

A QUÍMICA DOS LIQUENS

Neli Kika Honda

Departamento de Química - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - CP 549 - 79070-900 - Campo Grande - MS

Wagner Vilegas

Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química - UNESP - CP 355 - 14800-970 - Araraquara - SP

Recebido em 12/2/98; aceito em 21/8/98

THE CHEMISTRY OF LICHENS. Lichens are symbiotic associations between fungi and algae and/or cyanobacteria. They produce common intracellular products including proteins, amino acids, polyols, carotenoids, polysaccharides and vitamins. The secondary metabolites found in lichens are phenolics which accumulate either on the cortex or on the cell walls of medullary hyphae and they are mainly acetyl-polimalonyl pathway derivatives. Polysaccharides, proteins and secondary metabolites produced by lichens have attracted the attention of investigators due their biological activities. This revision comments about the biosynthetic origin and structures of the principal classes of compounds produced by these organisms.

Keyword: lichens; liquenic compounds; chemotaxonomy.

INTRODUÇÃO

Define-se líquens como organismos simbióticos compostos por um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobionte)¹.

Calcula-se que existam 13.500 espécies (aproximadamente 600 gêneros) de fungos liquenizados, o que corresponde a 20% dos fungos conhecidos^{2,3}. A grande maioria (98%) dos fungos liquênicos são Ascomycetos 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 liquenizado².

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 líquens. Além dessa, ocorrem também espécies de *Coccomyxa* e *Trentepohlia*. Entre as algas verde-azuladas (cianofíceas), as mais comuns são a *Nostoc* e *Scytonema*⁴.

Nos líquens, 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, estar restritas a uma camada especial do talo e responsabilizam-se totalmente pela fotossíntese³.

O micobionte, geralmente dominante, é um organismo heterotrófico que obtém sua fonte de carbono do fotobionte. A liquenização pode ser considerada uma estratégia pela qual o fungo pode satisfazer sua necessidade de carboidrato para respiração e crescimento². Sabe-se hoje, que políois em líquens com algas verdes e glicose em líquens com cianofíceas são passados do fotobionte para o micobionte³. No estado liquenizado a parede celular do fotobionte se torna mais permeável à perda de carboidratos, resultando em benefício para o micobionte⁵. Além disso, em cianolíquens o micobionte ganha uma fonte de nitrogênio⁶.

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 luminosidade⁷.

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 líquens ocorrem abundantemente em habitats que são freqüentemente secos^{8,9}.

Os líquens são encontrados desde o nível do mar até as montanhas mais altas. Porém, são relativamente raros em altitudes acima de 5.000 m e em matas excessivamente escuras. Podem, também, ser encontrados em desertos onde a temperatura é bastante variável, e em regiões polares, com temperaturas extremamente baixas. Seu limite de tolerância às oscilações climáticas é superior a qualquer outro vegetal⁹. 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 micro-habitats depende da disponibilidade de fatores físicos e climáticos que proporcionem as condições necessárias para seu desenvolvimento. Dessa forma, cada região pode apresentar uma comunidade liquênica com componentes específicos próprios em resposta às condições ambientais¹⁰.

QUÍMICA DOS LIQUENS

As substâncias químicas produzidas pelos 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 alga¹¹. Os produtos intracelulares (carboidratos, carotenóides e vitaminas, aminoácidos e proteínas) estão ligados na parede celular e ao 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 superiores¹¹.

Metabólitos primários

Carboidratos

Polióis tais como glicerol, eritritol, ribitol, arabinitol, D-volemitol, D-sifulitol e açúcares como glucose, sacarose, trealose e outros, são metabólitos comuns em líquens. São produtos resultantes da atividade fotossintética do fícobionte e ocorrem também em plantas superiores. Entretanto, compostos como 3-O- β -D-galactofuranosil-D-manitol (peltigerosídeo) e 2-O- β -D-galactofuranosil-D-ribitol (umbilicina) são exemplos de compostos restritos a líquens^{12,13}. Glucanas (liquenanas e isoliquenanas) e heteropolissacarídeos contendo manose estão presentes nos líquens em quantidades relativamente altas. Variações em estruturas químicas de α e β glucanas (isoliquenanas e liquenanas, respectivamente) são devidas às diferentes proporções de ligações 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4 contidas em cada uma. Um outro grupo, as pustulanas, contém unidades de β -D-glucopiranosil com ligações 1 \rightarrow 6, e, algumas vezes, encontram-se parcialmente acetiladas¹⁴.

Heteropolissacarídeos de líquens, contêm galactose, manose e em alguns casos, ácido galacturônico. Na maior parte, são constituídos de uma cadeia principal 1 \rightarrow 6 α -D-Manp, substituída com várias cadeias laterais, incluindo unidades de α - e β -D-Galp, β -D-Galf, α e β -D-Glcp e α e β -D-Manp. Algumas das estruturas de heteropolissacarídeos de líquens, são semelhantes àquelas isoladas de leveduras^{14,15}.

Aminoácidos, derivados e proteínas

Aminoácidos livres encontrados nos líquens são similares aos observados em outros vegetais. Dos aminoácidos que ocorrem em proteínas, alanina e ácido glutâmico são os predominantes em líquens. Além desses, podem ocorrer diferentes aminoácidos ou seus derivados, como sarcosina, taurina, citrulina, ácido β -aminobutírico¹⁶⁻¹⁸.

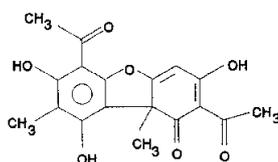
A natureza das proteínas de líquens não está ainda bem estabelecida e poucos são os relatos sobre o isolamento dessas substâncias. Vicente, em 1988¹⁹, publicou uma revisão abordando a enzimologia de líquens, envolvendo o metabolismo de carboidratos, lipídeos, fenóis e de nitrogênio nestes organismos. Outros relatam o isolamento de urease²⁰, celulase^{21,22}, manitol-1-fosfato-desidrogenase²³, bromoperoxidase²⁴. Inibidores de serinoproteinases (tripsina e calicreína tissular) e cisteinoproteinases foram isolados de *Collema leptosporum*^{25,26}.

Glicolipídeos

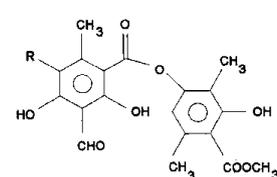
Recentemente, Machado *et al.*²⁷ relataram o isolamento e identificação de três glicolipídeos extraídos de *Ramalina celsastri*. O principal componente foi O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-D-glicerol esterificado com ácidos graxos de cadeia longa, sendo alguns desses insaturados.

Metabólitos secundários

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 vulpínico e ácido úsnico [1], outras incolores como atranorina [2] e liquexantona [3] são exemplos típicos de substâncias presentes no córtex. Entretanto, pode ocorrer que as substâncias químicas estejam localizadas também em outras partes do líquen. Nos apotécios de *Haematoma ventosum* está presente a hemaventosina [4], que é um pigmento vermelho escuro^{28, 29}, em *Letraria columbina* os apotécios contêm ácido norstítico [5] e no talo estão presentes atranorina [2] e ácido vulpínico³⁰ [6]. O ácido taminólico [7] ocorre nos apotécios e o ácido perlatólico [8] no talo de *Icmadophila ericetorum*³¹.

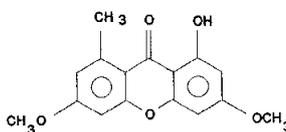


Ácido úsnico [1]

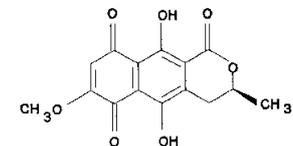


R=H Atranorina [2]

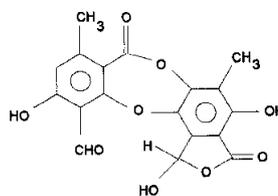
R=Cl 5-cloroatranorina [2a]



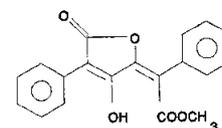
Liquexantona [3]



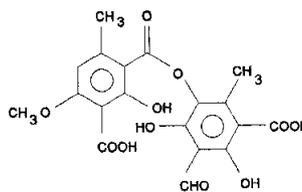
Hemaventosina [4]



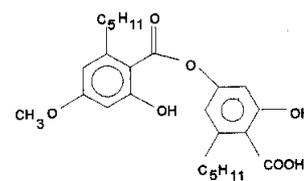
Ácido norstítico [5]



Ácido vulpínico [6]



Ácido taminólico [7]



Ácido perlatólico [8]

Em geral, em um espécime pode ocorrer de um a três ou mais compostos resultantes do metabolismo secundário. Entretanto, há casos, como *Pseudocyphellaria impressa* da Nova Zelândia que apresenta 41 diferentes depsídeos, depsidonas, derivados do ácido vulpínico e 17 triterpenos³².

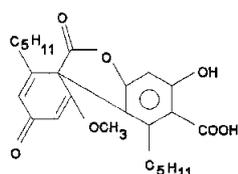
Atualmente, são conhecidos aproximadamente 630 compostos provenientes do metabolismo secundário de líquens. São ácidos alifáticos, *meta*- e *para*-depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido vulpínico. Ainda que esses compostos sejam também produzidos por fungos de vida livre e por plantas superiores (50-60), a maior parte é considerada exclusiva de líquens³³. Muitas espécies em que o fotobionte é uma cianobactéria não produzem derivados fenólicos³⁴.

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^{11,34,35}. O estudo sistemático das substâncias químicas resultantes do metabolismo secundário de líquens teve início com os trabalhos de Bebert em 1831, Alms em 1832 e Knopp em 1844 que isolaram os ácidos vulpínico [6], picrolíquênico [9] e úsnico [1], respectivamente, de algumas espécies líquênicas³⁶.

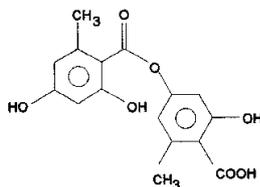
Gmelin, em 1858, publicou a primeira revisão sobre substâncias isoladas de líquens³⁶. Entretanto, o marco inicial da Lichenologia foi estabelecido com os trabalhos de Zopf e de Hesse. Zopf (Friedrich Wilhelm Zopf) era botânico e publicou, em 1907, uma das mais importantes obras na área de Lichenologia³⁷. 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 isoladas de líquens. O mais importante deles, "Flechtenstoffe", foi editado em 1912³⁸.

O ácido lecanórico [10] foi o primeiro depsídeo de líquen sintetizado em laboratório por Emil Fischer em 1913³⁹.



Ácido picrolíquênico [9]



Ácido lecanórico [10]

Durante o período de 1930, Asahina, químico japonês, determinou fórmulas moleculares de várias substâncias líquênicas mais comuns e estabeleceu a base para pesquisas posteriores desses compostos^{40a - 40r}.

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 físicas⁴¹. Nesse trabalho incluíram também a identificação de substâncias líquênicas por microcristalização e descreveram a ação antibiótica de vários compostos.

Asahina e Shibata dividiram as substâncias líquênicas em alifáticas e aromáticas. Na série alifática incluíram os ácidos graxos, polióis e triterpenos e na série aromática os derivados do ácido tetrônico (ácido pulvínico), depsídeos, depsídonas, quinonas, dibenzofuranos e derivados da dietopiperazina. O sistema de classificação das substâncias líquênicas proposto por Asahina e Shibata foi baseado em conhecimentos estruturais e vias biossintéticas que lhes dão origem⁴¹. O sistema de classificação mais recente é aquele proposto por Culberson & Elix⁴², em que as substâncias são ordenadas de acordo com sua provável origem biossintética.

