etila [98] foram os compostos que apresentaram atividade de inibição do crescimento de *C. sphaerospermum*. Ácido úsnico [2] e atranorina [3] na concentração mínima de 1 µg inibiram o crescimento do fungo, enquanto que o ácido difractáico [37] e orselinato de etila [98] apresentaram atividade na faixa de 1 a 5µg. Os demais compostos testados não apresentaram atividade fungitóxica na concentração de 10 µg (Tabela II).

Esses resultados indicam a viabilidade de estudos dessa classe de compostos frente a outros fungos, visando avaliar o uso desses, ou seus derivados, no tratamento de afecções causadas por esses microorganismos.

4.11.2 - ATIVIDADE CITOTÓXICA

De todos os compostos avaliados, o ácido úsnico [2] foi o mais ativo (DL₅₀ 3,70 ppm), seguido do ácido protocetráico [51] > 50,0 ppm; atranorina [3] 74,8 ppm, orselinato de etila [98] 105,0 ppm, ácido secalônico [99] > 125,0 ppm, ácidos hipostítico

[106] e lecanórico [12] > 250 ppm, ácido difractáico [37] e salazínico [52] > 300,0 ppm. Sulfato de atropina foi usado como padrão de comparação (Tabela II).

Os ácidos protocetrárico, secalônico, hipostítico, lecanórico, difractáico e salazínico, devido à baixa solubilidade em água, apresentaram dificuldades para a realização dos ensaios.

Os compostos isolados das amostras analisadas e relatadas no presente trabalho foram também testados quanto à atividade anti-tumor *in vitro* e *in vivo*. Dos compostos testados, o ácido secalônico apresentou atividade em relação às células KB e a CI_{50} (concentração que inibe 50% de proliferação celular) foi de 1,25 µg/mL. O ácido salazínico na dose de 120 mg/kg inibiu em 54,7% e 44,6% os tumores sarcoma 180 e carcinoma de Erlich (Tabela II).

Compostos	Atividades		
	fungitóxica	citotóxica	antitumor
Ácido úsnico	1 µg	3,70 ppm	
Atranorina	1 µg	74,80 ppm	
Orselinato de etila	1 a 5 µg	105,0 ppm	
Ácido difractáico	1 a 5 µg	> 300,0 ppm	
Ácido protocetrárico		> 50,0 ppm	
Ácido secalônico		> 125,0 ppm	células KB
Ácido salazínico		> 300,0 ppm	sarcoma 180 e carcinoma de Erlich
Ácido hipostítico		> 250,0 ppm	
Ácido lecanórico		> 250,0 ppm	

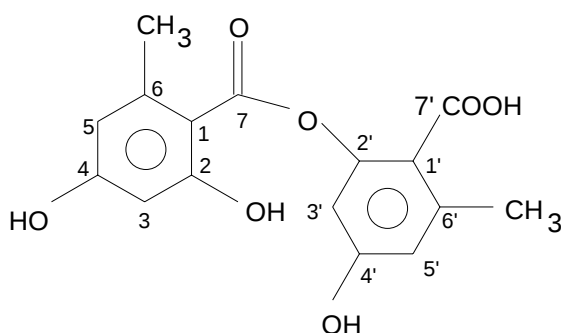
Tabela II - Atividades fungitóxica, citotóxica e antitumor apresentadas por 9 substâncias liquênicas. A atividade fungitóxica foi determinada frente ao fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum* e a atividade citotóxica frente às larvas de *Artemia salina*.

5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

No presente trabalho foram analisadas 10 espécies líquênicas pertencentes aos gêneros *Parmotrema* (5), *Pseudoparmelia* (02), *Usnea* (02) e *Heterodermia* (1).

Foram isolados e identificados 10 diferentes metabólitos secundários (Quadro II). A identificação desses compostos foi baseada na interpretação dos espectros de IV, RMN e de Massas e na análise do comportamento cromatográfico e em reações de microcristalização. Além dessas substâncias, 5-cloroatranorina [3a] e zeorina [84] foram identificadas somente por cromatografia e reações de microcristalização. Orselinato de etila [98], embora tenha sido isolado de *P. tinctorum*, não foi incluído como metabólito desse líquen, mas como artefato de técnica.

De acordo com Hale (1965), *P. tinctorum* (espécime das Ilhas Canárias) apresenta atranorina e ácido lecanórico em sua composição e foram determinados através de reações de coloração no talo. Ahmann et al. (1967) isolaram de um espécime do Mississippi, atranorina, cloroatranorina e ácido lecanórico, enquanto que Sakurai et al. (1987) isolaram de um espécime do Japão, o orto-depsídeo ácido isolecanórico [110].



Ácido isolecanórico [110]

orto-depsídeo

Vicente et al. (1984) analisaram por HPLC os constituintes fenólicos de dois ecotipos de *P. tinctorum*. Um dos espécimens foi coletado no Brasil (Paraíba) e apresentou ácido orselínico [26], orcinol, ácido nortístico [6], atranorina [3], ácido evérnico [30] e um componente não identificado. Ácido nortístico foi o componente principal desse espécime. O

outro espécime, um ecotipo de Costa Rica apresentou ácido orselínico, orcinol, ácido nortístico, atranorina, ácido evérnico, ácido lecanórico e ácido fumarprotocetrárico [50].

Considerando que a amostra de *P. tinctorum* analisada foi coletada em local relativamente próximo à uma área que havia sido queimada, orselinato de etila e o outro composto ainda não identificado (PtAcI) poderiam ser produtos da decomposição térmica dos metabólitos secundários presentes nesse líquen, ou produtos de alterações metabólicas por ação do calor.

Embora os metabólitos secundários de líquens, sejam suficientemente estáveis nas condições de campo e de armazenamento em herbários, alguns poucos compostos podem sofrer, ao longo dos anos, decomposição parcial em herbários. É o caso de espécimens contendo ácido salazínico [52] ou nortístico [6], que assumem coloração vermelha. Outro exemplo, é o ácido taminólico [8], que facilmente sofre descarboxilação resultando em ácido decarboxitamnólico [45], facilmente detectado por cromatografia. Certos ésteres, como fumarprotocetrárico [50] (ácido fumárico + ácido protocetrárico), galbínico (ácido acético + ácido salazínico) e outros, são facilmente hidrolisados e os ácidos que lhes dão origem são encontrados juntos com os ésteres podendo representar artefatos de armazenamento, extração ou procedimentos analíticos (Culberson et al. 1977).

