

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS
INSTITUTO DE QUÍMICA – INQUI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALINE SIQUEIRA GIANINI

Estudo quimiotaxonômico de líquens do gênero *Stereocaulon* e busca
de compostos bioativos

CAMPO GRANDE - MS

2022

ALINE SIQUEIRA GIANINI

Estudo quimiotaxonômico de líquens do gênero *Stereocaulon* e busca
de compostos bioativos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - INQUI/UFMS para obtenção do grau de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Camila Micheletti

Campo Grande - MS

2022

Stereocaulon alpinum



AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e por me permitir viver da melhor maneira, tornando meu caminho terreno mais sereno e feliz.

Agradeço à minha fantástica família... meu mundo que amo ser e estar e que dá sentido à minha vida! “Charles e Mariana: É por vocês e para vocês!”.

Aos meus pais... eterno amor, admiração e gratidão! “Não há palavras para descrever tamanho amor e gratidão!”.

As minhas irmãs, minhas grandes amigas e incentivadoras em tudo que for para meu melhor!

A Luciana M. Ravaglia pela amizade e pela ajuda profissional.

A Profa. Dra. Ana Camila Micheletti pela oportunidade ímpar e também pela confiança e respeito.

Ao Prof. Dr. Adriano Spielmann do Instituto de Biociência da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pelo fornecimento, identificação dos líquens e pela disposição em colaborar com este trabalho.

Ao M.Sc. Jean Marc Torres Pineda pela identificação dos líquens e pela disposição em colaborar com esse trabalho.

Aos participantes da banca examinadora que gentilmente aceitaram participar da avaliação deste trabalho.

A M.Sc. Karen Fernandes Cardoso pelo encaminhamento das amostras para análise para obtenção dos espectros de massas e pelas informações adicionais dessas análises.

Aos técnicos e professores do Instituto de Química - UFMS.

A todos os colegas do LP2.

A Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Neli K. Honda pela disposição admirável e incomensurável em me auxiliar nessa jornada. Não apenas pela didática impecável, mas também pelas demonstrações constantes de sabedoria, humildade e carinho com que me atendeu esses anos todos. Muitas vezes acreditando em mim mais que eu mesma.

“Minha eterna admiração e gratidão.”

RESUMO

Os líquens produzem muitos compostos e se destacam aqueles da via poliketídica; são compostos fenólicos, a maior parte exclusiva desses organismos, além de ácidos graxos de cadeia longa. Esses compostos possuem um papel importante na quimiotaxonomia dos líquens, pois servem como marcadores químicos para identificação em diferentes níveis taxonômicos. Neste trabalho, 151 exsiccatas de líquens do gênero *Stereocaulon* coletados no Brasil, Antártica, Chile e Argentina, foram analisadas através das técnicas de cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massa, microcristalização e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C . Foram identificados 24 compostos: os ácidos rangifórmico, pseudonorrangifórmico, vinapraesorediósico B e bourgeânico (ácidos graxos); os ácidos lobárico, norstítico, menegaziáico, hipoconstítico, colensóico, estítico (depsidonas); atranorina, ácidos girofórico, anziáico, estenospórico, 2-O-metilnoestenospórico e perlatólico (depsídeos), estrepsilina (dibenzofurano), lobarina (éter difenílico), oxisifulina (cromona) e cinco novos compostos, o depsídeo -1''-oxo-eno''-eno''' perlatólico ou eno''eno''' glomeliférico ou eno''-eno''' miríquidico e as depsidonas, ácidos 2''-eno lobárico, 3''-eno lobárico, 4''eno lobárico e eno''' lobárico.

A composição química juntamente com a análise morfológica de cada espécime permitiu identificar as espécies: *Stereocaulon corticatulum*, *Stereocaulon alpinum* (3 grupos químicos), *Stereocaulon melanopotamicum* (2 grupos químicos), *Stereocaulon implexum*, *Stereocaulon tomentosum* (4 grupos químicos), *Stereocaulon tomentosum* var. *capitatum* (2 grupos químicos), *Stereocaulon ramulosum* e *Stereocaulon argus*.

Os extratos das espécies *S. corticatulum*, *S. alpinum*, *S. tomentosum* e *S. ramulosum* foram avaliados quanto atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (cepa clínica e padrão), *Enterococcus faecium* (cepa clínica) e *Escherichia coli* (cepa padrão), e antioxidante frente ao radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). O extrato de *S. ramulosum* foi o mais ativo, com CMI de 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente às duas cepas de *S. aureus*; a bioautografia mostrou que todas as substâncias presentes no extrato foram responsáveis pela atividade. Os extratos das outras espécies apresentaram CMI $\geq 125 \mu\text{g}/\text{mL}$.

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos indicou mais de dez substâncias ativas. Nossos resultados representam uma contribuição para o conhecimento detalhado da composição química de 09 espécies de líquens do gênero *Stereocaulon*.

Palavras-chave: *Stereocaulon*, líquens, quimiotaxonomia, atividade antibacteriana, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Lichens produce many compounds and those of the polyketide pathway stand out; are phenolic compounds, most of which are exclusive to these organisms, in addition to long-chain fatty acids. These compounds play an important role in the chemotaxonomy of lichens, as they serve as chemical markers for identification at different taxonomic levels. In this work, 151 exsiccates of lichens of the genus *Stereocaulon* collected in Brazil, Antarctica, Chile and Argentina were analyzed using thin layer-chromatography, high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer, microcrystallization and Nuclear Magnetic Resonance of ^1H and ^{13}C . 24 compounds were identified: rangiformic, pseudonorrangiormic, vinapraesorediosic B and bourgeanic acids (fatty acids); lobaric, norstictic, menegazziaic, hypoconstictic, colensoic, stictic acids (depsidones); atranorin, gyrophoric acid, anziaic acid, stenosporic acid, 2-O-methylnorstenosporic acid and perlatolic acid (depsides); strepsilin (dibenzofuran); lobarin (diphenylether), oxysiphulin (chromone) and five new compounds: the depside 1''-oxo -ene''-ene''' perlatolic acid or -ene''-ene''' glomelliferic acid or -ene''-ene''' miriquidic acids and the depsidones: 2''-ene lobaric, 3''-ene lobaric and 4''-ene lobaric and -ene''' lobaric acids.

The chemical composition together with the morphological analysis of each specimen allowed to identify the species: *Stereocaulon corticatulum*, *Stereocaulon alpinum* (3 chemical groups), *Stereocaulon melanopotamicum* (2 chemical groups), *Stereocaulon implexum*, *Stereocaulon tomentosum* (4 chemical groups), *Stereocaulon tomentosum* var. *capitatum* (2 chemical groups), *Stereocaulon ramulosum* and *Stereocaulon argus*. Extracts of the species *S. corticatulum*, *S. alpinum*, *S. tomentosum* and *S. ramulosum* were evaluated for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (clinical and standard strain), *Enterococcus faecium* (clinical strain) and *Escherichia coli* (standard strain), and antioxidant against the free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). The extract of *S. ramulosum* was the most active, with MIC of 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against the two strains of *S. aureus*; bioautography showed that all substances present in the extract were responsible for the activity. The extracts of the other species showed MIC $\geq 125 \mu\text{g}/\text{mL}$.

The evaluation of the antioxidant activity of the extracts indicated more than ten active substances. Our results represent a contribution to the detailed knowledge of the chemical composition of 09 species of lichens of the genus *Stereocaulon*.

Keywords: *Stereocaulon*, lichens, chemotaxonomy, antibacterial activity, antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécie do gênero <i>Usnea</i> , RS, Brasil	18
Figura 2 - Espécie do gênero <i>Haematomma</i> , sobre tronco de árvore, SC, Brasil	18
Figura 3 - Espécie <i>Parmotrema tinctorum</i> , SC, Brasil	18
Figura 4 - Diversidade dos compostos produzidos pelos líquens	20
Figura 5 - Resumo das análises químicas, resultados obtidos e identificação das espécies de <i>Stereocaulon</i>	40
Figura 6 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo I de <i>Stereocaulon</i> no eluente tolueno: dioxano: ácido acético (90:25:4 v/v/v) – revelação para compostos fenólicos.....	41
Figura 7 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo I de <i>Stereocaulon</i> no eluente tolueno: dioxano: ácido acético (90:25:4 v/v/v) – revelação para ácidos graxos.	42
Figura 8 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo I de <i>Stereocaulon</i> no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v).	43
Figura 9 - Fotos da microcristalização do extrato acetônico dos espécimes representativo do grupo I de <i>Stereocaulon</i> (aumento de 10x).	44
Figura 10 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> , representativo do grupo I (CGMS 80216).	45
Figura 11 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆) do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> , representativo do grupo I (CGMS 80216).	46
Figura 12 -Cromatograma do pico base obtido por CLAE-DAD-EM do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> representativo do grupo I (CGMS 61885), no modo negativo.....	48
Figura 13 - Proposta da fragmentação do ácido norrangifórmico.....	50
Figura 14 - Proposta da fragmentação do ácido pseudonorrangifórmico.	50
Figura 15 - Fragmentação da Atranorina.....	51
Figura 16 - Propostas de fragmentação dos ácidos rangifórmico e isorrangifórmico.	52
Figura 17 - Perfil cromatográfico das substâncias identificadas no grupo I.	54

Figura 18 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo II de <i>Stereocaulon</i> no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v).	56
Figura 19 - Fotos da microcristalização do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo II de <i>Stereocaulon</i> (aumento de 10x).	57
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> , representativo do grupo II (CGMS 80161).	59
Figura 21 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆) do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> representativo do grupo II (CGMS 80161).	60
Figura 22 - Cromatogramas do pico base obtidos por CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de <i>Stereocaulon</i> (CGMS 61833, 61337, 61351, 61306 e 61835) representativos do grupo II, no modo negativo.	63
Figura 23 - Propostas de fragmentação da lobarina e loxodinol.....	66
Figura 24 - Proposta da fragmentação da lobarina.	66
Figura 25 - Fragmentação do ácido girofórico.	67
Figura 26 - Via de fragmentação proposta para oxisifulina.	68
Figura 27 - Proposta de fragmentação do ácido lobárico	69
Figura 28 - Possíveis estruturas do depsídeo eluído no pico 5 (Fórmula C ₂₅ H ₂₆ O ₈)	72
Figura 29 - Proposta de fragmentação do depsídeo (C ₂₅ H ₂₆ O ₈) eluído com tempo de retenção 48,5 min (pico 5).....	75
Figura 30 - Possíveis estruturas da depsidona eluída no pico 5 (Fórmula C ₂₅ H ₂₆ O ₈)	76
Figura 31 - Proposta de fragmentação da depsidona eluída com tempo de retenção 48,5 min (pico 5).....	76
Figura 32 - Proposta de fragmentação do ácido vinapraesorediósico B.	78
Figura 33 - Proposta de fragmentação do ácido bourgeânico.	78
Figura 34 - Proposta de fragmentação do ácido colensóico.....	79
Figura 35 - Cromatogramas de pico base dos extratos acetônico de <i>Stereocaulon</i> indicando três grupos químicos (A, B e C).	86
Figura 36 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo III de <i>Stereocaulon</i> no eluente tolueno: dioxano: ácido acético (90:25:4 v/v/v).....	91

Figura 37 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo III de <i>Stereocaulon</i> no eluente tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (139:83:8 v/v/v).....	92
Figura 38 - Foto das formações cristalinas do ácido estético observadas pela cristalização do extrato acetônico de líquens do grupo III em GAoT.....	94
Figura 39 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> , representativo do grupo III (CGMS 61845).	95
Figura 40 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆) do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> , representativo do grupo III (CGMS 61845).	96
Figura 41 - Cromatograma do pico base obtido por CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de <i>Stereocaulon</i> (A.A. Spielmann 12543 e 12672) representativos do grupo III, no modo negativo.....	99
Figura 42 - Propostas de fragmentação dos ácidos hipoconstítico e criptoestético.	101
Figura 43 - Proposta de fragmentação dos ácido menegaziáico.....	102
Figura 44 - Proposta de fragmentação do ácido norstético.	103
Figura 45 - Cromatogramas dos diferentes perfis químicos (A, B, C, D e E) dos extratos acetônicos do grupo III em tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (139:83:8 v/v/v).....	105
Figura 46 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo IV de <i>Stereocaulon</i> no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v).	109
Figura 47 - Fotos das formações cristalinas resultantes do tratamento do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> (grupo IV) com soluções de cristalização.....	110
Figura 48 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> , representativo do grupo IV (CGMS 61166).	111
Figura 49 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆) do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> , representativo do grupo IV (CGMS 61166).	112
Figura 50 - Cromatograma do pico base obtido por CLAE-DAD-EM do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> (CGMS 61201) representativo do grupo IV, no modo negativo.....	115
Figura 51 - Proposta de fragmentação dos ácidos anziáico e 2-O-metilestenospórico.	117
Figura 52 - Bioautografia do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> do grupo I frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecium</i> e revelação cromatográfica.	126

Figura 53 - Bioautografia do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> do grupo II frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecium</i> e revelação cromatográfica.	126
Figura 54 - Bioautografia do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> do grupo III frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecium</i> e revelação cromatográfica.	127
Figura 55 - Bioautografia do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> do grupo IV frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecium</i> e revelação cromatográfica.	127
Figura 56 - Reação de redução do DPPH por um antioxidante (AH).	130
Figura 57 - Cromatogramas dos extratos de <i>Stereocaulon</i> dos grupos I, II, III e IV, 30 minutos após a revelação com solução de DPPH.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de CLAE-DAD-EM do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> representativo do grupo I.	53
Tabela 2 - Dados de CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de <i>Stereocaulon</i> representativos do grupo II	80
Tabela 3 - Valores de R _f e cor observada na revelação química de depsídonas com anel lactol.	93
Tabela 4 - Dados de CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de <i>Stereocaulon</i> representativos do grupo III.....	104
Tabela 5 - Dados cromatográficos dos ácidos anziáico, 2-O-metilestenospórico e perlatólico no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v).....	117
Tabela 6 - Dados cromatográficos dos ácidos perlatólico, 2-O-metilnoestenospórico e estenospórico no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v).....	120
Tabela 7 - Dados de CLAE-DAD-EM do extrato acetônico de <i>Stereocaulon</i> representativo do grupo IV	122
Tabela 8 - Valores da CMI (µg/mL) de extratos de <i>Stereocaulon</i> frente à quatro linhagens de bactérias.	125
Tabela 9 - Substâncias ativas presentes nos extratos de <i>Stereocaulon</i> (grupos I, II, III e IV) frente às bactérias <i>S. aureus</i> (NEWP0023 e clínico) e <i>E. faecium</i> (clínico).	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHA	Hidroxianisol de butila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	Concentração efetiva para inibir 50% do crescimento celular
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI ₅₀	Concentração inibitória para inibir 50% do crescimento celular
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EM	Espectrometria de massas
GAoT	Glicerol: etanol: o-toluidina
GAW	Glicerol: etanol: água
GE	Glicerol: ácido acético
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
PAR2	Receptor ativado por protease tipo 2
PTB-1B	Proteína tirosina fosfatase 1B
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TTC	Cloreto de trifetil tetrazólio
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS GERAIS	32
2.1	Objetivos específicos	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Material	33
3.2	Líquens	33
3.3	Preparação dos extratos	33
3.4	Cromatografia	34
3.5	Microcristalização	35
3.6	Obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C	35
3.7	Obtenção dos espectros de massas	36
3.8	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bioautografia	36
3.9	Atividade antioxidante – bioautografia	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	- Grupo I - Atranorina e Ácidos rangifórmico e pseudonorrangifórmico	41
4.2	Grupo II - Atranorina, Ácido lobárico e outros compostos	56
4.3	Grupo III - atranorina, ácidos estítico, norstítico, menegaziáico e hipoconstítico	91
4.4	Grupo IV- Atranorina, Ácidos perlatólico, anziáico e outro(s) composto(s)	109
4.5	Atividade biológica	125
	4.5.1- Atividade antibacteriana	125
	4.5.2 - Atividade antioxidante	130
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	133

REFERÊNCIAS.....	135
APÊNDICE.....	144

1 INTRODUÇÃO

Líquens são ecossistemas formados por fungos e algas verdes ou cianobactérias. Estudos recentes indicaram que existem comunidades microbianas que podem participar da constituição ou desempenhar papéis essenciais nesses ecossistemas (CALCOTT *et al.* 2018; HAWKSWORTH & GRUBE, 2020). Na maioria dos casos, os fungos pertencem ao filo Ascomycota, embora também existam aqueles pertencentes aos filios Basidiomycota e Deuteromycota. Com relação às algas verdes presentes nos líquens, destacam-se aquelas dos gêneros *Trentepohlia*, *Trebouxia* e *Pseudotrebouxia*, presentes em quase metade dos líquens, e *Nostoc* e *Scytonema*, no caso das cianobactérias (MARCELLI, 2006; FRIEDL & BÜDEL, 2008; HONEGGER, 2008).

As algas verdes e cianobactérias são chamadas de fotobiontes por realizarem a fotossíntese, enquanto os fungos são os micobiontes. O fotobionte e o micobionte formam uma estrutura estável e específica chamada líquen que apresenta características fenotípicas diferentes dos parceiros que o compõe (NASH, 2008; HONEGGER, 2012). Cerca de 50 a 90% do talo do líquen é constituído pelo fungo (HONEGGER, 2012).

Os líquens podem apresentar diferentes tamanhos, formas e cores. Algumas espécies do gênero *Usnea*, chamadas de “barba-de-velho” (**Figura 1**), podem chegar a 4 metros de comprimento, mas a maior parte dos líquens são medidos em centímetros (1-30 cm), e existem aqueles menores com poucos milímetros. Os líquens podem colonizar vários substratos, dentre eles: córtex de árvores, rochas, solo, folhas. Em um único substrato, pode ocorrer o crescimento de uma ou de múltiplas espécies (HALE, 1973; MARCELLI, 2006, ZEDDA & RAMBOLD, 2015).

Os talos dos líquens podem ser do tipo crostoso, achatado e bem aderido ao substrato, como é o caso do líquen do gênero *Haematomma* indicado na **Figura 2**. Outros são do tipo folioso, com o corpo também achatado, porém menos aderido ao substrato, como a espécie *Parmotrema tinctorum* mostrada na **Figura 3**. Existem também aqueles do tipo fruticoso, como algumas espécies de *Usnea* (**Figura 1**), dentre outros tipos, sendo específico de cada espécie (MARCELLI, 2006; BÜDEL & SCHEIDEGGER, 2008).

Figura 1 - Espécie do gênero *Usnea*, RS, Brasil



Fonte: (SPIELMANN, 2006)

Figura 2 - Espécie do gênero *Haematomma*, sobre tronco de árvore, SC, Brasil



Fonte: (SPIELMANN, 2006)

Figura 3 - Espécie *Parmotrema tinctorum*, SC, Brasil



Fonte: (SPIELMANN, 2006)

Até 2017 existiam 19.409 espécies de líquens distribuídas em mais de 1002 gêneros e 119 famílias (LÜCKING *et al.* 2017). Atualmente esses números devem ser maiores. Os líquens são considerados os primeiros representantes a colonizar a Terra, mostram resistência e adaptação a situações ambientais adversas e extremas (temperatura, umidade, altitude), sendo encontrados em regiões tropicais e até mesmo em regiões polares, mostrando assim, a eficácia da simbiose (NASH, 2008).

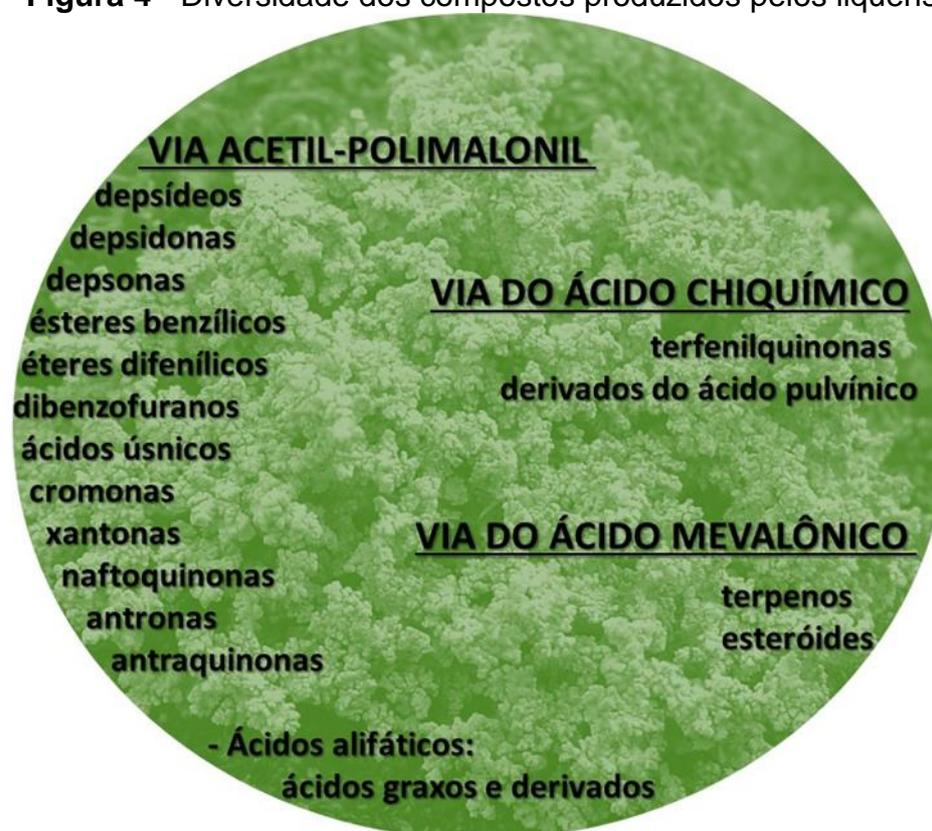
Líquens produzem substâncias necessárias para a sua sobrevivência, crescimento e correlacionadas à sua proteção física e biológica. Essas substâncias

são oriundas do metabolismo primário ou secundário desses organismos. As substâncias provenientes do metabolismo primário incluem os carboidratos, proteínas, aminoácidos, carotenóides e vitaminas, sendo produzidas pelo fungo e pela alga. Tais substâncias não são exclusivas dos líquens, podendo ser encontradas em outras fontes naturais, tais como fungos e algas de vida livre e plantas superiores (HUNECK, 1999; ELIX & STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008; RANKOVIĆ & KOSANIĆ, 2015).

Grande parte das substâncias presentes nos líquens é proveniente do metabolismo secundário, sendo muitas delas exclusivas desses organismos e produzidas pelo fungo apenas quando o mesmo se encontra na forma liquenizada. Essas substâncias são geralmente insolúveis em água, mas podem ser extraídas com solventes orgânicos e desempenham papel significativo no mecanismo de proteção e defesa dos líquens, como contra herbívoros, radiações UV e no controle de umidade. São conhecidos mais de 1000 compostos do metabolismo secundário de líquens, produzidos pelas vias biossintéticas acetil-polimalonil, do ácido chiquímico e do ácido mevalônico (ELIX & STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008; RANKOVIĆ & KOSANIĆ, 2015; CALCOTT *et al.* 2018).

A via acetil-polimalonil conduz a formação da maior parte dos compostos do metabolismo secundário, como pode ser observado na **Figura 4**. São compostos alifáticos, como os ácidos graxos de cadeia longa, e compostos fenólicos, das classes dos depsídeos, depsídonas, depsonas, ésteres benzílicos, éteres difenílicos, dibenzofuranos, ácidos úsnicos, cromonas, xantonas, naftoquinonas, antronas e antraquinonas. A via do ácido chiquímico produz pigmentos da classe das terfenilquinonas e derivados do ácido pulvínico, como os ácidos polipórico e vulpínico, respectivamente, enquanto terpenos e esteróis são oriundos da via do ácido mevalônico e não são tão comuns em líquens. (ELIX & STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008; RANKOVIĆ & KOSANIĆ, 2015).

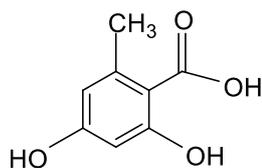
Figura 4 - Diversidade dos compostos produzidos pelos líquens



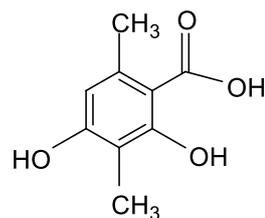
Fonte: própria autora

Os depsídeos representam uma das classes de compostos mais abundantes, formados pela esterificação de duas unidades do orcinol (ácido orselínico) ou do β -orcinol (ácido β -metil-orselínico), através da carboxila da primeira unidade com uma hidroxila da segunda unidade localizadas nas posições *meta* (*meta*-depsídeos) ou *para* (*para*-depsídeos) à carboxila. De uma maneira geral, as unidades do orcinol e β -orcinol podem apresentar diversos substituintes, como cadeias alquílicas de diferentes tamanhos e estados de oxidação, uma ou mais hidroxilas metiladas, a carboxila esterificada, dentre outras modificações estruturais, o que torna essa classe de compostos bastante numerosa (ELIX & STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008; CALCOTT *et al.* 2018).

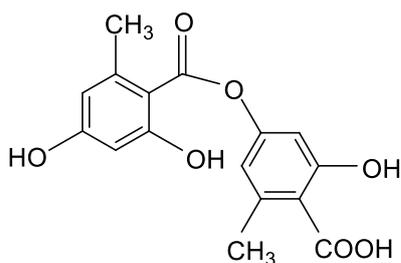
O ácido lecanórico e o ácido 4-O-desmetilbarbático são *para*-depsídeos. O primeiro é formado pela esterificação de duas unidades do ácido orselínico e o segundo é formado pela esterificação de duas unidades do ácido β -metil orselínico.



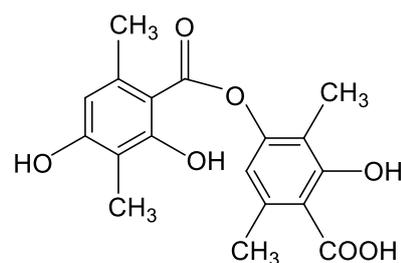
Ácido orselínico



Ácido β-metil-orselínico

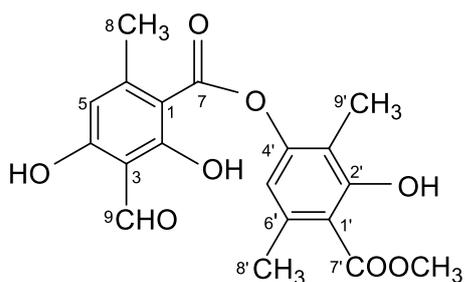


Ácido lecanórico

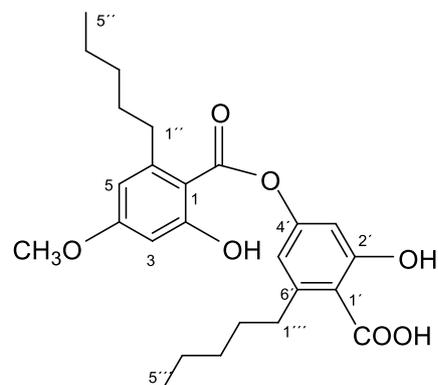


Ácido 4-O-desmetilbarbático

A atranorina é um outro exemplo de *p*-depsídeo derivado do β-metil orcinol e apresenta um grupo aldeído na posição 3 do primeiro anel e a carboxila (C7') sob a forma de éster metílico. O ácido perlatólico (*p*-depsídeo derivado do orcinol) apresenta a cadeia alifática com cinco átomos de carbono em cada anel e um grupo metoxila na posição 4.

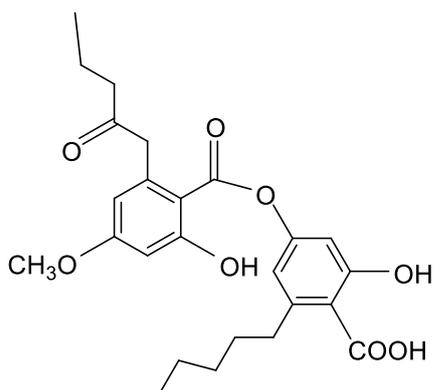


Atranorina

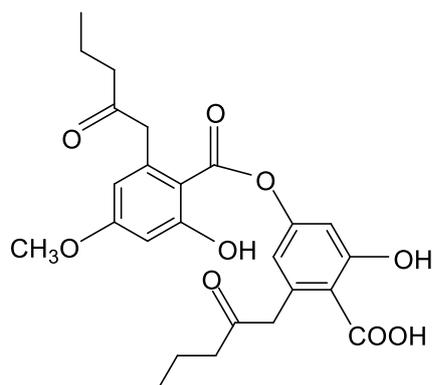


Ácido perlatólico

O ácido glomeliférico apresenta um grupo cetônico no carbono 2 da cadeia alquílica do primeiro anel e o ácido glomérico apresenta o grupo cetônico nas duas cadeias alquílicas.

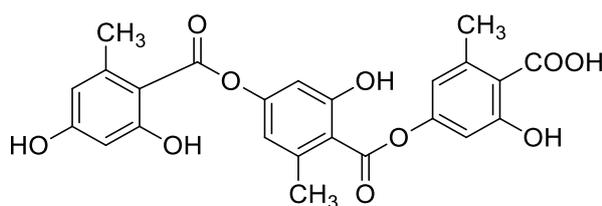


Ácido glomeriférico



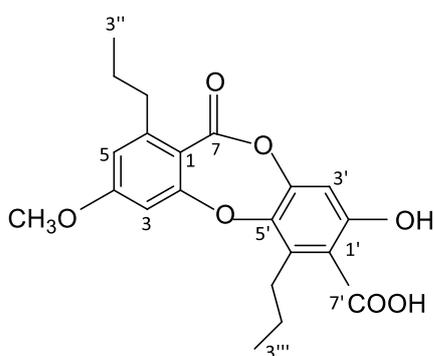
Ácido glomérico

Há também compostos formados por três unidades fenólicas, chamados de tridepsídeos, como o ácido girofórico.

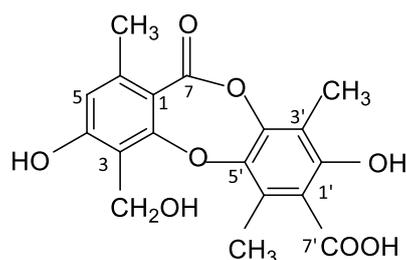


Ácido girofórico

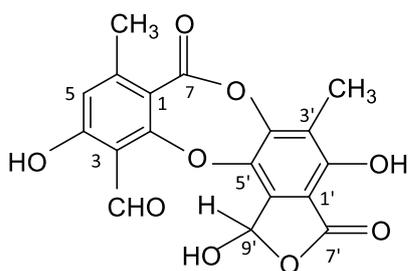
As depsidonas representam outra classe de compostos com estrutura química relacionada aos depsídeos. Apresentam, além da ligação éster, uma ligação éter entre as unidades, geralmente entre as posições 2 e 5', formando um sistema policíclico estável, como é caso dos ácidos divarônico e convirênsico. Há depsidonas que apresentam um anel lactol em sua estrutura, como os ácidos norstítico e criptoestítico.



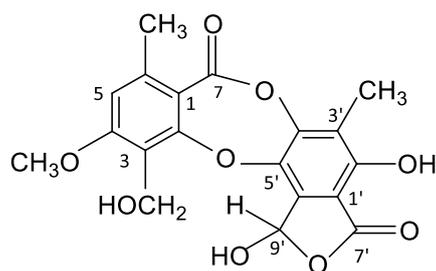
Ácido divarônico



Ácido convirênsico

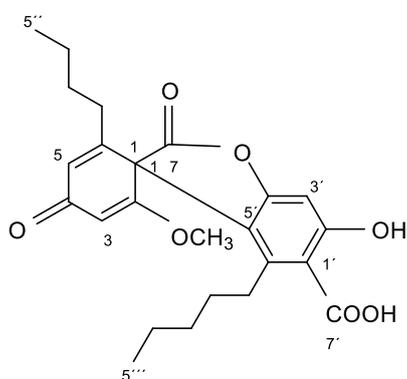


Ácido norstífico

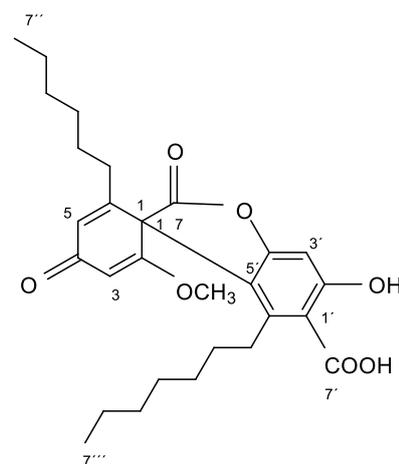


Ácido criptoestítico

As depsonas, menos abundantes, apresentam uma ligação éster e uma ligação entre os carbonos 1 e 5'. Os ácidos picrolíquênico e superpicrolíquênico são depsonas encontradas no gênero *Pertusaria* e apresentam cadeia alifática com cinco e sete átomos de carbono em cada unidade, respectivamente (HUNECK & YOSHIMURA, 1996).

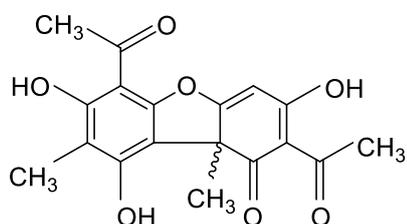


Ácido picrolíquênico

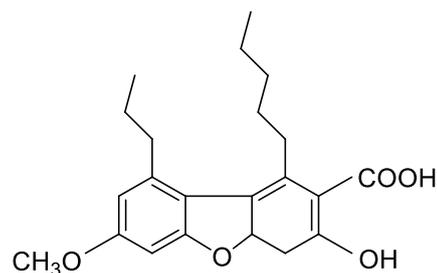


Ácido superpicrolíquênico

Os ácidos úsnicos e dibenzofuranos apresentam características estruturais semelhantes: uma ligação carbono-carbono e uma ligação éter entre as duas unidades aromáticas, porém podem ser classificados em grupos diferentes pois apresentam diferentes precursores biossintéticos (CULBERSON, 1969; HALE, 1973; CÓRDOBA, 1975). O ácido úsnico e o ácido didímico são exemplos de compostos dessas classes. O ácido úsnico é um dos compostos mais comuns encontrados nos líquens e pode existir sob a forma de dois enantiômeros (COCCHIETTO *et al.* 2002).

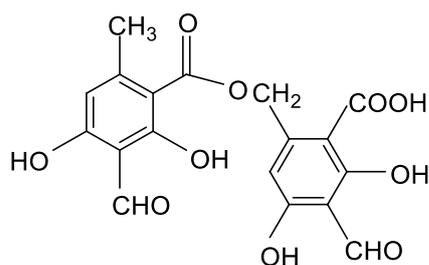


(±) Ácido úsnico

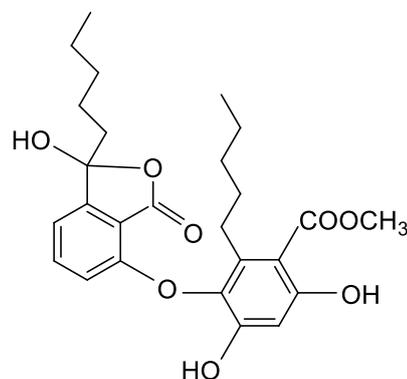


Ácido didímico

Ésteres benzílicos e éteres difenílicos também podem ser encontrados nos líquens, como o ácido barbatólico e loxodinol, respectivamente.