Biossíntese

A maior parte dos metabólitos secundários de líquens são compostos oriundos da via do acetil-polimalonil. Essa via 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 e 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 Claisen⁴³.

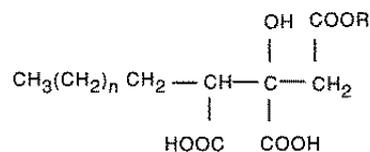
A formação do β ceto-éster é o ponto de partida para a síntese de terpenos pela via do ácido mevalônico. O β ceto-éster obtido pode também, por redução e repetidas condensações, conduzir à formação de ácidos graxos, ou, por condensações sem redução, a policetídeos, os quais podem ciclizar, dando origem a compostos aromáticos^{43, 44}.

Via do acetil-polimalonil

Ácidos graxos

Os ácidos graxos que ocorrem em líquens apresentam certa semelhança com aqueles que ocorrem em fungos não liquenizados,

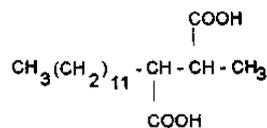
porém não são idênticos. Ácidos agarícico [11] e 2-decilecátrico [12] isolados de fungos são estruturalmente relacionados ao ácido caperático [13], um metabólito comum em líquens^{45, 46}.



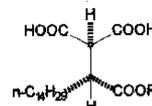
$n=8$, $R=H$ - ácido 2-decilecátrico [12]; $n=13$, $R=CH_3$ - ácido caperático [13]; $n=14$, $R=H$ - ácido agarícico [11].

Além do ácido caperático [13], podem ocorrer em líquens outros ácidos, como rocélico [14], rangifórmico [15] e nor-rangifórmico [16]. Ácidos acaranóico [17] e acarenóico [18] são δ -lactonas e os ácidos liquesterínico [19], nefrosterínico [20], nefrosterínico [21] e protoliquesterínico [22], são exemplos de ácidos γ -lactônicos de cadeia longa.

Ácidos hidroxilados como 9, 10, 12, 13-tetrahidroxieicosanóico e 9, 10, 12, 13-tetrahidroxieicosanóico são freqüentes em líquens. Até 1973, ácidos graxos de cadeia longa, como oleico e linoleico não tinham sido citados como componentes de líquens³⁵. Mais recentemente, Dembitsky *et al.* analisaram cinco espécies de líquens da subclasse Gymnocarpeae⁴⁷, três espécies do gênero *Parmelia*⁴⁸, três espécies da ordem Lecanorales⁴⁹ e identificaram, através da análise por CG-EM, 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 11,14-eicosadienoico⁵⁰. Ácidos palmítico, esteárico, láurico, linoleico, oleico e araquídico também foram identificados em *Collema leptosporum*⁵¹.

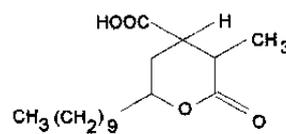


Ácido rocélico [14]

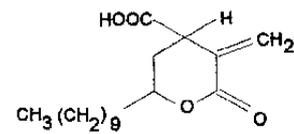


$R = CH_3$ Ácido rangifórmico [15]

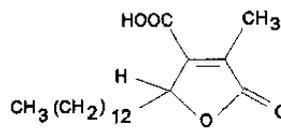
$R = H$ Ácido norrangifórmico [16]



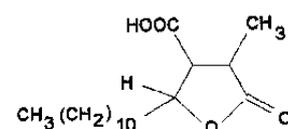
Ácido acaranóico [17]



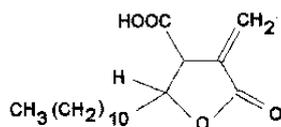
Ácido acarenóico [18]



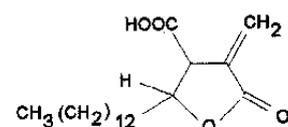
Ácido liquesterínico [19]



Ácido nefrosterínico [20]



Ácido nefrosterínico [21]



Ácido protoliquesterínico [22]

A biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa presentes em líquens, procede de maneira semelhante àquela já estabelecida em diversos organismos^{19, 43, 44 52-54}. Entretanto, são poucas as informações disponíveis sobre a biossíntese das lactonas dos ácidos alifáticos de cadeia longa. A biossíntese do ácido protoliqueterínico [22] foi estudada por Blomer *et al.*⁵⁴ que suplementaram talos de *Cetraria islandica* com glucose e [1-¹⁴C]acetato de sódio. Os autores sugeriram que a biossíntese do ácido protoliqueterínico 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. A desidratação e ciclização oxidativa do produto resultante dessa condensação dá origem ao ácido protoliqueterínico [22].

Compostos aromáticos

Depsídeos e Depsidonas

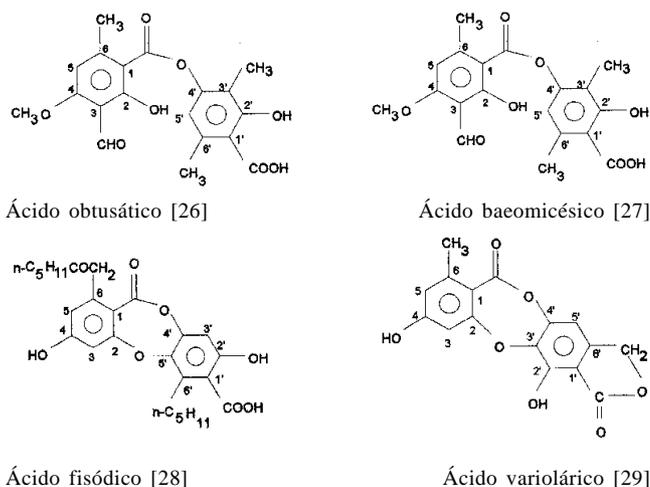
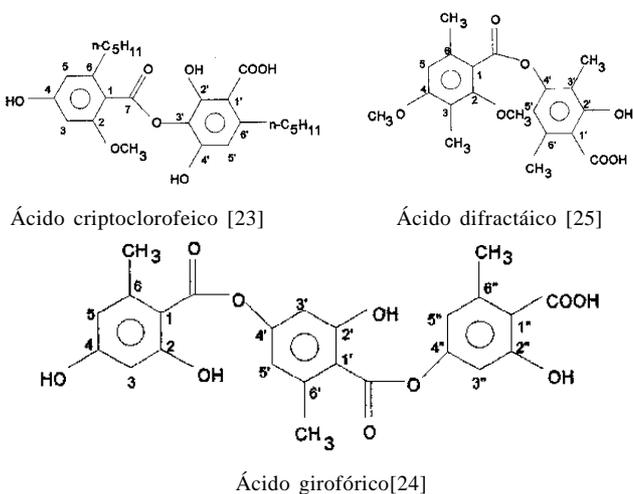
Embora muitos dos compostos aromáticos isolados de líquens sejam exclusivos desse grupo vegetal, alguns podem ser encontrados também em fungos não liquenizados ou em plantas superiores.

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 orselínico⁴³.

Duas unidades fenólicas derivadas do orcinol, isto é, sem substituintes na posição 3 podem formar compostos denominados depsídeos⁵⁵. 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 [10] e o ácido criptoclorofoico [23]. Tridepsídeos são resultantes da esterificação de três unidades fenólicas, como no ácido girofórico[24]⁵⁵.

Além dos depsídeos derivados do orcinol (ácido orselínico), ocorrem outros derivados do β -orcinol (ácido β -metil-orselínico), como por exemplo atranorina [2], os ácidos difractáico [25], obtusático [26] e baeomicésico [27].

Um outro grupo de compostos estruturalmente relacionados aos depsídeos são as depsidonas. Além de ligação éster presente nos depsídeos, as depsidonas apresentam também um heterociclo adicional resultante de uma ligação éter, geralmente entre as posições 2 e 5' como no ácido fisódico [28]. No ácido variolário [29] a ligação éter está entre as posições 2 e 3', sendo este o único caso, até então, conhecido.



Biossíntese de derivados fenólicos

O ácido orselínico é a unidade fundamental da biossíntese de depsídeos e depsidonas. 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, formando um policetídeo de 8 carbonos. Este último pode ciclizar através de dois processos distintos: um deles por condensação aldólica produzindo ácido orselínico, e o outro por condensação tipo Claisen, produzindo floacetofenona⁵² (Fig. 1).

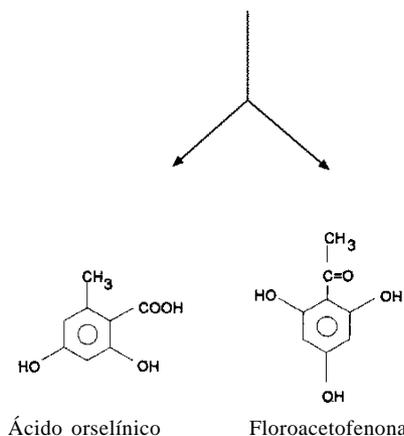
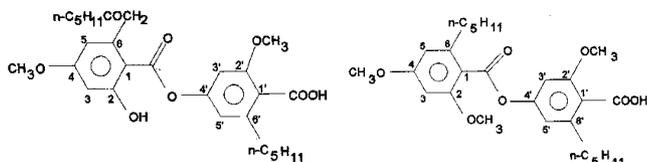


Figura 1. Reações biossintéticas de formação de ácido orselínico e floacetofenona por condensação de acetilSCoA e malonilSCoA.

A reação biossintética de formação de ácido orselínico é catalisada pela enzima ácido orselínico sintase¹⁹. O mecanismo de formação desse ácido envolve reação de desidratação somente na etapa final quando ocorre a ciclização da cadeia para formar o ácido orselínico, diferente do que acontece na biossíntese do ácido 6-metilsalicílico, característico de outras espécies de fungos de vida livre. A reação de obtenção do ácido 6-metilsalicílico é catalisada pela enzima ácido aromático sintase¹⁹. A enzima ácido orselínico sintase tem sido caracterizada como um complexo enzimático contendo 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 elucidado¹⁹.

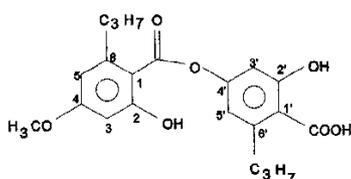
O ácido orselínico é o precursor de depsídeos derivados do orcinol. A formação desses compostos ocorre por esterificação entre unidades derivadas desse ácido. Várias esterases podem estar envolvidas nesse processo. Entretanto, essas enzimas não foram ainda isoladas⁵⁶.

Os *para*-depsídeos da série do orcinol apresentam hidroxilas substituintes nas posições 2 e 4 do primeiro anel e 2' do segundo anel, exceto no ácido planáico [30] em que 2 e 2' se encontram metoxiladas. No ácido conflüentico [31] as metoxilas se encontram nas posições 4 e 2', enquanto que no ácido divaricático [32] a metoxila se encontra na posição 4.



Ácido planáico [30]

Ácido conflüentico [31]

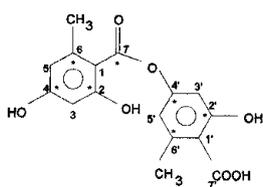


Ácido divaricático [32]

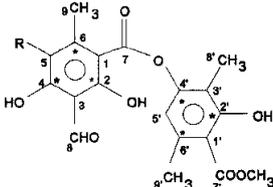
Vários depsídeos derivados do orcinol contêm outros grupos substituintes ligados às unidades de ácido orselínico. Esses depsídeos são biossinteticamente derivados do ácido 6-alkil-2,4-diidróxibenzóico ou do ácido 6-alkil- β -ceto-2,4-diidróxibenzóico. Devido às variações da cadeia alquila nas unidades do ácido orselínico, o número de depsídeos é bastante elevado⁵².