Hylands et al. (1985) isolaram β -orselinato de metila de *Stereocaulon alpinum* e consideraram que esse composto podia ser um artefato proveniente da hidrólise de atranorina. Clorofórmio contém etanol como estabilizante e nos processos de extração com esse solvente pode ocorrer alcóolise. Para comprovar esse fato, conduziram experimentos em que atranorina foi aquecida com clorofórmio, contendo diversas proporções de etanol, e verificaram que em todos os casos, mesmo nas concentrações traços de etanol, ocorre alcóolise de atranorina. Os autores sugeriram, ainda, que o isolamento de β -orselinato de metila, como metabólito de ocorrência natural de *Parmotrema tinctorum*, pode não ser uma informação correta, visto que os processos de extração citados envolvem o uso de clorofórmio como solvente (Hylands et al., 1985).

Orselinato de etila é citado como um metabólito de *Roccella fuciformis* DC e foi isolado por tratamento do líquen com clorofórmio sob aquecimento (Aberhart et al., 1969). Esse composto pode, também, ser um artefato de técnica resultante da alcóolise de eritrina, que é um dos compostos isolados de *R. fuciformis*. Eritrina é um derivado do ácido lecanórico com eritritol.

Não há citação na literatura consultada da ocorrência de orselinato de etila em *P. tinctorum*. Dessa forma, o produto poderia ser um artefato resultante de alterações dos metabólitos por ação do calor, devido às queimadas, ou poderia ter sido formado durante o processo de purificação. A comprovação de que orselinato de etila não é um metabólito natural de *P. tinctorum*, mas um artefato de técnica, foi feita mediante a análise de três amostras desse líquen coletadas na mesma área, porém, os procedimentos de purificação do ácido lecanórico foram conduzidos em banho de gelo. Dessas amostras foram isolados atranorina e ácido lecanórico. Portanto, orselinato de etila obtido de *P. tinctorum* pode ser um artefato resultante dos processos de extração e purificação do ácido lecanórico. O ácido orselínico pode resultar da hidrólise da ligação éster entre as duas unidades aromáticas do ácido lecanórico. As diferenças observadas, quanto ao rendimento em termos de ácido lecanórico obtido das três amostras analisadas, podem estar relacionadas ao tipo de substrato, ao efeito da luz e à idade do talo liquênico (Quilhot et al. 1988).

De *P. dilatatum* foram isolados atranorina [3] e ácido protocetrário [51]. Ácido úsnico [2] também foi identificado. Porém, ocorre somente na forma de traços. O espécime de Mato Grosso do Sul apresenta a mesma composição de um espécime de herbário coletado por Vainio, em 1890, em Minas Gerais, e revisado por Hale (1965). A composição citada por esses autores foi baseada em resultados de reações de coloração no talo.

Parmotrema cf. delicatulum, *Parmotrema cf. miranda* e *Parmotrema cf. flavescens* apresentaram a mesma composição, tendo sido identificados ácido úsnico [3] e ácido salazínico [52]. De acordo com Hale (1965), *P. delicatulum* e *P. flavescens* contêm atranorina, ácidos úsnico e salazínico, enquanto que *P. miranda* contém somente ácidos úsnico e salazínico. Os espécimens de *P. delicatulum* e *P. flavescens* analisados não apresentaram atranorina como parte dos metabólitos secundários desses espécimens. A composição em termos de ácidos liquênicos citada por Hale (1965), para essas três espécies, foi determinada através de reações de coloração no talo realizadas em espécimens de herbário.

Esse grupo de 3 espécies de *Parmotrema* merece atenção especial. Foram coletadas muito próximas, são muito semelhantes na morfologia, cor e apresentaram a mesma composição química. *P. delicatulum* apresentou-se sem propágulos vegetativos, *P. flavescens* apresentou-se isidiada e *P. miranda*, sorediada. São espécies muito próximas entre si e o fato de ocorrerem lado a lado, na mesma área, faz supor que possam ter tido uma origem comum.

E que, talvez, a primeira pudesse ter sido a ancestral das outras duas, pois muitas vezes é encontrada estéril; ou então, seria uma quarta espécie, também amarelada e sem sorédios ou isídios e com composição química diferente das outras três, a qual foi identificada como *P. vividum* (Krog & Swinsc.) Krog & Swinsc. Esse espécime citado para o sul da África, pode ter sido o ancestral desse grupo, ou ter tido origem comum (Fleig, 1992). Devido a isso, essas espécies estão sendo indicadas ainda como cf. (conferatur), até melhor definição taxonômica.

De *Pseudoparmelia hypomilta* foi isolado ácido secalônico. Esse composto é conhecido por ser um metabólito de fungo e de rara ocorrência em líquens. O ácido secalônico foi isolado também de *Pseudoparmelia sphaerospora*. Desse último espécime foi isolado, além do ácido secalônico, uma depsidona identificada como ácido hipostítico [106].

O gênero *Pseudoparmelia* Lynge engloba somente quatro espécies tropicais: *P. cyphellata* Lynge, *P. chapadensis* (Lynge) Hale, *P. hypomilta* (Fée) Hale e *P. sphaerospora* (Nyl.) Hale. De acordo com Hale (1986), todas quatro espécies mostram um pigmento medular amarelo pálido, não identificado, que foi suposto ser o ácido secalônico.

Hale (1976), examinando *Pseudoparmelia sphaerospora* de vários locais, inclusive do Brasil, através de testes de coloração concluiu que esse líquen pode conter atranorina, ácido estítico, ácido nortístico, ácido girofórico, um pigmento amarelo em várias combinações e uma mistura de compostos não identificados. Cita, ainda, que a maioria dos espécimens examinados continha atranorina e o pigmento, e um outro grupo, que correspondia a 20% dos espécimens, apresentava atranorina, ácido estítico e o pigmento. Somente alguns poucos espécimens apresentaram atranorina, ácidos estítico e nortístico e uma mistura de compostos não identificados, ou, ainda, atranorina com ácidos estítico e nortístico e com ácido girofórico.

O isolamento de ácido secalônico de *P. hypomilta* e de *P. sphaerospora*, confirma a hipótese de Hale (1986) de que o pigmento medular amarelo presente em todas as espécies do gênero *Pseudoparmelia* é o ácido secalônico. Este fato tem significado quimiotaxonômico importante para a identificação do gênero *Pseudoparmelia*.

A estereoquímica do ácido secalônico isolado de *P. hypomilta* e de *P. sphaerospora* está sendo determinada através de estudos de difração de RX.

De *Usnea* sp. foram isolados ácido úsnico [2] e o depsídeo ácido difractáico [37].