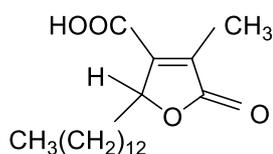


Ácido barbatólico

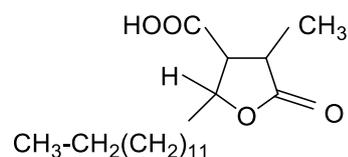


Loxodinol

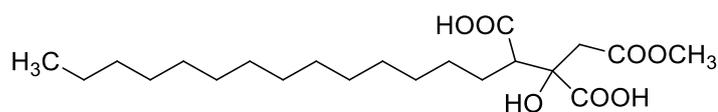
Outros compostos fenólicos como cromonas, xantonas, naftoquinonas, antronas e antraquinonas também ocorrem nos líquens, porém muitos são idênticos àqueles produzidos por outros organismos. Já os ácidos graxos, apesar de alguns serem iguais aos produzidos por outros organismos, como por exemplo os ácidos oleico e linoleico, outros são exclusivos dos líquens, como os ácidos liquesterínico e rocelárico (ácidos δ -lactonas), além dos ácidos caperático, bourgeânico e norrangifórmico (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008).



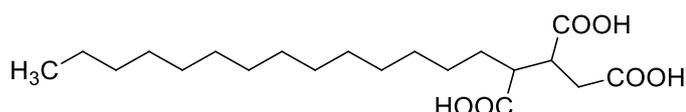
Ácido liquesterínico



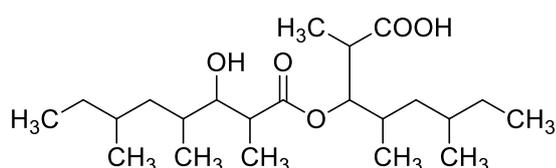
Ácido rocelárico



Ácido caperático



Ácido norrangifórmico



Ácido bourgeânico

Todos esses compostos do metabolismo secundário de líquens têm importante papel na quimiotaxonomia, pois servem como marcadores químicos para identificação em diferentes níveis taxonômicos, combinados às características morfológicas de cada espécie. Em muitos casos, é difícil determinar certo nível taxonômico baseado apenas nos dados morfológicos e se faz necessário utilizar informações químicas para conduzir a uma definição taxonômica mais segura e precisa (CULBERSON, 1986; HONDA & VILEGAS, 1998; KARUNARATNE *et al.* 2005; STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008).

Informações sobre a composição química dos líquens, em relação aos compostos do metabolismo secundário, podem ser obtidas através do teste de coloração (*spot test*), cromatografia em camada delgada (CCD), microcristalização, ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografias líquida de alta eficiência (CLAE) e gasosa (CG), e essas técnicas acopladas à espectrometria de massas (CLAE-EM e CG-EM).

A análise da composição química de líquens para fins taxonômicos foi iniciada por Nylander em 1866. Ele desenvolveu a técnica chamada de *spot test* ou teste de

coloração, que é utilizada rotineiramente até os dias de hoje, pelos liquenologistas. Essa técnica consiste na aplicação de gotas de soluções reagentes sobre um fragmento do líquen e a cor desenvolvida depende da natureza da(s) substância(s) presente(s) (NYLANDER, 1866 apud VITIKAINEN, 2001; ELIX & STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008).

As soluções de hidróxido de potássio, hipoclorito de sódio ou de cálcio e *p*-fenilenodiamina são as mais usadas. A solução de hidróxido de potássio quando aplicada ao talo do líquen promove a hidrólise da ligação éster de depsídeos, depsídonas e outros compostos e dependendo da disposição dos grupos ligados ao anel aromático pode ocorrer a formação de estruturas quinoidais com colorações que variam do amarelo ao vermelho intenso. A solução de hipoclorito promove a oxidação de hidroxilas fenólicas livres que estão presentes em posição meta uma à outra, e formam quinonas com coloração laranja e vermelha. O *p*-fenilenodiamina reage com grupo aldeído formando derivados de cor amarela, laranja ou vermelha (HALE, 1983).

Outra técnica também utilizada na quimiotaxonomia é a microcristalização, desenvolvida pelo químico japonês Asahina em 1936, que permite a identificação de vários compostos provenientes do metabolismo secundário de líquens. Muitas dessas substâncias quando tratadas com soluções apropriadas podem formar estruturas cristalinas características. A identificação dessas estruturas é feita por observação ao microscópio e comparação com estruturas resultantes da cristalização de substâncias isoladas ou presentes em extratos de composição conhecida ou com fotos disponíveis na literatura. Para a realização desta técnica são usadas soluções de cristalização contendo glicerina e ácido acético; glicerina, água e etanol; glicerina, etanol e *o*-toluidina, entre outras (HUNECK & YOSHIMURA, 1996; SHIBATA, 2000; ELIX & STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008).

A cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas na quimiotaxonomia de líquens, em particular a CCD, que é amplamente empregada por ser uma técnica sensível, rápida e simples. Diversas misturas eluentes foram desenvolvidas e são amplamente usadas para a separação de substâncias presentes em um extrato (CULBERSON & KRISTINSSON, 1970; CULBERSON, 1972; CULBERSON & JOHNSON, 1976; CULBERSON *et al.* 1981).

A separação, visando a identificação de substâncias presentes em um extrato pode ser feita também usando a técnica de CCD de alta eficiência (HPTLC – *high performance thin layer chromatography*) e pela Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência (STRACK *et al.* 1979; ARCHER, 1981; ARUP *et al.* 1993; FEIGE *et al.* 1993; YOSHIMURA *et al.* 1994; GUPTA *et al.* 2007; TABBABI & KARNOUS, 2016).

A espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa (CG-EM) ou à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-EM) também é utilizada nas análises de substâncias de líquens. O uso da cromatografia gasosa, no entanto, é mais limitado, pois muitos compostos de líquens são termoinstáveis e podem degradar durante a volatilização, dificultando a execução da análise (ELIX & STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008; SANTOS *et al.* 2015; KONOREVA *et al.* 2019). Já a CLAE-EM permite a análise de compostos de baixa estabilidade térmica, o que torna a técnica bastante utilizada nas análises de vários compostos de líquens (CORNEJO *et al.* 2016; MUSHARRAF *et al.* 2017; OLIVER-JIMENEZ *et al.* 2019; REDDY *et al.* 2019; NOROUZI *et al.* 2020).

A ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C tem sido aplicada não só na elucidação estrutural de substâncias produzidas pelos líquens como também na análise na composição de extratos (HONDA *et al.* 2016a, 2016b; RAVAGLIA *et al.* 2014).

Todos esses métodos descritos acima são importantes ferramentas que auxiliam na análise da composição química de extratos e são de grande valia na área da taxonomia de líquens. Um exemplo são os líquens do gênero *Stereocaulon*, que pertencem à classe Ascomycetes, subclasse Ascomycetidae, ordem Lecanorales, e família Stereocaulaceae (LAMB, 1977), são amplamente distribuídos pelo mundo, sendo encontrados em diferentes latitudes geográficas e apesar de sua ampla distribuição geográfica o estudo desse gênero é ainda limitado e representa um desafio para liquenólogos, pois é considerado um gênero de difícil trabalho taxonômico devido à grande variabilidade de características morfológicas (RIDDLE, 1910; LAMB, 1951, 1977; RINCÓN-ESPITIA & MATEUS, 2013; PARK *et al.* 2018).

Os primeiros trabalhos de taxonomia do gênero *Stereocaulon* foram relatados a partir de 1910 com líquens da América do Norte (RIDDLE, 1910; LAMB, 1951). Este gênero apresenta cerca de 130 espécies relatadas e muitas delas não foram amplamente estudadas quanto à sua composição química.

Cerca de 75 compostos já foram relatados no gênero *Stereocaulon*. O depsídeo atranorina é comum praticamente em todas as espécies e as depsídonas ácidos lobárico e estítico estão entre os compostos mais presentes nas espécies deste gênero. Outros depsídeos, como os ácidos lecanórico, miriquídico, perlatólico,

anziáico, e também outras depsidonas, como por exemplo os ácidos peristítico, menegaziáico, criptoestítico, constítico, vesuviânico e norstítico, também são relatados no gênero. Já os compostos da classe dos éteres difenílicos (por exemplo, lobarina e metil sakisakaulon), dibenzofuranos (por exemplo, estrepsilina e ácido porfirílico) e ácido graxos alifáticos (por exemplo, ácidos bourgeânico e rangifórmico) também são reportadas nas espécies de *Stereocaulon*, porém são menos frequentes (LAMB, 1977; BOEKHOUT, 1982; YOUN *et al.* 2018).

Assim, visando auxiliar na identificação taxonômica de espécies do gênero *Stereocaulon*, realizamos neste trabalho o estudo químico de 151 espécimes coletados na Antártica, Argentina, Chile e no Brasil.

Atividade Biológica

Os líquens produzem muitos compostos que tem sido estudados quanto às suas atividades biológicas como, por exemplo, as atividades antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, inseticida, herbicida, entre outras (MOLNÁR & FARKAS, 2010; HUNECK, 1999; MÜLLER, 2001; BOUSTIE & GRUBE, 2005; MALHOTRA *et al.* 2007; SHUKLA & JOSHI, 2010; ZAMBARE & CHRISTOPHER, 2012; RANKOVIĆ & KOSANIĆ, 2015; BHATTACHARYYA *et al.* 2016; ELKHATEEB *et al.* 2021; THAKUR & CHANDER, 2021).

Algumas espécies de líquens do gênero *Stereocaulon* têm sido avaliadas quanto à atividade biológica. *S. alpinum* é uma das espécies mais estudadas desse gênero e a atranorina e o ácido lobárico são os compostos presentes nessa espécie. Compostos tais como, lobarina, sakisacaulon A, lobastina e outros, são também relatados, porém, ocorrem em menor proporção. O ácido lobárico e a lobastina são os compostos mais estudados do gênero *Stereocaulon* quanto às suas atividades biológicas (SMITH & ØVSTEDAL, 1991; SEO *et al.* 2008a, 2008b; OSET, 2014).

O ácido lobárico apresenta várias atividades biológicas, tais como as atividades anticancerígena, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (INGOLFSDOTTIR *et al.* 1996; ÖGMUNDSDÓTTIR *et al.* 1998; BUCAR *et al.* 2004; HARALDSDÓTTIR *et al.* 2004; KOKUBUN *et al.* 2007; SEO *et al.* 2009; MORITA *et al.* 2009; BRISDELLI *et al.* 2012; BHATTARAI *et al.* 2013; JOO *et al.* 2016; HONG *et al.* 2018; CARPENTIER *et al.* 2018). Ögmundsdóttir *et al.* (1998) verificaram que o ácido lobárico inibiu o crescimento celular em 50% em doses de 14,5 µg/mL à 44,7

µg/mL sobre três linhagens de células malignas (carcinomas de mama T-47D e ZR-75-1 e eritroleucemia K-562) sem afetar a proliferação de células normais de fibroblastos de pele em doses de até 30 µg/mL. Haraldsdóttir *et al.* (2004) avaliaram o efeito antiproliferativo do ácido lobárico sobre doze diferentes células de câncer humano: Capan-1, Capan-2 e PANC-1 (pâncreas), T-47-D (mama), PC-3 (próstata), NCI-H1417 (pulmão), NIH:OVCAR-3 (ovário), AGS (estômago), WiDr (colorretal), HL-60, K-562 e JURKAT (leucemia promielocítica aguda, eritroleucemia e leucemia de células T). Os valores de CE₅₀ (concentração efetiva para inibir 50% do crescimento celular) variaram entre 15,2 ± 3,5 µg/mL e 63,9 ± 2,2 µg/mL. O ácido lobárico e a lobastina inibiram significativamente a proliferação de linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de colo de útero (HeLa) e carcinoma de cólon (HCT116), com CI₅₀ (concentração inibitória para inibir 50% do crescimento celular) de 78,0 ± 7,1 µM e 93,2 ± 0,2 µM, respectivamente (BRISDELLI *et al.* 2012; HONG *et al.* 2018).

A lobastina também apresentou efeito tóxico seletivo às células tumorais cerebrais de glioblastoma (TG98G), resistentes a tratamentos de radioterapia e quimioterapia, na concentração de 40 µM e sem efeito sobre células normais de fibroblasto humano (KIM *et al.* 2013).

O ácido lobárico e a lobastina mostraram também ação inibidora diante de algumas moléculas biológicas que são alvos terapêuticos no tratamento de certas doenças desencadeadas por processos inflamatórios, incluindo a 5-lipoxigenase e a 12-lipoxigenase. Essas enzimas participam da formação de mediadores inflamatórios a partir do ácido araquidônico (WISASTRA *et al.* 2014). O ácido lobárico provou ser um potente inibidor, *in vitro*, da 12-lipoxigenase de plaquetas humanas, com CI₅₀ de 28,5 µM. Essas substâncias promoveram, *in vitro*, a supressão significativa da expressão da VCAM-1 em células vasculares lisas, estimuladas pela TNF-α, via sinalização da NF-κB e MAPK. O aumento da expressão dessa enzima está associado ao desenvolvimento da arterosclerose, doença inflamatória crônica desenvolvida nas grandes artérias. O ácido lobárico também inibiu a produção de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo, mediado pela supressão das vias de sinalização MAPKs e NF-κB. Essas vias controlam diversos processos celulares e estão envolvidas na indução da inflamação (KNON *et al.* 2016; LEE *et al.* 2016; CARPENTIER *et al.* 2018; LEE *et al.* 2018; INGOLFSDOTTIR *et al.* 1996; BUCAR *et al.* 2004; HARALDSDÓTTIR *et al.* 2004; MORITA *et al.* 2009).

O ácido lobárico é antagonista do receptor ativado por protease (PAR2), enzima que está intimamente relacionada à inflamação na dermatite atópica. Antagonistas do PAR2 podem interromper sintomas relacionados à dermatite atópica, doença inflamatória crônica da pele (JOO *et al.* 2016). Esse ácido e os éteres difenílicos sakisacaulon A e metil lobarina apresentam atividade inibitória da proteína tirosina fosfatase 1B (PTB-1B), que possui papel crítico na regulação da via de sinalização da insulina. O ácido lobárico foi o componente mais ativo dentre os compostos avaliados (CI_{50} de 0,87 μM) e mais ativo que o ácido ursólico utilizado como controle positivo (CI_{50} de 3,08 μM). A inibição ou a redução da expressão da PTB-1B melhora a sensibilidade à insulina e tem demonstrado ser uma estratégia eficaz para o tratamento de diabetes tipo 2 e de obesidade (SEO *et al.* 2009).

O ácido lobárico e a lobastina também possuem atividade antibacteriana, sendo ativos frente à bactéria *Staphylococcus aureus* com concentração mínima inibitória (CMI) de 88 μM e 44 μM , respectivamente (BHATTARAI *et al.* 2013). Este ácido também apresentou atividade contra diferentes linhagens bacterianas de *S. aureus*, que por sua vez são resistentes à meticilina e outras drogas antibacterianas, com valores de CMI entre 17,5 μM e 140 μM (KOKUBUN *et al.* 2007).

A lobastina mostrou moderada atividade antioxidante na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) em comparação com o padrão comercial sintético hidroxianisol de butila (BHA), (BHATTARAI *et al.* 2013).

O ácido estítico isolado da espécie *S. graminosum* apresentou moderada atividade citotóxica diante de células humanas do tipo adenocarcinoma de mama (MCF-3) e carcinoma escamosa oral (HSC-3), com CI_{50} de 95,78 μM e 39,50 μM , respectivamente (HUSNUNNISA *et al.* 2019). Esse ácido também inibiu o crescimento de células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) (CI_{50} de 75,88 μM) e apresentou baixa inibição do crescimento de células normais de fibroblasto de pulmão fetal (MRC-5) (CI_{50} de 6.420,73 μM), sendo, portanto 84,6 vezes mais seletivo para as células HT-29 (PEJIN *et al.* 2017).

O ácido porfirílico, isolado de *S. strictum*, apresentou toxicidade com $CI_{50} < 218$ μM para as linhagens celulares humanas de adenocarcinoma do colo do útero (HeLa), eritroleucemia (K562) e queratinócitos (HaCaT); e $CI_{50} < 223$ μM para células carcinoma de mama humana (MCF-7) (PERICO-FRANCO *et al.* 2015).

A avaliação da atividade antibiótica e antioxidante de extratos de líquens do gênero *Stereocaulon* também tem sido relatada, entretanto, a maioria não indica as

substâncias responsáveis pela atividade. As informações obtidas da atividade de extratos podem auxiliar na seleção de novas substâncias com propriedades terapêuticas, que podem servir de protótipos para produção de medicamentos em processos de síntese em laboratório ou biotecnológicos.

Pensando nisso, o presente trabalho selecionou alguns extratos acetônicos de *Stereocaulon* para a análise das atividades antioxidante e antibacteriana.

2 OBJETIVOS GERAIS

Estudar o perfil químico dos extratos obtidos dos líquens do gênero *Stereocaulon* para identificação das espécies e realizar avaliação da atividade antibiótica e antioxidante desses extratos visando a busca de compostos bioativos.

2.1 Objetivos específicos

- Identificar as substâncias presentes nos extratos acetônicos de líquens do gênero *Stereocaulon* utilizando as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), microcristalização, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM);

- Fornecer os dados da composição química para o Prof. Dr. Adriano Spielmann para a identificação taxonômica das espécies;

- Realizar os ensaios de atividade antibiótica dos extratos acetônicos selecionados de *Stereocaulon* frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (cepa clínica), *Enterococcus faecium* (cepa clínica) e *Escherichia coli* utilizando a técnica de microdiluição em caldo e bioautografia;

- Avaliar os extratos acetônicos de *Stereocaulon* quanto a capacidade de reduzir o radical DPPH pela técnica de bioautografia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As pesagens foram realizadas em balança analítica da marca BIOPRECISA, modelo FA-2104N com precisão $\pm 0,0001\text{g}$.

Os solventes utilizados foram de grau P.A. (Dinâmica, Merck, Quimex, Synth e Vetec), previamente destilados e secos.

Para as análises cromatográficas foram utilizadas cromatofolhas de alumínio recobertas com sílica gel da marca MACHEREY-NAGEL G/UV₂₅₄.

Para visualização das formas cristalinas nos processos de microcristalização foi utilizado microscópio binocular da marca Nikon Eclipse modelo E200.

Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 300 MHz da marca BRUKER de 7,05 Tesla, modelo DPX300 (300,13 MHz para a frequência do hidrogênio e 75,48 MHz para ¹³C) no INQUI/UFMS.

As análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM) foram realizadas no equipamento com as seguintes especificações: UFCL LC-20AD Shimadzu Prominence acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução com fonte ionizadora eletrospray (MicrOTOF-Q III- Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). O UV/VIS foi monitorado entre 240-800 nm e utilizada a coluna Kinetex C18 (2,6 μ , 100 A, 150X 2,1 mm, Phenomenex) e foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais (Lapnem) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da UFMS.

3.2 Líquens

Espécimes do gênero *Stereocaulon* (151 exsiccatas) foram fornecidas pelo Prof. Dr. Adriano A. Spielmann (Instituto de Biociência da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – INBIO / UFMS) e foram coletadas em regiões do Brasil, Antártica, Chile e Argentina. A identificação das espécies foi realizada pelo Prof. Dr. Adriano A. Spielmann e M.Sc. Jean Marc Torres Pineda.

3.3 Preparação dos extratos

De cada exsicata foram retirados pequenos fragmentos de talos do líquen que foram limpos utilizando uma pequena escova e, quando necessário, foi utilizado água

destilada para auxiliar na remoção dos resíduos aderidos aos talos. Os talos foram secos à temperatura ambiente em capela de exaustão por aproximadamente 3 dias.

Para a análise química preliminar, cerca de 50-100 mg de talo limpo de cada espécime foi colocado em frasco de vidro, fragmentado com auxílio de tesoura e bastão de vidro e a seguir tratado com acetona destilada e seca. A extração com acetona (3-10 mL) foi repetida quatro vezes, sob repouso, e o tempo de extração em cada etapa foi de aproximadamente 30 minutos. Os extratos foram reunidos e após evaporação do solvente foram armazenados em dessecador.

3.4 Cromatografia

Para a análise cromatográfica os extratos foram solubilizados em acetona e aplicados em placas de sílica gel. Após avaliação preliminar de vários eluentes, foram selecionadas as seguintes misturas: tolueno: acetato de etila: ácido acético (6:4:1 v/v/v); tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (139:83:8 v/v/v); tolueno: dioxano: ácido acético (90:25:4 v/v/v); tolueno: dioxano: ácido acético (180:45:5 v/v/v); tolueno: ácido acético (85:15 v/v); tolueno: ácido acético (100:15 v/v); éter etílico: ácido acético (100:1 v/v); *n*-hexano: éter etílico: ácido fórmico (5:4:1 v/v/v).

A visualização das manchas nos cromatogramas foi realizada sob a luz UV 254 nm, solução de ácido sulfúrico a 10% em metanol e aquecimento, posteriormente com solução de *p*-anisaldeído/ácido sulfúrico e reaquecimento. A nebulização com água foi utilizada para revelação de ácidos graxos. A migração cromatográfica dos constituintes presentes nos extratos foi comparada com dados da literatura (HUNECK & YOSHIMURA, 1996; ELIX, 2014), com o comportamento cromatográfico de substâncias puras e daqueles presentes em extratos de composição conhecida. Os valores de R_f foram multiplicados por 100 para comparação com os valores citados na literatura.

Foram utilizadas para comparação cromatográfica as substâncias de referência: os ácidos úsnico, norstítico, lobárico, estítico, perlatólico e atranorina. A atranorina e o ácido úsnico são substâncias corticais comumente encontradas em várias espécies de líquens. O ácido norstítico e a atranorina foram utilizados por CULBERSON & KRISTINSSON (1970) como substâncias de referência para comparação da migração cromatográfica de outras substâncias. O ácido lobárico é uma substância encontrada em várias espécies do gênero *Stereocaulon*, assim como o ácido estítico e o ácido perlatólico.

3.5 Microcristalização

Os extratos solubilizados em acetona foram aplicados sobre lâminas para microscópio, com auxílio de um capilar, e tratados, separadamente, com as soluções GE 1:3 - Glicerol: ácido acético (1:3 v/v), GE 3:1 - Glicerol: ácido acético (3:1 v/v), GAW - Glicerol: etanol: água (1:1:1 v/v/v) e GAoT - Glicerol: etanol: o-toluidina (2:2:1 v/v/v). Após a adição das soluções, cada mistura foi coberta com lamínula e, foram brandamente aquecidas sobre chama de lamparina à álcool, com exceção das lâminas com GAoT (HUNECK & YOSHIMURA, 1996).

As lâminas foram observadas em microscópio logo após o preparo e em intervalos de tempos até um máximo de 7 dias. As estruturas cristalinas das substâncias presentes nos extratos foram comparadas com fotos da literatura (HUNECK & YOSHIMURA, 1996) ou com aquelas produzidas pela cristalização das substâncias puras ou de extratos de composição conhecida.

3.6 Obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C

Os extratos analisados por RMN ^1H e ^{13}C foram solubilizados em dimetil-sulfóxido deuterado e sinais deste solvente foram utilizados para calibração dos espectros. Os espectros de RMN de ^1H (SFO1=300,13 MHz) foram obtidos utilizando-se a sequência de pulso zg, largura espectral (SWH) média de 21 ppm, tempo de aquisição (AQ) 5,19s, número de pontos na aquisição (TD) 64K, tempo de espera entre cada aquisição (d1) 1,2s, sendo acumulados (ns) 8 FIDs. Eles foram processados com zero-filling (SI=TD) e com multiplicação exponencial (LB= 0,3 Hz). Os espectros de RMN de ^{13}C (SFO1= 75,48 MHz) foram obtidos utilizando-se a sequência de pulso zgpg30. Foi utilizada uma largura espectral (SWH) média de 250 ppm, tempo de aquisição (AQ) e número de FIDs acumulados (ns) variável, tempo de espera entre cada aquisição (d1) 0,15s e foram processados sem zero-filling (SI<TD) e com multiplicação exponencial (LB=1 Hz). Os espectros foram processados com o software TopSpin 4.0.1.

3.7 Obtenção dos espectros de massas

Os extratos acetônicos selecionados foram avaliados quanto à sua composição química por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas.

Os dados dos espectros de massas foram obtidos por CLAE-DAD-EM/EM ionizados no modo negativo, utilizando o equipamento com as seguintes especificações: UFCL LC-20AD Shimadzu Prominence acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução com fonte ionizadora eletrospray (MicrOTOF-Q III- Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). O UV/VIS foi monitorado entre 240-800 nm. Foi utilizada coluna Kinetex C18 (2,6 μ , 100 Å, 150X 2.1 mm, Phenomenex).

As amostras foram solubilizadas em acetonitrila e duas gotas de água destilada, preparadas na concentração 300 μ g/mL, filtradas em filtros PTFE (Millex 0,22 mm x 13 mm, Millipore) e 1 μ L foi injetado no sistema cromatográfico sob temperatura de 50° C e fluxo de 0,3 mL/minuto. A fase móvel utilizada foi acetonitrila (B) e água (A) ambos acrescidos com ácido fórmico 0,1 % (v/v). A eluição foi realizada em modo gradiente nas seguintes concentrações: 0 a 8 minutos 3% de B, 8 a 30 minutos 3 a 25% de B, 30 a 60 minutos 25 a 80% de B, 60 a 63 minutos 80% de B, 64 a 68 minutos 3 a 80% de B.

O nitrogênio foi usado como gás nebulizador (4 bar) e gás de secagem (9 L/min), aplicando a voltagem capilar de 2500 kV. Para identificação dos compostos foram utilizadas massas moleculares (FM) e os fragmentos obtidos foram comparados com os dados da literatura. Todos os cromatogramas das amostras foram ajustados na mesma intensidade. Foram identificadas as substâncias compatíveis aquelas do metabolismo secundário de líquens.

3.8 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bioautografia

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos foi realizada através da determinação da CMI pelo método de microdiluição em caldo e bioautografia. Placas de 96 poços foram preparadas colocando-se 100 μ L de caldo Mueller- Hinton em cada poço. Cada extrato acetônico seco (**grupos I** – CGMS 80218, **II** – CGMS 80157, **III** – CGMS 61847 e **IV** – CGMS 61198) foi ressuspendido em DMSO na concentração de 2 mg/mL. 100 μ L dessa solução foi adicionada ao primeiro poço e adicionado 100 μ L de DMSO. Então, 100 μ L deste poço foi transferido para o segundo e sucessivas diluições 1:1, atingindo concentrações nos poços no intervalo entre 7,8 μ g/mL até

1000 µg/mL, com volume final de 100 µL em cada poço. Para gentamicina a concentração final nos poços variou entre 60 µg/mL e 0,5 µg/mL. O inóculo bacteriano se constituiu de uma cultura de 24 horas de cada espécie bacteriana [*Staphylococcus aureus* (NEWP0023 e cepa clínica, resistente a macrolídeos e penicilina G), *Enterococcus faecium* (cepa clínica resistente à vancomicina, teicoplanina, quinolonas, penicilinas e macrolídeos) e *Escherichia coli* (NEWP0022)] em ágar Mueller-Hinton diluída em solução salina estéril (0,45%) a uma concentração de 10⁸ UFC/mL. Esta solução foi diluída 1/10 em solução salina estéril e 5 µL foram adicionados em cada poço. Todos os testes foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas a 36°C por 18 horas. Após este período, 20 µL de uma solução aquosa (0,5 %) de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas novamente a 36°C por 2 horas. Nos poços onde o crescimento bacteriano ocorreu, houve uma mudança de coloração, de incolor para vermelho. A CMI foi definida como a menor concentração de cada extrato onde não ocorreu mudança de coloração da solução.

Para bioautografia, foram preparadas soluções de cada extrato acetônico de *Stereocaulon* (**grupos I** – CGMS 80218, **II** – CGMS 80157, **III** – CGMS 61847 e **IV** – CGMS 61198) em acetona na concentração de 2 mg/mL e aplicados 50 µL (100 µg) em placas de CCD. As CCDs dos extratos dos **grupos I, II e IV** foram eluídas em tolueno: ácido acético (85:15 v/v) e do grupo **III** foi eluída em tolueno: dioxano: ácido acético (90:25:4 v/v/v). Após a eluição, as placas foram secas em capela e em seguida colocadas em placas de Petri contendo ágar Mueller–Hinton e recobertas com cerca de 2mm de ágar líquido. Após solidificação do meio, os inóculos (10⁸ UFC/mL) foram espalhados e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Uma solução aquosa (0,5%) de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) foi pulverizada sobre as placas contendo *S. aureus* e a ausência de mudança de cor indica manchas contendo substâncias ativas. Para a identificação das substâncias foram preparados cromatogramas (CCDs) dos mesmos extratos (**grupos I** – CGMS 61885, **II** – CGMS 61833, **III** – CGMS 12543 e **IV** – CGMS 61201) sob as mesmas condições acima e reveladas com luz ultravioleta em 250 nm (UV₂₅₀), metanol/H₂SO₄ aquecimento, *p*-anissaldeído/H₂SO₄ aquecimento ou água.

3.9 Atividade antioxidante – bioautografia

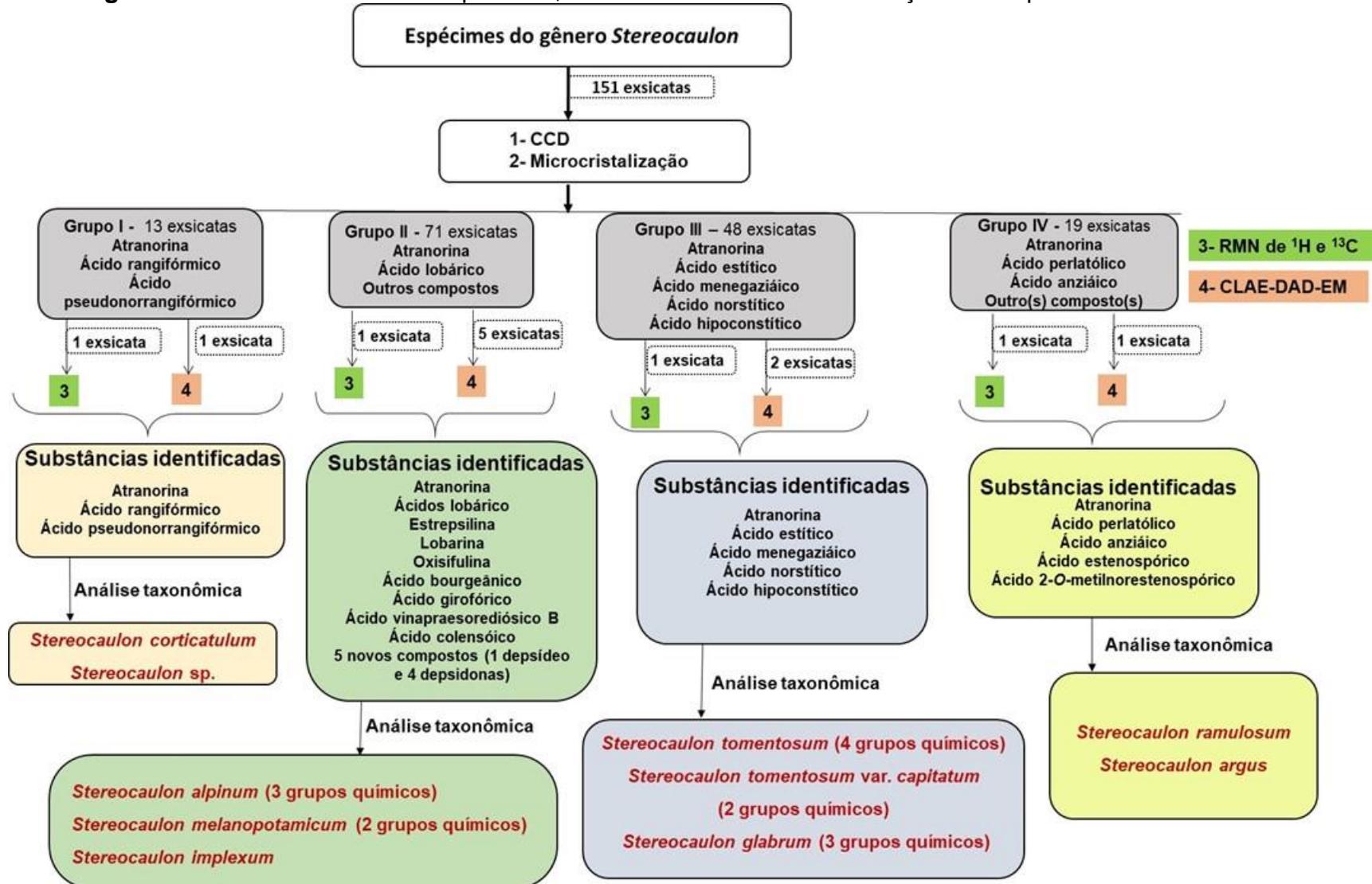
Os extratos acetônicos de *Stereocaulon* (**grupos I** – CGMS 61965, **II** – CGMS 80162, **III** – CGMS 61871 e **IV** – CGMS 61196) foram aplicados em placas de sílica gel e eluídos em tolueno: ácido acético 85:15 v/v (**grupos I, II, IV**) e em tolueno: dioxano: ácido acético 90:25:4 v/v (**grupo III**). Após a eluição, as placas foram secas em capela e então nebulizadas com solução do radical livre DPPH à 0,5 mg/mL em metanol. As placas foram examinadas 30 minutos após a aplicação do revelador, sendo que os compostos ativos apareceram como manchas amarelo-claro sobre o fundo púrpura. Para cada extrato foi preparada uma placa sob as mesmas condições mencionadas acima e revelada com luz UV 254nm, nebulização com solução de ácido sulfúrico a 10% em metanol e aquecimento e/ou posteriormente com solução de *p*-anisaldeído/ ácido sulfúrico e reaquecimento. O extrato do **grupo I** foi também revelado com água para identificação das manchas correspondentes aos ácidos graxos presentes. A identificação das substâncias com atividade sequestradora de radical livre DPPH foi realizada mediante comparação dos perfis cromatográficos visualizados com DPPH, metanol/ácido sulfúrico, *p*-anisaldeído/ ácido sulfúrico e/ou água.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espécimes foram previamente avaliados quanto à morfologia pelo Prof. Adriano A. Spielmann e enquadrados no gênero *Stereocaulon*. Para a identificação a nível de espécie, além das características morfológicas é necessário dispor de dados da composição química de cada espécime. Para isso, foram preparados os extratos acetônicos de fragmentos retirados de cada exsicata os quais foram analisados preliminarmente por cromatografia em camada delgada (CCD) e microcristalização. Dos resultados dessas análises, os 151 extratos foram agrupados de acordo com a composição química observada, como segue: **grupo I** (13 exsicatas) contendo atranorina e ácidos graxos; **grupo II** (71 exsicatas) com atranorina, ácido lobárico e outros compostos; **grupo III** (48 exsicatas) com atranorina, ácido estético e outros compostos e **grupo IV** (19 exsicatas) com atranorina, ácido perlatólico e outros compostos.

Visando obter mais informações sobre a composição química, além daquelas obtidas da análise por CCD e Microcristalização, foram selecionados extratos representativos de cada grupo químico e analisados por RMN de ^1H e ^{13}C e CLAE-DAD-EM. A **Figura 5** resume os procedimentos de análise química realizados e os resultados obtidos junto com a análise morfológica (análise taxonômica) que conduziram a identificação das espécies. A identificação foi conduzida pelo Prof. Dr. Adriano A. Spielmann e pelo Msc. Jean Marc Torres.

Figura 5 - Resumo das análises químicas, resultados obtidos e identificação das espécies de *Stereocaulon*.