Cadeias laterais de um ou mais carbonos (-CH₃, -CH₂CH₂CH₃, -C₅H₁₁, -C₇H₁₅) localizam-se nas posições 6 e 6'. Pode ocorrer que a cadeia lateral apresente grupo cetônico na posição β , como no ácido conflüentico [31].

Visando determinar se as unidades de 1 Carbono são introduzidas antes ou após a ciclização de policetídeos para formação de derivados do β -orcinol, foram realizados experimentos utilizando talos de *Parmotrema tinctorum* que produzem ácido lecanórico [10], atranorina [2] e 5-cloroatranorina [2a]^{57,58}. Os talos foram suplementados com [1-¹⁴C]acetato e [1-¹⁴C]formiato. Após uma semana de incubação os compostos foram isolados e a medida da atividade específica de cada um deles indicou que [1-¹⁴C]acetato é o precursor dos três depsídeos, enquanto que [1-¹⁴C]formiato é incorporado somente em atranorina [2b] e em 5-cloroatranorina [2c] participando na formação dos grupos -CHO (C 8) e CH₃ (C 8') desses compostos⁴³.



Ácido lecanórico [10a]



R = H Atranorina [2b]

R = Cl 5-cloroatranorina [2c]

Quando o ácido orselínico marcado nos carbonos 2,4 e 6 com ¹⁴C foi suplementado aos talos de *P. tinctorum* somente o ácido lecanórico [10a] apresentou-se radioativo. A ausência de atranorina [2b] e 5-cloroatranorina [2c] levou à conclusão de

que a introdução de unidades de 1 Carbono ocorre antes da ciclização do policetídeo^{19, 43, 52}.

Nos *para*-depsídeos derivados do β -orcinol, a posição 3 (anel A) apresenta substituinte de uma unidade de carbono, que pode ser -CH₃, -CHO, -COOH, enquanto que na posição 3' o substituinte é sempre -CH₃. As posições 6 e 6' estão sempre metiladas, e a carboxila da posição 1' está na forma de éster metílico somente na atranorina [2] e na 5-cloroatranorina [2a].

Meta-depsídeos

A ligação éster se estabelece entre a posição 1 do anel A e a posição 3' do anel B. As unidades fenólicas da série do orcinol, que intervêm 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.

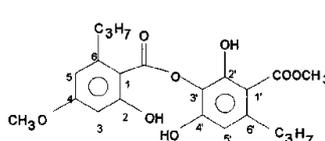
Quimicamente existem 3 possibilidades distintas: a) A ligação éster (-COO-) pode se estabelecer em posição *meta* do anel B por reagrupamento de um *para*-depsídeo, que atuaria como precursor; b) O grupo -COOH da primeira unidade fenólica pode transformar-se em carboxilato, o qual poderia formar a ligação 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 hipótese a, 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 4'⁵⁵.

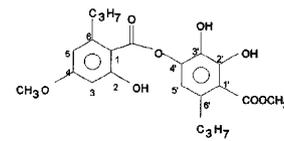
A hipótese b consiste em um ataque direto do grupamento carboxílico da primeira unidade fenólica (anel A) sobre a posição 3' da segunda unidade (anel B). Quimicamente o sistema é possível, dada a alta reatividade da espécie ArCOO⁻. Considerando do ponto de vista biológico, devem haver reações enzimáticas que realizariam mais facilmente a formação da ligação⁵⁵.

A hipótese c 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.*⁵⁹ 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 escombiculata*, consistindo de *m*-escrobiculina [33], ácido úsnico, ácidos estítico, norstítico e constítico. Verificaram por cromatografia em camada delgada que a substância *m*-escrobiculina sempre estava acompanhada de um composto relacionado de R_f levemente maior. A análise cromatográfica e os dados espectroscópicos do composto isolado indicaram que se tratava de uma mistura em equilíbrio dinâmico de *m*-escrobiculina com seu isômero *p*-escrobiculina [34]. Para verificar a consistência dessas observações, os autores procederam a síntese de *p*-escrobiculina e concluíram que a hidroxilação do *para*-depsídeo é seguida por rápido rearranjo intermolecular ao *meta*-depsídeo termodinamicamente mais estável.

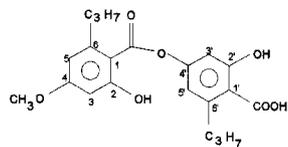


m-escrobiculina [33]

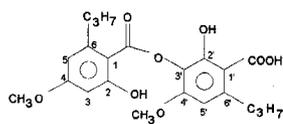


p-escrobiculina [34]

A co-ocorrência de ácido divaricático[32] e ácido sequicáico [35] em várias espécies de *Ramalina* fornece evidências para essa proposta⁵⁹.



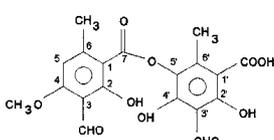
Ácido divaricático [32]
para-depsídeo



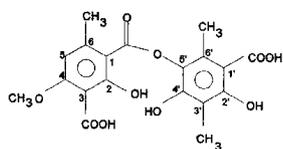
Ácido sequicáico [35]
meta-depsídeo

Os *meta*-depsídeos apresentam cadeias laterais de mais de 1 Carbono, como no caso dos *para*-depsídeos, porém, com a diferença de 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 criptoclorofoico [23], que é n-C₅H₁₁. A cadeia lateral na posição 6' é sempre n-C₅H₁₁, exceto no *meta*- e *para*-escrobiculina [33] e [34] e no ácido sequicáico [35], que é -C₃H₇^{52, 55}.

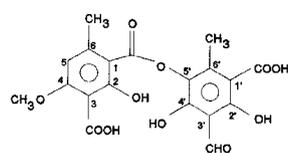
Os *meta*-depsídeos da série do β-orcíno são menos abundantes na natureza, sendo conhecidos os ácidos hemataminólico [36], hipotaminólico [37], taminólico [38] e decarboxitaminólico [39]. Este último é considerado por alguns autores como sendo um artefato resultante da descarboxilação do ácido taminólico [38] na posição 1' durante os processos de extração, não sendo, portanto, um produto natural⁵⁵. Recentemente Elix *et al.*,⁶⁰ isolaram de *Heterodermia dissecta*, um novo *meta*-depsídeo derivado do β-orcíno que foi denominado ácido dissético [40].



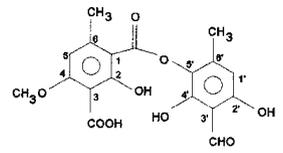
Ácido hemataminólico [36]



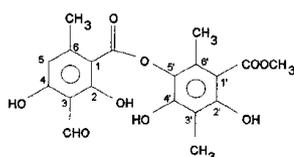
Ácido hipotaminólico [37]



Ácido taminólico [38]



Ácido decarboxitaminólico [39]

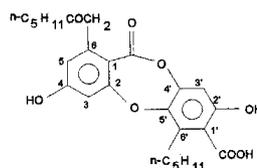


Ácido dissético [40]

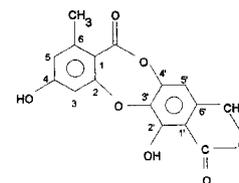
Depsídonas

Representam um grupo de compostos estruturalmente relacionados aos depsídeos, sendo estes considerados seus precursores⁵⁹. Além de ligação éster presente nos depsídeos, as depsídonas apresentam também um heterociclo adicional, resultante de uma ligação éter, geralmente entre as posições 2

e 5', como no ácido fisódico [28]. Entretanto, no ácido variolárico [29] a ligação éter está entre as posições 2 e 3', sendo este o único caso, até então, conhecido.

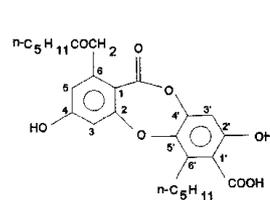


Ácido fisódico[28]

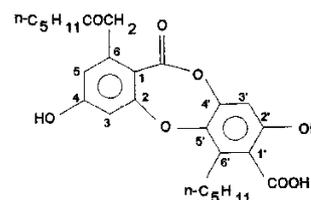


Ácido variolárico[29]

Embora a origem biossintética das depsídonas ainda não esteja esclarecida, a existência de depsídeos e depsídonas estruturalmente relacionados no mesmo líquen indica que esses compostos podem ter relação biogenética⁶¹. Como exemplos, tem-se os ácidos olivetórico [41] e fisódico [28] isolados de *Cetraria ciliaris*⁶¹.



Ácido olivetórico [41]



Ácido fisódico [28]

Nesse caso, a formação de depsídonas, 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 laboratório⁶².

Uma outra rota possível para a biossíntese de depsídonas é aquela sugerida por Sala *et al.*⁶³, em que as depsídonas são derivadas de depsídeos através de acoplamento fenólico de benzofenonas, tendo como intermediário espirobenzofurano-3-ona. Entretanto, nenhum desses intermediários ocorre naturalmente em líquens, embora seja um processo energeticamente favorável^{62, 63} (Fig. 2).

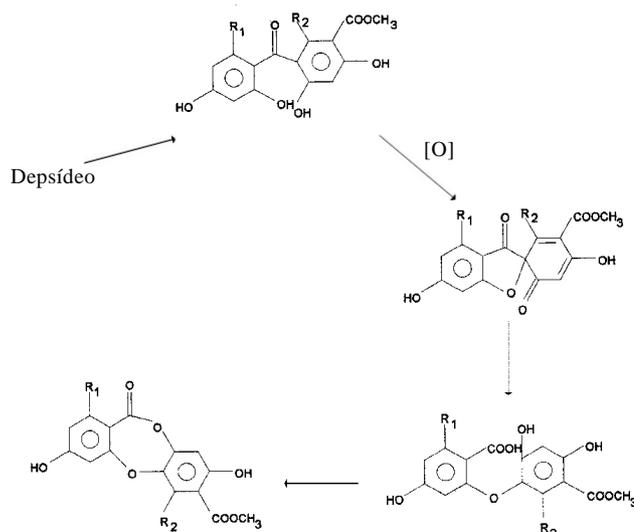


Figura 2. Formação de depsídonas a partir de depsídeos por acoplamento fenólico de benzofenonas, segundo Sala *et al.*⁶³.

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[41]¹³. Se essa oxidação ocorre na posição 3, subsequentes rearranjos do *para*-depsídeo formado conduzem a *meta*-depsídeos por migração do grupo acila⁵⁹. Se ocorrer oxidação na posição 5' seguida por uma migração de acila e subsequente rearranjo tipo Smiles do *meta*-depsídeo formado, isso poderá conduzir às correspondentes depsidonas derivadas do orcinol⁶⁴ (Fig. 3). Os autores consideraram que tal rota poderia estar envolvida na biossíntese desses compostos.