De *Usnea aff. meridionalis* foram isolados os ácidos úsnico [2], protocetrárico [51], estético [53] e constítico [107]. Além desses, os ácidos hipostítico [106], criptostítico [109] e salazínico [52] também estão presentes no líquen, porém, em proporção traço. A identificação desses três últimos compostos foi feita pela análise cromatográfica comparativa com padrões de substâncias puras e com extratos de composição conhecida e dados da literatura (Culberson 1972, Culberson et al. 1981, White et al. 1985).

De *Heterodermia microphylla* foram identificados atranorina [3] e zeorina [84]. Esses dois compostos são componentes constantes desse gênero. Em muitas espécies, além desses dois compostos, estão presentes outros, sendo os mais comuns as depsidonas da série do β -orcinol, ácido norstístico e ácido salazínico (Kurokawa, 1962).

Das análises realizadas no presente trabalho, verificou-se que em muitos casos ocorrem diferenças quanto à composição em termos de ácidos liquênicos, quando comparados àquelas descritas na literatura para espécimens de outros locais. Essas diferenças podem estar relacionadas com a idade do líquen, com as variações climáticas e demais fatores ambientais (Mirando et al., 1978; Stephenson et al., 1979; Quilhot et al., 1988).

Além disso, informações sobre a composição em termos de metabólitos secundários de líquens, citados na literatura, são, em muitos casos, resultados de reações de coloração no talo liquênico realizadas como ferramenta auxiliar em estudos taxonômicos. Entretanto, sabe-se que muitas espécies tiveram sua identificação revisada em função de informações obtidas de análise química, através do isolamento e elucidação estrutural dos componentes.

Diversos bioensaios simples têm sido desenvolvidos para avaliação da atividade biológica de extratos vegetais e de substâncias puras. A avaliação de atividade fungitóxica, utilizando os ensaios de bioautografia, é um ensaio rápido e utiliza quantidades mínimas de substância teste. Um outro ensaio, é a avaliação da toxicidade de extratos e substâncias puras sobre as larvas do microcrustáceo *Artemia salina*.

Tem-se encontrado correlação positiva entre a toxicidade à larva desse organismo e a citotoxicidade às células KB (McLaughlin, 1991).

Os resultados da avaliação de atividade fungitóxica são promissores considerando de maneira especial o composto orselinato de etila que, mediante avaliações mais rigorosas de atividade frente a outros organismos patogênicos e testes de toxicidade, poderá ser um agente potencial para o combate a doenças causadas por fungos. Devido à sua

estrutura mais simples, quando comparada aos demais compostos que apresentaram atividade, poderá ser preparado em laboratório, caso possa ser utilizado como produto de interesse comercial.

As investigações em busca de novos agentes antifúngicos têm recebido destacada atenção nos últimos anos. Na agricultura, há necessidade de novos fungicidas que sejam mais eficientes que os sintéticos, economicamente viáveis e não-poluidores. Na área médica, o interesse está centrado na busca de substâncias que sejam eficientes como agentes antimicóticos, para o tratamento de micoses sistêmicas, e de novos anti-sépticos tópicos, para afecções da pele, bastante necessários nos países de Terceiro Mundo. A incidência de micoses oportunistas tem aumentado significativamente devido ao uso de imunossupressores (como nos diabetes e em pessoas soro-positivas ao vírus da AIDS) (Paxton, 1991).

O (+) ácido úsnico isolado de *U. meridionalis* apresentou DL_{50} 3,70 ppm no ensaio de citotoxicidade frente às larvas de *A. salina*. Os demais compostos testados apresentaram $DL_{50} > 50$ ppm. A maior dificuldade para a realização desses ensaios foi devida à baixa solubilidade dos compostos liquênicos em solução aquosa. Dos compostos avaliados, apenas orselinato de etila foi totalmente solúvel nas condições dos experimentos.

Dongning et al. (1994) avaliaram a atividade anticâncer de 19 amostras de extratos clorofórmico, compostos puros e polissacarídeos de 6 diferentes espécies de líquens frente às larvas de *A. salina*. Os extratos clorofórmico de *Usnea longissima* e *Cladonia stellaris*, R(+) ácido úsnico, S(-) ácido úsnico e *Umbilicaria hypococcinea* II foram bioativos. Das amostras avaliadas, o composto mais ativo foi S(-) Usnato de sódio que apresentou DL_{50} 5,5 µg/mL.

Os compostos liquênicos isolados e relatados no presente trabalho poderão ser avaliados frente à outras atividades biológicas/farmacológicas, dependendo apenas do interesse de pesquisadores da área de farmacologia.

QUADRO I I

Composição química de 10 (dez) espécies liquênicas coletadas no Mato Grosso do Sul.

Líquen	Compostos isolados	Outros compostos identificados (não isolados).
<i>Parmotrema tinctorum</i>	Atranorina [3],	5- Cloroatranorina [3a]
	Ácido lecanórico[12]	
	Orselinato de etila *[98]	
<i>Parmotrema dilatatum</i>	Atranorina [3]	Ácido úsnico [2]
	Ácido Protocetrário [51]	
<i>Parmotrema delicatulum</i>	Ácidos úsnico e salazínico [52]	
<i>Parmotrema miranda</i>	Ácidos úsnico e salazínico	
<i>Parmotrema flavescens</i>	Ácidos úsnico e salazínico	
<i>Pseudoparmelia hypomiltha</i>	Ácido secalônico [99]	
<i>Pseudoparmelia sphaerospora</i>	Ácidos secalônico e hipostítico [106]	
<i>Usnea meridionalis</i>	Ácidos úsnico, estítico [53], constítico [107] e criptostítico [109].	
<i>Usnea sp.</i>	Ácidos úsnico e difractáico [37]	
<i>H. microphylla</i>	Atranorina e zeorina [86].	