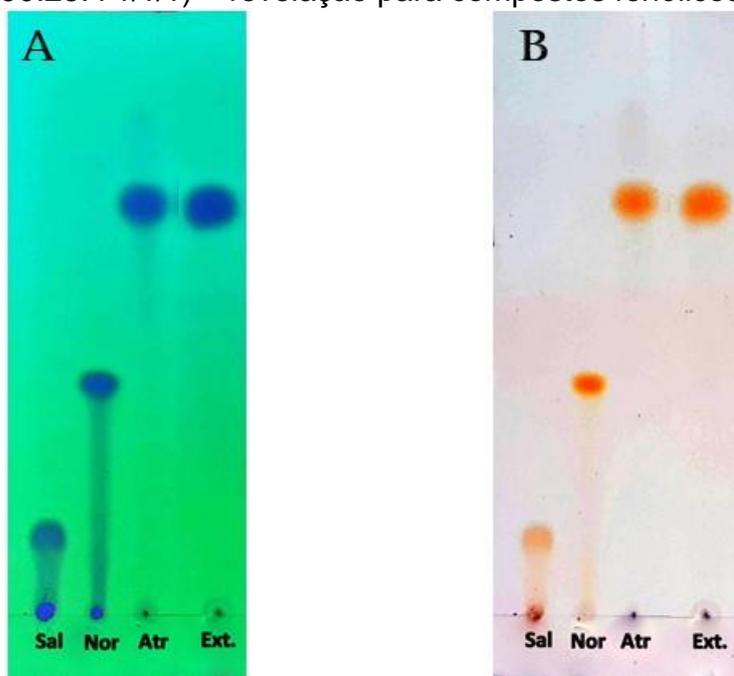
Fonte: própria autora

Será apresentado a seguir o detalhamento da análise da composição química de cada grupo de amostras.

4.1 - Grupo I - Atranorina e Ácidos rangifórmico e pseudonorrangifórmico

O **grupo I** é composto de treze exsiccatas. Todas elas apresentaram o mesmo perfil cromatográfico. As cromatografias em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo desse grupo (I) estão representadas nas **Figuras 6, 7 e 8**.

Figura 6 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo I de *Stereocaulon* no eluente tolueno: dioxano: ácido acético (90:25:4 v/v/v) – revelação para compostos fenólicos.



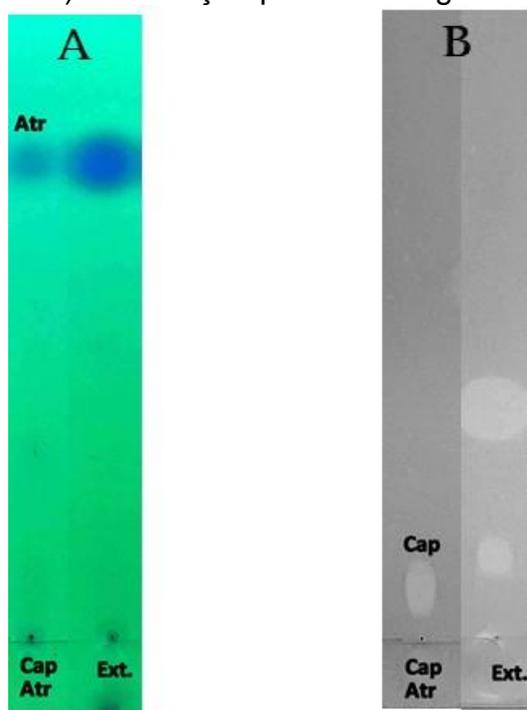
Fonte: própria autora.

Visualização das manchas na luz Ultravioleta em 254 nm (A); revelação com ácido sulfúrico 10% em metanol e aquecimento até o completo aparecimento das manchas (B); Sal: Ácido salazínico; Nor: Ácido norstítico; Atr: Atranorina; Ext.: Extrato.

A revelação cromatográfica com luz UV₂₅₄ (**Figura 6A**) e metanol / ácido sulfúrico (**Figura 6B**) indicou apenas uma mancha com R_f e cor semelhante à atranorina aplicada no cromatograma como substância de referência.

Um extrato representativo do **grupo I** foi novamente cromatografado e revelado com água (**Figura 7**). Atranorina é observada na revelação UV₂₅₄ e na revelação com água aparecem duas manchas com valores de R_f 12 e 34, respectivamente.

Figura 7 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo I de *Stereocaulon* no eluente tolueno: dioxano: ácido acético (90:25:4 v/v/v) – revelação para ácidos graxos.

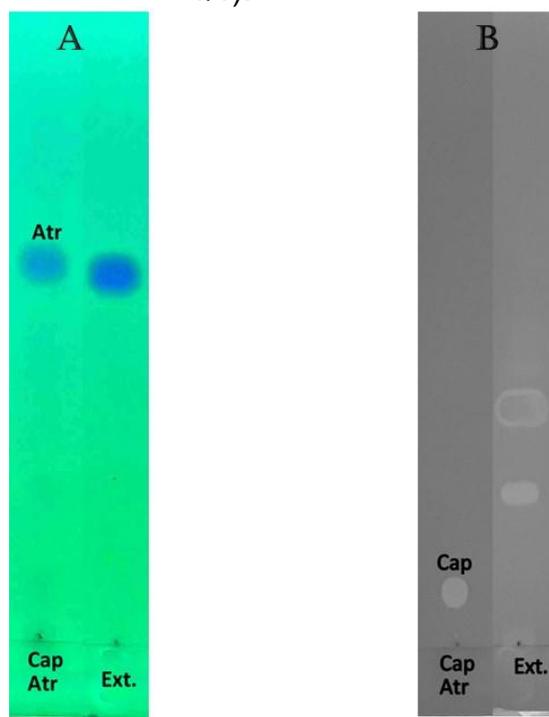


Fonte: própria autora.

Visualização das manchas na luz Ultravioleta em 254 nm (A); revelação com água à temperatura ambiente (B). Cap, Atr: Ácido caperático e Atranorina; Ext.: Extrato.

A substância de Rf menor (Rf 12) tem migração muito próxima daquela do ácido caperático usado como substância de referência. Para melhor conclusão sobre a identidade dessa substância, os extratos foram recromatografados no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v). A CCD do extrato representativo desse grupo é apresentada na **Figura 8**.

Figura 8 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo I de *Stereocaulon* no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v).



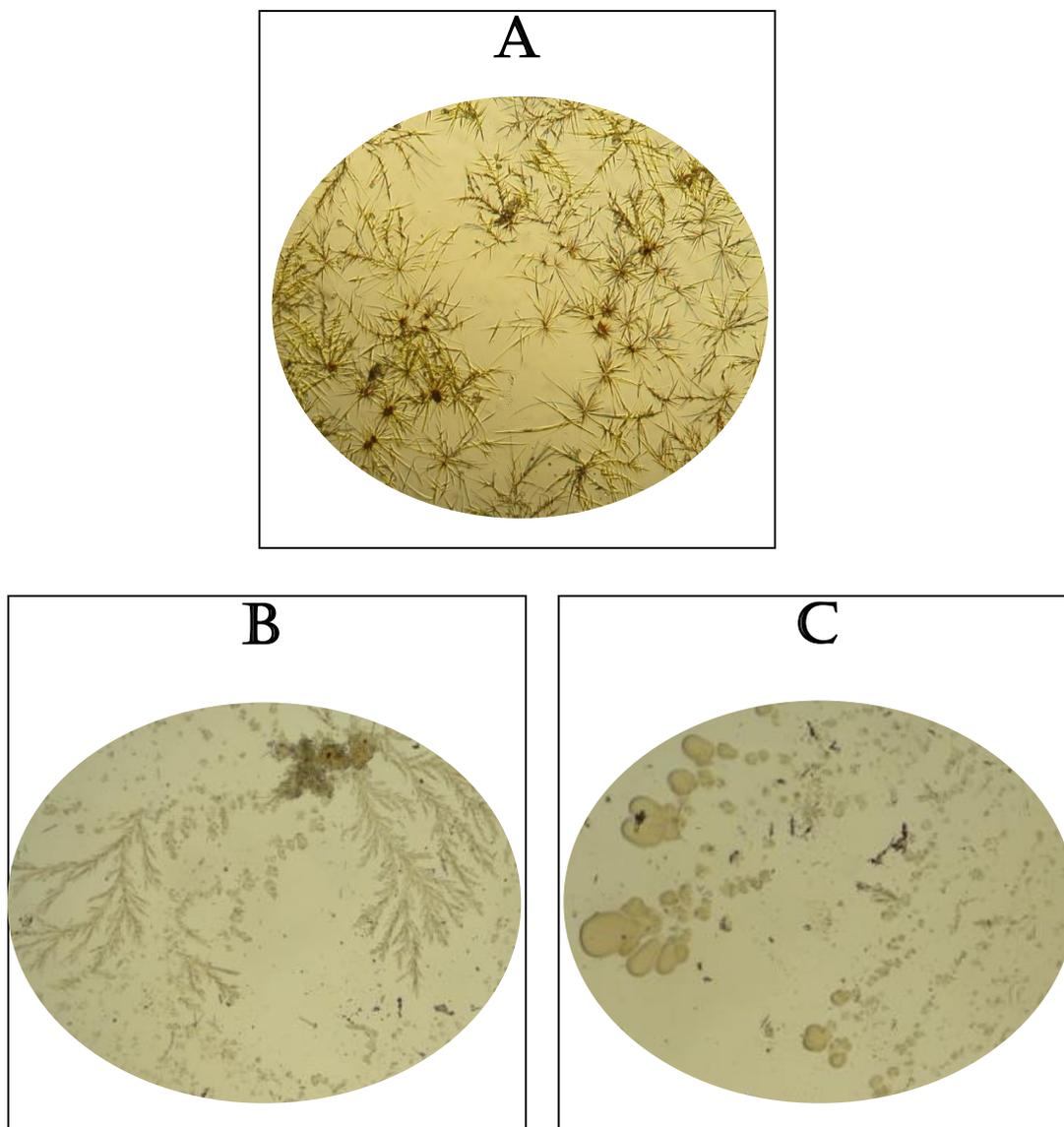
Fonte: própria autora.

Visualização das manchas na luz Ultravioleta em 254 nm (A); revelação com água à temperatura ambiente (B). Cap, Atr: Ácido caperático e Atranorina; Ext. Extrato.

A análise do cromatograma (**Figura 8B**) indica que a substância de menor valor de Rf, presente na mistura, não apresenta comportamento cromatográfico semelhante ao ácido caperático usado como referência.

A análise cromatográfica dos extratos acetônicos dos espécimes de *Stereocaulon* permitiu identificar o depsídeo atranorina e dois ácidos graxos, sendo que o ácido graxo de Rf maior está presente em maior proporção. A presença dessas substâncias foi investigada também pela técnica de microcristalização. A **Figura 9** mostra as fotos das formações, observadas ao microscópio, após tratamento com as soluções de cristalização.

Figura 9 - Fotos da microcristalização do extrato acetônico dos espécimes representativo do grupo I de *Stereocaulon* (aumento de 10x).



Fonte: própria autora.

Cristalização em GAOt (A). Formações observadas em GE 1:3 (B e C).

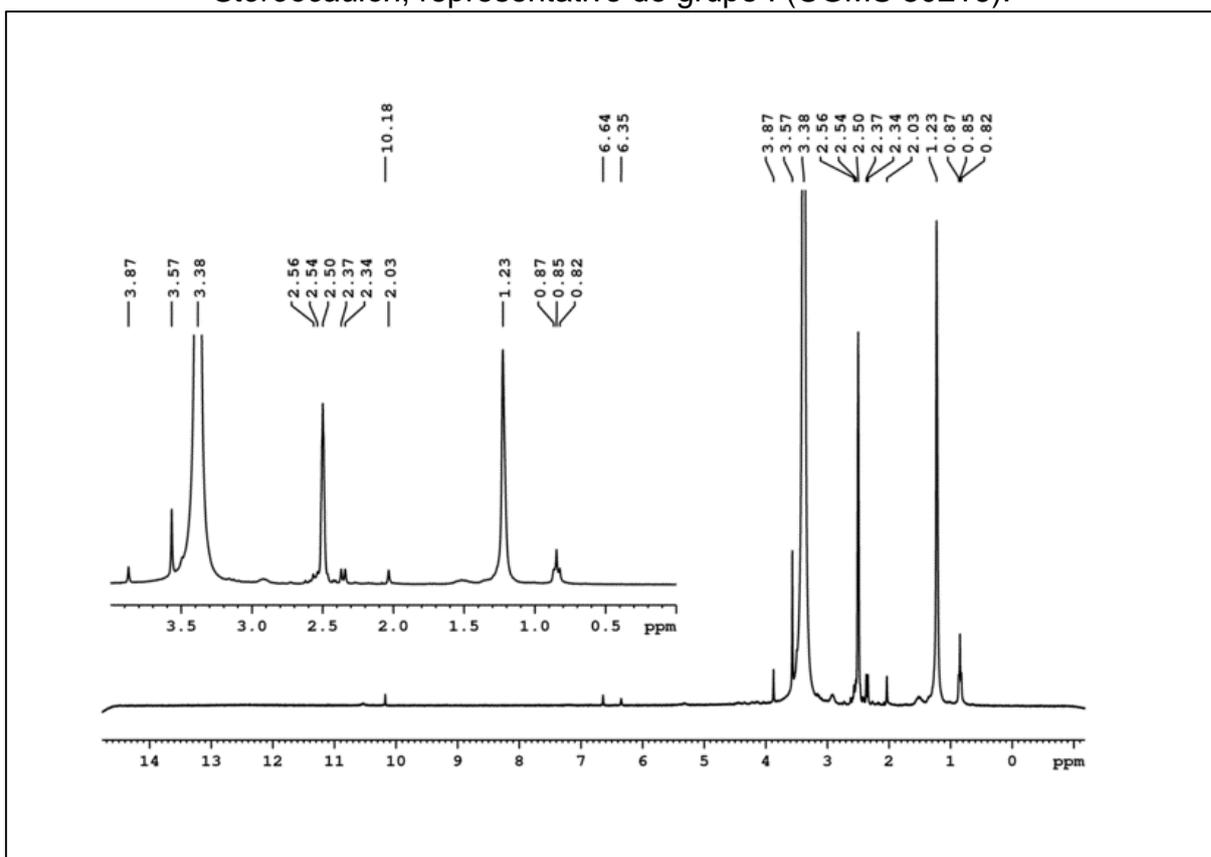
As estruturas cristalinas desenvolvidas pelo tratamento do extrato com solução GAOt (**Figura 9A**) são semelhantes àsquelas observadas da cristalização de atranorina e com fotos da literatura (HUNECK & YOSHIMURA, 1996).

As estruturas observadas em GE 1:3 comparadas com fotos da literatura (HUNECK & YOSHIMURA, 1996) sugerem a presença dos ácidos rangifórmico (**Figura 9B**) e pseudonorrangifórmico (**Figura 9C**) no extrato analisado.

O extrato acetônico representativo desse grupo I de líquens (CGMS 80216) foi também analisado através dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

No espectro de RMN de ^1H (**Figuras 10**), é possível observar um conjunto de dez sinais principais, permitindo definir alguns grupos, dentre eles: 10,18 ppm (singleto), característico de hidrogênio aldeídico ou fenólico (HUNECK & YOSHIMURA, 1996); 6,64 ppm e 6,35 ppm (singletos), de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos; 3,87 ppm e 3,75 ppm (singletos) de hidrogênios de grupo metoxila; 2,37 ppm, 2,34 ppm e 2,03 ppm (singletos) de prováveis metilas ligadas a anel aromático, 1,23 ppm (singleto intenso e largo) característico de hidrogênios metilênicos de cadeia alquílica longa e 0,85 ppm (triplete, $J= 6,95$ Hz), compatíveis a grupos metílicos de cadeia alquílica. Assim, é possível esperar que nesses extratos estejam presentes uma ou mais substâncias aromáticas e substâncias com cadeia alquílica longa.

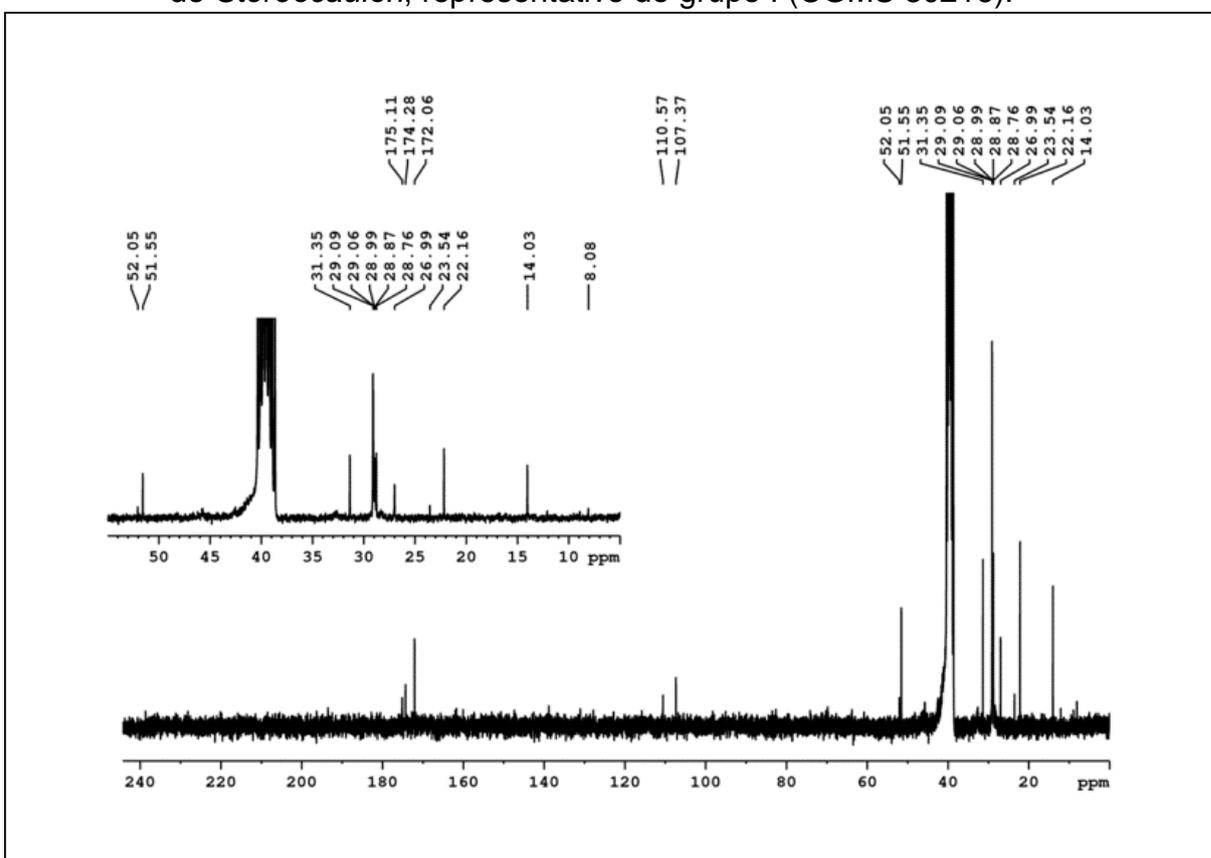
Figura 10 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo I (CGMS 80216).



Fonte: própria autora

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figuras 11**), destaca-se um conjunto de dezessete sinais, permitindo identificar alguns grupos: 175,1 ppm, 174,3 ppm e 172,1 ppm (mais intensa), de grupos carboxílicos e/ou carbonilas; em 110,6 ppm e 107,4 ppm, de possíveis carbonos metínicos aromáticos; em 52,1 ppm e 51,6 ppm, de carbonos típicos de metoxilas; em 31,4 ppm à 22,2 ppm, compatíveis a carbonos metilênicos e 14,0 ppm e 8,1 ppm de prováveis grupos metila.

Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo I (CGMS 80216).

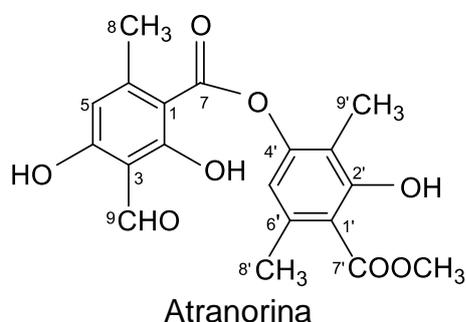


Fonte: própria autora

A atranorina, previamente identificada na microcristalização e na análise cromatográfica, foi confirmada também pela presença de sinais nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H (**Figura 10**) o singlete em 10,18 ppm refere-se ao hidrogênio aldeídico (H8), os dois singletos em 6,64 ppm e 6,35 ppm correspondem aos dois hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (H3 e H5'), os três

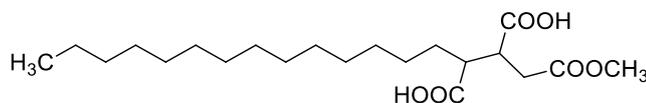
singletos 2,37 ppm, 2,34 ppm e 2,03 ppm das metilas (H8', H9 e H9') e o singlete em 3,87 ppm pode ser atribuído à metoxila do éster metílico (H10').

Nos espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 11**), não foi possível observar a grande maioria dos sinais dos carbonos da atranorina. Esse depsídeo está em baixa proporção no extrato e apresenta muitos carbonos sem hidrogênios, que geralmente geram sinais menos intensos. Entretanto, é possível observar dois sinais em 110,6 ppm e 107,4 ppm referentes aos dois carbonos aromáticos metínicos (C5 e C5'), além do éster metílico (C10') em 52,1 ppm, menor sinal dessa região, e os sinais em 23,5 ppm e 8,1 ppm referente as metilas ligadas ao anel aromático (C9, C9' e C8').



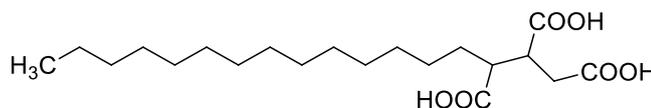
A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indica também a presença de compostos de cadeia longa com carboxilas e carbonila de éster metílico em suas estruturas. As carboxilas foram identificadas pelos sinais mais desblindados do espectro de RMN de ^{13}C : em 175,1 ppm, 174,3 ppm e a carbonila em 172,1 ppm com deslocamento químico que sugere carbonila de éster, juntamente com o sinal em 51,6 ppm, sinal que pode ser atribuído ao carbono CH_3 do grupo COOCH_3 , além dos sinais já mencionados (31,4 ppm a 22,2 ppm), compatíveis a carbonos metilênicos que sugerem a presença de ácidos graxos.

A análise cromatográfica e a microcristalização indicam a presença de dois ácidos graxos. Comparando com dados da literatura (ELIX, 2014), o ácido de R_f maior pode ser o ácido rangifórmico. O outro ácido de R_f menor por comparação das fotos das estruturas cristalinas em GE 1:3 com aquelas da literatura (HUNECK & YOSHIMURA, 1996) é compatível aquelas do ácido pseudonorrangifórmico. Este ácido não possui estrutura química descrita na literatura (HUNECK & YOSHIMURA, 1996), somente é indicada a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_6$, sendo, um isômero do ácido norrangifórmico.



Ácido rangifórmico (BENN *et al.* 1998)

Fórmula Molecular: $C_{21}H_{38}O_6$



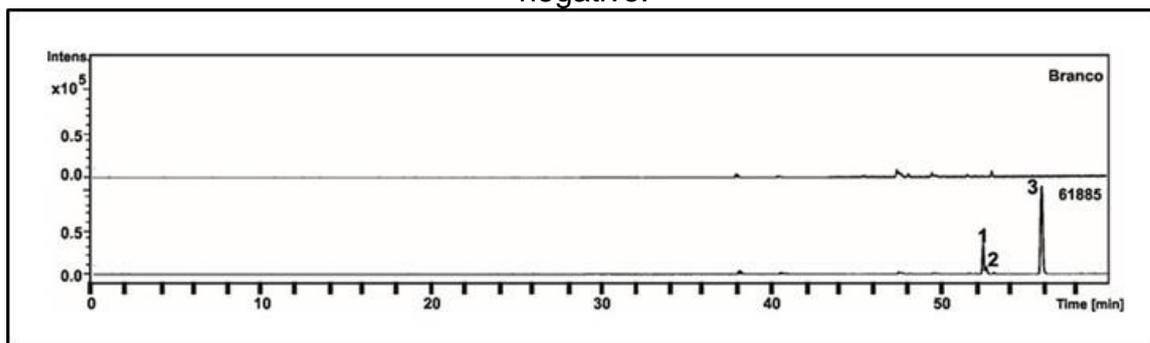
Ácido norrangifórmico

Fórmula Molecular: $C_{20}H_{36}O_6$

Esses dois ácidos apresentam estruturas químicas semelhantes, por isso muitos dos sinais sobrepõem-se nos espectros de RMN.

O extrato acetônico foi analisado também por CLAE-DAD-EM à qual fornece informações sobre o íon $[M-H]^-$ e fragmentos característicos que possibilitaram confirmar as estruturas das substâncias contidas nos extratos analisados.

Figura 12 -Cromatograma do pico base obtido por CLAE-DAD-EM do extrato acetônico de *Stereocaulon* representativo do grupo I (CGMS 61885), no modo negativo.



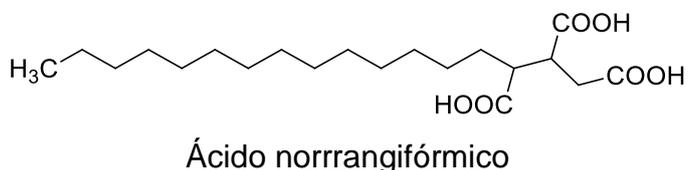
Fonte: própria autora.

1-3 representam substâncias do extrato acetônico analisado.

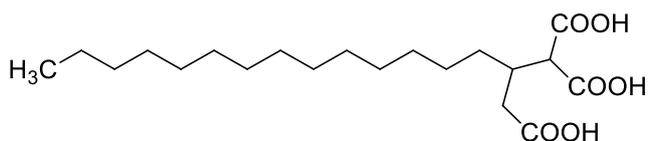
O cromatograma obtido (**Figura 12**) indica a presença de três substâncias detectadas no extrato acetônico, representadas pelos picos **1**, **2** e **3**.

A substância eluída no pico **1** apresentou íon molecular desprotonado ($[M-H]^-$) de m/z 371,2461 ($C_{20}H_{35}O_6$) e gerou fragmentos (EM/EM) de m/z 265,2547 e m/z

353,2346 (**tabela 1**). Os ácidos pseudonorrangifórmico e norrangifórmico são isômeros ($C_{20}H_{36}O_6$) e estão entre as possibilidades para identificação deste pico (**1**).



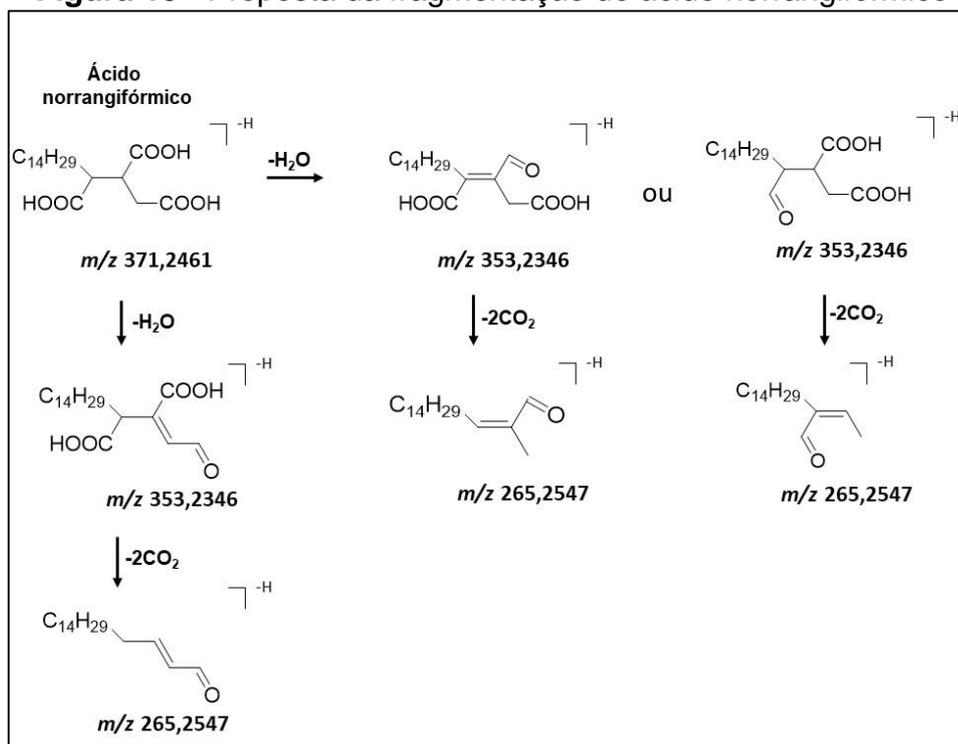
Analisando os fragmentos obtidos no espectro de massas e considerando que os ácidos norrangifórmico e pseudonorrangifórmico são isômeros, é provável que a diferença entre as estruturas seja com relação à posição dos grupos carboxilas. A estrutura proposta para o ácido pseudonorrangifórmico é representada abaixo:



Estrutura proposta para o ácido pseudonorrangifórmico

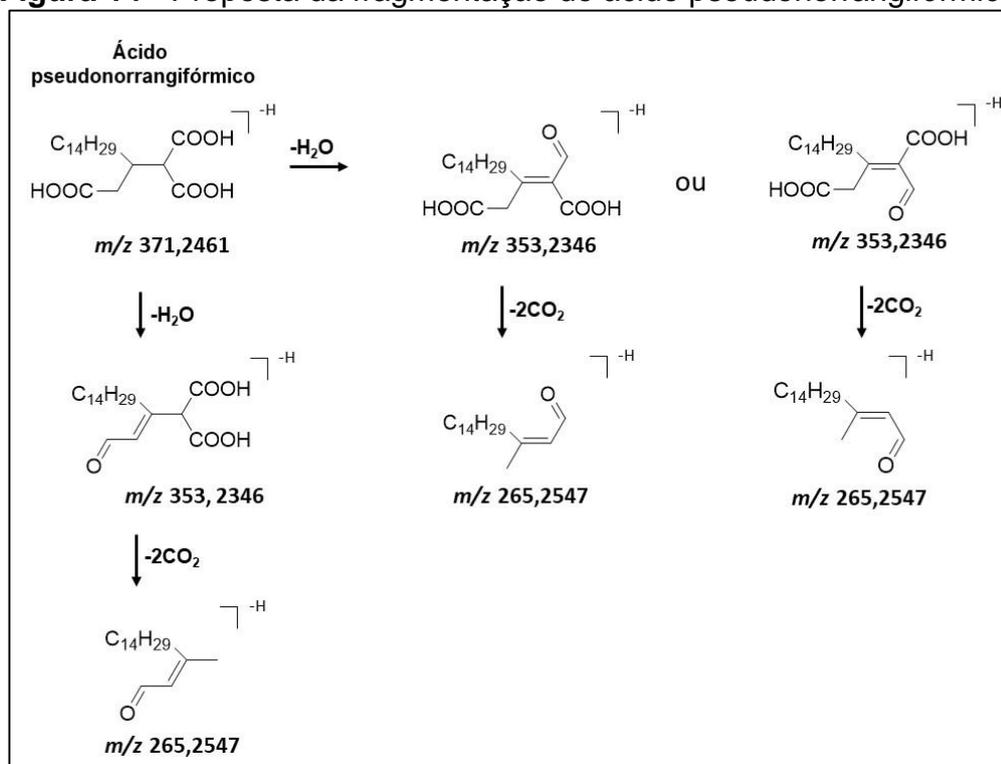
As **Figuras 13** e **14** indicam propostas de fragmentação dos ácidos norrangifórmico e pseudonorrangifórmico, respectivamente. Estes ácidos podem apresentar o mesmo padrão de fragmentação que envolve a perda de uma molécula de água e consecutiva perda de duas moléculas de CO_2 , gerando fragmentos de mesmos valores de m/z 353,2346 e m/z 265,2547, respectivamente, seguindo proposta semelhante àquela indicada por BRAKNI *et al* (2018). Assim, não é possível determinar através da análise desses fragmentos gerados qual ácido está presente neste extrato. Entretanto, as estruturas formadas na microcristalização dos extratos acetônicos de *Stereocaulon* do **grupo I**, apresentam semelhança com aquelas mostradas em fotos da microcristalização do ácido pseudonorrangifórmico (Huneck & Yoshimura, 1996); assim consideramos que o ácido pseudonorrangifórmico é a substância eluída no **pico 1 (Figura 12)**.

Figura 13 - Proposta da fragmentação do ácido norrangifórmico



Fonte: adaptado de BRAKNI *et al.* 2018.

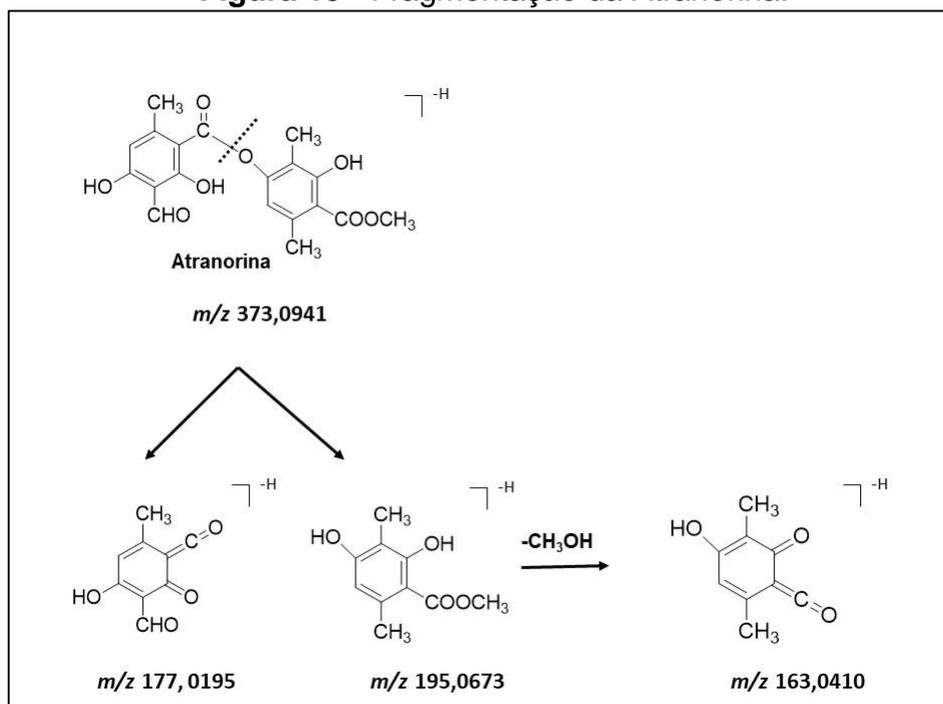
Figura 14 - Proposta da fragmentação do ácido pseudonorrangifórmico.



Fonte: própria autora

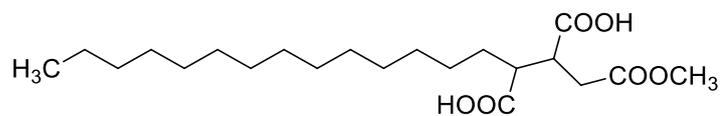
O pico **2** apresentou uma substância de $[M-H]^-$ de m/z 373,0941 de fórmula $C_{19}H_{17}O_8$. A fragmentação desse íon gerou os fragmentos de m/z 195,0673 $[M-C_9H_7O_4-H]^-$, m/z 177,0195 $[M-C_{10}H_{11}O_4-H]^-$ e m/z 163,0410 $[M-C_9H_7O_4-CH_3OH-H]^-$ (**tabela 1**). Esses fragmentos confirmam a estrutura do depsídeo atranorina. A fragmentação da atranorina é indicada na **Figura 15**.

Figura 15 - Fragmentação da Atranorina.

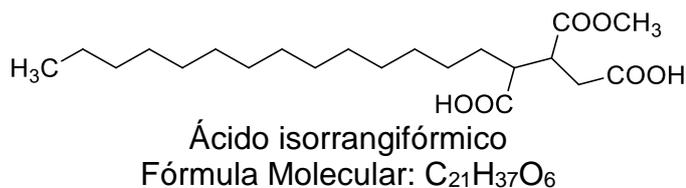


Fonte: adaptado de LATKOWSKA *et al.* 2015; MUSHARRAF *et al.* 2015.