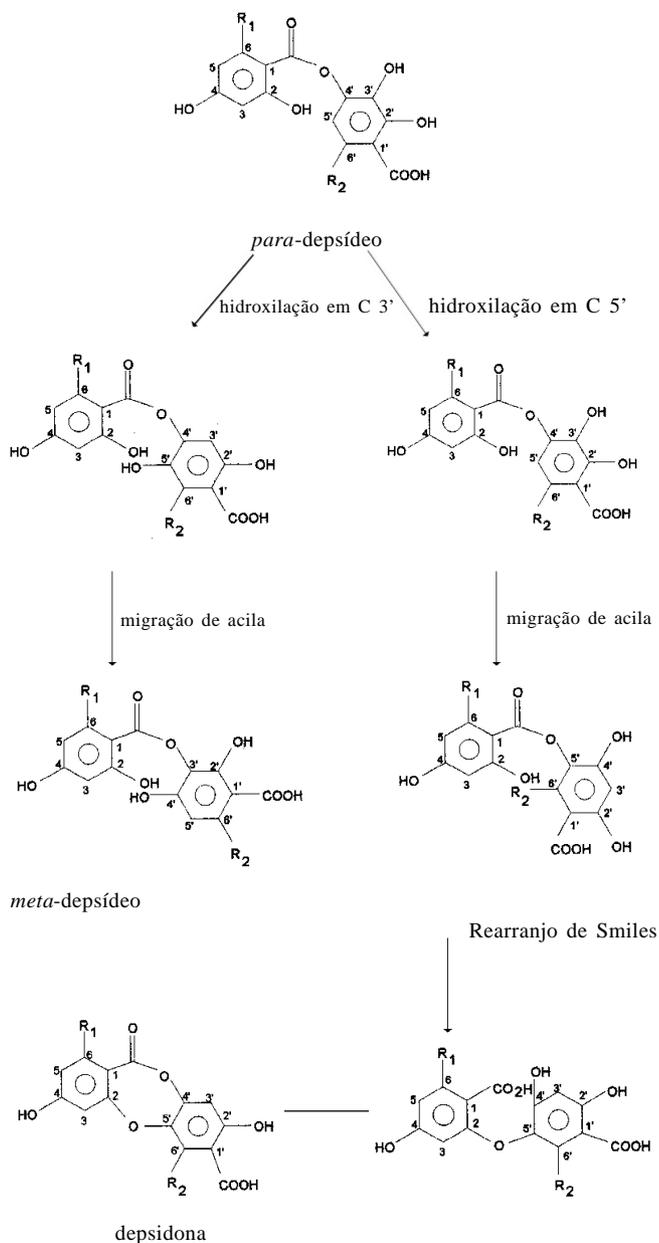
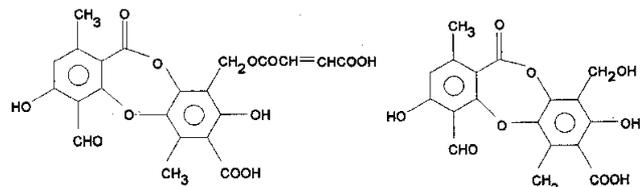


Figura 3. Reações de obtenção de *meta*-depsídeos e depsidonas a partir da hidroxilação e rearranjo de *para*-depsídeos⁶⁴.

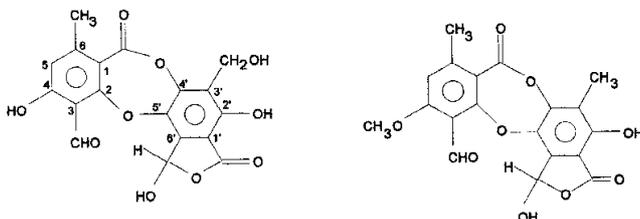
Diferenças estruturais entre depsídeos e depsidonas não ocorrem necessariamente após a ciclização. Por exemplo, o ácido fumarprotocetrárico [42] pode ser originado por inserção do ácido fumárico na posição 3 do ácido orselínico (na forma de ácido 3-metil-orselínico) dando origem ao anel B do ácido fumarprotocetrárico, ou por esterificação direta do grupo -CH₂OH do anel B do ácido protocetrárico¹⁹ [43] com o ácido fumárico.

As depsidonas originárias do β-orsinol 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 [44], estético [45] e norstético [5].



Ácido fumarprotocetrárico [42]

Ácido protocetrárico [43]

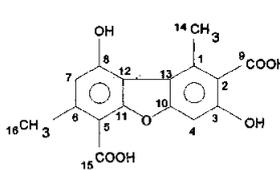


Ácido salazínico [44]

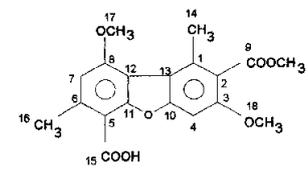
Ácido estético [45]

Dibenzofuranos

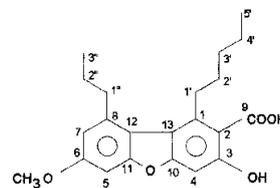
A característica estrutural desse grupo de substâncias é a ligação carbono-carbono e uma ligação éter entre duas unidades fenólicas. A ligação éter é formada a partir de grupos hidroxilas nas posições 11 e 10 da primeira e segunda unidades fenólicas, respectivamente. Os dibenzofuranos podem ser divididos em dois grupos: um deles engloba os compostos que apresentam grupo carboxila na posição 5 do primeiro anel, como os ácidos panárico [46] e chizopéltico [47], e o outro em que esse grupo não está presente nessa posição, como nos ácidos dídímico [48] e hipostrepisílico [49]^{33, 65, 66}.



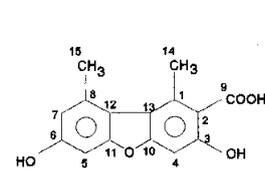
Ácido panárico[46]



Ácido chizopéltico[47]



Ácido dídímico[48]



Ácido hipostrepisílico[49]

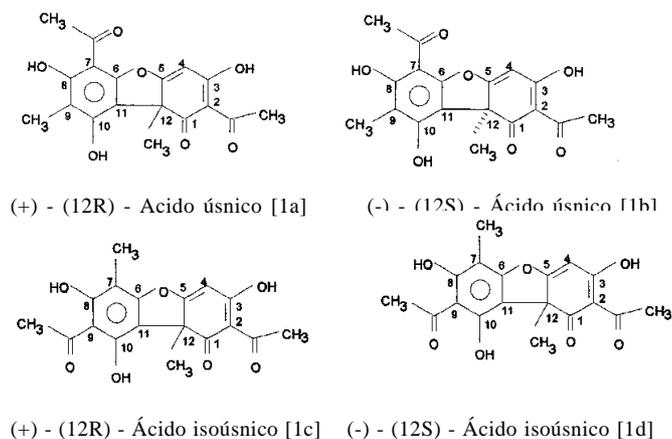
Ácidos Úsnicos

Uma das substâncias originadas de líquens mais conhecida 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.*⁶⁷. Apresenta-se em duas formas isoméricas: ácido (+)-úsnico [α]_D²⁰ + 495° e (-)-úsnico [α]_D²⁰ - 495°.

Em 1967, Shibata *et al.*⁶⁸ isolaram de *Cladonia mitis* e *Cladonia arbuscula* o ácido (+)-isouúsnico [α]_D²⁰ + 510° e de

Cladonia pleurosta o ácido (-)-úsico [α]_D²⁰ - 490°. Os ácidos úsicos [1a] e [1b] são largamente distribuídos em líquens, enquanto que os ácidos isoúsnicos [1c] e [1d] são de distribuição restrita⁵⁵.

Embora muitos autores classifiquem os ácidos úsicos como um grupo de dibenzofuranos, considera-se que sejam formados pela ciclização do tipo floriglucinol e não do tipo orselínica, típica de dibenzofuranos^{46, 55}.



A cadeia policetídisca (ácido 3,5,7-tricetoctanóico 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 acetilfloriglucinol (metilfloroacetofenona), que é precursor dos ácidos úsicos⁵².

A biossíntese do ácido úsico foi estudada por Taguchi *et al.*⁶⁹ usando várias espécies líquênicas e quatro precursores marcados: [1-¹⁴C]-acetato, [2-¹⁴C]-malonato, [¹⁴CH₃-CO]-floroacetofenona e [¹⁴CH₃-CO]-metilfloroacetofenona (Fig. 4).

Quando [1-¹⁴C]-acetato foi usado, o ácido úsico incorporou radioatividade nas posições 2, 4, 7, 9, 11, 12, 15 e 17, enquanto que ao usar [2-¹⁴C]-malonato os grupos metila das posições 15 e 15' não estavam marcados. Isto significa que o grupo CO-CH₃ em cada unidade fenólica deriva do acetato. Resultados coincidentes com esses foram encontrados por Fox *et al.*⁷⁰ para a síntese do ácido úsico por *Cladonia sylvatica* suplementada com ¹⁴CO₂.

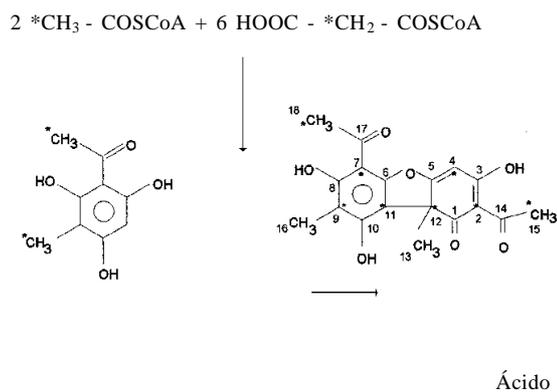


Figura 4. Biossíntese do ácido úsico [1] a partir de [1-¹⁴C]acetato e [2-¹⁴C] malonato.

A utilização alternativa de floroacetofenona ou metilfloroacetofenona radioativas como precursores, resolveu outro ponto importante no quadro biossintético dos ácidos úsicos. Quando se empregava [¹⁴CH₃-CO]-metilfloroacetofenona, o ácido úsico isolado apresentava-se marcado nos grupos CO-CH₃ das duas

unidades fenólicas. Porém, quando o precursor era floroacetofenona marcada na mesma posição, o ácido úsico isolado não era radioativo em nenhum dos seus carbonos⁴³.

Entretanto, quando se administrava ao líquen floroacetofenona e formiato, ambos radioativos, o ácido úsico formado apresentava radioatividade (Fig. 5). 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 úsicos quando o líquen dispõe de formiato radioativo administrado de forma exógena (Fig. 5).

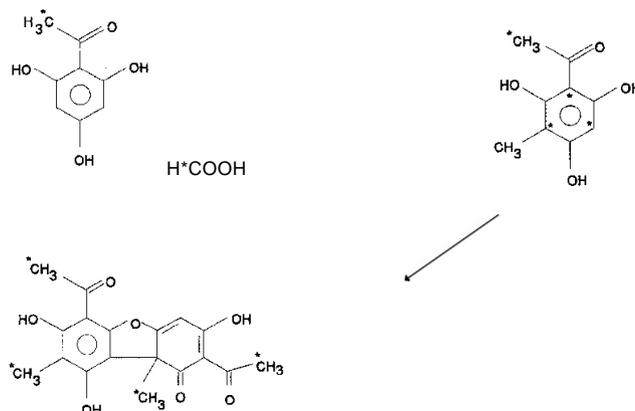


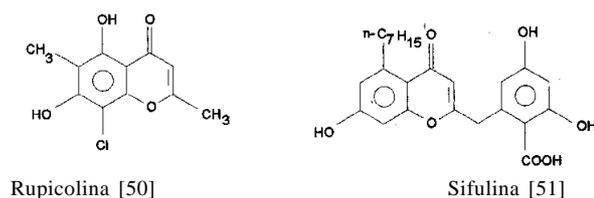
Figura 5. Reação biossintética de obtenção ácido úsico [1] a partir de floroacetofenona e formiato radioativos.

A formação da ligação C - C ocorre de maneira idêntica como na formação de outros dibenzofuranos, envolvendo sucessivamente a formação de radicais livres. Uma reação subsequente de desidratação conduz à formação da ligação éter do anel furânico⁴³. A reação é catalisada por fenol-oxidases ou por peroxidases⁴³.

Cromonas, xantonas, naftoquinonas, antronas e antraquinonas

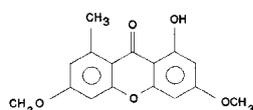
Compostos pertencentes a essas classes também ocorrem em líquens, porém não são exclusivos desses organismos. São compostos freqüentemente idênticos a produtos biossintetizados por fungos de vida livre ou por plantas superiores.