* Considerado artefato de técnica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERHART, D.J., CHEN, Y. S., DE MAYO, P. & STOTHERS, J.B. Mould Metabolites - IV - The isolation and constitution of some ergot pigments. *Tetrahedron* 21: 1417-1432, 1965.
- ABERHART D.J. & OVERTON, K.H. Studies on Lichen Substances. Part LXII. Aromatic constituents of the lichen *Roccella fuciformis* DC. A revised structure of Lepraric Acid. *J. Chem. Soc. (C)* 704-707, 1969.
- AHMADJIAN, V. A guide to the algae occurring as lichen symbionts : isolation, culture, cultural physiology and identification. *Phycologia* 6: 127-160, 1967.
- AHMADJIAN, V. *The Lichen Symbiosis*, Wiley & Sons, New York, 250p. 1993
- AHMANN G.B. & MATHEY, A. Lecanoric acid and some constituents of *Parmelia tinctorum* and *Pseudoevernia intensa*. *Bryologist*. 70(1): 93-97, 1967.
- AIRAKSINEM, M.M., PEURA, P. & ANTERE, S. Toxicity of Iceland Lichen and Reindeer Lichen. *Arch. Toxicol.* 9: 406-409, 1986.
- ANDERSEN, R., BÜCHI, G., KOBBE, B., & DEMAINE, A., L. Secalonic Acids D and F are Toxic Metabolites of *Aspergillus aculeatus* *J. Org. Chem.*, 42(2): 352-353, 1977.
- ARMSTRONG, R.A. Studies on the growth rates of lichens. In. *Lichenology : Progress and Problems*. Brown, D.H., Hawksworth, D.L. & Bailey, R.H. (eds.) pp. 309-322, Academic Press, London, 1976.
- ARUP, U., EKMAN, S., LINDBLOM, L. & MATTESSON, J.E. High performance thin layer chromatography (HPTLC) an improved technique for screening lichen substances. *Lichenologist* 25(1): 61-71, 1993.
- ASAHINA, Y., & SHIBATA, S. *Chemistry of Lichen Substances*. Japan Society from the Promotion of Science. Tokyo, 240 p, 1954.
- BLOMER, J.L. & HOFFMAN, W.F. On the origin of the C₃-unit in (+)protolichesterinic acid. *Tetrahedron Lett.* 4339, 1969.
- BROONPRAGOB, 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. *Environment and Experimental Botany* 29(2): 187-197, 1989.
- BRODO, I.M. The lichens of Long Island, New York : A vegetational and floristic analysis. *N. Y. State Mus. Sci. Serv. Bull.* 410: 1-330, 1968.

- BRODO, I.M. *Substrate Ecology*. In: *The Lichens*. Ahmadjian, V. & Hale, M.E. Academic Press, New York, 696p, 1973.
- BUDAVARI, S. *The Merck Index*. Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, p. 8374, 1989.
- BURKHOLDER, P.R., EVANS, A.W., McVEIGH, I. & THORTON H.K. Antibiotic Activity of Lichens. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* **30** : (9) 250-255, 1944.
- BURKHOLDER, P.R., & EVANS, A.W. Further studies on the antibiotic activity of Lichen. *Bull. Torrey Bot. Club.* **72**(2): 157-164, 1945.
- BUSTINZA, F. Substances antibióticas procedentes de liquenes - *Endeavour* **10**(38): 95-99, 1951.
- CAIN, B.F. Potential Anti-tumour Agents. Part I. Polyporic Acid Series. *J. Chem. Soc.* 936-940, 1961.
- CAIN, B.F. Potential Anti-tumour Agents. Part II. Polyporic Acid Series. *J. Chem. Soc.* 356-359, 1963.
- CAIN, B.F. Potential Anti-tumour Agents. Part III. Polyporic Acid Series. *J. Chem. Soc.* 5472-5473, 1964.
- CAIN, B.F. Potential Anti-tumour Agents. Part. IV. Polyporic Acid Series. *J. Chem. Soc.* 1041-1045, 1966.
- CARVALHO, C.F. & SARGENT, M.V. Naturally occurring dibenzofurans. Part 4. Synthesis of dibenzofurandiols by annellation of benzofurans. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*: 1605-1612, 1984.
- CAVALCANTI, L.H.S.M., MAIA, R.F., OLIVEIRA LIMA, E. & XAVIER FILHO, L. Atividade anti-microbiana “in vitro” da atranorina. *Rev. Microbiol. São Paulo*, **14**(3): 168-171, 1983.
- CULBERSON, C.F. Joint occurrence of a lichen depsidone and its probable depside precursor. *Science*. **143**: 255, 1964.
- CULBERSON, C. F. Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. The University of North Carolina Press, Chapel Hill, 627p, 1969.
- CULBERSON, C. F. Supplement to “Chemical and Botanical Guide to Lichen Products”. *Bryologist.*, **73**(2): 177-277, 1970.
- CULBERSON, C. F. & KRISTINSSON, H. A standardized method for the identification of lichen products. *J. Chromatogr.* **46**: 85-93, 1970.

- CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *J. Chromatogr.*, 72: 113-125, 1972a.
- CULBERSON, C. F. High-speed Liquid Chromatography of Lichen Extracts. *Bryologist*. 75: 54-62, 1972b.
- CULBERSON, C. F., & JOHNSON, A. A standardized two-dimensional thin-layer chromatographic method for lichen products. *J. Chromatogr.* **128**: 253-259, 1976.
- CULBERSON, C. F., CULBERSON, W. L., & JOHNSON, A. Thermally induced chemical artifacts in lichens. *Phytochemistry* **16**: 127-130, 1977.
- CULBERSON, C. F., CULBERSON, W.L., & JOHNSON A. A Standardized TLC Analysis of β orcinol depsidones, *Bryologist* **84**(1): 16-29, 1981.
- CULBERSON, C.F. Biogenetic Relationships of the Lichen Substances in the Framework of Systematics. *Bryologist* **89**: 91-98, 1986.
- CULBERSON, C.F. & ELIX, J.A. Lichen substances. In. *Methods in Plant Biochemistry*, V.1, *Plant Phenolics*,. DEY, P.M. & HARBORNNE, J.A. Academic Press, London, 509-535, 1989.
- CULBERSON, C.F. & ARMALEO, D. Induction of a complete secondary-product pathway in a cultured lichen fungus. *Expeprimental Micology* **16**: 52-63, 1992.
- DEMBITSKY, V. M., REZANKA, T., & BYCHEK, I. A. Lipid composition of some lichens. *Phytochemistry* **31**(5): 1617-1620, 1992a.
- DEMBITSKY, V. M., REZANKA, T., BYCHEK, I. A., & SHUSTOV, M. V. Fatty acid composition of *Parmelia* lichens. *Phytochemistry* **31**(3): 841-843, 1992b.
- DEMBITSKY, V. M., REZANKA, T., & BYCHEK, I. A. Fatty Acids and Phospholipids from Lichens of the order Lecanorales. *Phytochemistry* **31**(3): 851-853, 1992c.
- DEVINCENZI, I.A.A., HONDA, N. K., & XAVIER FILHO, L. Chemical studies on lichens from Mato Grosso do Sul - VI - Chemical Investigation on the Lichen *Collema leptosporum* Malme. Anais da 16^a Reunião Anual da SBQ (PN 72), Caxambú-MG, 1993.
- DONGNING, D., JUQING J., BAOQI Y. & CIBO, L. Brine shrimp lethality bioassay of six lichens constituents. *Zhongguo Yaoxue Zazhi* **29**(4): 211-213 apud *Chem. Abstr.*, *Columbus* **121**: 221173c, 1994.