A substância eluída no pico **3** apresentou $[M-H]^-$ de m/z 385,2628 de fórmula $C_{21}H_{37}O_6$ e produziu o fragmento de m/z 265,2547 (**tabela 1**). Os ácidos rangifórmico e isorrangifórmico apresentam essa mesma fórmula molecular, são ácidos alifáticos de estruturas muito parecidas que diferem apenas na posição do grupo éster metílico.

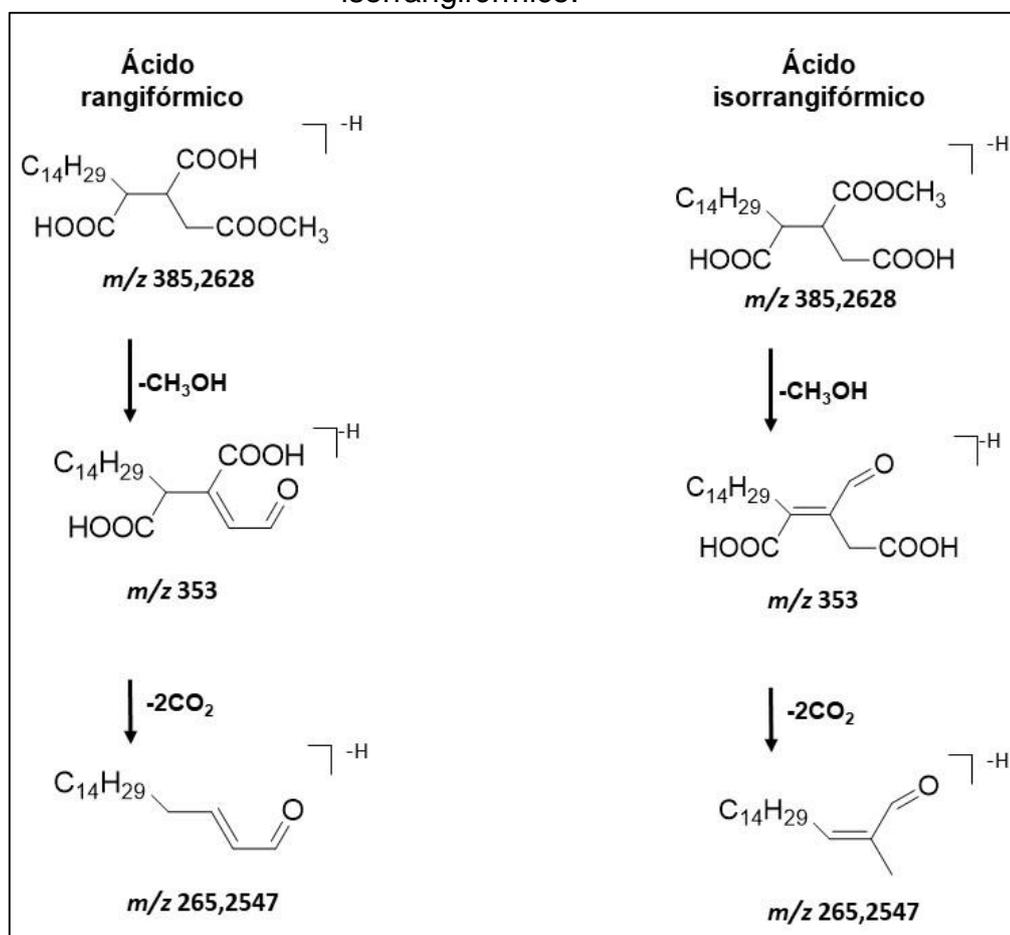


Ácido rangifórmico
Fórmula Molecular: $C_{21}H_{37}O_6$



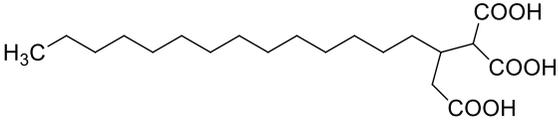
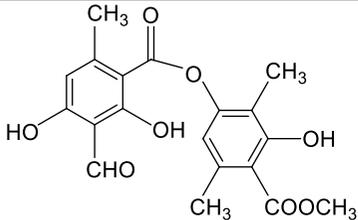
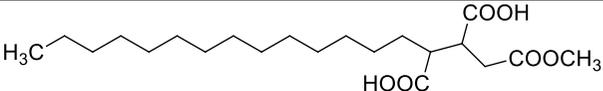
Estes dois ácidos podem gerar o fragmento de m/z 265,2547 pela perda de uma molécula de CH₃OH e a perda consecutiva de duas moléculas de CO₂, como mostra a **Figura 16**, não sendo possível definir através desses dados espectrais qual destes ácidos foi eluído no pico **3**. A análise por microcristalização mostrou a formação de estruturas compatíveis com aquelas mostradas em fotos da literatura da microcristalização do ácido rangifórmico (HUNECK & YOSHIMURA, 1996), mas não dispomos de imagens das estruturas formadas pela microcristalização do ácido isorrangifórmico. Entretanto, é provável que estes ácidos tenham formações diferentes, pensando assim, o ácido rangifórmico é a substância eluída no pico **3**.

Figura 16 - Propostas de fragmentação dos ácidos rangifórmico e isorrangifórmico.



Fonte: adaptado de XU *et al.* 2017; BRAKNI *et al.* 2018.

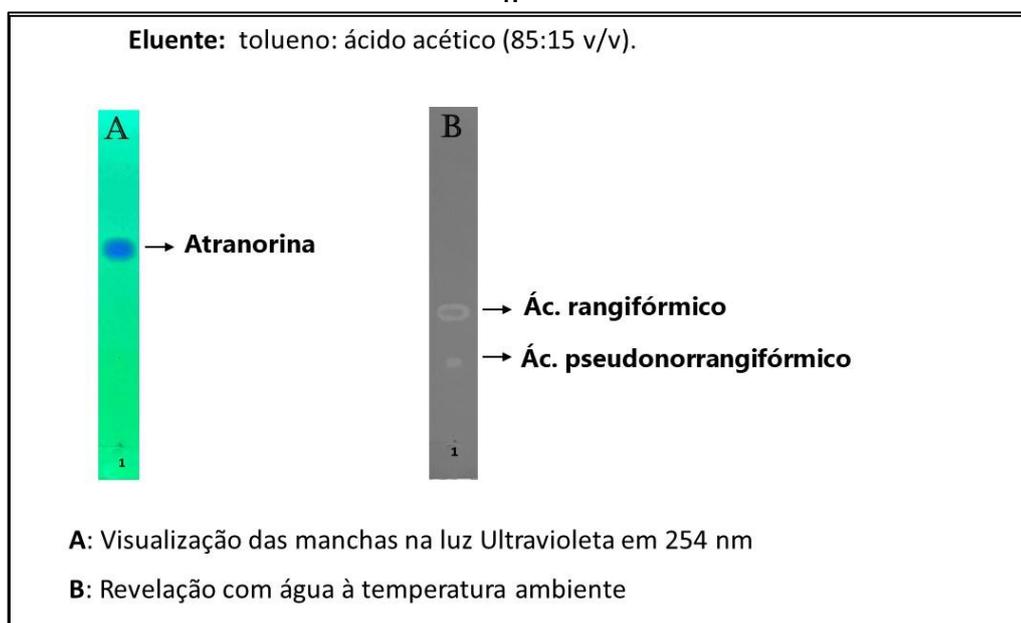
Tabela 1 - Dados de CLAE-DAD-EM do extrato acetônico de *Stereocaulon* representativo do grupo I.

Pico	Tempo de Retenção (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Íon (s) - Fragmento (s) MS/MS (m/z)	Identificação da Substância	Estrutura química
1	52,5	371,2461	C ₂₀ H ₃₅ O ₆	353,2346 (C ₂₀ H ₃₃ O ₅) 265,2547 (C ₁₈ H ₃₃ O)	Ácido pseudonorrangifórmico	
2	52,7	373,0941	C ₁₉ H ₁₇ O ₈	195,0673 (C ₁₀ H ₁₁ O ₄) 177,0195 (C ₉ H ₅ O ₄) 163,0410 (C ₉ H ₇ O ₃)	Atranorina	
3	56,1	385,2628	C ₂₁ H ₃₇ O ₆	265,2547 (C ₁₈ H ₃₃ O)	Ácido rangifórmico	

Fonte: própria autoria.

Nos extratos acetônicos de líquens do **grupo I** foi possível identificar através das técnicas de cromatografia em camada delgada, microcristalização, RMN de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM), a atranorina e os ácidos pseudonorrangifórmico e rangifórmico. A **Figura 17** representa o perfil cromatográfico das substâncias identificadas no **grupo I**.

Figura 17 - Perfil cromatográfico das substâncias identificadas no grupo I.



Fonte: própria autora.

Todas as 13 (treze) exsiccatas de líquens deste grupo apresentaram o mesmo perfil químico e 12 (doze) dessas foram identificadas como *Stereocaulon corticatulum*; um espécime ficou sem definição da espécie (*Stereocaulon* sp.). Segue abaixo informações dos espécimes analisados (composição química, local de coleta, número do coletor e número de herbário (CGMS)).

Stereocaulon corticatulum Nyl. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Atranorin, rangiformic and pseudonorrangiformic acids. Specimens analysed collected in Santa Cruz, El Chalten, PTG-6, Argentina: A.A. Spielmann 12532, 12539 and 12847 (CGMS 80216, 80218 e 80220), 49°4'47.83"S, 72°53'15.35"W. Collected in Torres de Paine, Patagonia, PTG-9, Chile: A.A. Spielmann 12544 (CGMS 80217), 51°6'54.68"S, 73°6'51.79"W. Collected in Tierra del Fuego, Ushuaia, Argentina: M.J. Kitaura 4108, 4109 and 4110 (CGMS 61864, 61965

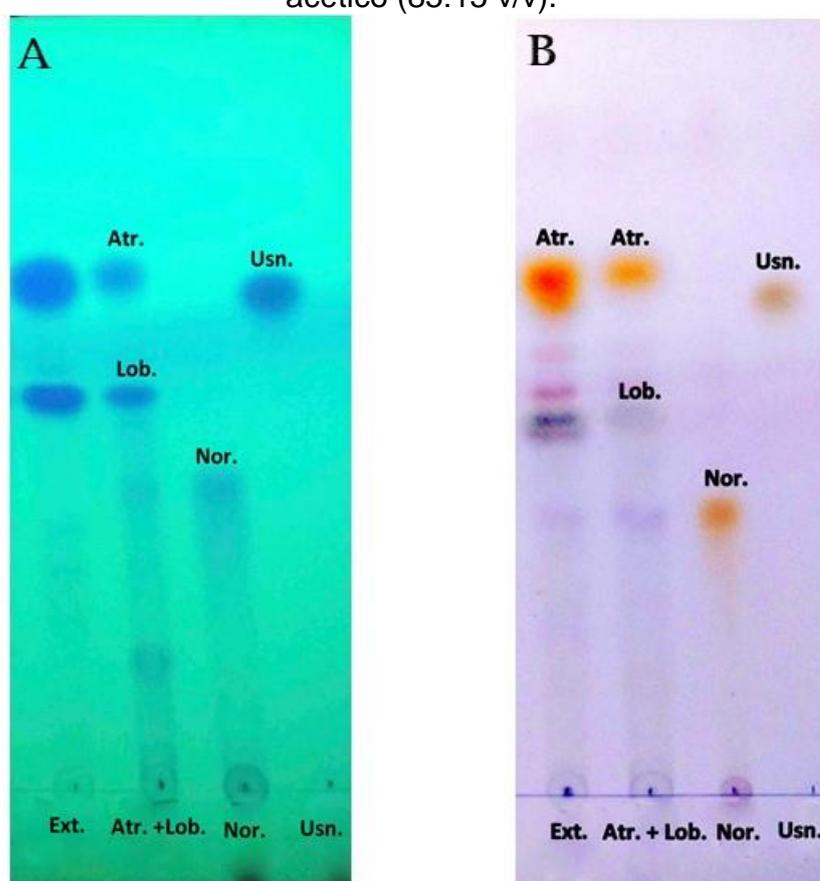
and 61866), 54°51'1''S, 68°32'26''W; M.J. Kitaura 4121 (CGMS 61869), 54°51'29''S, 68°30'24''W. Collected in Santa Cruz, El Chalten, Argentina: M.J. Kitaura 4207, 4211 and 4221 (CGMS 61882,61883 and 61885), 49°4'21''S, 72°53'27''W. Collected in Torres del Paine, Patagonia, Chile: M.J. Kitaura 4237 (CGMS 61888), 51°6'40''S, 73°6'44''W.

Stereocaulon sp. Chemical composition: Atranorin, rangiformic and pseudonorrangiformic acids. Specimen analysed collected in Torres de Paine, Patagonia, PTG-9, Chile: A. A. Spielmann 12528 (CGMS 80219), 51°6'54.68''S, 73°6'51.79''W

4.2 Grupo II - Atranorina, Ácido lobárico e outros compostos

Este grupo é composto por 71 (setenta e uma) exsiccatas de líquens do gênero *Stereocaulon*. A **Figura 18** mostra o perfil cromatográfico de um extrato representativo do conjunto de amostras analisadas neste grupo juntamente com substâncias de referência, atranorina, ácido úsnico, ácido norstítico e ácido lobárico.

Figura 18 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo II de *Stereocaulon* no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v).



Fonte: própria autora.

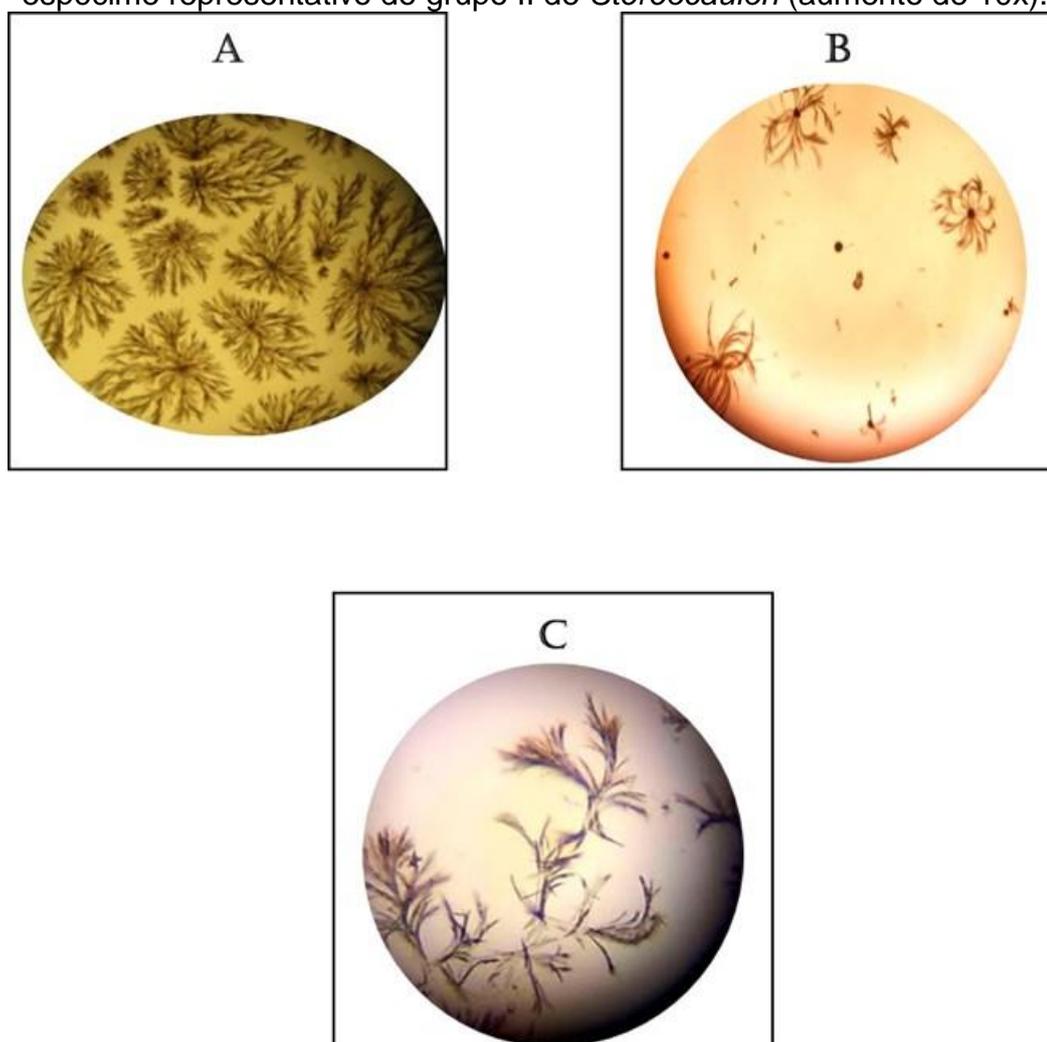
Visualização das manchas na luz Ultravioleta em 254 nm (A); revelação com ácido sulfúrico 10% em metanol e aquecimento até o completo aparecimento das manchas (B); Ext.: extrato acetônico de um espécime de *Stereocaulon* representativo do grupo II; Atr + Lob.: extrato contendo atranorina e ácido lobárico; Nor.: ácido norstítico; Usn.: ácido úsnico.

A revelação com luz UV₂₅₄ (**Figura 18A**) indica uma mancha com migração semelhante à atranorina usada como referência (Rf 68) e outra equivalente ao ácido lobárico (Rf 48). Na revelação com metanol/ácido sulfúrico (**Figura 18B**) observa-se que a mancha de Rf 48 é composta de pelo menos duas manchas sobrepostas.

A análise dos cromatogramas acima (**Figura 18**) indicou que o extrato acetônico dos espécimes do **grupo II**, contém possivelmente atranorina, ácido lobárico e outras substâncias. Outras técnicas de análise, descritas a seguir, foram utilizadas para a elucidação da composição do **grupo II**.

O tratamento do extrato acetônico com soluções de GAoT, GE e GAW em condições adequadas, resultou na formação de estruturas cristalinas que confirmaram a presença de atranorina e ácido lobárico (**Figura 19**). As estruturas observadas de atranorina são iguais as que já foram relatadas no **grupo I**. A identificação das estruturas cristalinas foi feita por comparação com a cristalização de extrato de composição conhecida e com fotos da literatura (HUNECK *et al.* 1996).

Figura 19 - Fotos da microcristalização do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo II de *Stereocaulon* (aumento de 10x).



Fonte: própria autora.

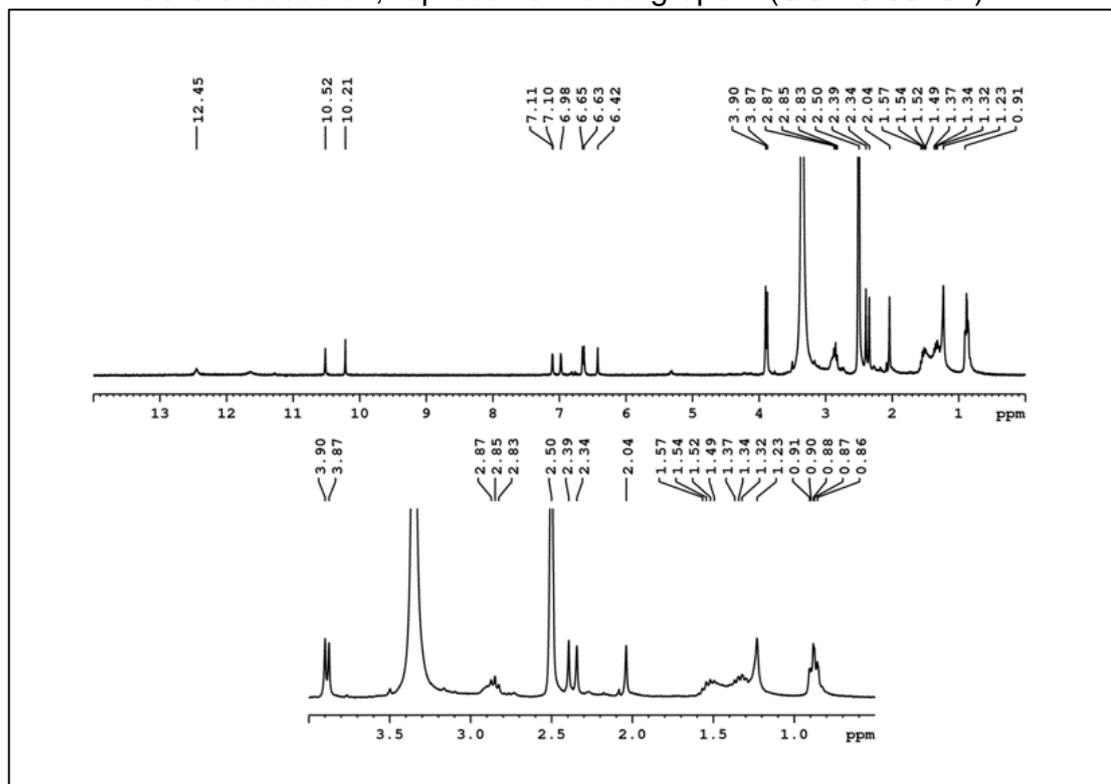
Formações cristalinas observadas com o tratamento do extrato com soluções: GE 1:3 (A), GE 3:1 (B) e GAW (C).

A análise por microcristalização confirmou a presença de atranorina e ácido lobárico, identificados preliminarmente por cromatografia em camada delgada. Outras substâncias presentes nos extratos não apresentaram formações cristalinas, seja por estarem presentes em baixa concentração ou por não cristalizarem nas condições especificadas.

Foram obtidos os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do extrato acetônico do espécime analisado representativo desse **grupo II** (CGMS 80161).

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 20**) apresentou um singlete que pode caracterizar a presença de hidroxila fenólica em 12,45 ppm, dois singletos de prováveis hidrogênios aldeídicos ou de fenóis em 10,52 ppm e 10,21 ppm. Na região entre 8 e 6 ppm é possível visualizar dois dubletos em 7,11 ppm ($J=2,1$ Hz) e 6,98 ppm ($J=2,1$ Hz); três singletos em 6,65 ppm, 6,63 ppm e 6,42 ppm. Na região mais blindada do espectro é possível observar a presença de dois singletos intensos em 3,90 ppm e 3,88 ppm, além de um conjunto de sinais, dentre os mais intensos estão três singletos em 2,39 ppm, 2,34 ppm e 2,04 ppm. Há também um tripleto em 2,85 ppm ($J=7,1$ Hz), um singlete em 1,23 ppm que pode ser atribuído a hidrogênios metilênicos e um sinal 0,88 ppm que aparenta serem dois tripletos e ainda dois multipletos na região de 1,57 a 1,32 ppm.

Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo II (CGMS 80161).

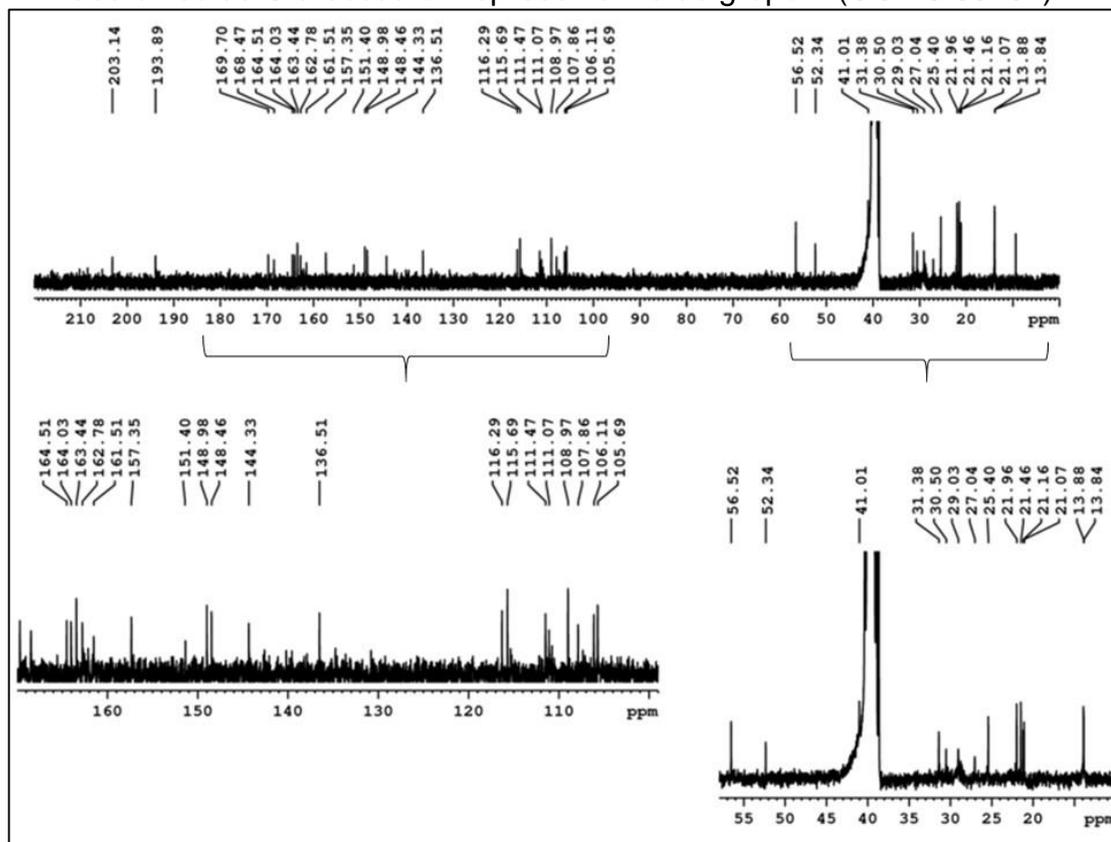


Fonte: própria autoria.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 21**) apresentou sinais em 203,1 ppm e 193,9 ppm, na região mais desblindada do espectro que são característicos de carbonilas de cetonas e aldeídos. Na região de 169,7 ppm à 161,5 ppm podem ser observados sete sinais atribuíveis a carbonilas de ácidos carboxílicos e/ou ésteres e/ou de carbonos aromáticos. Na faixa entre 157,4 ppm à 136,5 ppm existem seis sinais e oito sinais entre 116,3 ppm a 105,7 ppm que podem estar relacionados a carbonos aromáticos.

Observa-se ainda os sinais 56,5 ppm e 52,3 ppm de prováveis grupos metoxila, além de doze sinais na faixa de 31,4 ppm a 9,3 ppm de grupos CH_2 e CH_3 , indicando a presença de cadeia alquílica alifática e de metilas ligadas a anel aromático.

Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon* representativo do grupo II (CGMS 80161).



Fonte: própria autoria.

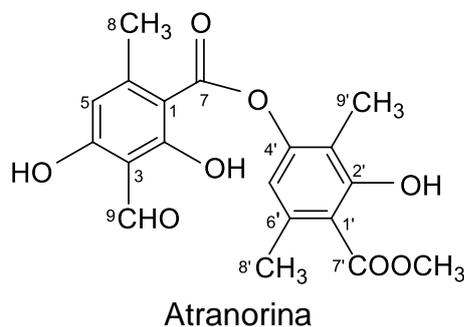
No espectro de RMN de ^1H (**Figura 20**), o singlete em 12,45 ppm e um dos singletos na região de 10 ppm (10,21 ppm ou 10,52 ppm) podem ser atribuídos as hidroxilas fenólicas ligadas ao C-4 e C-2' da atranorina ou a C-2 e C2' do ácido lobárico. O outro singlete na região de 10 ppm refere-se a um hidrogênio aldeídico da atranorina (H8). Existem também dois singletos na região de 6 ppm, correspondentes a dois hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (H5 e H5'), um singlete em 3,88 ppm de éster metílico (H10') e três singletos em 2,39 ppm, 2,34 ppm e 2,04 ppm das metilas (H8', H9 e H9') que podem ser atribuídos também a atranorina.

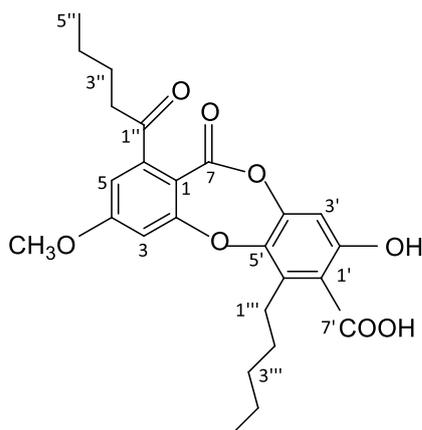
Observa-se ainda nessa **Figura 20** dois dubletos em 7,11 ppm ($J = 2,1$ Hz) e 6,97 ppm ($J = 2,1$ Hz) que podem ser atribuídos aos hidrogênios H3 e H5 da estrutura do ácido lobárico; além de um singlete na região de 6 ppm que pode ser atribuído ao hidrogênio H3'. Na região de menor deslocamento químico aparece um singlete em 3,90 ppm referente aos hidrogênios da metoxila (H8); um tripleto em 2,85 ppm ($J = 7,1$ Hz) que pode ser atribuído aos hidrogênios H2''; dois multipletos na região de 1,57 a

1,32 ppm; um singleto largo em 1,23 ppm e um possível tripleto em 0,88 ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios H3'', H4'', H5'' e H1''', H2''', H3''', H4''', H5''' desta depsidona.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 21**) os sinais em 193,9, 52,3 e 9,3 ppm podem ser atribuídos a carbonila de aldeído (C8), a éster metílico (C10') e a grupo metila (C9') ligada a anel aromático, respectivamente. Esses sinais podem ser atribuídos a carbonos do depsídeo atranorina. Há um conjunto de 22 sinais entre 169,7 ppm a 105,7 ppm que são compatíveis aos carbonos aromáticos e carbonilas do ácido lobárico e da atranorina. No espectro de RMN de ^{13}C seria esperado um total de 27 (vinte e sete) sinais dessas substâncias: 13 deles são referentes aos carbonos dos dois anéis aromáticos da atranorina e a carbonila que participa da ligação éster entre esses dois anéis (C7). Outros 14 sinais são referentes aos dois anéis aromáticos do ácido lobárico, a carbonila que participa da ligação entre esses dois anéis (C7) e do carbono do grupo carboxílico (C7') desta depsidona. Entretanto, são observados apenas 22 sinais. É possível que alguns sinais se sobreponham e/ou que sejam menos intensos e não aparecem no espectro.

Outros sinais também foram atribuídos ao ácido lobárico: o sinal em 56,5 ppm correspondente a metoxila C8, em 203,1 ppm referente a carbonila cetônica (C1'), juntamente com os sinais 41,0 ppm, 31,4 ppm, 30,5 ppm, 27,0 ppm, 25,4 ppm, dois sinais na região de 21 ppm, 13,9 ppm e 13,8 ppm atribuídos aos carbonos da cadeia alifática ligada ao anel aromático desta depsidona (C1'', C3'', C4'', C5'', C1''', C2''', C3''', C4''' e C5''').



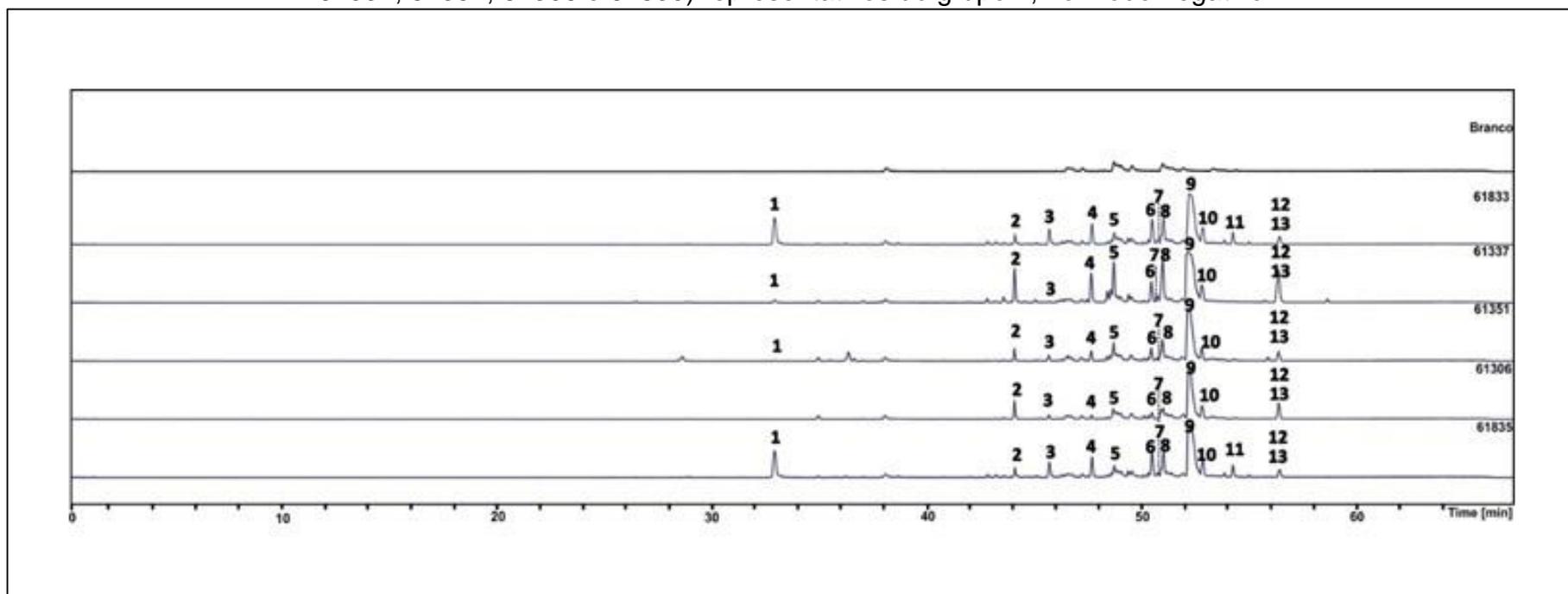


Ácido lobárico

A análise cromatográfica e de microcristalização indicou a presença da atranorina e do ácido lobárico como componentes principais no extrato. A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indicou sinais compatíveis a essas substâncias, entretanto não foi possível identificar outros componentes em menor proporção, seja pela presença de sinais muito próximos ao ruído que não são reconhecidos, e/ou pela similaridade estrutural com a atranorina e o ácido lobárico, o que tornaria muitos dos sinais com o mesmo deslocamento químico com sobreposição nos espectros.

Foram selecionados cinco extratos de *Stereocaulon* que apresentaram pequenas diferenças na análise cromatográfica (CCD) para análise por CLAE-DAD-EM utilizando ionização eletrospray. Os cromatogramas destes extratos estão representados na **Figura 22**.

Figura 22 - Cromatogramas do pico base obtidos por CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de *Stereocaulon* (CGMS 61833, 61337, 61351, 61306 e 61835) representativos do grupo II, no modo negativo.

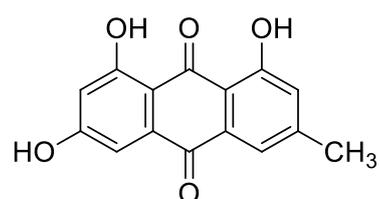


Fonte: própria autoria.

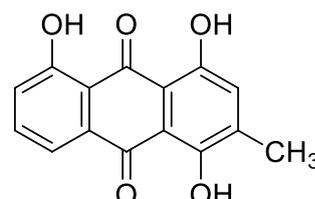
1-13 representam substâncias do extrato acetônico analisado.

A análise dos cromatogramas aponta 13 substâncias nos extratos acetônicos de *Stereocaulon* analisados, as quais foram identificadas através dos dados espectrais de massas mostrados na **tabela 2**. A **Figura 22** mostra que os cinco espécimes de *Stereocaulon* (CGMS 61833, 61337, 61351, 61306 e 61835) apresentam os picos **2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 13**, indicando composição química semelhante entre eles e diferindo entre si com relação à proporção destes constituintes. O pico **1** não aparece na amostra CGMS 61306 e o pico **11** está presente somente nas amostras CGMS 61831 e 61835.