As rotas biossintéticas propostas envolvem 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 na rupicolina [50] e sifulina [51]^{43, 52}.

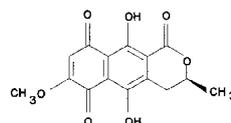


Xantonas e antronas são resultantes da condensação de 1 mol de AcetilSCoA com 6 e 7 moles de malonilSCoA, respectivamente^{43, 44, 52}.

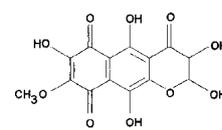
As antronas são facilmente oxidadas às antraquinonas. As antraquinonas e seus derivados são produtos do metabolismo de fungos (*Aspergillus* e *Penicillium sp.*), líquens, basidiomicetos e plantas superiores. Clivagens oxidativas do anel B de



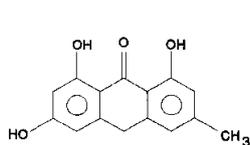
Lixexantona [3]



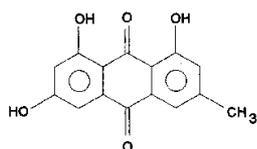
Hemaventosina [5]



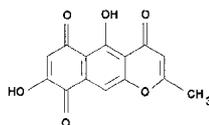
Ácido quiodectônico [54]



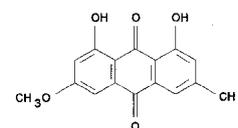
Emodina antrona [52]



Emodina antraquinona [53]



Canariona [55]



Parietina ou fisciona [56]

antraquinonas produzem derivados da benzofenona que são transformados em xantonas⁴⁴. A dimerização de xantonas produzindo os ácidos secalônicos ocorre, provavelmente, via fenoloxidasas, ou por radicais derivados de peroxidases⁴⁴ (Fig. 6).

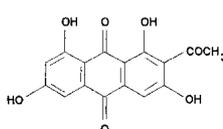
Hemaventosina [4], ácido quiodectônico [54] e canariona [55] são exemplos de naftoquinonas que ocorrem em líquens. Hemaventosina [4] é um pigmento vermelho presente nos apotécios de *Haematomma ventosum*^{28, 29}. Ácido quiodectônico [54] e canariona [55] foram isolados de *Chiodecton sanguineum* (Sw.) Vain. e de *Usnea canariensis*, respectivamente⁷¹.

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

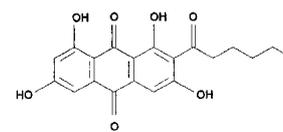
Atualmente, são conhecidas cerca de 40 antraquinonas isoladas de líquens, embora algumas ocorram também em fungos não liquenizados¹¹.

A substância mais conhecida desse grupo é a parietina ou fisciona [56], encontrada não só em líquens, mas também em fungos e em plantas superiores.

Recentemente, Huneck *et al.*⁷² isolaram dos apotécios⁽ⁱ⁾ de *Haematomma puniceum* um pigmento vermelho que foi denominado hematoma [58] e que se assemelha ao ácido norsolorfínico [59].

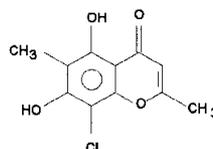


Hematomona [58]

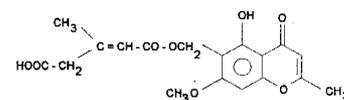


Ácido norsolorfínico [59]

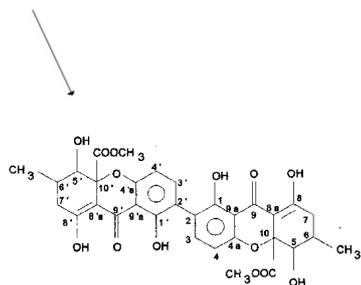
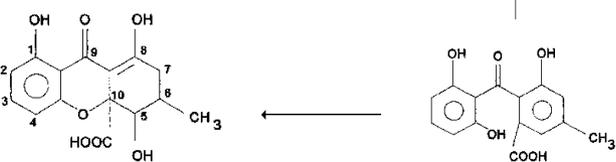
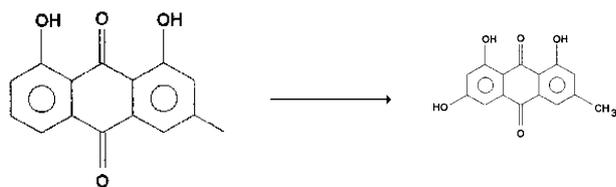
Sordidona [60], sifulina [51] e ácido leprárico [61] são as cromonas conhecidas como componentes de algumas espécies líquênicas. Sifulina apresenta dois derivados, oxisifulina [62] e protosifulina [63], que foram isolados de *Siphula ceralites*^{73, 74}.



Sordidona [60]

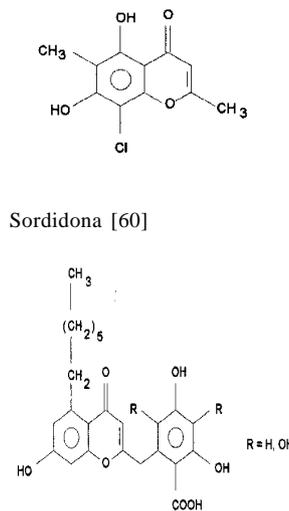


Ácido leprárico [61]

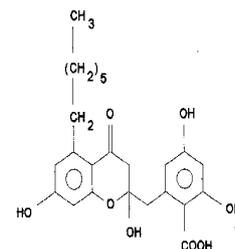


Ácido secalônico [57]

Figura 6. Reações envolvidas na biossíntese de xantonas. A primeira etapa mostra a formação de xantonas por clivagem oxidativa do anel B de antraquininas pela ação de deidroxilasas e a segunda etapa a obtenção de ácido secalônico por dimerização de xantonas.



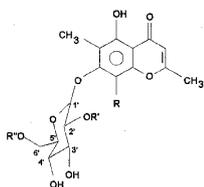
Oxisifulina [62]



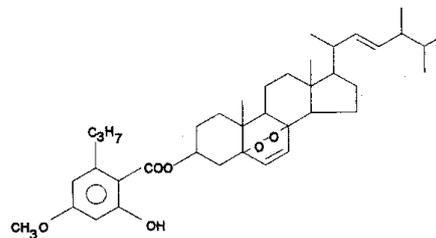
Protosifulina [63]

Em líquens ocorrem também alguns glicosídeos. De *Rocellaria mollis* (Hampe) Zahlbr., *Schismatomma accedens* (Nyl.) Zahlbr. e *Rocella galepagoensis* Follm. foram isolados os glicosídeos rocelina [64], molina [65] e galapagina [66], cuja aglicona é uma cromona⁷⁵.

⁽ⁱ⁾ Apotécios são estruturas de reprodução de líquens em que o fungo é um ascomiceto. São frutificações abertas em forma de disco ou taça⁴⁵.



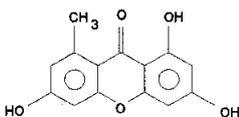
Rocelina [64] R = H; R', R'' = Ac
 Molina [65] R, R'' = H; R' = Ac
 Galapagina [66] R = CH₃; R' = H; R'' = Ac.



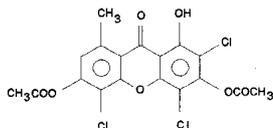
Divaricatinato de peroxigosterila [75]

As xantonas isoladas de líquens são derivadas da norliquesantona³⁵ [67]. Seis desses compostos variam somente em relação ao grupo de O-metilação e à presença de cloro no anel. Entretanto, uma delas, a eritromona [68], isolada de *Haematomma erythromma*, é o primeiro exemplo de xantona líquênica O-acetilada⁷⁶.

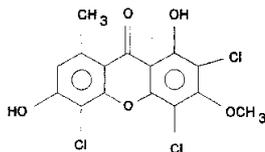
Além da norliquesantona [67], as xantonas conhecidas, são a turingiona [69], ácido tiofânico [70], ácido tiofanínico [71], artotelina [72], liquexantona [3], 2,4-dicloronorliquesantona [73], 2,7-dicloronorliquesantona [74] e outras.



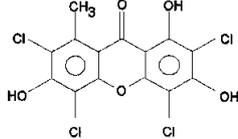
Norliquesantona [67]



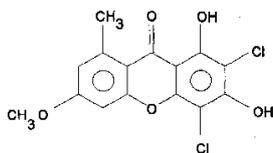
Eritromona [68]



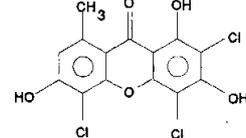
Turingiona [69]



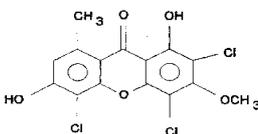
Ácido tiofânico [70]



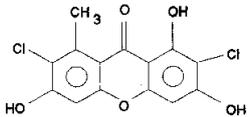
Ácido tiofanínico [71]



Artotelina [72]



2,4-dicloronorliquesantona [73]



2,7-dicloronorliquesantona [74]

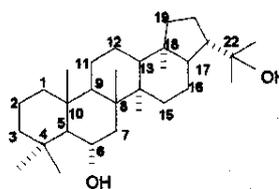
Derivados da via do mevalonato

Esteróis e terpenos

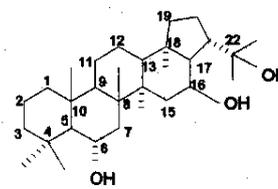
Esteróis e terpenos não são tão freqüentes em líquens quanto em plantas superiores. Ergosterol, fitosterol e β-sitosterol são exemplos de esteróis conhecidos por ocorrerem em algumas espécies de líquens. Fungisterol foi isolado de *Pseudovernia furfuraceae*⁷⁷.

Outros compostos derivados do ciclopentanoperidrofentreno também são conhecidos, incluindo divaricatinato de peroxigosterila [75] isolado de *Haematomma ventosum*⁷⁸.

Triterpenos constituem o maior número de compostos entre os terpenos isolados de líquens. Nesta classe de compostos estão incluídos zeorina [76], o mais conhecido triterpeno isolado de líquens, leucotilina [77], que difere da zeorina pela presença de uma hidroxila com configuração β na posição 16 e diversos compostos derivados desses por hidroxilação, acetoxilação e oxidação do grupo metila⁷⁶.



Zeorina [76]



Leucotilina [77]

Compostos como ácido ursólico, taraxeno e friedelina ocorrem também em líquens⁷⁶.

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 que 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^{43, 53}.

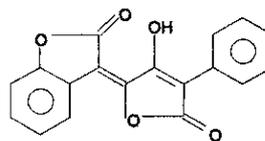
A condensação entre unidades de pirofosfato de isopentenila (isopreno) conduz à formação de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e outros^{43, 44, 53}.

Até o momento, foram isolados de líquens aproximadamente 70 compostos derivados da via do ácido mevalônico, incluindo diterpenos, sesquiterpenos e triterpenos. Além desses, são conhecidos também 41 esteróis³³.

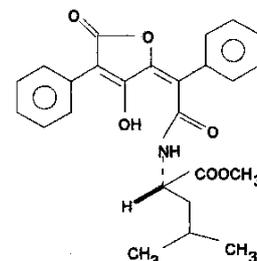
Via do ácido chiquímico

Derivados do ácido pulvínico

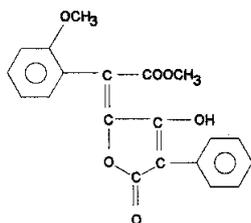
Os derivados do ácido pulvínico são pigmentos amarelos ou de cor laranja. Nesse grupo estão incluídos compostos como calicina [78], epanorina [79], ácido leprapínico [80], ácido vulpínico [6] e outros.