- DORMAAR, J. F. Infrared absorption spectra of mineral matter in saxicolous lichens and associated mosses. *Can. J. Earth Sci.* 5: 223-230, 1968.
- ELIX, J. A., FERGUSON, B. A., & SARGENT, M. V. The Structure of Alecoronic Acid and Related Lichen Metabolites. *Aust. J. Chem.* 27: 2403-2411, 1974.
- ELIX, J.A. Biochemistry and secondary metabolites. In. *Lichen Biology*, Nash III, T.H. (ed.) 1st. ed. Cambridge, Cambridge University Press, . 154-180, 1996.
- ELIX, J. A., WHITTON, A..A., & SARGENT, M.V. Recent Progress in the Chemistry of Lichen Substances. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* 45: 103-234, 1984.
- ELIX, J. A., & GAUL, K. L. The Interconversion of the Lichen Depsides *para*- and *meta*-scrobiculin, and the Biosynthetic Implications. *Aust. J.Chem.* 39: 613-624, 1986.
- ELIX, J. A., JENIE, U. A. & PARKER, J.L. A novel synthesis of the lichen depsidones divaronic acid and stenoporonic acid, and the biosynthetic implications. *Aust. J. Chem.* 40: 1461-1464, 1987.
- ELIX, J.A. & WARDLAW, J.H. The Structure of Dissectic Acid, a β -Orcinol meta-Depside from the Lichen *Heterodermia dissecta*. *Aust. J. Chem.* 49:539-540, 1996.
- FAHSELT, D. Individuals, populations and population ecology. In. *Lichen Biology*, Nash III, T.H. (ed.) 1st. ed. Cambridge, Cambridge Universty Press, 1996.
- FEIGE, G.B., LUMBSCH, H.T., HUNECK, S. & ELIX, J.A. The identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr.* 646: 417-427, 1993.
- FIGUEIREDO, M. B., & PIMENTEL, C. P. V. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da Seção de Micologia do Instituto Biológico.*Summa Phytopathologica* 1(4): 299-302, 1975.
- FINNEY , D.J. Probit Analysis. 3rs. Cambridge Universty Press, Cambridge, (1971).
- FLEIG, M. Comunicação pessoal, 1992.
- FLEIG, M. & RIQUELME, I. Líquens de Piraputanga, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta. bot. bras.* 5(1): 3-12, 1991.
- FOX, C.H. & MOSBACH, K. On the biosynthesis of lichen substances. Part 3. Lichen acids as products of a symbiosis. *Acta Chem. Scand.* 21: 2327, 1967.
- GALLOWAY, D. J. Flora of New Zealand Lichens, Halleberg, New Zealand. 66l p, 1985.

- GALLOWAY, D.J. Lichen biogeography. In. *Lichen Biology* Nash III, T.H. (ed.) 1st. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1996.
- GALUN, M., and SHOMER-ILAN, A. Secondary metabolic products. In . *CRC Handbook of Lichenology*, V. III, M. Galun (ed.) p. 3-8, CRC Press Inc. Boca Raton, 1988.
- GEISSMAN, T.A. & CROUT, D.H. Organic Chemistry of Secondary Metabolism. Freeman, San Francisco, 592p, 1969.
- GRIES, C. Lichens as indicators of air pollution. In: *Lichen Biology* Nash III, T.H. (ed.) 1st. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1996.
- HALE, Jr. M.E. A monograph of *Parmelia* subgenus *Amphigymnia*. *Contr. U.S. Nat. Herb.*, 36(5): 193-308, 1965.
- HALE M. E. Growth. In. *The Lichens*. Ahmadjian, V. & Hale, M. E.. Academic Press, New York, 1973. 696 p, 1973.
- HALE, Jr. M. E. The Biology of Lichens. 2nd. ed. London, Edward Arnold, 181 p, 1974.
- HALE, Jr. M. E. A monograph of the lichen genus *Pseudoparmelia* Lynge (*Parmeliaceae*). *Smith. Contr. Bot.*, 31 : 1-62, 1976.
- HALE, Jr. M. E. *The Biology of Lichens*. 3rd. ed. Baltimore, Edward Arnold, 190 p, 1983.
- HALE, Jr. M.E. Flavoparmelia, a new genus in the lihen family *Parmeliaceae* (*Ascomycotina*) *Mycotaxon* XXV(2): 603-605, 1986.
- HAMADA, N. & UENO, T. Depside from an Isolated Lichen Mycobiont. *Agric. Biol. Chem.*, 51(6): 1705-1706, 1987.
- HAMADA, N. The effect of various culture conditions on depside production by an isolated lichen mycobiont. *Bryologist* 92(3): 310-313, 1989.
- HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants : the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30: 3864-3874, 1991.
- HARADA, M., YANO, S., WATANABE, H., YAMAZAKI, M. & MIYAKI, K. Phlogistic activity of secalonic acid A. *Chem. Pharm. Bull.* 22(7): 1600-1606, 1974.
- HARRIS, G.P. The ecology of corticolous lichens. II. The relationship between physiology and environment. *J. Ecol.* 59: 441-452, 1971.
- HAWKSWORTH, D.L. & HILL, D.J. *The lichen-forming fungi*. Glasgow, Blackie & Sons. ltd. 158 p, 1984.
- HIDALGO, M. E., FERNANDEZ, E., QUILHOT, W., & LISSI, E. Antioxidant activity of Depsides and Depsidones. *Phytochemistry* 6 (37): 1585-1587, 1994.