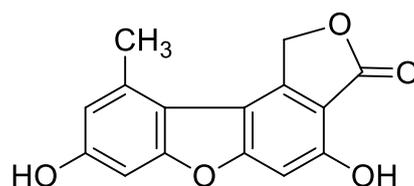
No pico **1** foi eluída uma substância de $[M-H]^-$ m/z 269,0453 ($C_{15}H_9O_4$) e um único fragmento de segunda ordem de m/z 197,0602 (**tabela 2**). As antraquinonas emodina e islandicina, além da estrepsilina – um dibenzofurano, apresentam essa mesma fórmula molecular de $C_{15}H_{10}O_4$.



Emodina

Fórmula Molecular: $C_{15}H_{10}O_4$ 

Islandicina

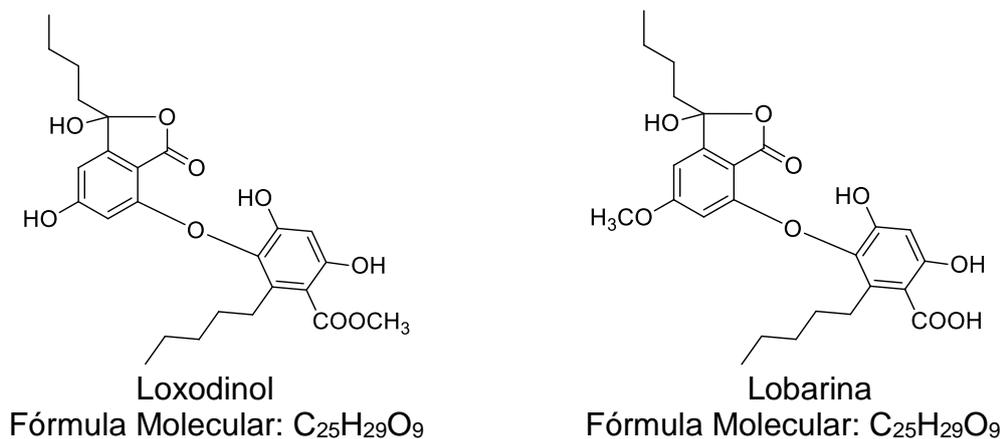
Fórmula Molecular: $C_{15}H_{10}O_4$ 

Estrepsilina

Fórmula Molecular: $C_{15}H_{10}O_4$

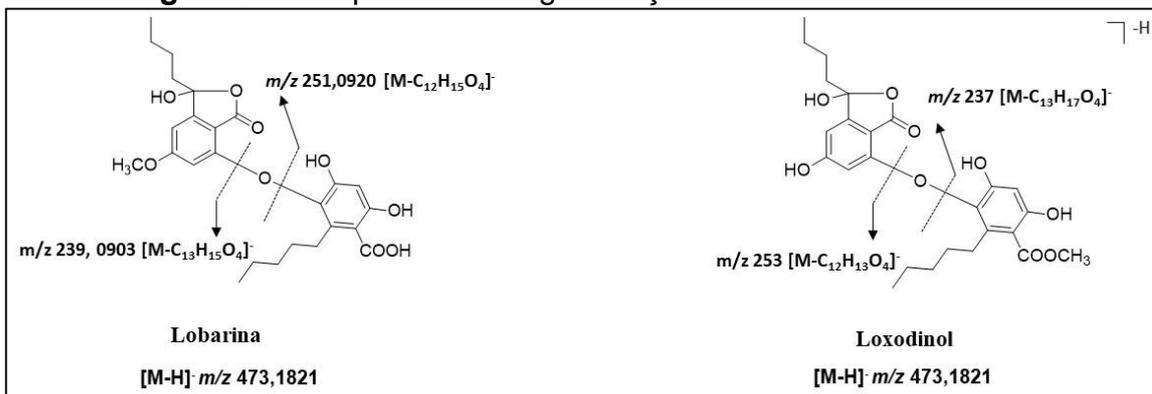
Não foi possível propor, através da análise do fragmento de m/z 197,0602 $[M-C_2O_3-H]^-$ qual destas substâncias poderia gerá-lo. Porém, foi possível notar na análise cromatográfica (CCD) de algumas exsiccatas, após a revelação com ácido sulfúrico e aquecimento, o aparecimento de uma mancha acinzentada e de R_f compatível com a estrepsilina, o que permitiu atribuir esse pico como sendo este dibenzofurano. Essa informação é ainda reforçada pelo fato de que os outros possíveis isômeros, emodina e islandicina, nas mesmas condições, seriam reveladas com coloração laranja. Adicionalmente, a estrepsilina já foi relatada no gênero *Stereocaulon* (GONZÁLEZ *et al.* 1992; VU, 2014).

No pico **2** foi eluída uma substância de $[M-H]^-$ m/z 473,1821 de fórmula molecular de $C_{25}H_{29}O_9$ (**tabela 2**). São duas possibilidades: o loxodinol e a lobarina – são substâncias da classe éter difenílico com semelhança estrutural. O loxodinol apresenta suas hidroxilas livres e a carboxila esterificada, enquanto a lobarina apresenta uma hidroxila metilada e a carboxila na forma livre.

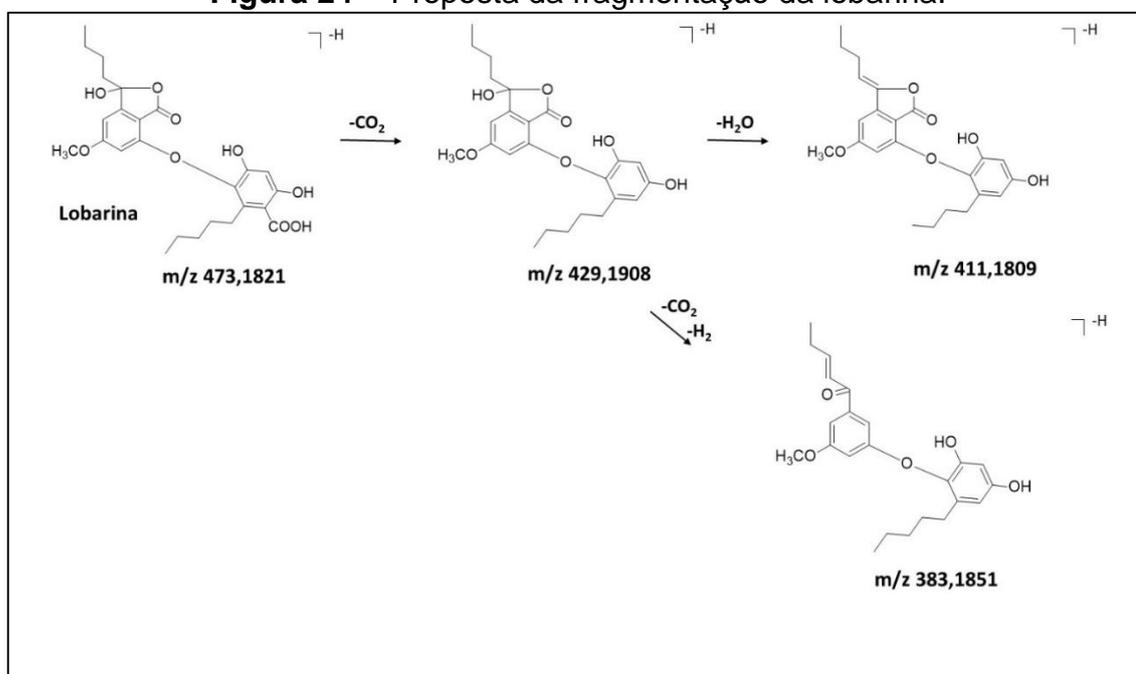


Espera-se que espectro de massas de compostos da classe do tipo éter difenílico apresentem fragmentos originados da quebra da ligação éter, além daqueles gerados por desidratação e/ou descarboxilação, entre outros (FOO & GALLOWAY, 1979; LE POGAM *et al.* 2015).

A análise dos fragmentos gerados indica que a substância eluída no pico **2** é a lobarina, pois apenas a lobarina pode gerar, através da quebra da ligação éter, os fragmentos de m/z 251,0920 e m/z 239,0903, como é indicado na **Figura 23**. E ainda, a lobarina pode gerar o fragmento de m/z 383,1851 formado pela perda de duas moléculas de CO_2 , uma proveniente do anel lactol e do grupo carboxila, além de uma molécula de H_2 . A **Figura 24** indica a proposta de fragmentação da lobarina considerando os demais fragmentos observados.

Figura 23 - Propostas de fragmentação da lobarina e loxodinol.

Fonte: própria autoria.

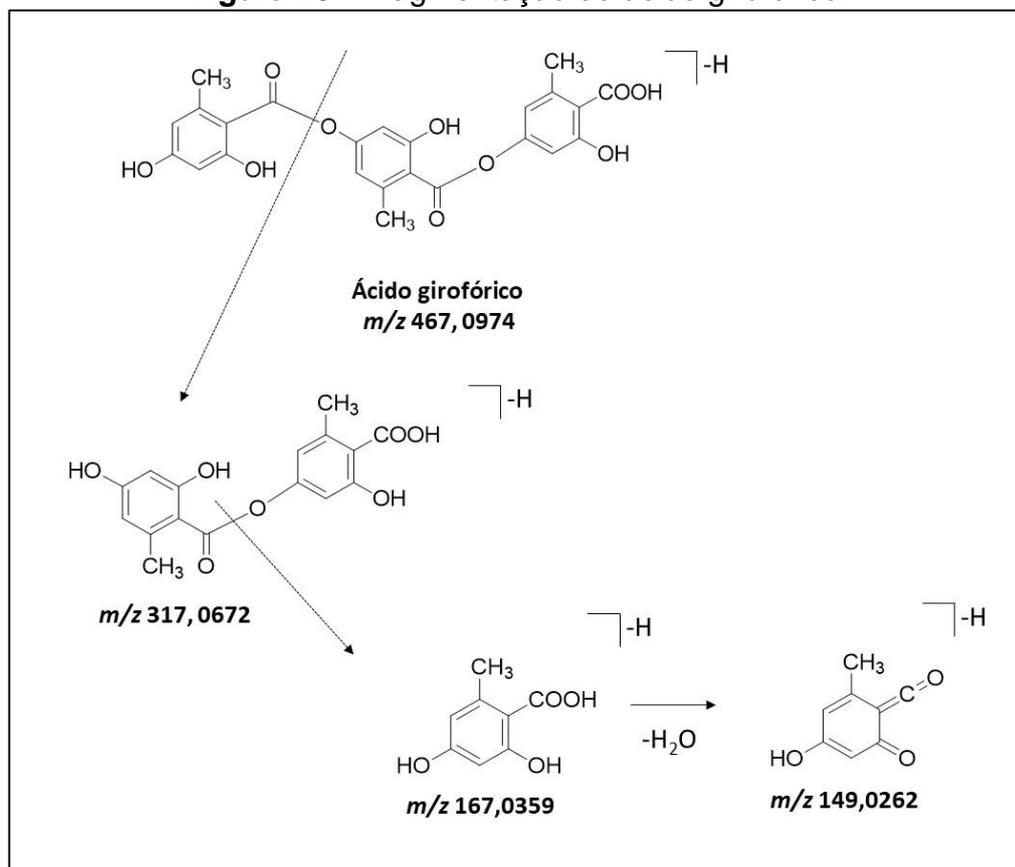
Figura 24 - Proposta da fragmentação da lobarina.

Fonte: própria autoria.

No pico **3** foi eluída uma substância de [M-H]⁻ m/z 467,0974 de fórmula $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$ (**tabela 2**). Essa fórmula sugere o ácido girofórico. Este ácido é um tridepsídeo, formado por três unidades do ácido orselínico ligados por duas ligações ésteres. Compostos desta classe geralmente geram fragmentos pela quebra de uma ou mais ligação éster (HOLZMANN & LEUCKERT 1990; MUSHARRAF *et al.* 2015; CORNEJO *et al.* 2016; CASTRO *et al.* 2017). O ácido girofórico desprotonado, através da quebra da ligação éster, produz o fragmento m/z 317,0672 que pela quebra de outra ligação éster produz o fragmento m/z 167,0359. Este fragmento por desidratação produz o fragmento m/z 149,0262. Esses fragmentos são observados para a substância eluída no **pico 3** e confirmam a identificação do ácido girofórico. A

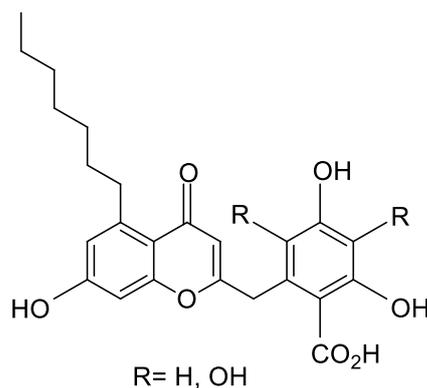
Figura 25 representa a fragmentação do ácido girofórico de acordo com HOLZMANN & LEUCKERT (1990).

Figura 25 - Fragmentação do ácido girofórico.



Fonte: adaptado de HOLZMANN & LEUCKERT, 1990.

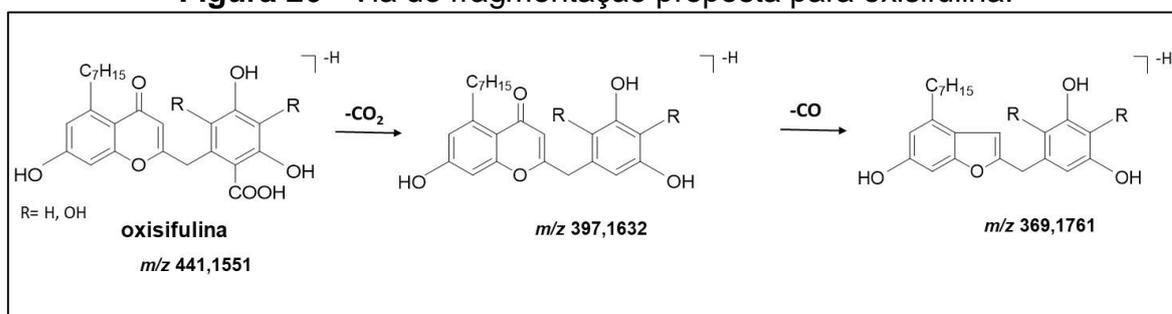
No pico **4** foi eluída uma substância de $[M-H]^-$ de m/z 441,1551 de fórmula $C_{24}H_{25}O_8$ (**tabela 2**). Essa fórmula corresponde à oxisifulina, uma cromona derivada da sifulina. Os dados espectrais de EM/EM mostraram fragmentos de valores de m/z de 397,1632 $[M-CO_2-H]^-$; 369,1761 $[M-CO_2-CO-H]^-$ e 353,1536 que confirmam a presença da oxisifulina nos extratos acetônicos de *Stereocaulon* do grupo II. A via de fragmentação proposta para a oxisifulina é mostrada na **Figura 26**.



Oxisifulina – (HUNECK & YOSHIMURA, 1996)

Fórmula Molecular: C₂₄H₂₅O₈

Figura 26 - Via de fragmentação proposta para oxisifulina.

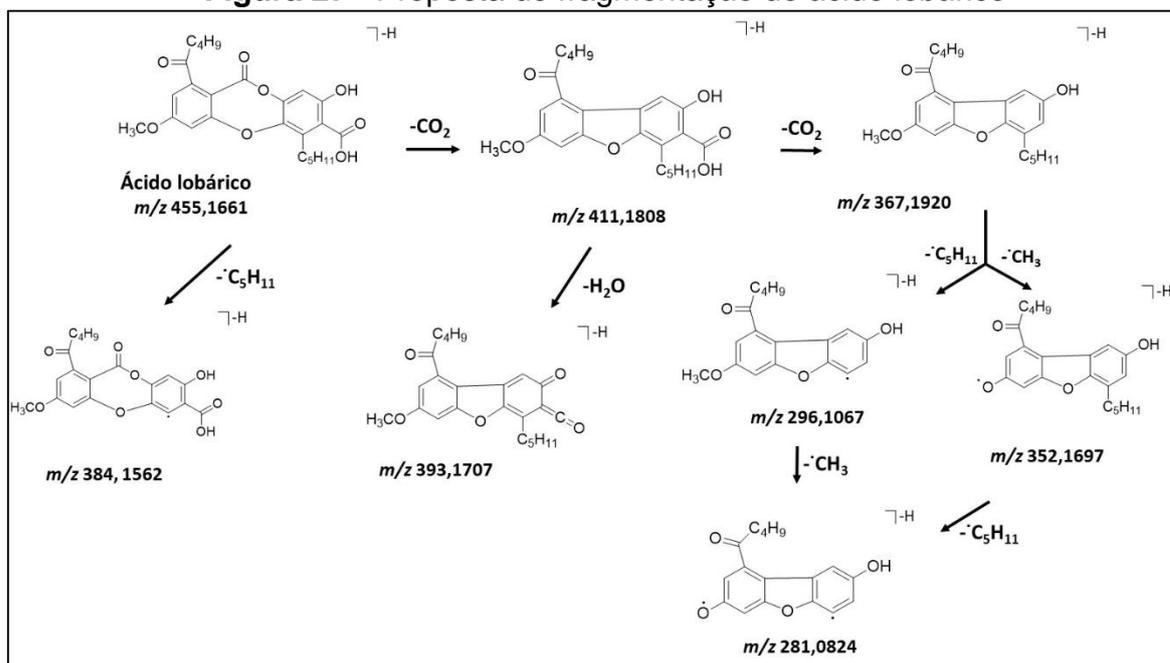


Fonte: própria autoria.

A seguir, serão comentadas a identificação da substância eluída no pico **9**, na sequência aquelas eluídas nos picos **6**, **7**, **8** e **5**, pois são compostos de estrutura e fragmentações relacionadas:

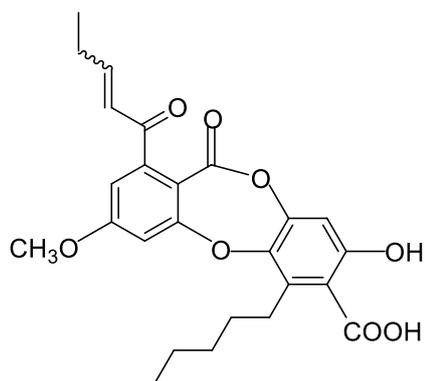
A substância eluída no pico **9** apresentou $[M-H]^-$ de m/z 455,1661 de fórmula C₂₅H₂₇O₈ foi identificada como o ácido lobárico (**tabela 2**). Esse íon gerou os seguintes fragmentos: m/z 411,1808 $[M-CO_2-H]^-$, m/z 393,1707 $[M-CO_2-H_2O-H]^-$, m/z 384,1562 $[M-C_5H_{11}-H]^-$, m/z 367,1920 $[M-2CO_2-H]^-$, m/z 352,1697 $[M-2CO_2-CH_3-H]^-$, m/z 296,1067 $[M-2CO_2-C_5H_{11}-H]^-$ e m/z 281,0824 $[M-2CO_2-CH_3-C_5H_{11}-H]^-$ que confirmaram a estrutura dessa depsidona (MUSHARRAF *et al.* 2015; CORNEJO *et al.* 2016; CASTRO *et al.* 2017; TORRES-BENÍTEZ *et al.* 2017; JIN *et al.* 2018; SALGADO *et al.* 2018). A fragmentação do ácido lobárico é mostrada na **Figura 27**.

Figura 27 - Proposta de fragmentação do ácido lobárico

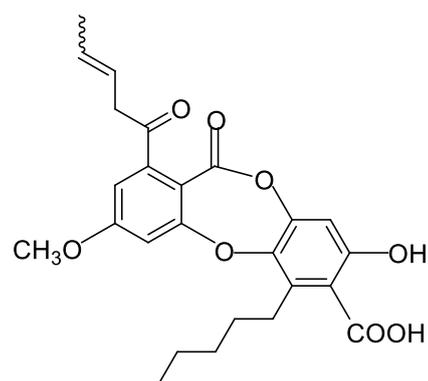


Fonte: adaptado de MUSHARRAF *et al.* 2015; JIN *et al.* 2018.

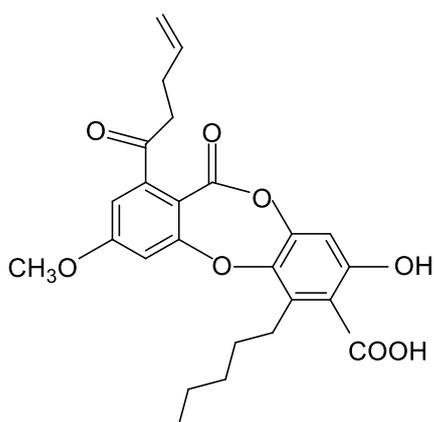
As substâncias eluídas nos picos **6**, **7** e **8** apresentaram o mesmo $[M-H]^-$ de m/z 453,1556; 453,1544 e 453,1566, respectivamente, todas de fórmula $C_{25}H_{25}O_8$ (**tabela 2**). Não foi encontrada nenhuma substância de origem natural, com a fórmula molecular $C_{25}H_{26}O_8$, descrita na base de dados SciFinder que poderia gerar esses fragmentos. Porém, esses isômeros apresentam uma unidade a mais do Índice de Deficiência de Hidrogênio (IDH) que o ácido lobárico e seguem o mesmo padrão de fragmentação (m/z 409 ($[M-CO_2-H]^-$), 382 ($[M-C_5H_{11}-H]^-$), 365 ($[M-2CO_2-H]^-$) e 350 ($[M-2CO_2-CH_3-H]^-$) e 294 ($[M-2CO_2-C_5H_{11}-H]^-$) indicando que estes isômeros apresentam uma dupla ligação a mais que o ácido lobárico. Os fragmentos m/z 382, gerado pela perda da cadeia $-C_5H_{11}$, e o de m/z 294 formado através da perda de duas moléculas de CO_2 e um grupo $-C_5H_{11}$ indicam que essa dupla ligação está localizada na cadeia alquílica com o grupo cetônico (anel A), nas posições α , β e γ ao grupo ceto de cada uma das depsidonas. A posição do grupo cetônico foi considerada a mesma do ácido lobárico (1''). Sendo assim, essas substâncias eluídas nestes picos (**6**, **7** e **8**) foram nomeadas: ácidos 2''-eno lobárico, 3''-eno lobárico e 4''-eno lobárico. Não foi possível, no momento, definir a estereoquímica da dupla ligação.



Ácido 2''-eno lobárico

Fórmula Molecular: $C_{25}H_{25}O_8$ 

Ácido 3''-eno lobárico

Fórmula Molecular: $C_{25}H_{25}O_8$ 

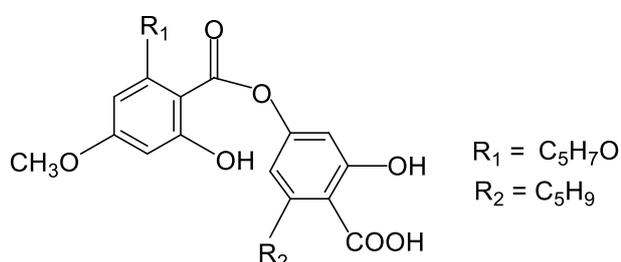
Ácido 4''-eno lobárico

Fórmula Molecular: $C_{25}H_{25}O_8$

No pico **5** foi eluída uma substância com $[M-H]^-$ de m/z 453,1561 correspondente a $C_{25}H_{25}O_8$ (**tabela 2**) igual as substâncias eluídas nos picos **6**, **7** e **8**. A presença dos fragmentos de menor valor m/z (m/z 231,0656, m/z 193,0861 e m/z 165,0921) sugeriram que a substância seja um depsídeo, pois compostos desta classe geram fragmentos pela quebra da ligação éster entre os dois anéis aromáticos.

A análise dos fragmentos de m/z 409,1634 $[M-CO_2-H]^-$, m/z 377,1384 $[M-CO_2-CH_3OH-H]^-$ e m/z 231,0656 $[M-C_{12}H_{13}O_3-H_2O-H]^-$ permitiram indicar que a substância seja um depsídeo com estrutura semelhante à do ácido lobárico, porém com uma dupla ligação em cada uma das cadeias alifáticas.

O fragmento de m/z 231,0656 foi essencial para determinar que as duplas ligações estão nas diferentes cadeias alifáticas. Não é possível determinar a localização dessas duplas ligações e a posição do grupo cetônico (C=O). O grupo cetônico pode estar localizado no C1'' (um depsídeo correspondente ao ácido lobárico, chamado de ácido 1''-oxo perlatólico), como também nas posições 2'' e 3'', como os ácidos glomeliférico e miríquidico, respectivamente. Os ácidos perlatólico, glomeliférico e miríquidico são relatados no gênero *Stereocaulon* (LAMB, 1977). Sendo assim, é possível que o grupo cetônico deste depsídeo esteja em posição C1'', C2'' e C3'' e que as duplas ligações estejam localizadas em diferentes posições nas cadeias alifáticas (C1''- C4'' e C1'''- C4'''). As estruturas possíveis para este depsídeo estão representadas na **Figura 28**. Não foi possível, no momento, definir a estereoquímica da dupla ligação. A proposta de fragmentação é indicada na **Figura 29**.



Depsídeo eluído no pico 5
 Fórmula Molecular: $C_{25}H_{26}O_8$
 Ácido 1''-oxo -eno''-eno''' perlatólico ou
 Ácido -eno'' -eno''' glomeliférico ou
 Ácido -eno'' -eno''' miríquidico

Figura 28 - Possíveis estruturas do depsídeo eluído no pico 5 (Fórmula $C_{25}H_{26}O_8$)
(continua)

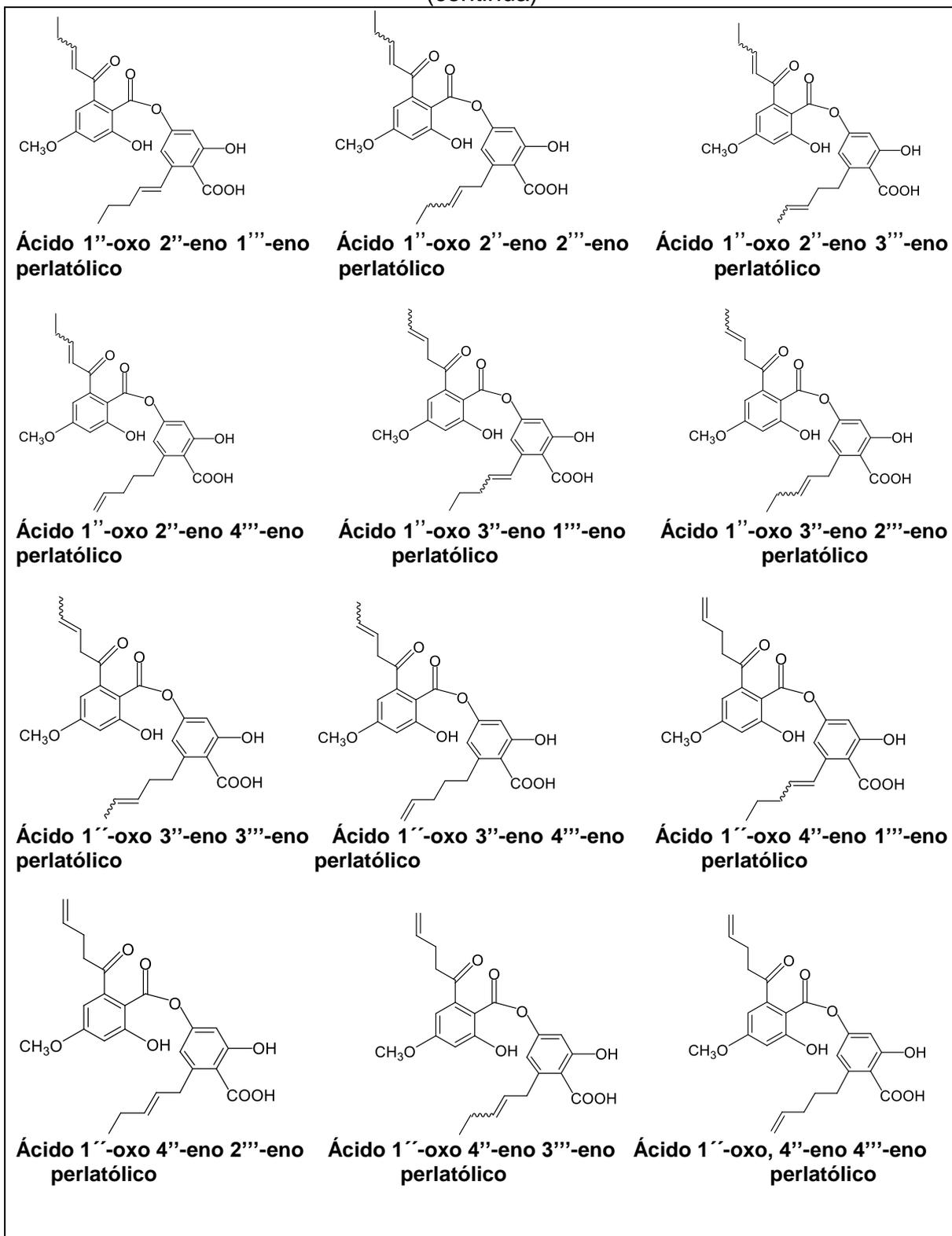


Figura 28 - Possíveis estruturas do depsídeo eluído no pico 5 (Fórmula $C_{25}H_{26}O_8$)
(continua)

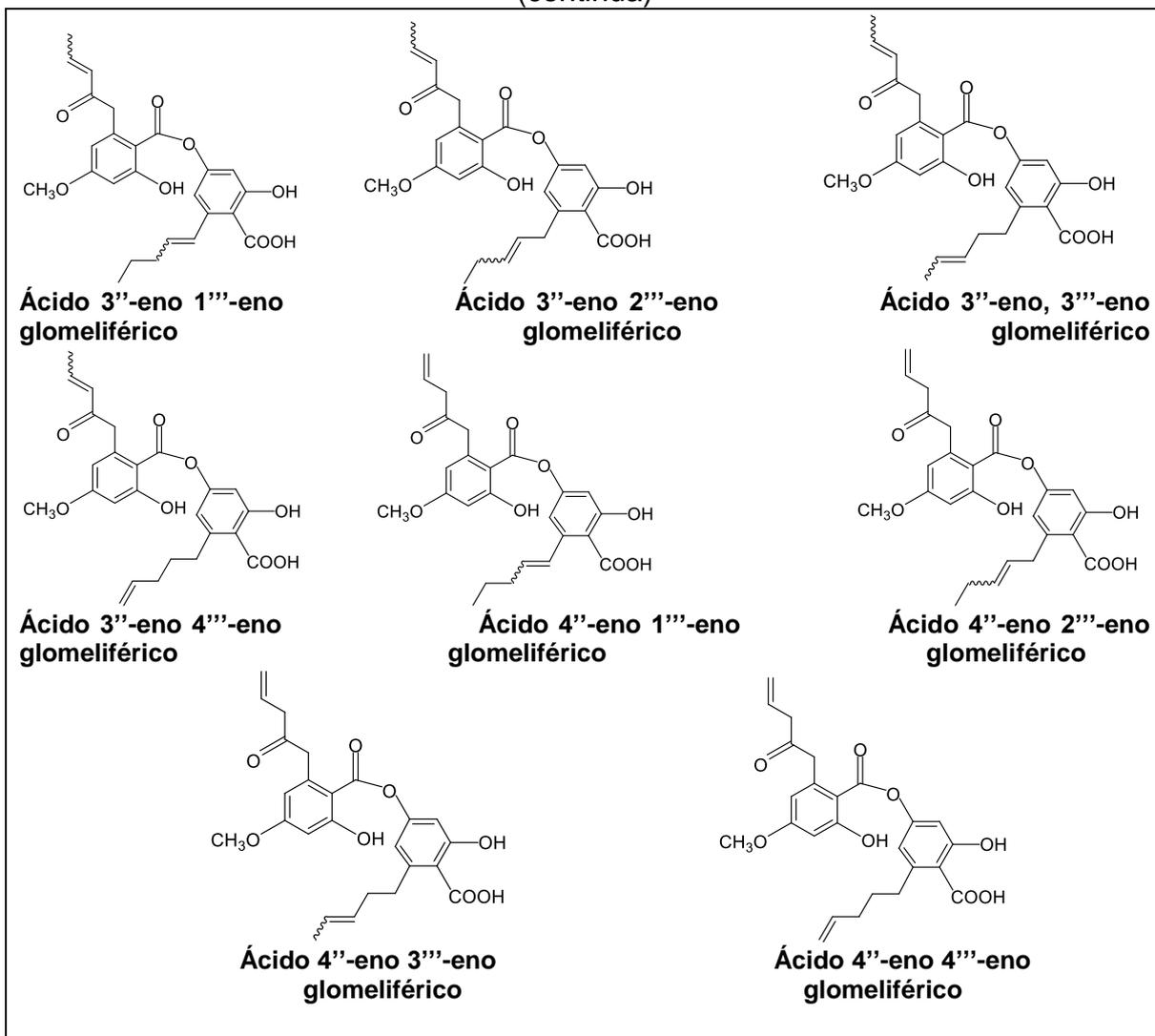


Figura 28 - Possíveis estruturas do depsídeo eluído no pico 5 (Fórmula $C_{25}H_{26}O_8$) (conclusão)

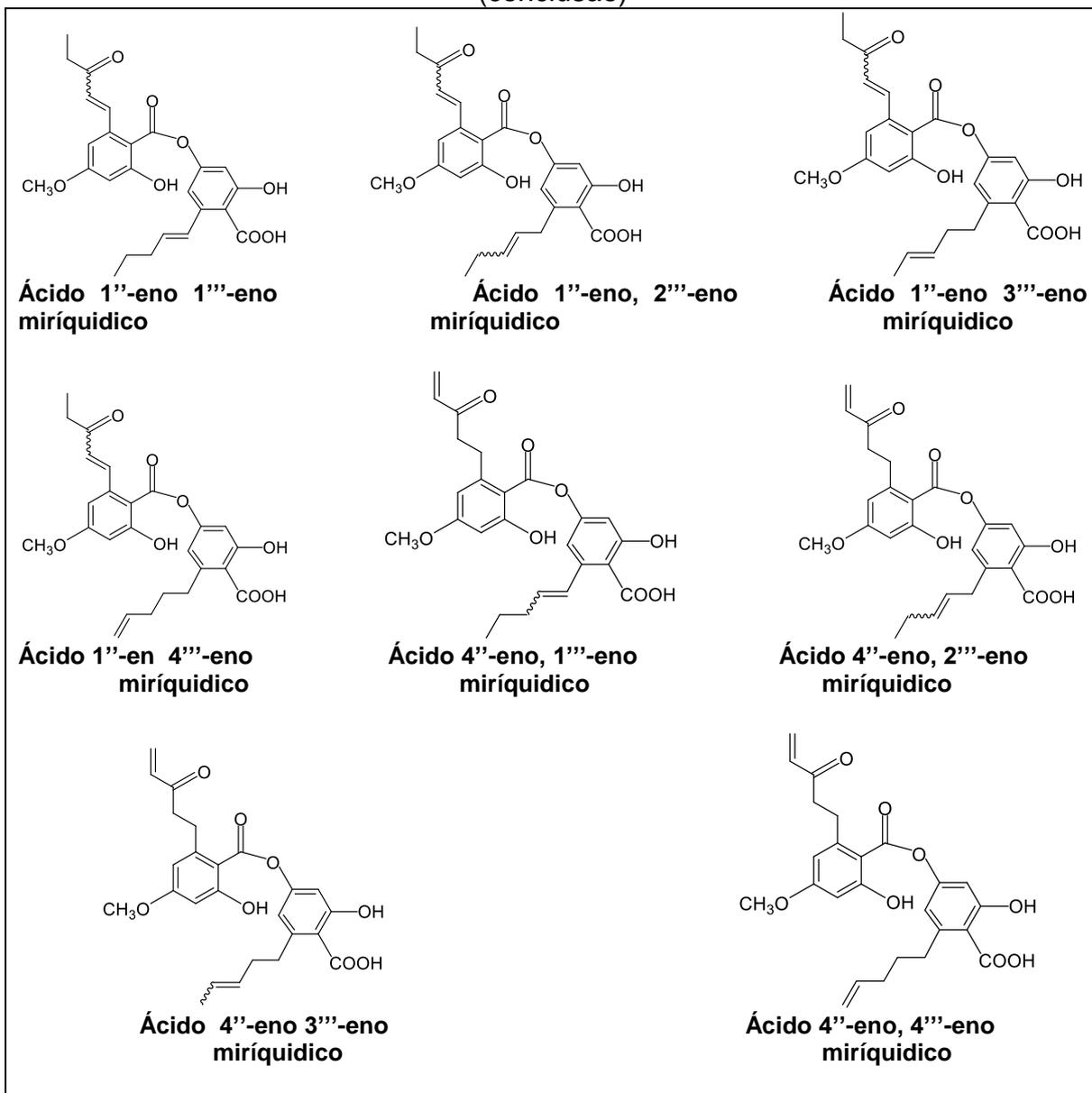
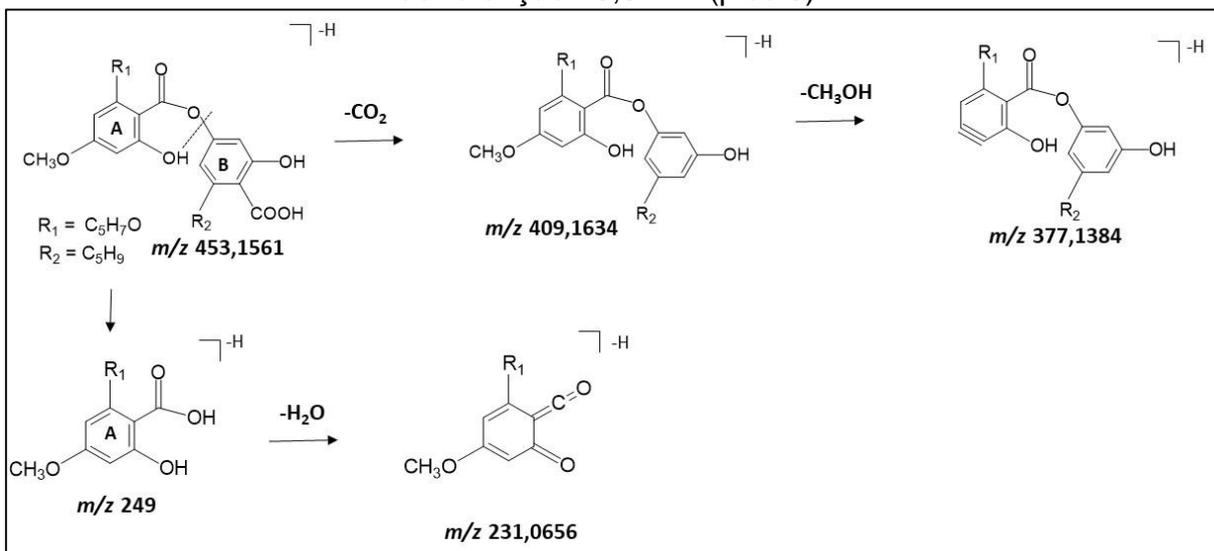


Figura 29 - Proposta de fragmentação do depsídeo ($C_{25}H_{26}O_8$) eluído com tempo de retenção 48,5 min (pico 5).