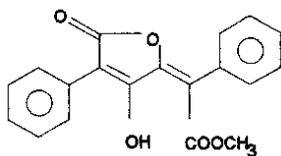
Calicina [78]



Epanorina [79]

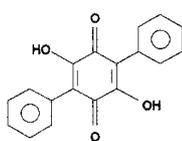


Ácido leprapínico [80]

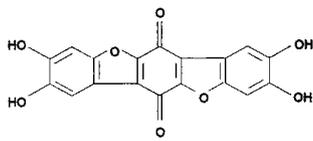


Ácido vulpínico [6]

Dos compostos obtidos de líquens, somente dois pertencem à classe das terfenilquinonas e 12 são derivados do ácido pulvínico. São compostos biossintetizados pela via do ácido chiquímico. Seus intermediários geram fenilpropanóides, que se condensam, dando origem a compostos como os ácidos polipórico [81] e telefórico [82] ou os derivados do ácido pulvínico calicina [78], epanorina [79], ácido leprapínico [80], ácido vulpínico [6] e outros^{43, 79}.



Ácido polipórico [81]



Ácido telefórico [82]

Os derivados do ácido pulvínico são pigmentos amarelos encontrados em alguns líquens, como em *Letraria vulpina*, *Rhizocarpon geographicum* e *Bryoria fremontii*. As terfenilquinonas são pigmentos de cor vermelha e púrpura e, até o momento, foram isolados somente de líquens da família Peltigerales⁸⁰.

Taxonomia e Quimiotaxonomia

Líquens são identificados aos níveis de gêneros e espécies por várias combinações de caracteres morfológicos dos 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, análise por fluorescência e análise por espectrometria de massas. 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 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 análise³³.

- Reações de Coloração

Reagentes como hidróxido de potássio e hipoclorito de cálcio, são usados para caracterização de várias substâncias liquênicas. O uso desses reagentes em taxonomia de líquens foi iniciado em 1886, por Nylander⁸¹. As reações são conduzidas aplicando a solução do reagente com um capilar a um fragmento do talo liquênico, e a variação de cor é melhor observada em microscópio estereoscópico. As colorações observadas dependem da natureza das substâncias presentes.

O hidróxido de potássio promove a hidrólise da ligação éster de depsídeos e de depsidonas, dando formação a compostos cujas colorações variam de amarelo a vermelho intenso. 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.

A reação com hipoclorito de cálcio é positiva com compostos que apresentam configuração *meta*-diidroxil. A ação de oxidantes moderados sobre compostos *meta*-diidroxil promove a formação de derivados 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 cálcio¹¹.

Depsídeos derivados do orcinol dão aparecimento à coloração vermelha intensa pela ação de hipoclorito. Esse procedimento permite separar os depsídeos em dois grupos, um deles constituído por derivados metaidroxilados, que reagem positivamente com hipoclorito, e outro, constituído por derivados *meta*-substituídos metoxilados, que em sua maior parte dão reação negativa¹¹.

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 sobre depsidonas pode dar aparecimento à coloração vermelha⁸².

Além desses, podem ser utilizados outros reagentes para detecção de outros grupos funcionais, como por exemplo grupamento aldeído. Soluções de benzidina, *p*-fenilenodiamina, anilina, *o*-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.

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. Além disso, muitos ácidos liquênicos não produzem qualquer variação de cor pela ação desses reagentes, requerendo, portanto, a utilização de outras técnicas de detecção dessas substâncias.

Outros reagentes também são usados, como por exemplo, solução de Cloramina T e de Cloreto de Titânio para detecção de ácido úsnico e reagente de Dimroth para xantonas⁸².

- Microcristalização

A técnica de microcristalização é utilizada em taxonomia de líquens para 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 literatura⁸³⁻⁸⁶.

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 e outras levemente. Soluções para cristalização contendo derivados nitrogenados exigem pouco ou nenhum aquecimento^{82, 86}.

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 literatura⁸³⁻⁸⁶.

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 taxonomia⁸³.

As soluções usadas para cristalização podem conter compostos nitrogenados como *o*-toluidina, quinolina, anilina, 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. As soluções que não contém compostos nitrogenados na composição, não promovem qualquer reação, sendo apenas meios de cristalização^{45, 86}.

Além das soluções 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^{45, 83 - 86}.

Pelo uso da técnica de microcristalização é possível identificar um grande número de ácidos liquênicos das séries dos depsídeos, depsídonas e dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos alifáticos (ácidos caperático [13], protoliquesterfínico [22], rangifórmico [15], rocélico [14] e outros) e terpenos (friedelina, leucotilina [77], ácido ursólico, zeorina [76] e outros), que também formam estruturas cristalinas nas condições citadas⁸⁶.

- Cromatografia

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

Wachtmeister⁸⁷ e Mitsuno⁸⁸ 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 fina⁸⁹⁻⁹². Tabulações de dados e referências são encontrados nos trabalhos de Huneck⁹³ e Santesson⁹⁴.

A cromatografia de extratos liquênicos utilizando placas de cromatografia em camada delgada de alta performance tem permitido detectar com mais precisão um número de compostos presentes nos extratos devido à maior resolução do método⁹⁵. 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 (clae) para análise de extratos liquênicos foi empregada pela primeira vez por Culberson⁹⁶.

Estudos sobre a composição e proporção de ácidos liquênicos em espécies do gênero *Cladonia* empregando clae têm sido realizados por Huovinen *et al.*⁹⁷⁻¹⁰³. Feige *et al.*¹⁰⁴ analisaram por clae 331 compostos obtidos de líquens e Yoshimura *et al.*¹⁰⁵ utilizaram a técnica de análise por clae com detector de arranjo

de fotodiodos. Yoshimura *et al.*¹⁰⁵ tabelaram dados relativos a 80 diferentes compostos liquênicos e determinaram a composição de extratos de 15 espécies de líquens.

A identificação de líquens aos níveis de gêneros e espécies tem sido conduzida pela análise morfológica, reações de coloração no talo, cromatografia, microcristalização e em alguns casos análise por espectrometria de massas de micro-extratos. Mais recentemente, tem sido sugerida a utilização de dados espectrais de RMN ¹³C de heteropolissacarídeos para identificação de líquens¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Importância dos compostos liquênicos

O interesse na química de polissacarídeos de líquens está na possibilidade de sua atividade antitumoral. Esses estudos tiveram início no final da década de 60¹⁰⁹⁻¹¹³. Recentemente, Hirabayashi *et al.*¹¹⁴ relataram a atividade inibitória de um polissacarídeo sulfatado, GE-3-S, contra a replicação de HIV *in vitro*.

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.*^{115,116} 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. Os compostos liquênicos exercem sua ação antibiótica preferencialmente sobre bactérias gram-positivas¹¹⁷.

A atividade antibiótica está relacionada à presença de derivados fenólicos nos extratos liquênicos. Os mecanismos da ação antibiótica de ácidos liquênicos, mais precisamente do ácido úsnico [1] 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 celular⁵⁵.

Tentativas de relacionar estrutura química e atividade antibiótica têm sido realizadas desde 1948. Shibata *et al.*¹¹⁸ estudaram os efeitos de substituições nos anéis A e B do ácido úsnico [1] 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) no primeiro anel, são fundamentais como suporte da atividade antibiótica dos ácidos úsnicos. Tal conclusão é reafirmada pelo fato de que o ácido 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 (-)-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 nuclear¹¹⁹.

O ácido (-)-úsnico [1b] atua também como agente antitumor^{120, 121}. Os ácidos úsnicos apresentam também atividade antiestamínica, espasmolítica e antiviral. São usados em cremes antissépticos encontrados no comércio europeu como "Usno"¹²² e "Evosin"¹²². 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 fisodálico¹²².

Dibenzofuranos estruturalmente relacionados aos ácidos ús-nicos também possuem atividade antibiótica frente a uma ampla gama de bactérias. O ácido dídímico [56] mostra atividade quando na presença de *Staphylococcus aureus* e *M. tuberculosis*.

Cain¹²³⁻¹²⁶ estudou a ação do ácido polipórico [81] e seus derivados como agentes antitumoral, e Hirayama *et al.*¹²⁷ testaram extratos de líquens, ácidos liquênicos e seus produtos de degradação quanto à atividade antitumoral frente aos carcinomas ascite e de Erlich. Verificaram que os ácidos nefrosterínico [21] e protoliqueterínico [22] 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 antitumoral, como é o caso de vernolepina e elefantopina, que são lactonas sesquiterpênicas⁵.

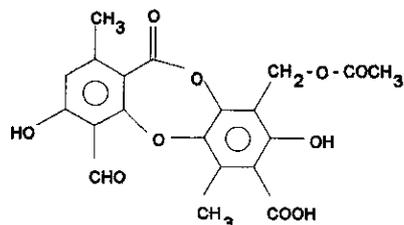
Ácido vulpínico [6], ácidos secalônicos e seus derivados são metabólitos altamente tóxicos. O ácido vulpínico é o princípio tóxico de *Letharia vulpina* e foi usado tradicionalmente no norte da Europa como veneno para lobos. É um metabólito não somente venenoso para carnívoros, mas também para insetos e moluscos. Entretanto, não causa o mesmo efeito em coelhos e ratos³³.

O ácido secalônico D, um metabólito teratogênico, é inibidor da proteína quinase C e proteína quinase dependente de AMP cíclico. Inibidores dessas proteínas podem interferir no desenvolvimento normal¹²⁸.

Harada *et al.*¹²⁹ observaram que o ácido secalônico A 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.

Wennersten¹³⁰ 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 fotossensibilização. Atranorina [2] e ácido estíptico [45] são capazes de fotossensibilizar a pele humana, sendo, portanto, alérgenos de contacto^{5, 11}.

Hidalgo *et al.*¹³¹ investigaram a atividade antioxidante de atranorina [2], ácido divaricático [32], panarina [83] e 1'-cloropanarina [84], empregando como modelo a auto-oxidação de homogenato de cérebro de rato e β -caroteno em uma suspensão de ácido linolênico. Dos compostos testados, o 1'-cloropanarina [84] foi o mais ativo, seguido da panarina [83]. Atranorina [2] e ácido divaricático [32] foram menos ativos em relação aos dois primeiros.

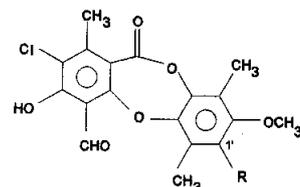


Panarina [83] R = H
1'-Cloropanarina [84] R = Cl

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 organismos¹³¹.

Shibamoto *et al.*¹³² testaram os ácidos ús-nico[1] e fisodálico [85] quanto à mutagenicidade no teste de Ames: o último exibiu mutagenicidade dependente da dose.

Os ácidos ús-nico [1] e difractáico [25] apresentam também atividade analgésica e antipirética quando testados em ratos¹³³.



Ácido fisodálico [85]

Um dos 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, subsequentemente 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 maior parte é constituída de borneol, cineol, geraniol, citronelol, derivados da cânfora, naftaleno, orcinol, ésteres do orselinato e seus homólogos⁵.

Os ácidos liquênicos frequentemente contêm grupos polares tais como OH, COOH, e CHO que favorecem a complexação de cátions¹³⁴. 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 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 malformações⁵⁵.

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^{135, 136}. Foi sugerido, também, que as propriedades antimicrobianas apresentadas pelos ácidos liquênicos envolvem um mecanismo de complexação de metais, face a forte correlação que existe entre propriedades antibacterianas e a capacidade de complexação de metais em compostos orgânicos sintéticos¹³⁷.