- HIRAYAMA, T., FUJIKAWA, F., KASAHARA, T., OTSUKA, M., NISHIDA, N., & MIZUNO, D. Anti-tumor Activities of Some Products and Their Degradation Products. *Yakugaku Zasshi* 100(7): 755-759, 1980.
- HOMANS, A. L., & FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatog.* 51: 327-329, 1970.
- HONNEGER, R., Morphogenesis. In: *Lichen Biology*, Nash III, T. H. (ed.) 1st ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1996.
- HOOPE, J.W., MARLOW, W., WHALLEY, W.B. BORTHWICH, A.D. & BOWDEN, R.. The Chemistry of Fungi. Part LXV. The Structures of Ergochrysin A, Isoergochrysin A, and Ergoxanthin, and of Secalonic Acids A, B, C, and D. *J. Chem. Soc.(C)*: 3580-3590, 1971.
- HOUVINEN, K., HILTUNEN, R., & VON SCHANTZ, M. A standardized HPLC method for analysis of lichen compounds from the genus *Cladonia*. *Planta Med.* 45: 152, 1982.
- HOUVINEN, K. A high performance liquid chromatographic method for the analysis of lichen compounds from the genera *Cladonia* and *Cladonia*. *Acta Pharm. Fenn.* 94: 99-112, 1985.
- HOUVINEN, K., & AHTI, T. The composition and contents of aromatic lichen substances in the genus *Cladonia*. *Ann. Bot. Fenn.* 23: 93-106, 1986.
- HOUVINEN, K., & AHTI, T. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia*, section *Unciales*. *Ann. Bot. Fenn.* 23: 173-188, 1986.
- HOUVINEN, K., & AHTI, T. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia* section *Perviae*. *Ann. Bot. Fenn.* 25: 371-383, 1988.
- HOUVINEN, K., AHTI, T., & STENROOS, S. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia*, section *Cocciferae*. *Ann Bot. Fenn.* 26: 133-148, 1989a.
- HOUVINEN, K., AHTI, T., & STENROOS, S. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia*, section *Helopodium* and subsection *Foliosae*. *Ann. Bot. Fenn.* 26: 197-306, 1989b.
- HOWARD, C.C. & JOHNSTONE, R.A.W. Fungal Metabolites. Part III. Isolation of Secalonic Acids from *Phoma terrestris*. *J. C. S. Perkin I.*: 2440-2444, 1973.
- HUNECK, S. Lichen Substances. In: Reinhold L. & Liwschitz, Y. (orgs.) *Progress in Phytochemistry* 1: 223-346, London, 1968.

- HUNECK, S., Nature of lichen substances. In. *The Lichens*. Ahmadjian, V. & Hale, M.E... New York, Academic Press, 495-522, 1973.
- HUNECK, S., CULBERSON, C. F., CULBERSON, W. L. & ELIX, J. A. Haematomone, a red pigment from apothecia of *Haematomma puniceum*. *Phytochemistry* 30(2): 706-707, 1991.
- HUNECK, S. & YOSHIMURA, I. Identification of Lichen Substances. Springer-Verlag, Berlin. 493p, 1996.
- HYLANDS, P. J. & INGOLFSDOTTIR, K. The isolation of methyl β -orsellinate from *Stereocaulon alpinum* and comments on the isolation of 4,6-dihydroxy-2-methoxy-3-methylacetophenone from *Stereocaulon* species. *Phytochemistry* 24(1): 127-129, 1985.
- INGOLFSDOTTIR, K., HYLANDS, P. J., and SOLBERG, Y. Structure of vesuvianic acid from *Stereocaulon* species. *Phytochemistry* 25(2): 550-553, 1986.
- JAHNS, H. M. Anatomy, Morphology and Development. In. *The Lichens*. Ahmadjian, V. & Hale, M.E.,. Academic Press, New York, 1973.
- JENKINS, D. A. & DAVIES, R.I. Trace element content of organic accumulations. *Nature (London)* 210: 1296-1297, 1966.
- JOHNSON, G.T. Contributions to the study of the Trypetheliaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 27:1-50, 1940.
- KALB K. Brasilianische Flechten 1. Die Gattung Pyxine. *Bibliotheca Lichenologica*, band 24. J. Cramer, Stuttgart, 1987.
- KAPPEN, L. Response to Extreme Environments . In . *The Lichens* .Ahmadjian, V., & Hale, M. E. Academic Press, New York, 1973.
- KEOGH, M. F. Malonprotocetratic acid from *Parmotrema conformatum*. *Phytochemistry* 16: 1102, 1977.
- KEOGH, M. .F. New β -orcinol depsidones from *Xanthoparmelia quintaria* and a *Thelotrema* species. *Phytochemistry* 17: 1192-1193, 1978.
- KERSHAW, K. & HARRIS, G.P. Simulation studies and ecology : A simple definid system model. apud BRODO, I. *Substrate Ecology* In . *The Lichens*. Ahmadjian, V. & Hale, M.E. Academic Press, New York, (1973), 696p. 1971.
- KUPCHAN, S. M. & KOPPERMAN, H. L. l-usnic acid : Tumor Inhibitor Isolated from Lichens. *Experientia* 31(6): 625, 1975.

- KUROBANE, I. & VINING, L.C. A new Secalonic Acid, linkage between tetrahydroxanthone units determined from deuterium isotope ^{13}C chemical shifts. *Tetrahedron Lett.* 47: 4633-4636, 1978.
- KUROKAWA, S. A monograph of the genus Anaptychia. Beihefte zur Nova Hedwigia. Heft 6. Verlag von J. Cramer, Weinheim. p. 449-558, 1962.
- LAWREY, J.D. Lichen Allelopathy : A Review. In. *Allelopathy - organisms, processes and applications*. INDERJIT, K., DAKSHINI, M. & EINHELLIG, F.A. ACS Symposium Series 582, August 1-5, 1993. American Chemical Society. Washington, DC, 1995.
- LAWREY, J. D. & HALE, M.E. Lichen growth responses to stress induced by automobile exhaust pollution. *Science, N.Y.* 204: 423-4, 1979.
- LIMA, R.M.O.C., NASCIMENTO, S.C., PEREIRA, E.C., HONDA, N.K., DEVINCENZI, I.A.A., & ALVES, R.C. Estudo preliminar da ação antineoplásica de substâncias liquênicas. Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, pg. 131, 1996.
- LUCKNER, M. Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals. 3^a ed. Springer-Verlag, Berlin. 563p, 1990.
- McLAUGHLIN, J.L. *Methods in Plant Biochemistry*. In. Dey, P.M. & Harbone, J. eds. Academic Press, London, New York, vol.6 pp. 1-32, 1991.
- MALME, G.O.A. Die Flechten der ersten Regnellschen Expedition. II. Die Gattung *Rinodina* (Ach.) Stiz. *Bih. T.K. SW. Vet. - Akad.*, Stockholm, **28**(3): 1-53, 1902.
- MALME, G.O.A. Die Flechten der ersten Regnellschen Expedition. *Astrotheliaceae, Paratheliaceae* und *Trypetheliaceae*. *Ark. Bot.*, Upsala, 19(1): 1-34, 1924.
- MALME, G.O.A. Die *Pannariazeen* des Regnellschen Herbars. *Ark. Bot.*, Upsala, **22A** (3): 1-11, 1925.
- MALME, G.O.A. Lichenes basteniospori Herbarii Regnelliani. *Ark. Bot.* , Upsala, 20A(9): 1-51, 1926.
- MALME, G.O.A. *Buelliae* itineris Regnelliani primi. *Ark. Bot.*, Upsala, 21A(14): 1-42, 1927.
- MALME, G.O.A. Lichenes pyrenocarpi aliquot in Herbaris Regnelliano asservati. *Ark. Bot.*, Upsala, **22A** (6) :1-11, 1928.
- MALME, G.O.A. Die Ramalinen der ersten Regnellschen Expedition. *Ark. Bot.*, Upsala, 26A (12): 1-9, 2Taf, 1934.