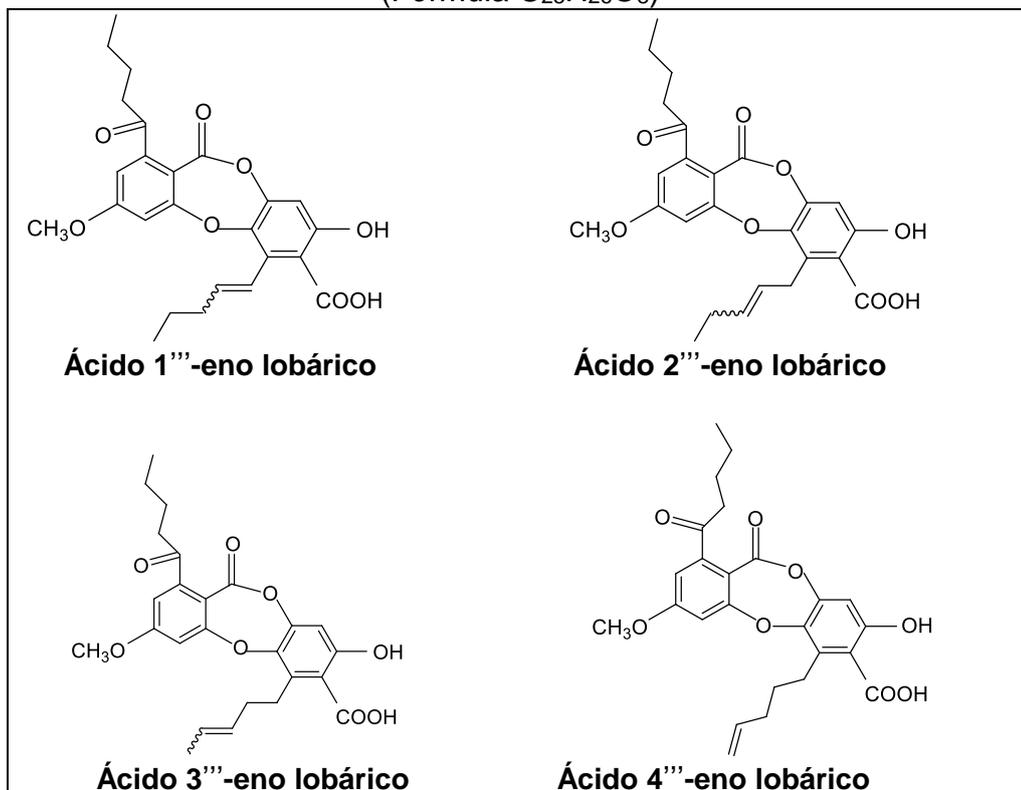
Fonte: própria autoria.

Nesse mesmo pico (5) foi eluída uma outra substância que apresenta fragmentos típicos de depsidona, formados pela perda consecutiva de duas moléculas de CO_2 , como o de m/z 365,1775 $[M-2CO_2-H]^-$, 350,1601 $[M-2CO_2-CH_3-H]^-$, 333,1468 $[M-2CO_2-HOCH_3-H]^-$, além do m/z 391,1476 $[M-CO_2-H_2O-H]^-$. A análise desses fragmentos sugere a estrutura de uma depsidona de estrutura semelhante ao ácido lobárico com uma dupla ligação na cadeia alifática, porém também não é possível indicar a localização do grupo cetônico e da dupla ligação. Para identificação desta depsidona será considerado que o grupo ceto esteja na posição $C1''$ como o ácido lobárico. Assim, como já foram descritas as depsidonas isômeras: ácido $2''$ -eno lobárico, ácido $3''$ -eno lobárico e ácido $4''$ -eno lobárico, propomos que a dupla ligação dessa nova substância esteja na cadeia alquílica do anel B, podendo ser um dos seguintes ácidos: $1'''$ -eno lobárico, $2'''$ -eno lobárico, $3'''$ -eno lobárico ou o $4'''$ -eno lobárico, mostradas na **Figura 30**. A **Figura 31** ilustra a proposta para formação dos fragmentos para esses ácidos. Não foi possível, no momento, definir a estereoquímica da dupla ligação.

Sendo assim, provavelmente existem dois isômeros coeluído no pico 5:

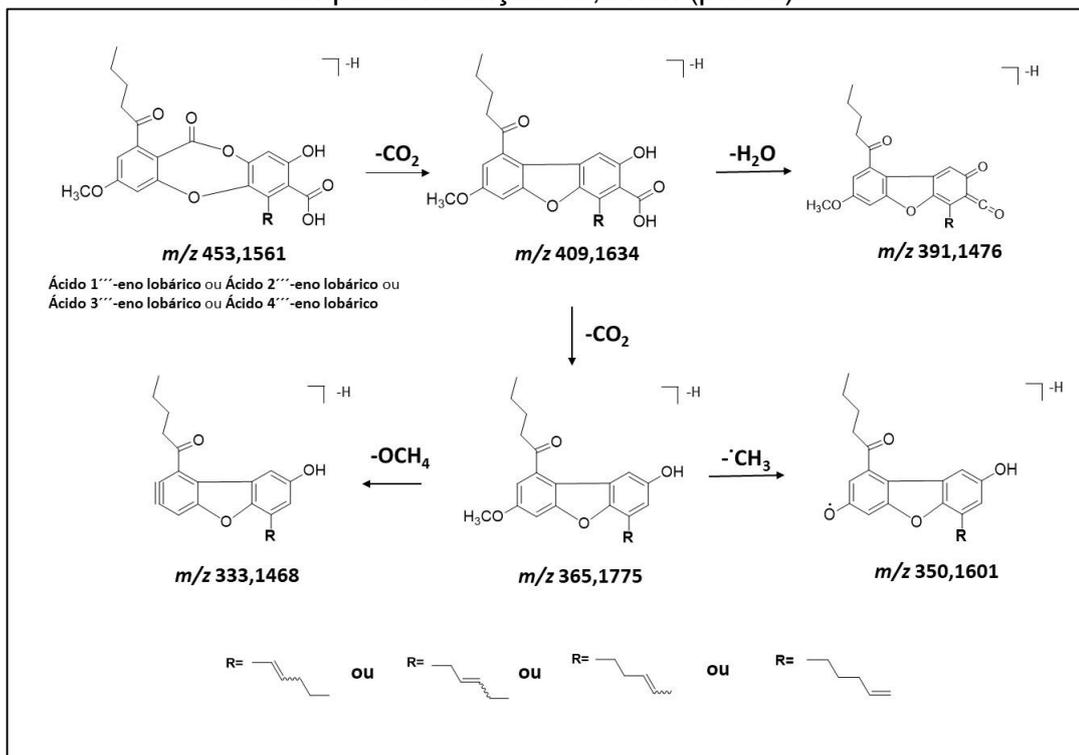
- ✓ **um depsídeo:** o ácido $1''$ -oxo - eno'', -eno'' perlatólico ou ácido - eno'', -eno'' miríquidico ou ácido - eno'', -eno'' glomeliférico;
- ✓ **uma depsidona:** o ácido $1'''$ -eno lobárico, ou o ácido $2'''$ -eno lobárico, ou o ácido $3'''$ -eno lobárico ou o ácido $4'''$ -eno lobárico.

Figura 30 - Possíveis estruturas da depsidona eluída no pico 5
(Fórmula $C_{25}H_{26}O_8$)



Fonte: própria autoria.

Figura 31 - Proposta de fragmentação da depsidona eluída com tempo de retenção 48,5 min (pico 5).

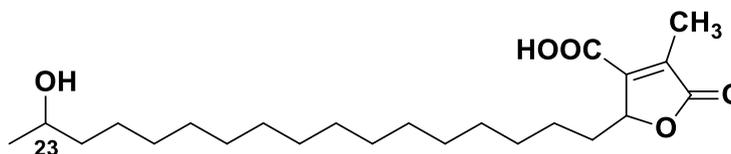


Fonte: própria autoria.

As substâncias eluídas nos **picos 5, 6, 7 e 8** apresentam estruturas próximas ao ácido lobárico e devem apresentar comportamento cromatográfico semelhante a este ácido, podendo então corresponder às manchas sobrepostas ao ácido lobárico, comentadas anteriormente, quando da interpretação dos resultados da CCD dos extratos acetônicos do grupo de espécimes de *Stereocaulon* em estudo.

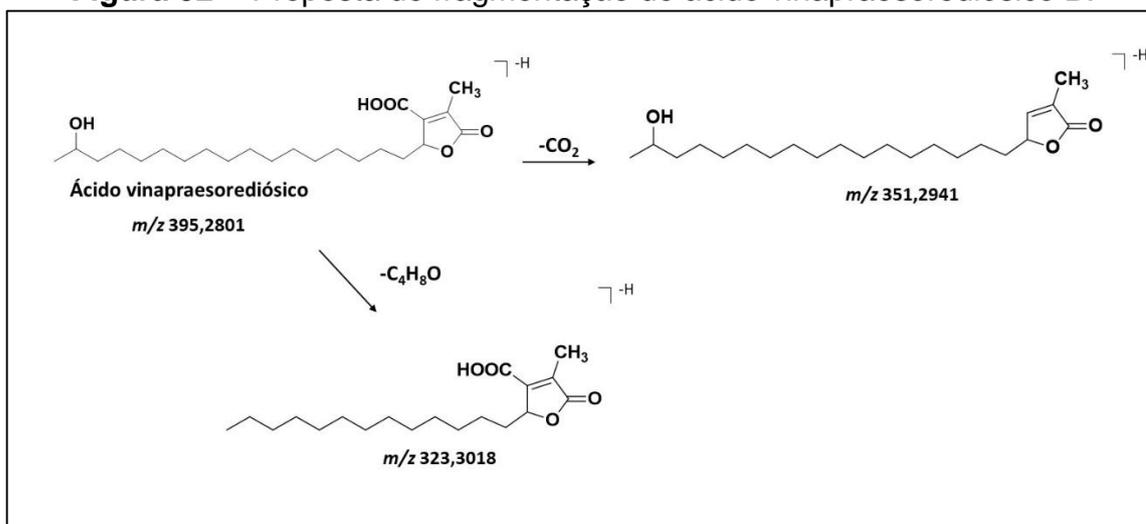
A substância eluída no pico **10** apresentou $[M-H]^-$ de m/z 373,0934 e fórmula $C_{19}H_{17}O_8$ (**tabela 2**). A fragmentação EM/EM levou aos fragmentos de m/z 195,0672 $[M-C_9H_7O_4-H]^-$, m/z 177,0197 $[M-C_{10}H_{11}O_4-H]^-$ e m/z 163,0401 $[M-C_9H_7O_4-CH_3OH-H]^-$. Esses fragmentos confirmam a estrutura do depsídeo atranorina. O padrão de fragmentação da atranorina já foi apresentado na análise do extrato acetônico de líquens do **grupo I** representada na (**Figura 15**).

A substância eluída no pico **11** apresentou $[M-H]^-$ de m/z 395,2801 de fórmula $C_{23}H_{39}O_5$ (**tabela 2**). Essa substância foi identificada como o ácido vinapraesorediósico B, que é um ácido graxo lactonizado com 17 átomos de carbono na cadeia saturada alifática.



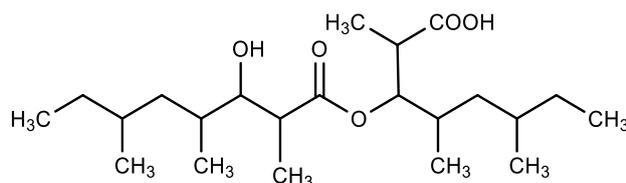
Ácido vinapraesorediósico B
Fórmula Molecular: $C_{23}H_{40}O_5$

Os fragmentos m/z 351,2941 $[M-CO_2-H]^-$ e m/z 323,3018 $[M-C_4H_8O-H]^-$ confirmaram sua estrutura. A proposta para formação desses fragmentos é indicada na **Figura 32**.

Figura 32 - Proposta de fragmentação do ácido vinapraesorediósico B.

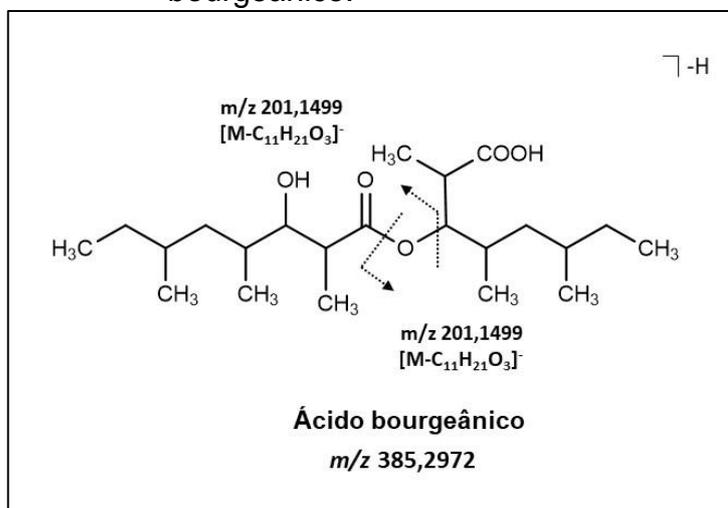
Fonte: própria autoria.

No pico **12** foi eluída uma substância com $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 385,2972 de fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{O}_5$ (**tabela 2**) identificada como o ácido bourgeânico.



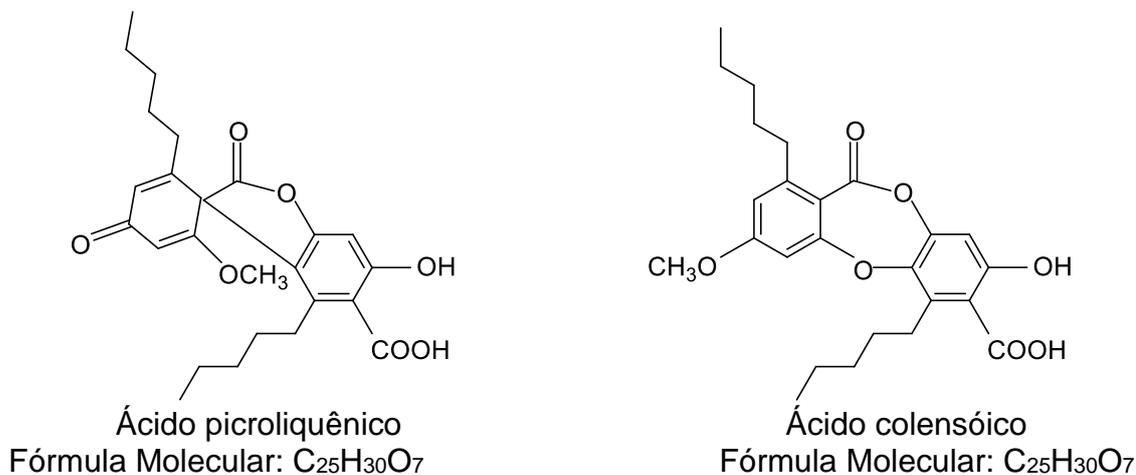
Ácido bourgeânico

O fragmento observado de m/z 201,1499 confirma sua estrutura e é formado através da quebra da ligação éster, como é indicado na **Figura 33**.

Figura 33 - Proposta de fragmentação do ácido bourgeânico.

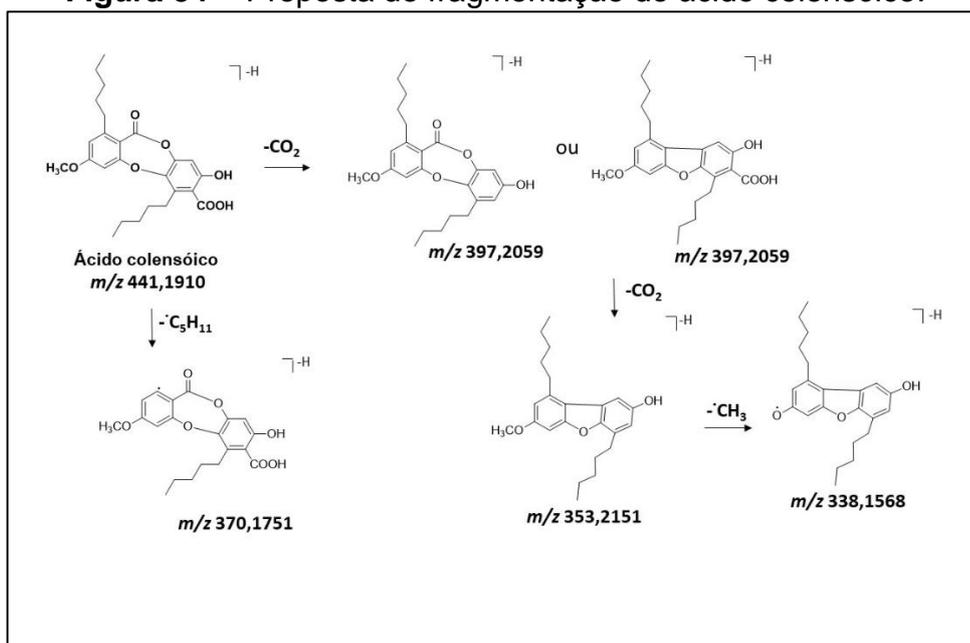
Fonte: própria autoria.

No pico **13** foi eluída uma substância que apresentou íon molecular desprotonado de m/z 441,1910 ($C_{25}H_{29}O_7$). Esta fórmula corresponde à duas substâncias, o ácido colensóico e o ácido picroliquênico.



Porém, observando os fragmentos (**pico 13 - tabela 2**), é provável que os fragmentos de m/z 397,2059 $[M-CO_2-H]^-$, m/z 370,1751 $[M-C_5H_{12}-H]^-$, m/z 353,2151 $[M-2CO_2-H]^-$ e m/z 338,1868 $[M-2CO_2-CH_3-H]^-$ m/z 353 $[M-2CO_2-H]^-$ e m/z 338 $[M-2CO_2-CH_3-H]^-$ sejam formados a partir do ácido colensóico, como mostra a **Figura 34**. O ácido picroliquênico não gera os fragmentos de m/z 353 e 338, pois envolvem a perda de duas moléculas de CO_2 . Assim, a substância eluída no **pico 13** é o ácido colensóico.

Figura 34 - Proposta de fragmentação do ácido colensóico.



Fonte: própria autoria.

Tabela 2 - Dados de CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de *Stereocaulon* representativos do grupo II (continua).

Pico	Tempo de Retenção (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Íon (s) - Fragmento (s) MS/MS (m/z)	Identificação da Substância	Estrutura química
1	32,7	269,0453	C ₁₅ H ₉ O ₅	197,0602 (C ₁₃ H ₉ O ₂)	Estrepsilina	
2	43,9	473,1821	C ₂₅ H ₂₉ O ₉	429,1908 (C ₂₄ H ₂₉ O ₇) 411,1809 (C ₂₄ H ₂₇ O ₆) 383,1851 (C ₂₃ H ₂₇ O ₅) 251,0920 (C ₁₃ H ₁₅ O ₅) 239,0903 (C ₁₂ H ₁₅ O ₅)	Lobarina	
3	45,5	467,0974	C ₂₄ H ₁₉ O ₁₀	317,0672 (C ₁₆ H ₁₃ O ₇) 167,0359 (C ₈ H ₇ O ₄) 149,0262 (C ₈ H ₅ O ₃)	Ácido girofórico	
4	47,5	441,1551	C ₂₄ H ₂₅ O ₈	397,1632 (C ₂₃ H ₂₅ O ₆) 369,1761 (C ₂₂ H ₂₅ O ₅) 353,1536 (C ₂₂ H ₂₅ O ₄) 329,1728 (C ₂₀ H ₂₅ O ₄)	Oxisifulina	

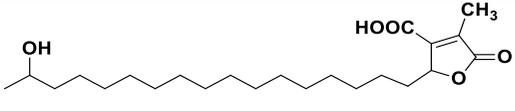
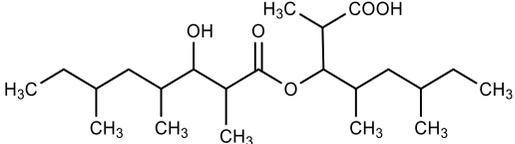
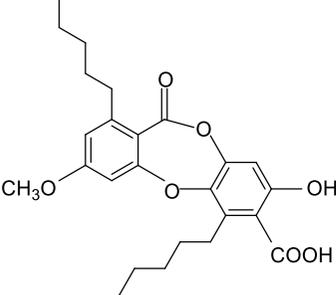
Tabela 2 - Dados de CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de *Stereocaulon* representativos do grupo II (continua).

Pico	Tempo de Retenção (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Íon (s) - Fragmento (s) MS/MS (m/z)	Identificação da Substância	Estrutura química
5	48,5	453,1561	C ₂₅ H ₂₅ O ₈	409,1634 (C ₂₄ H ₂₅ O ₆) 391,1476	Ácido 1-''oxo-eno'', -eno'' perlatólico ou Ácido -eno'' -eno'' glomeliférico ou Ácido -eno'' -eno'' miríquidico	
				377,1384 (C ₂₃ H ₂₁ O ₅) 365,1775 (C ₂₃ H ₂₅ O ₄) 350,1601 333,1468 (C ₂₂ H ₂₁ O ₃) 231,0656 (C ₁₃ H ₁₁ O ₄) 193,0861 (C ₁₁ H ₁₃ O ₃) 165,0921 (C ₁₀ H ₁₃ O ₂)		
6	50,2	453,1556	C ₂₅ H ₂₅ O ₈	409,1663 (C ₂₄ H ₂₅ O ₆) 382,1416 365,1775 (C ₂₃ H ₂₅ O ₄) 350,1537 294,0952 (C ₁₁ H ₁₇ O ₉)	Ácido 2''-eno lobárico	
7	50,5	453,1544	C ₂₅ H ₂₅ O ₈	409,1663 (C ₂₄ H ₂₅ O ₆) 365,1775 (C ₂₃ H ₂₅ O ₄) 382,1416 350,1537	Ácido 3''-eno lobárico	

Tabela 2 - Dados de CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de *Stereocaulon* representativos do grupo II (continua).

Pico	Tempo de Retenção (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Íon (s) - Fragmento (s) MS/MS (m/z)	Identificação da Substância	Estruturas química
8	50,8	453,1566	C ₂₅ H ₂₅ O ₈	409,1663 (C ₂₄ H ₂₅ O ₆) 365,1775 (C ₂₃ H ₂₅ O ₄) 382,1416 350,1537	Ácido 4''-eno lobárico	
9	52,0	455,1661	C ₂₅ H ₂₇ O ₈	411,1808 (C ₂₄ H ₂₇ O ₆) 393,1707 (C ₂₄ H ₂₅ O ₅) 384,1562 367,1920 (C ₂₃ H ₂₇ O ₄) 352,1697 339,1852 (C ₁₈ H ₂₇ O ₆) 309,1156 (C ₁₉ H ₁₇ O ₄) 296,1067 281.0824 (C ₁₇ H ₁₃ O ₄)	Ácido lobárico	
10	52,7	373,0934	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	195,0672 (C ₁₀ H ₁₁ O ₄) 177,0197 (C ₉ H ₅ O ₄) 163,0401 (C ₉ H ₇ O ₃)	Atranorina	

Tabela 2 - Dados de CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de *Stereocaulon* representativos do grupo II (conclusão).

Pico	Tempo de Retenção (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Íon (s) – Fragmento (s) MS/MS (m/z)	Identificação da Substância	Estruturas química
11	54,1	395,2801	C ₂₃ H ₃₉ O ₅	351,2941 (C ₂₂ H ₃₉ O ₃) 323,3018 305,2867 (C ₂₁ H ₃₇ O) 291,2684 (C ₂₀ H ₃₅ O)	Ácido vinapraesorediósico B	
12	56,2	385,2972	C ₂₂ H ₄₁ O ₅	201,1499 (C ₁₁ H ₂₁ O ₃)	Ácido bourgeânico	
13	56,3	441,1910	C ₂₅ H ₂₉ O ₇	397,2059 (C ₂₄ H ₂₉ O ₅) 370,1751 353,2151 (C ₂₃ H ₂₉ O ₃) 338,1868 295,1360 (C ₁₉ H ₁₉ O ₃) 267,1035 (C ₁₇ H ₁₅ O ₃)	Ácido colensóico	

Fonte: própria autoria.

As análises por microcristalização e cromatografia em camada delgada permitiram identificar a atranorina (**pico 10**) e o ácido lobárico (**pico 9**) no extrato acetônico de espécimes do **grupo II**. A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indicou sinais compatíveis à essas substâncias.

Na microcristalização, as demais substâncias contidas no extrato não foram observadas seja pela baixa concentração ou por não cristalizarem nos meios utilizados. A estrepsilina (**pico 1**), a lobarina (**pico 2**), o ácido girofórico (**pico 3**), a oxisifulina (**pico 4**), o depsídeo ácido 1''-oxo -eno'' -eno''' perlatólico ou ácido -eno'' -eno''' glomeliférico ou ácido -eno'' -eno''' miríquidico, as depsídonas ácido 2''-eno lobárico, ácido 3''-eno lobárico, ácido 4''-eno lobárico e ácido -eno''' lobárico (**picos 5, 6, 7 e 8**), os ácidos vinapresorediósico (**pico 11**), bourgeânico (**pico 12**) e o ácido colensóico (**pico 13**) não foram identificados nos cromatogramas (CCDs) seja porque apresentam valores de Rf próximos ao do ácido lobárico ocorrendo sobreposição das manchas, seja pela não revelação de algumas dessas substâncias devido à baixa proporção de algumas delas no extrato.

A análise dos cromatogramas de pico base obtidos por CLAE-DAD-EM dos extratos deste grupo (**Figura 22**) permite identificar três grupos químicos bastantes semelhantes entre si, diferindo na presença/ ausência da estrepsilina e/ou do ácido vinapresorediósico B:

Grupo químico A: contendo estrepsilina (**pico 1**), lobarina (**pico 2**), ácido girofórico (**pico 3**), oxisifulina (**pico 4**), ácido 1''-oxo -eno'' -eno''' perlatólico ou ácido -eno'' -eno''' glomeliférico ou ácido -eno'' -eno''' miríquidico, -eno'' lobárico, -eno''' lobárico (**picos 5, 6, 7, 8**), ácido lobárico (**pico 9**), atranorina (**pico 10**), ácido bourgeânico (**pico 12**), ácido colensóico (**pico 13**);

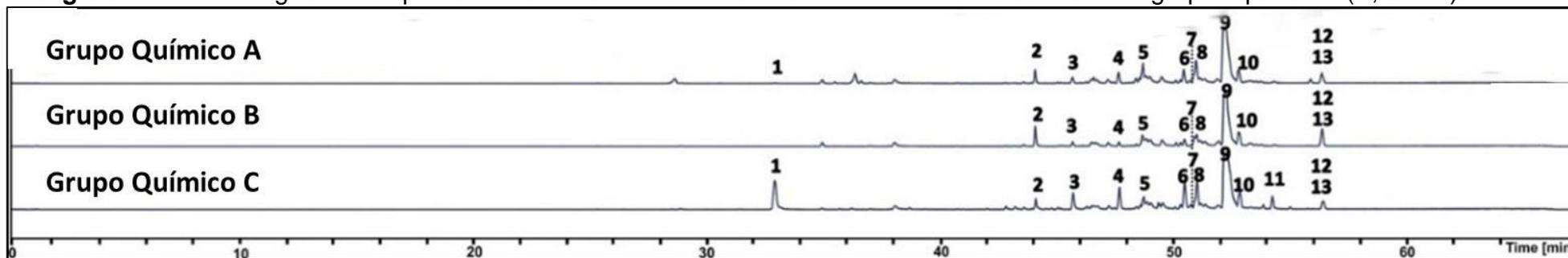
Grupo químico B: contendo lobarina (**pico 2**), ácido girofórico (**pico 3**), oxisifulina (**pico 4**), ácido 1''-oxo -eno'' -eno''' perlatólico ou ácido -eno'' -eno''' glomeliférico ou ácido -eno'' -eno''' miríquidico, -eno'' lobárico, -eno''' lobárico (**picos 5, 6, 7, 8**), ácido lobárico (**pico 9**), atranorina (**pico 10**), ácido bourgeânico (**pico 12**), ácido colensóico (**pico 13**);

Grupo químico C: contendo estrepsilina (**pico 1**), lobarina (**pico 2**), ácido girofórico (**pico 3**), oxisifulina (**pico 4**) ácido 1''-oxo -eno'' -eno''' perlatólico ou ácido -eno'' -eno''' glomeliférico ou ácido -eno'' -eno''' miríquidico, -eno'' lobárico, -eno''' lobárico (**picos 5, 6, 7, 8**), ácido lobárico (**pico 9**), atranorina (**pico 10**), ácido

vinapraesorediósico B (**pico 11**), ácido bourgeânico (**pico 12**), ácido colensóico (**pico 13**).

A **Figura 35** mostra os três grupos químicos dos extratos acetônicos de *Stereocaulon* do **grupo II**, a partir dos cromatogramas de pico base obtidos por CLAE-DAD-EM.

Figura 35 - Cromatogramas de pico base dos extratos acetônicos de *Stereocaulon* indicando três grupos químicos (A, B e C).



Fonte: própria autoria.

A lobarina (**pico 2**), ácido girofórico (**pico 3**), oxisifulina (**pico 4**), ácido 1''-oxo-eno'' -eno''' perlatólico ou ácido -eno'' -eno''' glomeliférico ou ácido -eno'' -eno''' miríquidico, -eno'' lobárico, -eno''' lobárico (**picos 5, 6, 7, 8**), ácido lobárico (**pico 9**), atranorina (**pico 10**), ácido bourgeânico (**pico 12**) e o ácido colensóico (**pico 13**) estão presentes nas cinco exsicatas analisadas (CGMS 61833, 61337, 61351, 61306, 61835).

A partir das informações sobre a composição química e da análise morfológica as 71 exsicatas desse grupo, foram identificadas a nível de espécie e separadas em grupos químicos: *Stereocaulon alpinum* (3 grupos químicos – A, B e C), *Stereocaulon melanopotamicum* (1 grupo químico – B) e *Stereocaulon implexum* (1 grupo químico – B).

Segue abaixo, a identificação das exsicatas, com sua respectiva composição química, local de coleta, número de coletor e número de herbário (CGMS).

Stereocaulon alpinum Laurer. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo químico A - strepsilin, lobarin, gyrophoric acid, oxysiphulin, lobaric 2''-en, lobaric 3''-en, and lobaric 4''-en acids, lobaric en''' acid, 1''-oxo -en'' -en''' perlatolic acid or -en'' -en''' glomelliferic acid or -en'' -en''' miriquidic acid, lobaric acid, atranorin, bourgeanic acid colensoic acid. Specimens analyzed collected in Cievo Point (Primavera base surrounding, Argentina) ASPA 134, Antarctica: M.C. Scur 750 (CGMS 61337), 64°5'36.35''S, 60°34'27.34''W. Danco Coast, Cievo Point, Musgo Island, Antarctica: M.C. Scur 843 (CGMS 61351), 64°10'3.50''S, 61°2'48.50''W.