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 invasores⁵⁵.

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 urease⁵⁵.

A enzimologia de líquens foi pioneira na biotecnologia de enzimas e células imobilizadas. Mosbach & Mosbach¹³⁸ desenvolveram 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 na matriz do gel, 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 bioquímico¹⁹. Estudos relacionados à imobilização de células de líquens e enzimas para bioprodução de metabólitos vêm sendo realizados por Vicente *et al.*^{139,140} e Pereira *et al.*^{141, 142}.

A bioprodução de metabólitos de líquens tem sido desenvolvida, também, através de cultura de células de líquens ou de células do micobionte^{143 - 145}.

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⁽ⁱⁱ⁾, 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^{146, 147}.

Substâncias cíclicas com grupos -OH livres são geralmente tóxicas para os seres vivos⁴ e as substâncias liquênicas (ácidos liquênicos) estão incluídas nesse grupo¹⁴⁸.

AGRADECIMENTOS

A Pró-Reitoria de Pesquisa de Pesquisa e Pós-Graduação da UFMS pelo apoio para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Nash III, T.H.; *Lichen Biology - Introduction*; In *Lichen Biology*; Nash III, T. H.; Ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1996; p 1.
- Hawksworth, D. L.; Hill, D. J.; *The lichen-forming fungi*; Blackie & Sons. Ltd. Glasgow, 1984.
- Smith, D. C.; Douglas, A. E.; *The Biology of Symbiosis*; Edward Arnold, London, 1987.
- Ahmadjian, V.; *Phycologia* **1967**, *6*, 127.
- Richardson, D. S. H.; *Medicinal an other economic aspects of lichens*; In *CRC Handbook of Lichenology*, V.III, Galun, M.; Ed.; CRC Press, Boca Raton, Flórida, 1988, p 93.
- Nash III, T. H.; *Nitrogen, its metabolism and potential contribution to ecosystems*; In *Lichen Biology*; Nash III, T. H.; Ed.; Cambridge University Press, Cambridge 1996, p 121.
- Nash III, T. H.; *Photosynthesis, respiration, productivity and growth*; In *Lichen Biology*; Nash III, T. H. Ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1996, p 88.
- Galloway, D. J.; *Lichen biogeography*; In *Lichen Biology*; Nash III, T. H.; Ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1996, p 199.
- Kappen, L.; *Response to Extreme Environments*; In *The Lichens*; Ahmadjian, V.; Hale, M. E.; Ed.; Academic Press, New York, 1973, p 311.
- Brodo, I. M.; *Substrate Ecology*; In *The Lichens*; Ahmadjian, V.; Hale, M. E.; Ed.; Academic Press, New York, 1973, p 401.
- Hale, Jr. M. E.; *The Biology of Lichens*. Baltimore, Edward Arnold, 1983.
- Lindberg, B.; Silvander, B. G.; Wachtmeister, C. A.; *Acta Chem. Scand.* **1963**, *17*, 1348.
- Lindberg, G.; Wachtmeister, C. A.; Wickberg, B.; *Acta Chem. Scand.* **1952**, *6*, 1052.
- Gorin, P. A. J.; Baron, M.; Iacomini, M.; *Storage products of lichens*; In *CRC Handbook of Lichenology* vol. III, Galun, M.; Ed.; CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988, p 9.
- Gorin, P. A. J.; Baron, M.; Silva, M. L. C.; Teixeira, A. Z. A.; Iacomini, M.; *Ciência e Cultura* **1993**, *45*, 27.
- Bahde, P. D.; Patwardhan, P. C.; *The Bryologist* **1972**, *75*, 368.
- Margaris, N. S.; *The Bryologist* **1974**, *77*, 77.
- Persecã, T.; Dordea, M.; Cordoreanv, V.; *Studia Univ. Bbase-Bolyai*, **1979**, XXIV, 26.
- Vicente, C.; Legaz, M. E.; *Lichen Enzymology*; In *CRC Handbook of Lichenology*, v.I. Galun, M.; Ed.; CRC Press Inc., Boca Raton, Florida 1988, p 239.
- Perez-Urria, E.; Vicente, C.; Xavier-Filho, L.; *Biochem. System. Ecol.* **1989**, *17*, 359.
- Yague, E.; Estevez, M. P.; *Physiol. Plant.* **1988**, *74*, 515.
- Yague, E.; Estevez, M. P.; *Lichenol.* **1989**, *21*, 147.
- Jensen, M.; Feige, G. B.; Waterkotte, A.; *Lichenol.* **1991**, *23*, 187.
- Plat, H.; Krenn, B. E.; Wever, R.; *Biochem. J.* **1987**, *248*, 277.
- Oliva, M. L. V.; Mendes, C. R.; Bueno, N. R.; Honda, N. K.; Sampaio, M. U.; Sampaio, C. A. M.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1992**, *25*, 999.
- Mendes, C. R.; *Dissertação de Mestrado*. Escola Paulista de Medicina, 1994, São Paulo.
- Machado, M. J.; Gorin, P. A. J.; Torri, G.; Iacomini, M.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1994**, *27*, 523.
- Bruun, T.; Lamvik, A.; *Acta Chem. Scand.* **1971**, *25*, 483.
- Rycroft, D. S.; Connolly, J. W.; Huneck, S.; Himmelreich, U.; *Z. Naturforsch.* **1995**, *50b*, 1557.
- Culberson, W. L.; *Mycologia* **1969**, *61*, 731.
- Leuckert, C.; Dölling, K.; Wolters, R.; *Herzogia* **1979**, *5*, 181.
- Wilkins, A. L.; James, P. W.; *Lichenol.* **1979**, *11*, 271.
- Elix, J. A.; *Biochemistry and secondary metabolites*; In *Lichen Biology*; Nash III, T. H. Ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1996, p 154.
- Galun, M.; Shomer-Ilan, A.; *Secondary metabolic products*; In *CRC Handbook of Lichenology*, V. III, M. Galun; Ed.; CRC Press Inc. Boca Raton, Flórida 1988, p 3.
- Huneck, S.; *Nature of lichen substances*; In *The Lichens*; Ahmadjian, V.; Hale, M. E.; Ed.; Academic Press, New York, 1973, p 495.
- Bebert; *J. Pharm. Sci. Acess.* **1831**, *17*, 696; Alms, I.; *Ann. Pharm.* **1832**, *1*, 61; Knopp, W.; *Ann. Chem. Pharm.* **1844**, *49*, 103; Gmelin, L.; *Handbuch der organischen Chemie*, 1858, Bd V., p 94-97, apud Huneck, S.; Yoshimura, I.; *Identification of lichen substances*, Springer, Berlin, 1996.
- Zopf, W.; *Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung*, Fischer, Jena, 1907.
- Hesse, O.; *Flechtenstoffe*, In *Biochemisches Handlexikon*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 1912.
- Fischer, E.; Fischer, HOL.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1913**, *46*, 1138, apud Huneck, S.; Yoshimura, I., *Identification of Lichen substances*; Springer-Verlag, Berlin, 1996.
- a) Asahina, Y.; Asano, J.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1932**, *65*, 475; b) Asahina, Y.; Fuzikawa, F.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1932**, *65*, 58; c) Asahina, Y.; Fuzikawa, F.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1932**, *65*, 580; d) Asahina, Y.; Fuzikawa, F.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1932**, *65*, 1665; e) Asahina, Y.; Yanagita, M.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1933**, *66*, 36; f) Asahina, Y.; Kanaoka, Y.; Fuzikawa, F.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1933**, *66*, 649; g) Asahina, Y.; Yanagita, M.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1933**, *66*, 1217; h) Asahina, Y.; Hashimoto, A.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1934**, *67*, 416; i) Asahina, Y.; Tukamoto, T-T.; *Ber. Dtsch.*

ii) Alguns fungos vivem nas raízes de plantas superiores em uma relação simbiótica denominada micorriza².