- MALME, G.O.A. Pertusariae Expeditionis Regnellianae primae. *Ark. Bot.*, Upsala, 28A(9): 1-27, 1936.
- MIRANDO, M. & FAHSELT, D. The effect of thallus age and drying procedure on extractable lichen substances. *Can. J. Bot.* 56: 1499-1504, 1978.
- MITCHELL, M.E. & MOLLOY, J. Contributions to the chemistry of the *Collema*taeae. - I. Lichen substances in some species of *Leptogium*. *Bryologist*, 73(3): 612-616, 1970.
- MITSUNO, M. Paper Chromatography of Lichen Substances. *J. Pharm.Bull.* 1: 170-173, 1953.
- MOISEEVA, E. N. Biochemical properties of lichens and their practical importance. *Akad. Nauk. SSSR Bot. Inst. im. V.L. Komarova, Moscou*, 1961.
- MOSBACH, K. On the biosynthesis of lichen substances. I. The depside gyrophoric acid. *Acta Chem. Scand.* 18: 329, 1964.
- MOSBACH, K. & MOSBACH, R. Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic cross linked polymers and their application in column techniques. *Acta. Chem. Scand.* 20, 2807, 1966.
- MOSBACH, K. Biosynthesis of Lichen Substances. In. *The Lichens*. Ahmadjian, V. & Hale, M. E. Academic Press, New York, 523-546, 1973.
- NASH III, T.H. Lichen Biology - Introduction. In. *Lichen Biology* Nash III, T.H. (ed.) 1st ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1996a.
- NASH III, T.H. Nitrogen, its metabolism and potential contribution to ecosystems. In. *Lichen Biology* Nash III, T.H. (ed.) 1st ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1996b.
- NASH III, T.H. Photosynthesis, respiration, productivity and growth.. In : *Lichen Biology* Nash III, T.H. (ed.) 1st ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1996c.
- OKUYAMA, E., UMEYAMA, K., YAMAZAKI, M., KINOSHITA, Y. & YAMAMOTO, Y. Usnic and Diffractaic Acid as Analgesic and Antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med.* 61: 113-115, 1995.
- PAXTON, J.D. Assays for antifungal activity. In. *Methods in Plant Biochemistry*. Dey P.M. & Harbone, J. (eds). vol. 6 pp. 32-46, 1991.

- PEREIRA, E.C., PEREYRA, T., MATOS, S.C., DA SILVA, N.H., ANDRADE, L., & VICENTE, C. Bioproduction of usnic acid from acetate by kaolinite immobilized cells of *Cladonia substellata* Vain. *Acta Soc. Bot. Pol.* 64: 171-174, 1995a.
- PEREIRA, E.C., MOLINA, M.C., PEDROSA, M.M., SOLAS, M.T., VICENTE, C. & LEGAZ, M.E. Production of ribitol by alginate-immobilized cells of the lichen *Cladonia verticillaris*. *An. Quím.* 91: 253-259, 1995b.
- PIERVITTORI, R., ALESSIO, F. & MAFFEI, M. Fatty Acid Variations in the Lichen *Xanthoria parietina*. *Phytochemistry* 36(4): 853-856, 1994.
- POUCHERT, C.J. & BEHNKE, J. The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FTNMR Spectra V.II. pp. 1258, 1st ed. Aldrich Company, Milwaukee Wisconsin, 1993.
- PRUSSIA, C. M. & KILLINGBECK, K. T. Concentrations of Ten Elements in Two Common Foliose Lichens : Leachability, Seasonality, and the Influence of Rock and Tree Bark Substrates. *The Bryologist* 94(2): 135-142, 1991.
- QUILHOT, W.P. & GUZMÁN, G.G. Factores que determinan la variabilidad de las concentraciones de los metabolitos liquenicos. *Rev. Latinoamer. Quím.* 19(1): 19-22, 1988.
- RICHARDSON, D.H.S. The surface physiology of lichens with particular reference to carbohydrate transfer between the symbionts. In. *Surface Physiology of Lichens*. Vicente, C. Brown, D.H. & Legaz, M.E.. (eds.) Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 1984.
- RICHARDSON, D.S.H. Medicinal and other economic aspects of lichens. In. *CRC Handbook of Lichenology*, V.III. Galun, M. (ed.) CRC Press, Boca Raton, 1988.
- RIKKINEN, J. What's behind the pretty colours ? A study on the photobiology of lichens. *Bryobrothera* v.4 Helsinki, 1995.
- RUSSI, G.C. Subsídios para o estudo de uma região : Aquidauana. Polígrafo de divulgação interna, Centro Universitário de Aquidauana, UFMS, 1975.
- SALA, T. & SARGENT M. V. Depsidone synthesis. Part 16. Benzophenone-grisa-3',5'-diene-2',3-dione-depsidone interconversion : A new theory of depsidone biosynthesis. *J. Chem. Soc, Perkin I*, 855-869, 1981.
- SANTESSON, J. Chemical studies on lichens. *Acta Univ. Upsaliensis*. Abstr. of Uppsala Diss. in Sci. 127, 28p, 1969.