Stereocaulon alpinum Laurer. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo químico B - lobarin, gyrophoric acid, oxysiphulin, lobaric 2''-en, lobaric 3''-en, and lobaric 4''-en acids, lobaric en''' acid, 1''-oxo -en'' -en''' perlatolic acid or -en'' -en''' glomelliferic acid or -en'' -en''' miriquidic acid, lobaric acid, atranorin, bourgeanic acid and colensoic acid. Specimens analyzed collected in South Shetland Islands, King George Island, Keller peninsula, Antarctica: A.A. Spielmann 488 (CGMS 80157), 62°04'40.5''S, 58°25'25.5''W. Collected in South Shetland Islands, Livingston Island, Byers Peninsula, Antarctica: A.A. Spielmann 3419 (CGMS 80158), 62°40'18.7''S, 61°06'18.1''W; Spielmann 3523, 3722 (CGMS 80159, 80161), 62°40'19.3''S, 61°06'23.9''W; A.A. Spielmann 3878 (CGMS 80162), 62°40'23.9''S, 61°06'44.2''W; A.A. Spielmann 3933 and 4664 (CGMS 80163, 80166), 62°40'20.6''S, 61°06'28.9''W; Spielmann 4019 and 4040 (CGMS 80164, 80165), 62°40'16.6''S, 61°06'20.8''W. Collected in South Shetland Islands, King George Island, Admiralty

Bay, Antarctica: A.A. Spielmann 5178 and 12178 (CGMS 80167, 80171), 62°10'45.2''S, 58°26'54.1''W. Collected in South Shetland Islands, King George Island, Potter Peninsula Stranger Point, Antarctica: A.A. Spielmann 7405 (CGMS 80169), 62°15'29.5''S, 58°36'51.6''W. Collected in South Shetland Island Deception Island, Operantar XXIX, Antarctica: A.A. Spielmann 9200 (CGMS 80170), 62°59'18.56''S, 60°40'0.06''W. Collected in Tierra del Fuego, Chile: A.A. Spielmann 12530 (CGMS 80174), 54°48'43.10''S, 68°32'23.40''W; A.A. Spielmann 12614, 12659 and 12689 (CGMS 80175, 80176, 80177), 54°49'8.27''S, 68°30'36.22''W. Collected in Point 32, Elephant Point, Livingston Island, South Shetlands, Antarctica: A.P. Lorenz-Lemke 270 (CGMS 61803), 62°41'09.6''S, 60°51'38.5''W. Collected in Point 43, Spark Point, Greenwich Island, South Shetland, Antarctica: A.P. Lorenz-Lemke 432 and 433 (CGMS 61821 and 61822), 62°26'43.5''S, 59°44'09.5''W. Collected in Rip Point, Nelson Island, South Shetlands, Antarctica: A.P. Lorenz-Lemke 784 (CGMS 61836), 62°14'26.8''S, 58°58'45.8''W. Collected in Hennequin Point, King George Island, South Shetlands, Antarctica: C. Bernardo 500, 502 and 504 (CGMS 80178, 80179, 80181), 62°7'17.58''S, 58°23'39.06''W. Collected in Peninsula Marton, King George Island, South Shetland, Antarctica: C. Bernardo 503 (CGMS 80180), 62°4'18.42''S, 58°22'27.30''W. Collected in Ardley Island, Antarctica: Diogo 153 and 166 (CGMS 80182, 80183), 62°12'49.5''S, 58°56'22.3''W. Collected in Refugio 2 Keller Peninsula, King George Island, South Shetlands, Antarctica: M. C. Scur 26 and 28 (CGMS 61294 and 61295), 62°04'00.8''S, 58°24'59.7''W; M.C.Sur 39 (CGMS 61296), 62°04'25.7''S, 58°24'46.4''W. Collected in Ullmam Point, Keller Peninsula, King George Island, South Shetlands, Antarctica: M.C. Scur 165 and 194 (CGMS 61301 and 61303), 62°04'49.1''S, 58°21'06.8''W. Collected in Cievo Point (Primavera base surrounding, Argentina) ASPA 134, Antarctica: M.C. Scur 757 (CGMS 61338), 64°5'36.35''S, 60°34'2.34''W; M.C. Scur 836 (CGMS 61347), 64°9'34.301''S, 60°56'10.9''W. Collected in Tierra del Fuego National Park, Cerro Guanaco, upper part, exposed site TFA17, Argentina: M.J. Kitaura 4055 and 4056 (CGMS 61857 and 61858), 54°49'06.50''S, 68°30'37.70''W. Collected in Tierra del Fuego National Park, Cerro Ganaco, part with undergrowth, TFA18, Argentina: M. J. Kitaura 4059, 4060, 4063, 4067 and 4069 (CGMS 61859, 61860, 61861, 61862 and 61863), 54°49'08.52''S, 68°30'35.04''W. Collected in Tierra del Fuego National Park, Cerro Guanaco, high part, left peak at the end of the trail, TFA30, Argentina: M; J. Kitaura 4149 (CGMS 61873), 54°48'38.05''S, 68°32'28.60''W. Collected in Tierra del Fuego National Park, Cerro

Guanaco, high part, base of the left hill, TFA29, Argentina: M. J. Kitaura 4150 (CGMS 61874), 54°48'38.05"S, 68°32'28.60"W. Collected in Antarctica: N.M. Koch 5172 (CGMS 80184), 62°27'36.2"S, 59°30'32.0"W. Collected in Shetland Islands, Antarctica: T. D. Barbosa 407, 423 and 462 (CGMS 80185, 80186, 80187), 62°7'12.78"S, 58°23'42.00"W; T.D. Barbosa 584 (CGMS 80188), 62°05'03.7"S, 57°56'59.9"W. Collected in Shetland Islands (Greenwich), Antarctica: T. D. Barbosa 609 (CGMS 80189), 62°26'40.25"S, 59°43'43.30"W. Collected in Shetland Islands (Punta Harmony): T.D.Barbosa 611, 612, 613 and 614 (CGMS 80190, 80191, 80192, 80193), 62°18'22.3"S, 59°11'55.3"W. Collected in Shetland Islands (Robert Island), Antarctica: T.D. Barbosa 615 (CGMS 80194) 62°27'36.2"S, 59°30'32.0"W. Collected in North Plateau, Stinker Point, Elephant Island, Antarctica: W.S. Fava 123 and 125 (CGMS 61249 and 61250), 61°13'13.0"S 55°22'16.8"W; W.S. Fava 262 (CGMS 61272), 61°12'53.4"S, 55°22'06.3"W. Collected in Ullmam Point, Keller Peninsula, King George Island, South Shetlands, Antarctica: M.C. Scur 193 (CGMS 61302), 62°04'49.1"S 58°21'06.8"W. Collected in South Shetland Islands, Livingston Island, Byers Peninsula, Antarctica: A.A. Spielmann 3602 (CGMS 80160), 62°40'19.3"S 61°06'23.9"W. Collected in South Shetland Islands, King George Island, Potter Peninsula, Stranger Point, Antarctica: A.A. Spielmann 7388 (CGMS 80168), 62°15'29.5"S, 58°36'51.6"W. Collected in Rip Point, Nelson Island, South Shetlands, Antarctica: A. P. Lorenz-Lemke 765 and 791 (CGMS 61832 and 61837), 62°14'26.8"S, 58°58'45.8"W. Collected in Cievo Point (Primavera base, Argentina) Danco Coast, Antarctica: M.C. Scur 206 (CGMS 61306), 64°09'50.6"S, 60°56'57.9"W.

Stereocaulon alpinum Laurer. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo químico C - strepsilin, lobarin, gyrophoric acid, oxysiphulin, lobaric 2''-en, lobaric 3''-en, and lobaric 4''-en acids, lobaric en''' acid, 1''-oxo -en'' -en''' perlatolic acid or -en'' -en''' glomelliferic acid or -en'' -en''' miriquidic acid, lobaric acid, atranorin, vinapraesorediosic acid B, bourgeanic acid and colensoic acid. Specimens analyzed collected in Rip Point, Nelson Island, South Shetlands, Antarctica: A. P. Lorenz-Lemke 767 (CGMS 61833), 62°14'26.8"S, 58°58'45.8"W and Rip Point, Nelson Island, South Shetlands, Antarctica: A. P. Lorenz-Lemke 782 (CGMS 61835), 62°14'26.8"S, 58°58'45.8"W.

Stereocaulon melanopotamicum I.M. Lamb. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico B- lobarin, gyrophoric acid, oxysiphulin, lobaric 2''-en, lobaric 3''-en, and lobaric 4''-en acids, lobaric en''' acid, 1''-

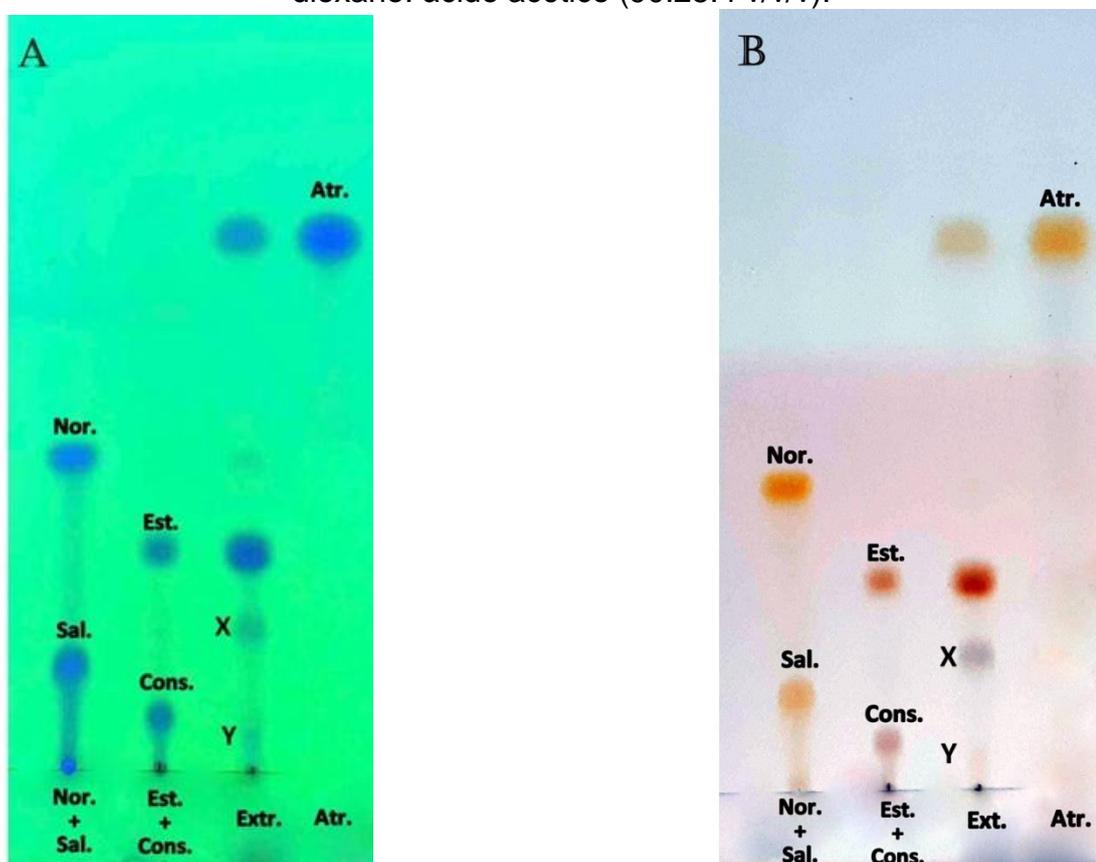
oxo -en'' -en''' perlatolic acid or -en'' -en''' glomelliferic acid or -en'' -en''' miriquidic acid, lobaric acid, atranorina, bourgeanic acid colensoic acid. Specimens collected in Tierra del Fuego National Park, close to the visitor center, Lapataia Bay, TFA31, Argentina: M.J. Kitaura 4166 (CGMS 61876), 54°50'41.42''S, 68°33'62.31''W. Tierra del Fuego National Parkm Lapataia river, TFA06, Argentina: M.J.Kitaura 3337 (CGMS 61844) 54°50'34.44''S, 68°34'05.52''W.

Stereocaulon implexum Th. Fr. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico B - lobarin, gyrophoric acid, oxysiphulin, lobaric 2''-en, lobaric 3''-en, and lobaric 4''-en acids, lobaric en''' acid, 1''-oxo -en'' -en''' perlatolic acid or -en'' -en''' glomelliferic acid or -en'' -en''' miriquidic acid, lobaric acid, atranorina, bourgeanic acid and colensoic acid. Specimens collected in Los Glaciares National Park, Cerro El Chatén, Desert Lake, PA05, Argentina: M.J. Kitaura 4228 (CGMS 61886), 49°04'20.74''S, 72°53'27.32''W. Collected in Torres del Paine Park, Gray Glacier lookout trail, PC01, Chile: M.J. Kitaura 4238 (CGMS 61889), 51°06'39.78''S, 73°06'43.95''W.

4.3 Grupo III - atranorina, ácidos estético, norstético, menegaziáico e hipoconstético.

Este grupo é representado por 52 (cinquenta e duas) exsiccatas de líquens. A **Figura 36** mostra o perfil cromatográfico de um extrato representativo do conjunto de amostras analisadas neste grupo juntamente com extratos de composição conhecida, contendo atranorina, ácido norstético, ácido salazínico, ácido estético e ácido constético, no eluente tolueno: dioxano: ácido acético (90:25:4 v/v/v).

Figura 36 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo III de *Stereocaulon* no eluente tolueno: dioxano: ácido acético (90:25:4 v/v/v).



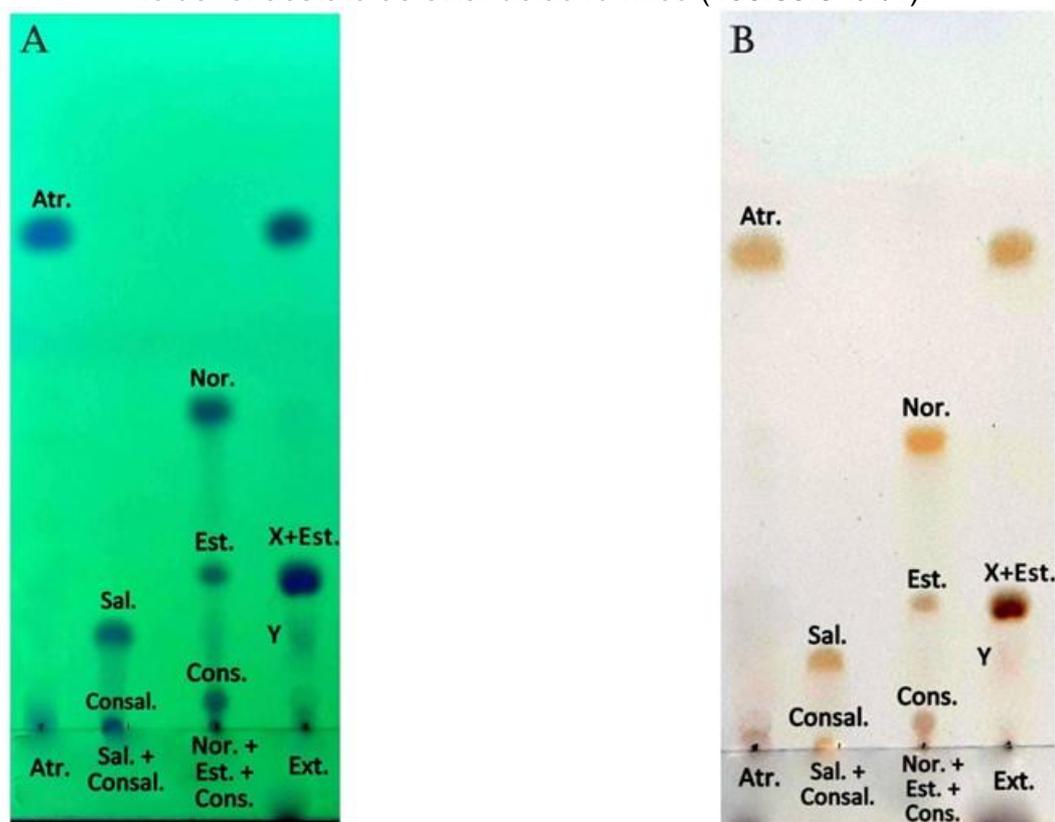
Fonte: própria autoria.

Visualização das manchas na luz Ultravioleta em 254 nm (A); revelação com ácido sulfúrico 10% em metanol e aquecimento até o completo aparecimento das manchas (B); Nor + Sal.: extrato contendo os ácidos norstético e salazínico; Est + Cons.: extrato contendo os ácidos estético e constético; Ext.: extrato acetônico de um espécime de *Stereocaulon* representativo do grupo III; Atr.: Atranorina. X: Substância X presente no extrato acetônico; Y: Substância Y presente no extrato acetônico.

A análise cromatográfica do extrato acetônico de *Stereocaulon* (**Figura 36**) indicou a presença de cinco manchas (**36A**), sendo três delas com comportamento cromatográfico compatíveis à atranorina, ao ácido norstítico e ao ácido estítico, além das manchas, X e Y. O ácido norstítico está presente em baixa concentração, assim só foi possível detectar a sua presença na revelação com luz UV.

O extrato acetônico de *Stereocaulon* foi recromatografado em outro eluente [tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (139:83:8 v/v/v)]. O cromatograma é mostrado na **Figura 37**. Observa-se neste cromatograma que X está migrando junto ao ácido estítico, e Y com Rf próximo ao do ácido salazínico.

Figura 37 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo III de *Stereocaulon* no eluente tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (139:83:8 v/v/v).



Fonte: própria autoria.

Visualização das manchas na luz Ultravioleta em 254 nm (A); revelação com ácido sulfúrico 10% em metanol e aquecimento até o completo aparecimento das manchas (B); Atr: Atranorina; Sal + Consal: extrato contendo os ácidos salazínico e consalazínico; Nor.+ Est. + Cons.: Extrato contendo os ácidos norstítico, estítico e constítico; Ext.: extrato acetônico de um espécime de *Stereocaulon* representativo do grupo III. X: Substância X presente no extrato acetônico; Y: Substância Y presente no extrato acetônico.

Os ácidos norstítico, estítico e salazínico são depsídonas que apresentam em sua estrutura um anel lactol. Além dessas, outras depsídonas lactonizadas são conhecidas. Visando identificar as substâncias X e Y nos cromatogramas deste **grupo III** foi elaborada uma compilação de dados da literatura referentes aos valores de R_f e cor apresentada por depsídonas lactonizadas, após revelação química (**tabela 3**).

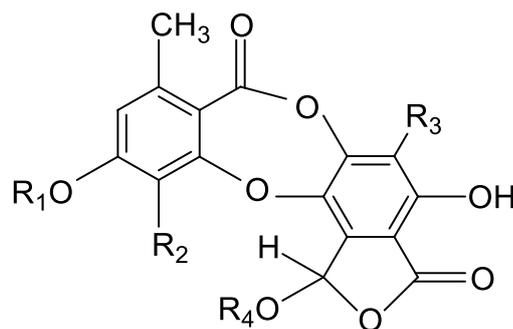


Tabela 3 - Valores de R_f e cor observada na revelação química de depsídonas com anel lactol.

Ácido	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R _f Eluente 1	R _f Eluente 2	Cor da Revelação*
α- acetilconstítico	CH ₃	CHO	CH ₂ - OCOCH ₃	H	16	23	laranja
α- acetilhipoconstítico	CH ₃	CH ₃	CH ₂ - OCOCH ₃	H	34	46	vermelho
α-acetilsalazínico	H	CHO	CH ₂ OCOCH ₃	H	29	40	laranja
conorstítico	H	CH ₂ OH	CH ₃	H	11	26	laranja
consalazínico	H	CH ₂ OH	CH ₂ OH	H	2	6	laranja
constítico	CH ₃	CHO	CH ₂ OH	H	7	9	marrom
criptoestítico	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	H	14	27	laranja
hipoconstítico	CH ₃	CH ₃	CH ₂ OH	H	15	28	vermelho
hiposalazínico	H	CH ₃	CH ₃	H	34	44	vermelho
hipostítico	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	50	61	vermelho
menegaziáico	CH ₃	OH	CH ₃	H	19	36	cinza
metilestítico	CH ₃	CHO	CH ₃	CH ₃	50	49	laranja
norstítico	H	CHO	CH ₃	H	40	57	amarelo
salazínico	H	CHO	CH ₂ OH	H	10	26	laranja
estítico	CH ₃	CHO	CH ₃	H	32	34	marrom
substítico	CH ₃	CHO	H	H	13	23	marrom

Fonte: adaptado de (HUNECK & YOSHIMURA, 1996 e ELIX, 2014).

1- Tolueno: dioxano: ácido acético (180:45:5 v/v/v); **2**- Tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (139:83:8 v/v/v); * ácido sulfúrico 10% e aquecimento.

Na **Figura 37B** a substância X mostrou cor acinzentada na revelação com ácido sulfúrico. Dentre as depsídonas citadas na **tabela 3**, apenas o ácido menegaziáico apresenta cor cinza após revelação com ácido e aquecimento.

No eluente tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (139:83:8 v/v/v), o ácido menegaziáico apresenta valor de R_f muito próximo ao valor do ácido estítico (36 e 34, respectivamente). A **Figura 37** mostra a CCD do extrato acetônico de *Stereocaulon* nesse eluente e observa-se a sobreposição das manchas correspondentes ao ácido estítico e a substância que revela cinza. Considerando o comportamento cromatográfico dessa substância (**Figuras 36 e 37**) é possível sugerir que a substância X seja o ácido menegaziáico.

A substância Y (**Figura 37**) mostra migração cromatográfica próxima àquela do ácido salazínico (padrão cromatográfico). Os ácidos criptoestítico, conorstítico e hipoconstítico apresentam valores de R_f próximos àquele do ácido salazínico no eluente considerado, entretanto, somente o ácido hipoconstítico revela com cor rosado/avermelhado. Dessa forma, comparando o perfil cromatográfico da substância Y, com os dados da **tabela 3**, é possível sugerir que Y seja o ácido hipoconstítico.

A análise da microcristalização do extrato acetônico de *Stereocaulon* em GAoT mostrou estruturas cristalinas características do depsídeo atranorina e da depsidona ácido estítico. As estruturas observadas de atranorina são iguais àquelas que já foram relatadas no **grupo I** conforme foi mostrado na **Figura 9A**. A **Figura 38** apresenta a foto dos cristais do ácido estítico cristalizado em GAoT.

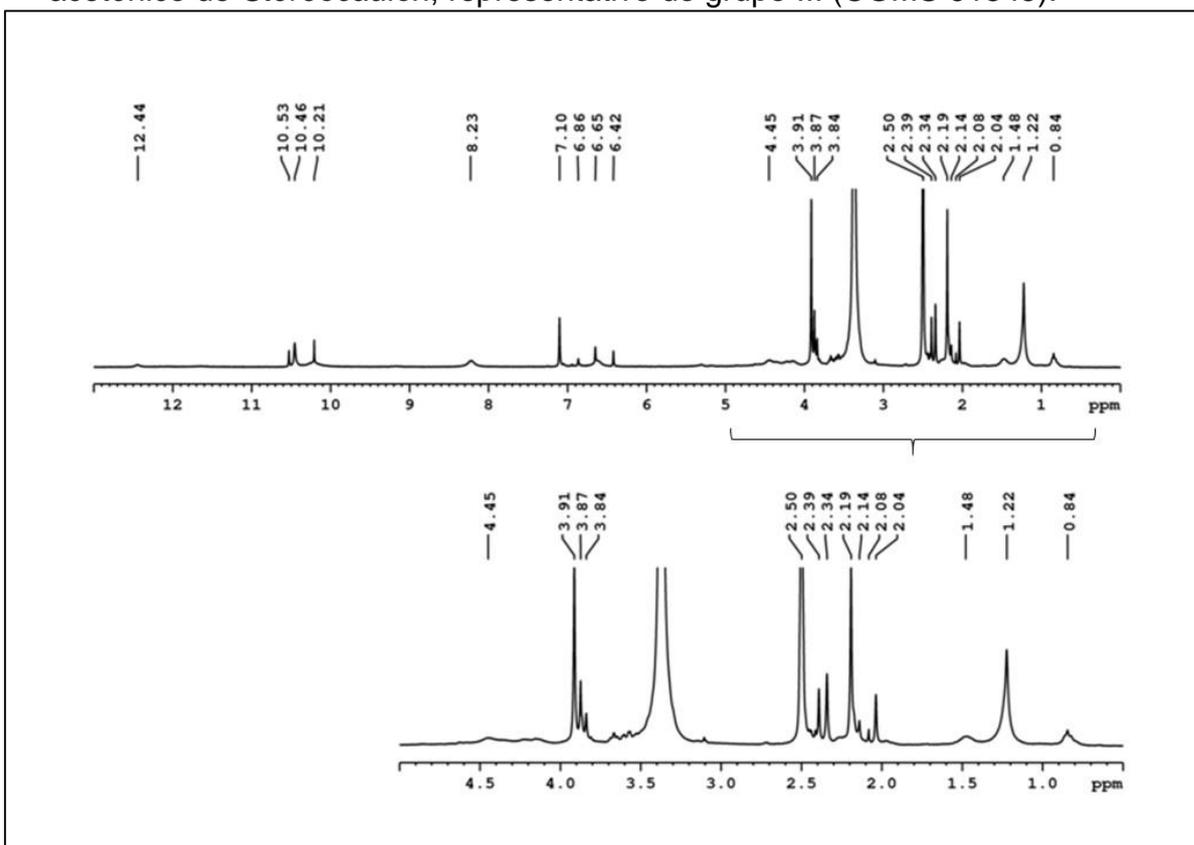
Figura 38 - Foto das formações cristalinas do ácido estítico observadas pela cristalização do extrato acetônico de líquens do grupo III em GAoT.



Fonte: própria autoria.

Foram obtidos espectros de RMN de ^1H (**Figura 39**) e ^{13}C (**Figuras 40**) do extrato acetônico de *Stereocaulon* do espécime analisado representativo do **grupo III** (CGMS 61845).

Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo III (CGMS 61845).

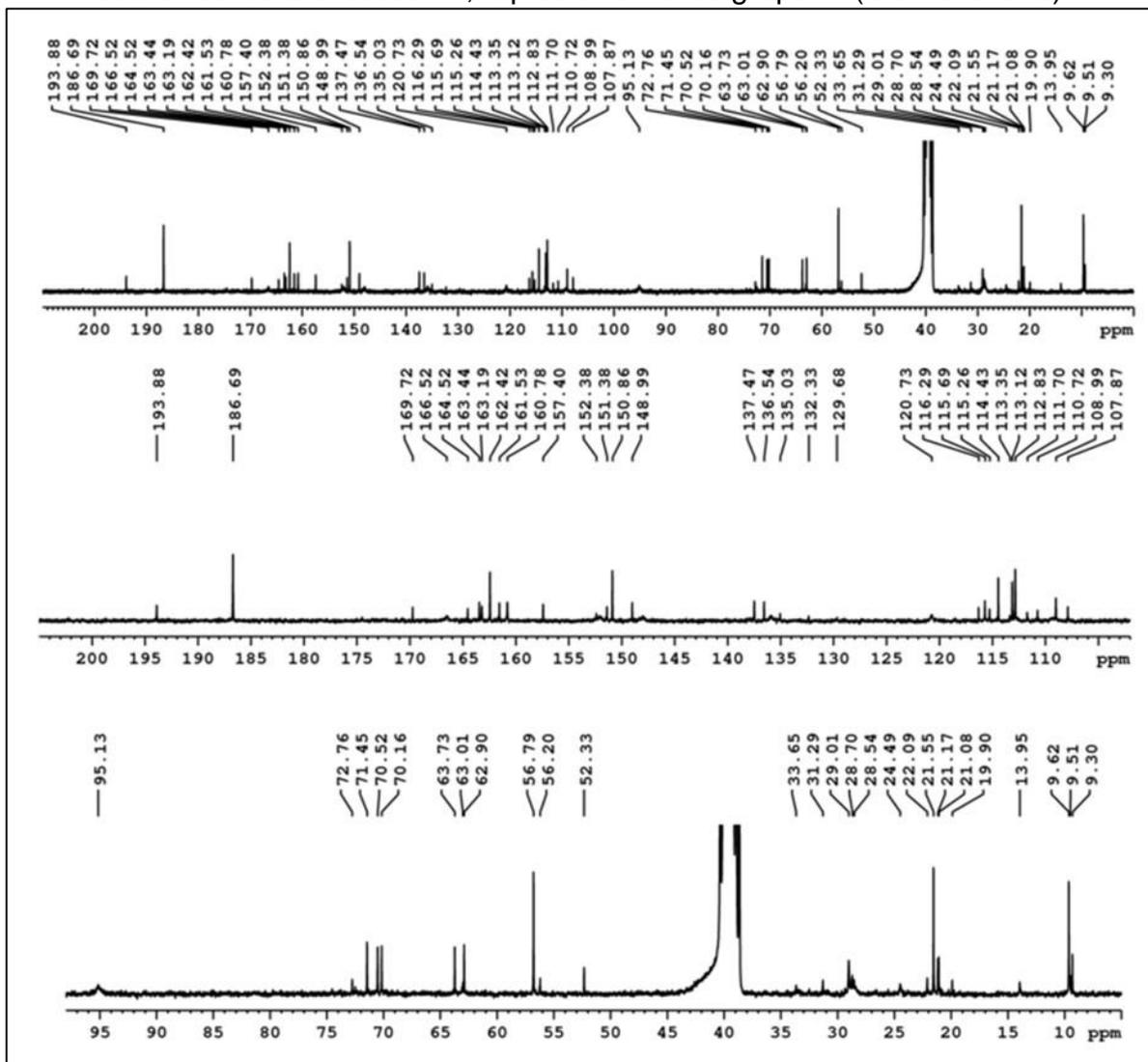


Fonte: própria autoria.

No espectro de ^1H (**Figuras 39**) observou-se um singlete alargado em 12,44 ppm, que pode ser de hidrogênio de hidroxila fenólica; três singletos próximos a 10 ppm (10,53 ppm, 10,46 ppm e 10,21 ppm) de prováveis hidrogênios aldeídicos ou fenólicos, além de um singlete alargado em 8,23 ppm, sugerindo a presença de hidroxila de anel lactol de depsidonas. Já na região intermediária do espectro foram observados quatro singletos em 7,10 ppm, 6,86 ppm, 6,65 ppm e 6,42 ppm. Na região mais blindada são encontrados além de um singlete em 4,45 ppm, três singletos em 3,91 ppm, 3,87 ppm e 3,84 ppm indicando metoxilas. Existem também seis sinais, todos singletos na região de 2,39 ppm, 2,34 ppm, 2,19 ppm, 2,14 ppm, 2,08 ppm, 2,04 ppm, podendo representar metilas ligadas a anel aromático, dois singletos em 1,48 ppm (sinal largo)

e 1,22 ppm sinalizando prováveis grupos metilênicos, além de um sinal que aparenta ser um multipeto em 0,85 ppm.

Figura 40 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo III (CGMS 61845).

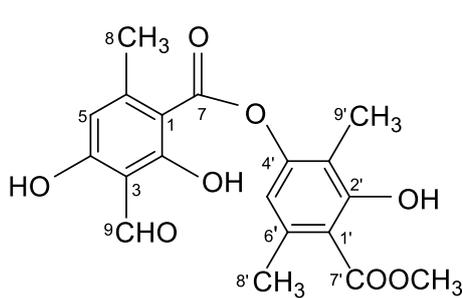


Fonte: própria autoria.

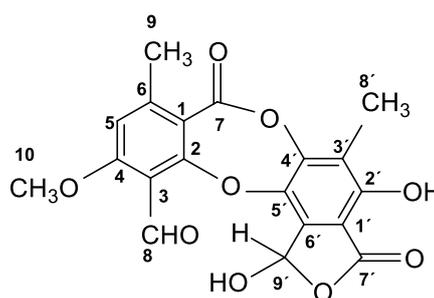
Os espectros de RMN de ^{13}C do extrato acetônico são mostrados na **Figura 40**. Observando o espectro a partir da região mais desblindada, é possível notar os sinais 193,9 ppm e 186,7 ppm, região típica de carbonilas de aldeídos. Em seguida, são observados sete sinais: 169,7 ppm, 166,5 ppm, 164,5 ppm, 163,4 ppm, 162,4 ppm, 161,5 ppm e 160,8 ppm que podem ser de carbonilas de ésteres, ácidos carboxílicos além de carbonos aromáticos. Na região de 157 ppm até 100 ppm, há um conjunto de vinte sinais. Todos esses sinais estão presentes em região de carbonos

aromáticos e/ou alcenos. O sinal 95,1 ppm pode ser de carbono ligado a um heteroátomo mais eletronegativo. Na faixa de 75 ppm a 50 ppm existem dez sinais que podem ser atribuídos a carbonos ligados a heteroátomo. Entre 35 ppm a 0 ppm encontra-se quinze sinais de prováveis carbonos de grupos alquila.

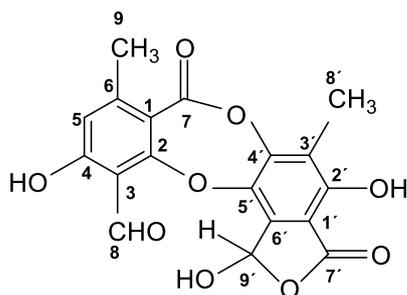
No espectro de RMN de ^1H (**Figura 39**) aparecem sinais que podem ser atribuídos a átomos presentes nas estruturas da atranorina e dos ácidos estítico, norstítico, menegaziáico e hipoconstítico. O espectro apresentou os sinais 10,53 ppm, 10,46 ppm e 10,21 ppm que podem ser atribuídos aos hidrogênios aldeídicos (H-8) da atranorina e dos ácidos norstítico e estítico. O singlete em 12,44 ppm pode ser atribuído a uma ou mais hidroxilas fenólicas e o sinal alargado em 8,23 é característico de hidroxila do anel lactol presente nessas depsidonas (C9' dos ácidos estítico, norstítico e menegaziáico). Os sinais 7,10 ppm, 6,86 ppm, 6,65 ppm e 6,42 ppm são atribuíveis aos H5 e H9' dos ácidos estítico (Est.), norstítico (Nor.) e menegaziáico (Men.) e H5 e H5' da atranorina (Atr.). Já os sinais 3,91 ppm, 3,87 ppm e 3,84 ppm são referentes aos hidrogênios das duas metoxilas (H10- Est. e Men.) e do éster metílico da atranorina. Os singletos 2,39 ppm, 2,34 ppm, 2,19 ppm, 2,14 ppm, 2,08 ppm, 2,04 ppm podem ser sinais das nove metilas ligadas ao anel aromático da atranorina e também dos ácidos estítico, norstítico e menegaziáico. O sinal em 4,45 ppm pode ser atribuído aos hidrogênios H8' do ácido hipoconstítico (mancha Y) e os sinais 1,22 ppm e 0,85 ppm pode ser de alguma cera presente no extrato.



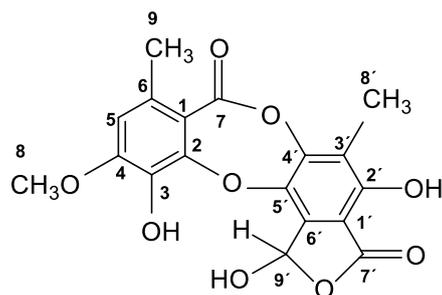
Atranorina



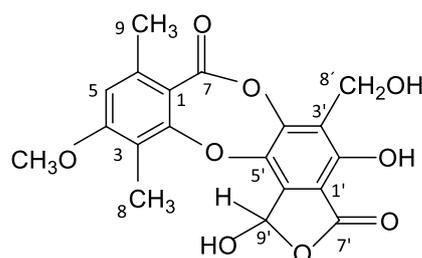
Ácido estítico



Ácido norstítico



Ácido menegaziáico



Ácido hipoconstítico

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 40**) também apresentou sinais compatíveis a átomos ou grupos ligados à estrutura da atranorina (Atr.) e aos ácidos estítico (Est.), norstítico (Nor.) e menegaziáico (Men.). Os sinais 193,9 ppm e 186,7 ppm podem ser atribuídos as carbonilas aldeídicas (C8 – Atr., Est. e Nor.). Já os sinais 169,7 ppm, 166,5 ppm, 164,5 ppm, 163,4 ppm, 162,4 ppm, 161,5 ppm e 160,8 ppm podem indicar as carbonilas de ésteres (C7 - Atr, Est., Nor. e Men.), (C7' - Est., Nor. e Men.) e dos carbonos aromáticos oxigenados (C2, C4, C2' – Atr e C2 e C4 – Est., Nor. e Men.).