- Chem. Ges.* **1934**, 67, 416; j) Asahina, Y.; Fuzikawa, F.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**, 68, 634; k) Asahina, Y.; Hiraiawa, M.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**, 68, 1705; l) Asahina, Y.; Fuzikawa, F.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**, 68, 2022.; m) Asahina, Y.; Yasue, M.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1936**, 69, 643; n) Asahina, Y.; Yasue, M.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1937**, 70, 206; o) Asahina, Y.; Tanase, Y.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1937**, 70, 62; p) Asahina, Y.; Shibamoto, Z. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1938**, 71, 2561; q) Asahina, Y.; Kusaka, T.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1942**, 17, 152; r) Asahina, Y.; Nogami, H.; *Proc. Imp. Acad. (Tokyo)*, **1942**, 17, 221, apud Huneck, S.; Yoshimura, I.; *Identification of Lichen Substances*; Springer-Verlag, Berlin, 1996.
41. Asahina, Y.; Shibata, S.; *Chemistry of Lichen Substances*; Japan Society from the Promotion of Science; Tokyo, 1954.
 42. Culberson, C. F.; Elix, J. A.; *Lichen substances; In Methods in Plant Biochemistry; V.1, Plant Phenolics*. Dly, P. M.; Harbourne, J. A.; Ed.; Academic Press, London, 1989.
 43. Geissman, T. A.; Crout, D. H.; *Organic Chemistry of Secondary Metabolism*; Freeman, San Francisco, 1969.
 44. Luckner, M.; *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals*. Springer-Verlag, Berlin, 1990.
 45. Hale, Jr. M. E.; *The Biology of Lichens*; Edward Arnold, London, 1974.
 46. Culberson, C. F.; *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*; The University of North Carolina Press, Chapel Hill, 1969.
 47. Dembitsky, V. M.; Rezanka, T.; Byчек, I. A.; *Phytochemistry* **1992**, 31, 1617.
 48. Dembitsky, V. M.; Rezanka, T.; Byчек, I. A.; Shustov, M. V.; *Phytochemistry* **1992**, 31, 841.
 49. Dembitsky, V. M.; Rezanka, T.; Byчек, I. A.; *Phytochemistry* **1992**, 31, 851.
 50. Piervittori, R.; Alessio, F.; Maffei, M.; *Phytochemistry* **1994**, 36, 853.
 51. Devincenzi, I. A. A.; Honda, N. K.; Xavier Filho, L.; Anais da 16ª Reunião Anual da SBQ 1993, Caxambú-MG.
 52. Mosbach, K.; *Biosynthesis of Lichen Substances*; In *The Lichens*; Ahmadjian, V.; Hale, M. E.; Ed.; Academic Press, New York, 1973, p 523.
 53. Torsell, K. B. G.; *Natural Product Chemistry - A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism*; John Wiley & Sons, New York, 1989.
 54. Blomer, J. L.; Hoffman, W. F.; *Tetrahedron Lett* **1969**, 4339.
 55. Vicente, C.; *Fisiologia de las sustancias liquénicas*; Alhambra, Madrid, 1975.
 56. Vicente, C.; *Symbiosis* **1991**, 11, 279.
 57. Hale, Jr. M. E.; *Contr. U. S. Nat. Herb.* **1965**, 36, 193.
 58. Ahmann, G. B.; Mathey, A.; *Bryologist* **1967**, 70, 93.
 59. Elix, J. A.; Gaul, K. L.; *Aust. J. Chem.* **1986**, 39, 613.
 60. Elix, J. A.; Wardlaw, J. H.; *Aust. J. Chem.* **1996**, 49, 539.
 61. Culberson, C. F.; *Science* **1964**, 143, 255.
 62. Culberson, C. F.; *The Bryologist* **1986**, 89, 91.
 63. Sala, T.; Sargent, M. V.; *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1981**, 855.
 64. Elix, J. A.; Jenie, U. A.; Parker, J. L.; *Aust. J. Chem.* **1987**, 40, 1461.
 65. Shibata, S.; Iitaka, Y.; *Chem. Pharm. Bull* **1984**, 32, 366.
 66. Carvalho, C. F.; Sargent, M. V.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1984**, 1605.
 67. Rochleder, F.; Heldt, W.; *Ann. Chem.* **1843**, 48, 1; apud Huneck, S.; Yoshimura, I.; *Identification of Lichen Substances*, Springer-Verlag, Berlin, 1996.
 68. Shibata, S.; Taguchi, H.; *Tetrahedron Lett.* **1967**, 4867.
 69. Taguchi, H.; Sankawa, U.; Shibata, S.; *Tetrahedron Lett.* **1966**, 5211.
 70. Fox, C. H.; Mosbach, K.; *Acta Chem. Scand.* **1967**, 21, 2327.
 71. Huneck, S.; Steglich, W.; Höfle, G.; *Phytochemistry* **1977**, 16, 121.
 72. Huneck, S.; Culberson, C. F.; Culberson, W. L.; Elix, J. A.; *Phytochemistry* **1991**, 30, 706.
 73. Aberhart, D. J.; Overton, K. H.; *J. Chem. Soc.* **1969**, (C) 704.
 74. Shimada, S.; Saito, H. T.; Namiki, Y.; Sankawa, U.; Shibata, S.; *Phytochemistry* **1980**, 19, 467.
 75. Huneck, S.; *J. Prakt. Chem.* **1972**, 314, 488.
 76. Elix, J. A.; Whitton, A. A.; Sargent, M. V.; *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, **1984**, 45, 103.
 77. Wojciechowski, Z. A.; Goad, L. J.; Goodwin, T. W.; *Phytochemistry* **1973**, 12, 1433.
 78. Bruun, T.; Motzfeld, A. M.; *Acta. Chem. Scand.* **1975**, B 29, 274.
 79. Fahlstet, D.; *Symbiosis* **1994**, 16, 117-165.
 80. Rikkinen, J.; *What's behind the pretty colours? A study on the photobiology of lichens. Bryobrothera v.4*, 1995, Helsinki.
 81. Nylander, W.; *Flora (Jena)* **1866**, 49, 233 apud Huneck, S.; Yoshimura, I. *Identification of Lichen Substances*, Springer-Verlag, Berlin, 1996.
 82. Santesson, J.; *Identification and isolation of lichen substances*; In *The Lichens*; Ahmadjian, V.; Hale, M. E.; Ed.; Academic Press, London, 1973, p 633.
 83. Asahina, Y.; *J. Jpn. Bot.* **1936-1940**, 12, 516; 859; 13, 529, 855; 14, 39, 244, 318, 650, 767; 15, 465; 16, 185 apud Huneck, S.; Yoshimura, I. *Identification of Lichen Substances*, Springer-Verlag, Berlin, 1996.
 84. Taylor, C. J.; *The Lichen of Ohio. Part I. Foliose Lichens*. The Ohio State University, 1967, Columbus, Ohio 151 p.
 85. Taylor, C. J.; *The Lichen of Ohio. Part II. Fruticose and Cladoniform lichens*. Columbus, Ohio. The Ohio State University, 95 p, 1967b.
 86. Huneck, S.; Yoshimura, I.; *Identification of Lichen Substances*, Springer-Verlag, Berlin, 1996.
 87. Wachtmeister, C. A.; *Acta. Chem. Scand.* **1952**, 6, 818.
 88. Mitsuno, M.; *J. Pharm. Bull.* **1953**, 1, 170.
 89. Culberson, C. F.; Kristinsson, H.; *J. Chromatogr.* **1970**, 46, 85.
 90. Culberson, C. F.; *J. Chromatogr.* **1972**, 72, 113.
 91. Culberson, C. F.; Johnson, A.; *J. Chromatogr.* **1976**, 128, 253.
 92. Culberson, C. F.; Culberson, W. L.; Johnson, A.; *The Bryologist* **1981**, 84, 16.
 93. Huneck, S.; *Lichen Substances*; In Reinhold L. & Liwischitz, Y. (orgs.) *Progress in Phytochemistry I*, London, 1968, p 223.
 94. Santesson, J.; *Acta. Chem. Scand.* **1967**, 21, 1162.
 95. Arup, U.; Ekman, S.; Lindblom, L.; Mattesson, J. E.; *Lichenologist* **1993**, 25, 61.
 96. Culberson, C. F.; *Bryologist.* **1972**, 75, 54.
 97. Houvinen, K.; Hiltunen, R.; Von Schantz, M.; *Planta Med.* **1982**, 45, 152.
 98. Houvinen, K.; *Acta Pharm. Fenn.* **1985**, 94, 99.
 99. Houvinen, K.; Ahti, T.; *Ann. Bot. Fenn.* **1986**, 23, 93.
 100. Houvinen, K.; Ahti, T.; *Ann. Bot. Fenn.* **1986**, 23, 173.
 101. Houvinen, K.; Ahti, T.; *Ann. Bot. Fenn.* **1988**, 25, 371.
 102. Houvinen, K.; Ahti, T.; Stenroos, S.; *Ann Bot. Fenn.* **1989**, 26, 133.
 103. Houvinen, K.; Ahti, T.; Stenroos, S.; *Ann. Bot. Fenn.* **1989**, 26, 197.
 104. Feige, G. B.; Lumbsch, H. T.; Huneck, S.; Elix, J. A.; *J. Chromatogr.* **1993**, 646, 417.
 105. Yoshimura, I.; Kinoshita, Y.; Yamamoto, Y.; Huneck, S.; Yamada, Y.; *Phytochem. Anal.* **1994**, 5, 197.
 106. Yokota, I.; Shibata, S.; Saitô, H.; *Carbohydr. Res.* **1979**, 69, 252.

107. Takahashi, K.; Kon, T.; Yokota, I.; Shibata, S.; *Carbohydr. Res.* **1981**, 89, 166.
108. Teixeira, A. Z. A.; Iacomini, M.; Gorin, P. A. J.; *Carbohydr. Res.* **1995**, 266, 309.
109. Fukuoka, F.; Nakanishi, M.; Shibata, S.; Nishikawa, F.; Takeda, T.; Tanaka, M.; *Gann* **1968**, 59, 421.
110. Shibata, S.; Nishikawa, Y.; Takeda, T.; Tanaka, M.; *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, 16, 2362.
111. Nishikawa, Y.; Takeda, T.; Shibata, S.; Fukuoka, F.; *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, 17, 191.
112. Nishikawa, Y.; Takeda, T.; Shibata, S.; Fukuoka, F.; *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, 18, 1431.
113. Takahashi, K.; Takeda, T.; Shibata, S.; Inomara, M.; Fukuoka, F.; *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, 27, 404.
114. Hyrabayashi, K.; Iwata, S.; Ito, M.; Sshigueta, S.; Narui, T.; Mori, T.; Shibata, S.; *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 2410.
115. Burkholder, P. R.; Evans, A. W.; McVeigh, I.; Thorton H. K.; *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash* **1944**, 30, 250.
116. Burkholder, P. R.; Evans, A. W.; *Bull. Torrey Bot. Club.* **1945**, 72, 157.
117. Bustinza, F.; *Endeavour* **1951**, 10, 95.
118. Shibata, S.; Miura, Y.; *Japan. Med. Journ.* **1948**, 1, 518.
119. Marshar, A.; Fager, J. J. *Cell. Comp. Physiol.* **1950**, 35, 317.
120. Kupchan, S. M.; Kopperman, H. L.; *Experientia* **1975**, 31, 625.
121. Takai, M.; Uehara, Y.; Beisler, J. A.; *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 1380.
122. Vartia, K. O.; *Antibiotics in Lichens*; In *The Lichens*; Ahmadjian, V.; Hale, M. E.; Ed.; Academic Press, New York, 1973, p 547.
123. Cain, B. F.; *J. Chem. Soc.* **1961**, 936.
124. Cain, B. F.; *J. Chem. Soc.* **1963**, 356.
125. Cain, B. F.; *J. Chem. Soc.* **1964**, 5472.
126. Cain, B. F.; *J. Chem. Soc.* **1966**, 1041.
127. Hirayama, T.; Fujikawa, F.; Kasahara, T.; Otsuka, M.; Nishida, N.; Mizuno, D.; *Yakugaku Zasshi* **1980**, 100, 755.
128. Wang, B. H.; Polya, G. M.; *Planta Med.* **1996**, 62, 111.
129. Harada, M.; Yano, S.; Watanabe, H.; Yamazaki, M.; Miyaki, K.; *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, 22, 1600.
130. Wennersten, G.; *Acta. Der. Venerel.* **1979**, 59, 199.
131. Hidalgo, M. E.; Fernandez, E.; Quilhot, W.; Lissi, E.; *Phytochemistry* **1994**, 6, 1585.
132. Shibamoto, T.; Wei, C. I.; *Environment Mutagenesis* **1984**, 6, 757.
133. Okuyama, E.; Umeyama, K.; Yamazaki, M.; Kinoshita, Y.; Yamamoto, Y.; *Planta Med.* **1995**, 61, 113.
134. Syers, J. K.; *Plant & Soil* **1969**, 31, 205.
135. Broompragob, K.; Nash III, T. H.; Fox, C. A.; *Environ. Exper. Bot.* **1989**, 29, 187.
136. Prussia, C. M.; Kollingbeck, K. T.; *The Bryologist* **1991**, 94, 135.
137. Syers, J. K.; Iskandar, I. K.; *Pedogenetic significance of Lichens*; In *The Lichens*; Ahmadjian, V.; Hale, M. E.; Eds.; Academic Press, New York, 1973, p 225.
138. Mosbach, K.; Mosbach, R.; *Acta. Chem. Scand.* **1966**, 20, 2807.
139. Vicente, C.; Cambon, C.; Garcia-Junceda, E.; *Planta Sci.* **1992**, 85, 143.
140. Vicente, C.; Pereyra, M. T.; Pedrosa, M. M.; Solas, M. T.; Pereira, E. C.; *Imobilization 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.; Eds.; Fletchen Follmann. Contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann. Cologne: The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Cologne, 1995, p 97.
141. Pereira, E. C.; Pereyra, T.; Matos, S. C.; Da Silva, N. H.; Andrade, L.; Vicente, C.; *Acta Soc. Bot. Pol.* **1995**, 64, 171.
142. Pereira, E. C.; Molina, M. C.; Pedrosa, M. M.; Solas, M. T.; Vicente, C.; Legaz, M. E.; *An. Quím.* **1995**, 91, 253.
143. Hamada, N.; Ueno, T.; *Agric. Biol. Chem.* **1987**, 51, 1705.
144. Hamada, N.; *Bryologist* **1989**, 92, 310.
145. Culberson, C. F.; Armaleo, D.; *Experim. Micol.* **1992**, 16, 52.
146. Fahselt, D.; *Individuals, populations and population ecology*; In *Lichen Biology*; Nash III, T. H.; Eds.; Cambridge University Press, Cambridge 1996, p 181.
147. Lawrey, J. D.; *Lichen Allelopathy: A Review*; In *Allelopathy - organisms, processes and applications*; Inderjit T, K.; Dakshini, M.; Einhellig, F. A.; ACS Symposium Series 582, August 1-5, 1993. American Chemical Society, 1995, Washington, DC.
148. Airaksinem, M. M.; Peura, P.; Antere, S.; *Arch. Toxicol.* **1986**, 9, 406.