- SANTESSON, J. Identification and isolation of lichen substances. In . *The Lichens* .Ahmadjian, V. & Hale M.E. London. Academic Press, p. 633-659, 1973.
- SAKURAI, A. & GOTO, Y., Chemical studies on the lichen. I. The structure of Isolecanoric acid, a new ortho-depside isolated from *Parmelia tinctorum* Despr. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 60: 1917-1918, 1987.
- SHIBATA, S. Some recent studies on the metabolites of fungi and lichens. *Pure Appl. Chem.* 33: 109-129, 1973.
- SHIBATA, S. & IITAKA, Y. Renewed studies on the structure of didymic acid. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 366-368, 1984.
- SHIBAMOTO, T., & WEI, C. I. Mutagenicity of lichen constituents. *Environment Mutagenesis* 6: 757-762, 1984.
- SHIBATA, S., & TAGUCHI, H. Occurrence of isousnic acid in lichens with reference to "isodihydrousnic acid" derived from dihydrousnic acid. *Tetrahedron Lett.* 1967 : 4867. 1967.
- SHIBATA, S., & MIURA, Y. Antibacterial effects of lichen substances. I. Comparative studies of various lichen substances. *Japan. Med. Journ.* 1(6): 518-521, 1948.
- SILVA, J.O., MAIA LEITE, J.E., PAULO, M.Q. & XAVIER FILHO, L. Atividade antimicrobiana de líquens brasileiros - I. *Bol. Soc. Brot., Sér. 2*, 59: 87-96, 1986.
- SHIMADA, S., SAITO H, T., NAMIKI, Y., SANKAWA, U. & SHIBATA, S. New siphulin derivatives from the lichen *Siphula ceratites*. *Phytochemistry* 19: 467-469 1980.
- SMITH , D.C. & DOUGLAS, A.E. 1987. *The Biology of Symbiosis*. Edward Arnold, London, 1987.
- SMITH, D.C. The biology of lichen thalli. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* 37: 537-50, 1962.
- SOLIS, P.N., WRIGHT, G.W., ANDERSON, M.M. GUOTA, M. P. & PHILLIPSON D.J. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Med.* 59: 250-252, 1993.
- STEPHENSON, N.L. & RUNDEL, P. W. Quantitative variation and the ecological role of vulpinic acid and atranorin in the thallus of *Letharia vulpina*. *Biochem. Syst. Ecol.* 7: 263-267, 1979.
- STEYN, P.S. The isolation, structure and absolute configuration of secalonic acid D, the toxic metabolite of *Penicillium oxalicum*. *Tetrahedron* 26 : 51-57, 1970.

- SUDHOLM, E.G. & HUNECK S. ^{13}C NMR - Spectra of Lichen Depsides, Depsidones and Depsones. *Chemica Scripta* 18: 233-236, 1981.
- SYERS, J. K. Chelating ability of fumarprotocetratic acid and *Parmelia conmpersa*. *Plant & Soil*, 31: 205-208, 1969.
- SYERS, J. K., & ISKANDAR, I. K. Pedogenetic significance of Lichens. In. *The Lichens* Ahmadjian V. & Hale, M. E. New York, Academic Press, p. 225-24, 1973.
- SWINSCOW, T. D. V. & KROG, H. Macrolichens of East Africa, British Museum, London 389p, 1988.
- TAGUCHI, H., SANKAWA, U. & SHIBATA, S. Biosynthesis of usnic acid in lichens. *Tetrahedron Lett.* 5211, 1966.
- TAKAI, M., UEHARA, Y. & BEISLER, J. A. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *J. Med. Chem.* 22: 1380-1384, 1979.
- TAYLOR, C.J. The Lichen of Ohio. Part I. Foliose Lichens. Columbus, Ohio. The Ohio State University, 151 p, 1967a.
- TAYLOR, C. J. The Lichen of Ohio. Part II. Fruticose and Cladoniform lichens. Columbus, Ohio. The Ohio State University, 95 p, 1967b.
- THOMPSON, J.W. The lichen genus *Cladonia* in North America. Toronto, University Toronto Press, 172 p, 1968.
- TORSSELL, K. B. G. Natural Product Chemistry - A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. John Wiley & Sons, New York, 401 p, 1989.
- VARTIA, K. O. Antibiotics in Lichens. In. *The Lichens*. Ahmadjian, V. & Hale, M.E.. (eds). New York, Academic Press, p. 547-561, 1973.
- VICENTE, C. Fisiología de las sustancias líquénicas. 1^a ed. Alhambra, Madrid. 161p, 1975.
- VICENTE, C. LEGAZ, M.E., PAULO, M.Q., & XAVIER FILHO, L. Chemical differences between two ecotypes of *Parmelia tinctorum*. *Phyton*, 44(2): 121-124, 1984.
- VICENTE, C. & LEGAZ, M.E. Lichen Enzymology. In. *CRC Handbook of Lichenology*, v.I. Galun, M.(ed.) CRC Press Inc. p. 239-284, 1988.
- VICENTE, C. Biochemical and environmental influence on the synthesis and accumulation of lichen phenolics. *Symbiosis* 11: 279-297, 1991.
- VICENTE, C., CAMBON C., & GARCIA-JUNCEDA E. Kinetic comparison between soluble and polyacrylamide-entrapped depsidone ether hydrolase from the lichen *Pseudevernia furfuracea*. *Planta Sci.* 85: 143-149, 1992.

- VICENTE, C., PEREYRA, M.T., PEDROSA, M.M., SOLAS, M.T., & PEREIRA, E.C. Immobilization of lichen cells and enzymes for bioproduction of lichen metabolites - Technical requirements and optimization of product recovering. In. Daniels, J.A., Schulz, M., Peine, J. (ed.) Fletchen Follmann. Contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann. Cologne : The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne. p. 97-110, 1995.
- XAVIER FILHO, L., MAIA LEITE, J.E., PAULO, M.Q. & DA SILVA, J.O. Atividade Antimicrobiana de Líquens Brasileiros - II. *Bol. Soc. Brot. Sér. 2*, 60: 79-86, 1987.
- WACHTMEISTER, C. A. Separation of depsides components by paper chromatography. *Acta. Chem. Scand.* 6: 818-825, 1952.
- WALKER, F. J. & JAMES, P. W. A revised guide to microchemical techniques for the identification of lichen products. *Bull. Brit. Soc.* 46 (Supl.) 13-29, 1980.
- WANG, B.H. & POLYA, G.M. The fungal teratogen secalonic acid D is an inhibitor of protein kinase C and of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Planta Med.* 62: 111-114, 1996.
- WENNERSTEN, G. Photodynamic reactions induced by compounds derived from lichens. *Acta. Der. Venerel.* 59: 199-202, 1979.
- WHITE, F.J. & JAMES, P.W. A new guide to microchemical techniques for the identification of lichen substances. *Brit. Lichen. Soc. Bull.*, 57(Suppl.) 53p, 1985.
- YOSHIMURA, I., KINOSHITA, Y., YAMAMOTO, Y., HUNECK, S. & YAMADA, Y. Analysis of Secondary Metabolites from Lichen by High Performance Liquid Chromatography with a Photodiode Array Detector. *Phytochem. Anal.* 5: 197-205, 1994.
- YOSIOKA, I., NAKANISHI, T., IZUMI, S. & KITAGAWA, I. Structure of a lichen pigment entothecin and its identity with secalonic acid A, a major ergot pigment. *Chem. Pharm. Bull. (Tokio)*, 16: 2090-2091, 1968.
- YOSIOKA, I., YAMAUCHI, H., MURATA, K., & KITAGAWA, I., 1972. Coloring substances of a lichen *Cetraria ornata*. *Chem. Pharm. Bull.* 20(5): 1082-1084.