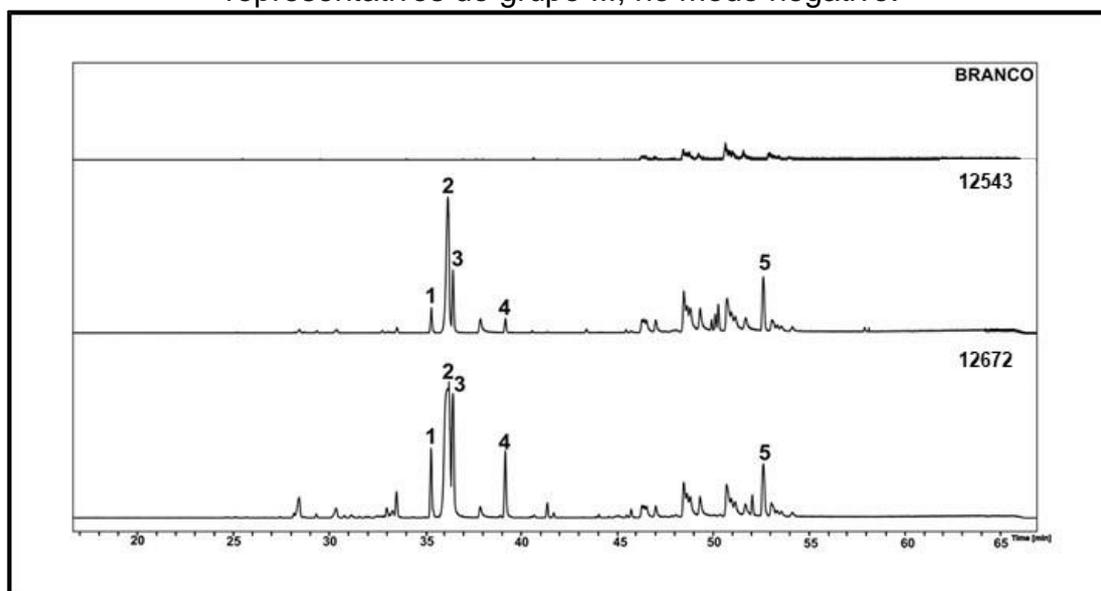
Os vinte sinais na região de 160 ppm até 100 ppm podem ser correspondentes aos carbonos aromáticos C1, C3, C4, C1', C3' - Est., Nor. e Men. e C1, C3, C1', C3', C5' - Atr). É possível que os sinais de alguns desses carbonos se sobreponham no espectro e/ou que apresentem sinal muito próximo ao ruído. O sinal em 95,1 ppm é atribuído a um ou mais carbonos de anel lactol (C9' - Est., Nor. e Men.), característicos de depsidonas que possuem esse grupo funcional na sua estrutura.

Os sinais 56,8 e 56,2 ppm podem ser atribuídos as metoxilas (C10- Est. e C8-Men.) e o 52,3 ppm do éster metílico (C10-Atr.). Na região, entre 35 ppm a 0 ppm, sete sinais (24,5; 22,1; 21,6; 21,2; 21,1; 9,6; 9,5 e 9,3 ppm) dos quinze presentes podem ser atribuídos as metilas ligadas aos anéis aromáticos (C9 e C8'-Atr., Est., Nor. e Men. e C9'-Atr.).

Nos extratos acetônicos de líquens do **grupo III** foi possível identificar, através da análise por CCD a atranorina, os ácidos estético, megaziáico, norstético e hipoconstético. A microcristalização confirmou o depsídeo atranorina e a depsidona ácido estético. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C apresentaram sinais compatíveis a atranorina e os ácidos ácido estético, megaziáico e norstético.

Os extratos acetônicos 12543 e 12672 foram analisados por CLAE-DAD-EM utilizando ionização eletrospray. Os cromatogramas obtidos estão representados na **Figura 41**.

Figura 41 - Cromatograma do pico base obtido por CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de *Stereocaulon* (A.A. Spielmann 12543 e 12672) representativos do grupo III, no modo negativo.



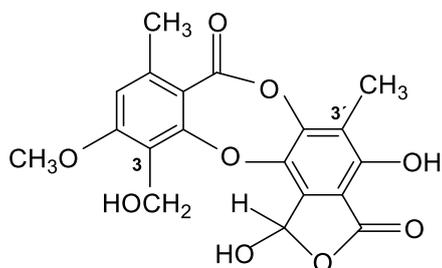
Fonte: própria autoria.

1-5 representam as substâncias dos extratos acetônicos analisados.

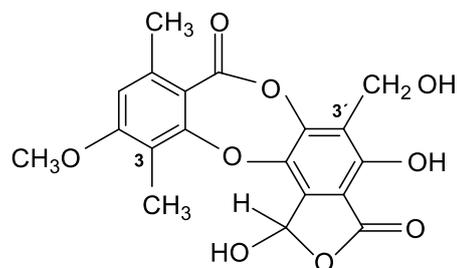
A análise dos cromatogramas aponta 5 substâncias no extrato acetônico de dois espécimes de *Stereocaulon*, os quais foram avaliados através dos dados espectrais de massas. Os cromatogramas (**Figura 41**) mostram que o extrato de dois espécimes de *Stereocaulon* apresentam os mesmos picos, portanto, apresentam a mesma composição, entretanto, diferem entre si com relação à proporção dos constituintes presentes.

No pico **1** foi eluída uma substância que apresentou $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 387,0730 de fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_9$ (**tabela 4**). Duas depsidonas apresentam essa mesma fórmula: os ácidos criptoestético e hipoconstético. A diferença estrutural destes ácidos se dá na posição dos grupos metila e hidroximetileno. No ácido criptoestético, o grupo

hidroximetila está ligado ao carbono na posição 3 e a metila (8') na posição 3', e no ácido hipoconstítico ocorre a inversão da localização desses dois grupos, o grupo hidroximetila está ligada na posição 3' e a metila no carbono 3.



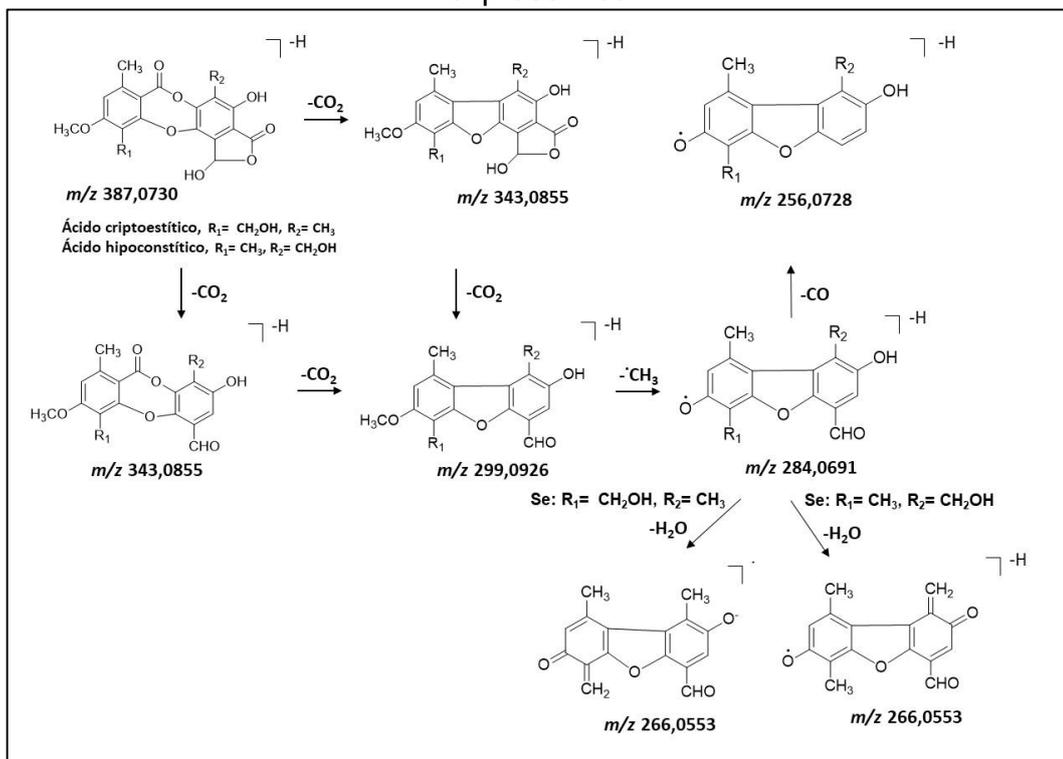
Ácido criptoestítico



Ácido hipoconstítico

A substância eluída no pico **1** apresentou os seguintes fragmentos de segunda ordem de m/z 343,0855 $[M-CO_2-H]^-$, m/z 299,0926 $[M-2CO_2-H]^-$, m/z 284,0691 $[M-2CO_2-CH_3-H]^-$, m/z 266,0553 $[M-2CO_2-CH_3-H_2O-H]^-$ e m/z 256,0728 $[M-2CO_2-CH_3-CO-H]^-$ (**tabela 4**). Esses fragmentos podem ter sido gerados tanto pelo ácido criptoestítico quanto pelo ácido hipoconstítico como mostra a **Figura 42**, não sendo possível identificar qual deles representa a substância eluída no pico **1**. Entretanto, a análise conjunta com os resultados observados na CCD, que apontam a presença do ácido hipoconstítico no extrato, reforçam a atribuição dessa depsidona à substância eluída no pico **1**.

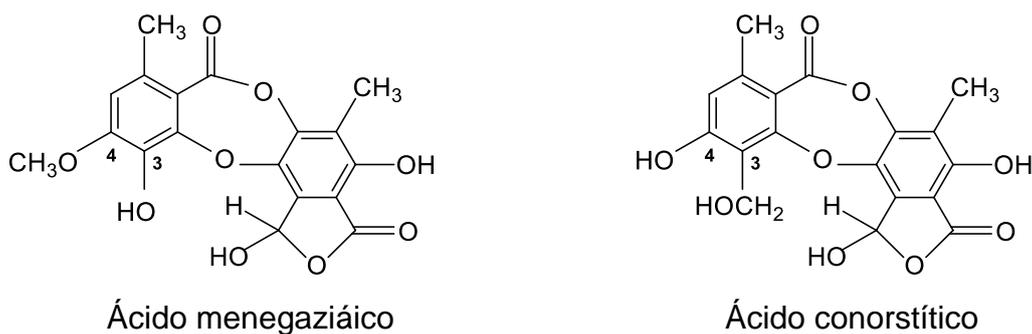
Figura 42 - Propostas de fragmentação dos ácidos hipocostístico e criptocostístico.



Fonte: própria autoria.

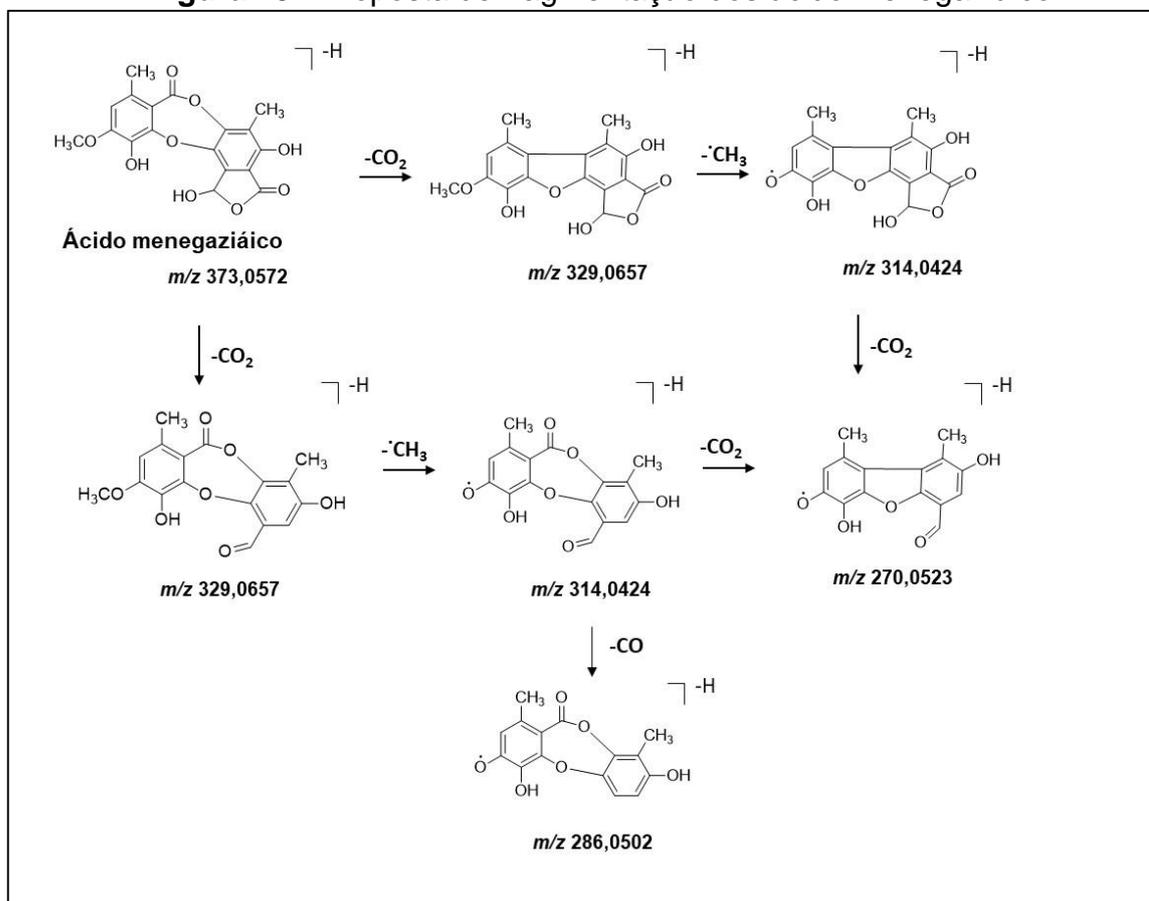
No pico **2** foi eluída uma substância de $[M-H]^-$ de m/z 385,0576 ($\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{O}_9$) que gerou fragmentos de segunda ordem de m/z 297,0766, m/z 282,0522, m/z 267,0305, m/z 254,0585 e m/z 238,0631 (**tabela 4**). O ácido estístico apresenta esta fórmula molecular ($\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_9$) e a análise dos fragmentos de m/z 297,0766 $[M-2\text{CO}_2-H]^-$, o de m/z 282,0522 $[M-2\text{CO}_2-\text{CH}_3-H]^-$ e o de m/z 267,0305 $[M-2\text{CO}_2-\text{OCH}_2-H]^-$ confirmaram sua estrutura (LE POGAM *et al.* 2015; TORRES-BENÍTEZ *et al.* 2017; KUMAR *et al.* 2018; SALGADO *et al.* 2018).

Uma substância de $[M-H]^-$ de m/z 373,0572 e fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{O}_9$ foi eluída no pico **3**. Além disso, apresentou os fragmentos de segunda ordem de m/z 329,0657, m/z 314,0424, m/z 299,0214, m/z 286,0502, m/z 270,0523 e m/z 255,0295 (**tabela 4**). Os ácidos conorstístico e menegaziáico são depsidonas que apresentam a mesma fórmula molecular de $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_9$. As diferenças estruturais se dão nos grupos ligados aos carbonos nas posições 3 e 4 de cada substância. O ácido menegaziáico apresenta um grupo hidroxila ligado ao carbono 3 e um grupo metoxila ligado ao carbono 4, enquanto o ácido conorstístico, apresenta o grupo hidroximetileno ligado ao carbono 3 e uma hidroxila na posição 4.



A análise dos fragmentos indica que os de m/z 329,0657 $[M-CO_2-H]^-$ e m/z 299,0214 $[M-CO_2-OCH_2-H]^-$ podem ter sido gerados tanto pelo ácido menegaziáico quanto pelo ácido conorstítico, porém os de m/z 314,0424 $[M-CO_2-CH_3-H]^-$, m/z 270,0523 $[M-2CO_2-CH_3-H]^-$ e m/z 286,0502 $[M-CO_2-CH_3-CO]^-$ envolvem a perda de uma metila, que provavelmente seja proveniente do grupo metoxila presente apenas no ácido menegaziáico o que permite indicar que a substância eluída no pico **3**, seja o ácido menegaziáico. A proposta de fragmentação do ácido menegaziáico é indicada na **Figura 43**.

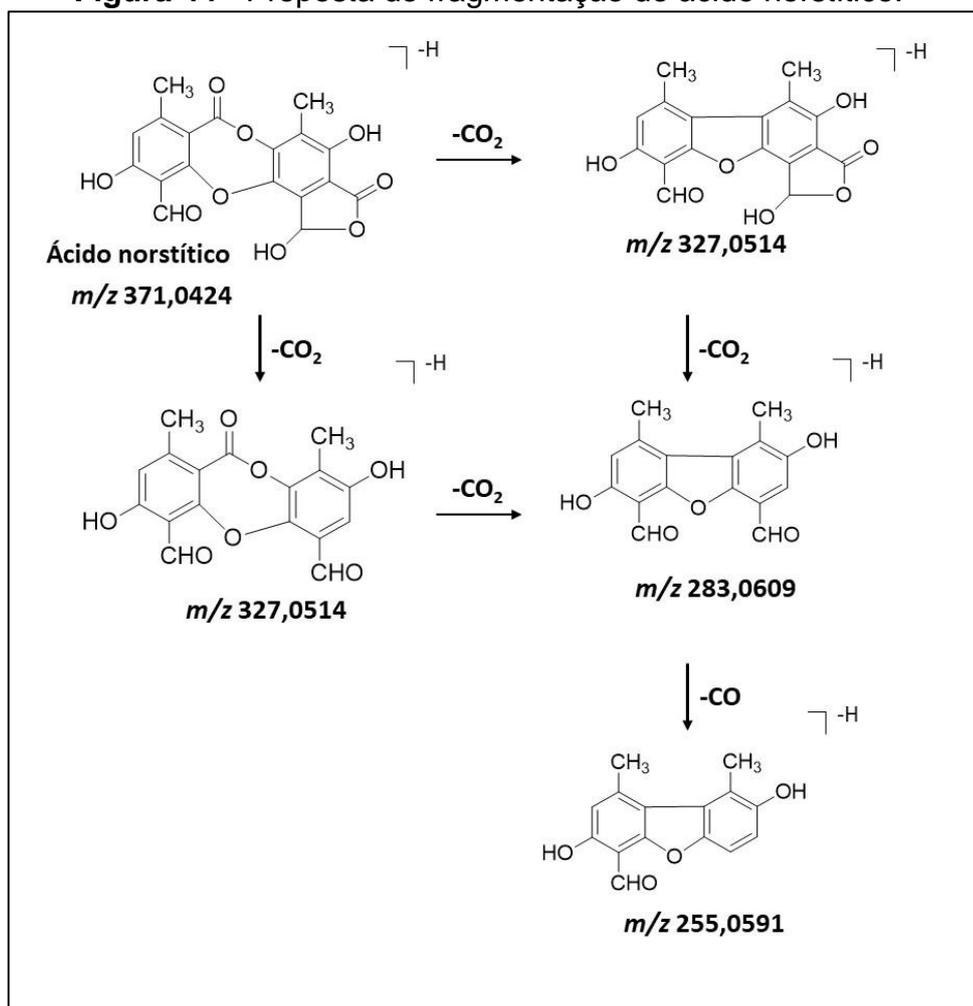
Figura 43 - Proposta de fragmentação dos ácido menegaziáico.



Fonte: própria autoria.

A substância eluída no pico **4** apresentou $[M-H]^-$ de m/z 371,0424 ($C_{18}H_{11}O_9$) e fragmentos de segunda ordem de m/z 327,0514, m/z 283,0609, m/z 255,0591, m/z 243,0309 e m/z 227,0342 (**tabela 4**). A análise desses fragmentos (m/z 327,0514 $[M-CO_2-H]^-$, m/z 283,0609 $[M-2CO_2-H]^-$ e m/z 255,0591 $[M-2CO_2-CO-H]^-$, permitiu identificar o ácido norstítico (PARROT *et al.* 2013; XU *et al.* 2017; BRAKNI *et al.* 2018). A fragmentação do ácido norstítico é indicada na **Figura 44**.

Figura 44 - Proposta de fragmentação do ácido norstítico.



Fonte: adaptada de PARROT *et al.* 2013; XU *et al.* 2017.

A substância eluída no pico **5** possui $[M-H]^-$ de m/z 373,0936 ($C_{19}H_{17}O_8$) e os fragmentos de segunda ordem de m/z 195,0672, m/z 177,0194 e m/z 163,0397 (**tabela 4**). A análise desses fragmentos (m/z 195 $[M-C_9H_7O_4-H]^-$, m/z 177 $[M-C_{10}H_{11}O_4-H]^-$ e m/z 163 $[M-C_9H_7O_4-CH_3OH-H]^-$) confirma a estrutura da atranorina. Os dados espectrais de massas das substâncias são indicados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Dados de CLAE-DAD-EM dos extratos acetônicos de *Stereocaulon* representativos do grupo III.

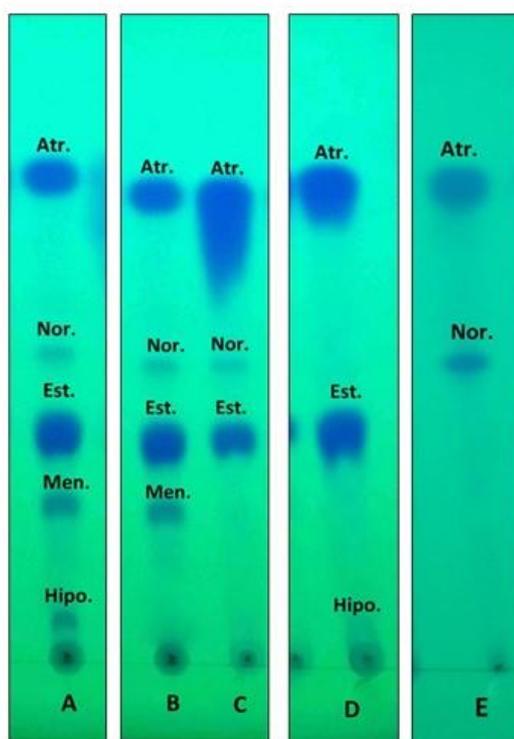
Pico	Tempo de Retenção (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Íon (s) - Fragmento (s) MS/MS (m/z)	Identificação da Substância	Estrutura química
1	35,3	387,0730	C ₁₉ H ₁₅ O ₉	343,0855 (C ₁₈ H ₁₅ O ₇) 299,0926 (C ₁₇ H ₁₅ O ₅) 284,0691 266,0553 256,0728.	Ácido hipoconstítico	
2	36,2	385,0576	C ₁₉ H ₁₃ O ₉	297,0766 (C ₁₇ H ₁₃ O ₅) 282,0522 267,0305 (C ₁₅ H ₇ O ₅) 254,0585 238,0631	Ácido estítico	
3	36,4	373,0572	C ₁₈ H ₁₃ O ₉	329,0657 (C ₁₇ H ₁₃ O ₇) 314,0424 299,0214 286,0502 270,0523 255,0295 (C ₁₄ H ₇ O ₅).	Ácido menegaziáico	
4	39,2	371,0424	C ₁₈ H ₁₁ O ₉	327,0514 (C ₁₇ H ₁₁ O ₇) 283,0609 (C ₁₆ H ₁₁ O ₅) 255,0591 243,0309 (C ₁₃ H ₇ O ₅) 227,0342 (C ₁₃ H ₇ O ₄)	Ácido norstítico	
5	52,6	373,0936	C ₁₉ H ₁₇ O ₈	195,0672 (C ₁₀ H ₁₁ O ₄), 177,0194 (C ₉ H ₅ O ₄), 163,0397 (C ₉ H ₇ O ₃)	Atranorina	

Fonte: própria autora.

A concentração das substâncias presentes nos extratos acetônicos analisados variou como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 41**. Os ácidos hipoconstítico (pico 1), menegaziáico (pico 3) e norstítico (pico 4) estão em maior concentração no extrato 12672 do que no 12543.

A análise cromatográfica (CCD) das 52 exsicatas deste **grupo III** permitiu identificar cinco grupos químicos (**A, B, C, D e E**) mostrados na **Figura 45**. Todos os grupos apresentaram em sua composição atranorina e ácido estítico, com exceção do grupo **E**, que apresentou apenas atranorina e ácido norstítico. A diferença da composição entre os grupos químicos com o ácido estítico (**A, B, C e D**), deve-se a presença ou não dos ácidos menegaziáico, norstítico e hipoconstítico. O grupo químico **A** apresentou: atranorina, ácidos norstítico, estítico, menegaziáico e hipoconstítico, o grupo químico **B**: atranorina, ácidos norstítico, estítico e menegaziáico; grupo químico **C**: atranorina, ácidos norstítico e estítico; grupo químico **D**: atranorina, ácidos estítico e hipoconstítico.

Figura 45 - Cromatogramas dos diferentes perfis químicos (A, B, C, D e E) dos extratos acetônicos do grupo III em tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (139:83:8 v/v/v).



Fonte: própria autora.

Manchas observadas com revelação luz Ultravioleta em 254 nm. Atr.: atranorina; Nor.: ácido norstítico; Est.: ácido estítico; Men.: ácido menegaziáico; Hipo.: ácido hipoconstítico.

Com base na análise morfológica e informações da composição química, foram identificadas neste grupo as seguintes espécies: *Stereocaulon tomentosum* (4 grupos químicos; **A**, **B**, **C** e **D**), *Stereocaulon tomentosum* var. *capitatum* (2 grupos químicos: **A** e **B**) e *Stereocaulon glabrum* (3 grupos químicos (**A**, **B** e **E**)).

Segue abaixo as espécies identificadas com suas respectivas exsicatas, composição química, número de coletor, número de herbário (CGMS) e local de coleta:

Stereocaulon tomentosum Fr. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico A - atranorin, stictic, menegazziaic, norstictic and hypoconstictic acids – Specimens analyzed collected in Tierra del Fuego, Chile: A. A. Spielmann 12534 (CGMS), 54°50'35.47''S, 68°34'2.07''W; A. A. Spielmann 12540 (CGMS), 54°48'35.24''S, 68°27'19.83''W; A. A. Spielmann 12543 (CGMS), 54°49'47.54''S, 68°28'53.86''W. Collected in Patagonia, Argentina: A. A. Spielmann 12535 (CGMS), 49°4'47.83''S, 72°53'15.35''W; A. A. Spielmann 12538 (CGMS), 51°6'54.68''S, 73°6'51.79''W. Collected in Tierra del Fuego, National Park, Rio Lapataia without trails, TF06, Argentina: M.J. Kitaura 3330, 3331 and 3332 (CGMS 61839, 61840 and 61841), 54°50'34.44''S, 68°34'05.52''W. Collected in Tierra del Fuego, National Park, sand Pampa alto, trail edge, open forest, TFA09, Argentina: M. J. Kitaura 3377 (CGMS 61845), 54°49'47.84''S, 68°28'53.87''W. Collected in Tierra del Fuego National Park, sandero Pampa alto, trail edge, clearing in the high part, TFA12, Argentina: M. J. Kitaura 3390 (CGMS 61847), 54°49'59.81''S, 68°29'58.68''W. Collected in Tierra del Fuego National Park, shore of the Beagle Channel, rocks and forest edge, TFA16, Argentina: M. J. Kitaura 4009 (CGMS 61852), 54°51'19.26''S, 68°34'54.49''W. Collected in Tierra del Fuego National Park, low part, 50m from the rock trail covered with undergrowth, TFA26, Argentina: M. J. Kitaura 4124 and 4130 (CGMS 61871 and 61872), 54°51'28.53''S, 68°30'23.83''W. Collected in Terra del Fogo National Park, near the visitor center, Lapataia Bay, TFA31, Argentina: M. J. Kitaura 4182 and 4189 (CGMS 67877 and 61878), 54°50'41.42''S, 68°33'52.31''W.

Stereocaulon tomentosum Fr. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico B - atranorin, stictic, menegazziaic and norstictic acids – Collected in Tierra del Fuego, National Park, Rio Lapataia without trails, TF06, Argentina: M. J. Kitaura 3333 (CGMS 61842), 54°50'34.44''S, 68°34'05.52''W. Collected in Tierra del Fuego National Park, shore of the Beagle Channel, rocks and forest edge, TFA16, Argentina: M. J. Kitaura 4005 (CGMS 61848), 54°51'19.26''S,

68°34'54.49"W. Collected in Tierra del Fuego National Park, low part, 50m from the trail, rock covered with undergrowth, TFA26, Argentina: M. J. Kitaura 4123 (CGMS 61870); 54°51'28.53"S, 68°30'23.83"W. Collected in Torres del Paine Park, Gray Glacier lookout trail, PC01, Chile: M. J. Kitaura 4249 (CGMS 61890), 51°06'39.78"S, 73°06'43.95"W. Collected in Tierra del Fuego, Chile: A. A. Spielmann 12637 (CGMS), 54°49'47.54"S, 68°28'53.86"W.

Stereocaulon tomentosum Fr. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico C - atranorin, stictic and norstictic acids – Collected in Tierra do Fogo National Park, sand Pampa alto, trail edge, clearing with a big tree, TFA11, Argentina: M. J. Kitaura 3383 (CGMS 61846), 54°49'52.59"S, 68°29'22.48"W. Collected in Tierra del Fuego, Chile: A. A. Spielmann 12673 (CGMS), 54°50'39.89"S 68°33'54.99"W.

Stereocaulon tomentosum Fr. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico D - atranorin, stictic and hypoconstictic acids – Collected in Patagonia, Argentina: A.A. Spielmann 12537 (CGMS), 49°4'47.83"S, 72°53'15.35"W.

Stereocaulon tomentosum* var. *capitatum I.M. Lamb. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico A - atranorin, stictic, menegazziaic, norstictic and hypoconstictic acids – Collected in Tierra del Fuego National Park, low part, 50m from the rock trail covered with undergrowth, TFA26, Argentina: M.J. Kitaura 4116 (CGMS 61867), 54°51'28.53"S, 68°30'23.83"W.

Stereocaulon tomentosum* var. *capitatum I.M. Lamb. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico B – atranorin, stictic, norstictic and menegazziaic acids – Collected in Tierra del Fuego National Park, low part, 50m from the rock trail covered with undergrowth, TFA26, Argentina: M.J. Kitaura 4117 (CGMS 61868), 54°51'28.53"S, 68°30'23.83"W.

Stereocaulon glabrum (Müll. Arg.) Vain. J.M. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico A - atranorin, stictic, menegazziaic, norstictic and hypoconstictic acids – Collected in Tierra del Fuego, National Park, Rio Lapataia without trails, TF06, Argentina: M.J. Kitaura 3336 (CGMS 61843), 54°50'34.44"S, 68°34'05.52"W. Collected in Tierra del Fuego National Park, shore of the Beagle Channel, rocks and forest edge, TFA16, Argentina: M.J. Kitaura 4006 4007 and 4008 (CGMS 61849, 61850 and 61851), 54°51'19.26"S, 68°34'54.49"W. Collected in Tierra del Fuego National Park, Cerro Guanaco, peak, exposed site

TFCerro, Argentina: J.M. Kitaura 4011 and 4015 (CGMS 61853 and 61854), 54°49'02.69"S, 68°30'37.71"W. Collected in Tierra del Fuego National Park, Cerra Guanaco trail, high part, left peak at the end of the trail, TFA30, Argentina: M. J. Kitaura 4155 (CGMS 61875), 54°48'20.46"S, 68°33'21.16"W. Collected in Martial Glacier, upper part, Argentina: M.J. Kitaura 4193 and 4198 (CGMS 61879 and 61881), 54°47'12.95"S, 68°24'11.02"W. Collected in Los Glaciares National Park, Cerro El Chaltén, Lago del Desierto, PA05, Argentina: M. J.Kitaura 4213 (CGMS 61884), 49°04'20.74"S, 72°53'27.32"W. Collected in Torres del Paine Park, Gray Glacier lookout trail PC01, Chile: M. J. Kitaura 4236 and 4253 (CGMS 61887 and 61891), 51°06'39.78"S, 73°06'43.95"W. Collected in Rip point, Nelson Island, Southern Shetlands, Antarctica: A. Lorenz 760 (CGMS 61831), 62°14'26.8"S, 58°58'45.8"W. Collected in Tierra del Fuego, Chile: A.A. Spielmann 12664 (CGMS), 54°49'8.27"S, 68°30'36.22"W; A.A. Spielmann 12672 and 12687 (CGMS), 54°48'25.88"S, 68°32'55.49"W. Collected in South Shetland Islands, Livingston Island, Byers Peninsula, Antarctica: A.A. Spielmann 3564 (CGMS), 62°38'12.7"S, 61°05'04.5"W. Collected in South Shetland Islands, King George Island, Potter Peninsula, Antarctica: A.A. Spielmann 7313 (CGMS), 62°14'47.3"S, 58°40'41.1"W. Collected in South Shetland Islands, Deception Island, Crater Lake, Antarctica: A.A. Spielmann 13483 (CGMS), 62°59'10.50"S, 60°39'55.95"W. Collected in King George Island, Peninsula Marton, near King Sejong Station, Antarctica: M.J. Kitaura 2279 (CGMS 51427), 62°13'55"S, 58°46'40"W.

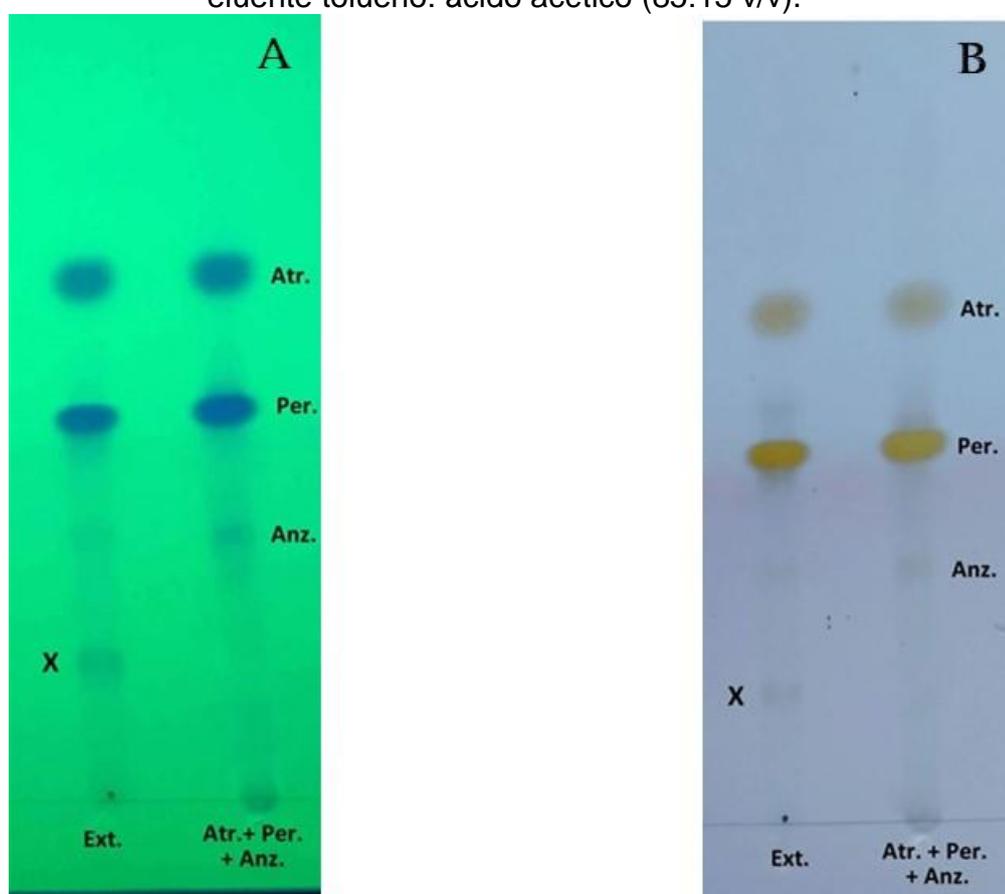
Stereocaulon glabrum (Müll. Arg.) Vain. J.M. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico B - atranorin, stictic, menegazziaic, and norstictic acids – Collected in Tierra del Fuego, Chile: A.A. Spielmann 12541 (CGMS), 54°48'43.10"S, 68°32'23.40"W. Collected in Tierra del Fuego National Park, Cerro Guanaco, peak, exposed site, TFCerro, Argentina: M.J. Kitaura 4038 (CGMS 61856), 54°49'02.69"S, 68°30'37.71"W.

Stereocaulon glabrum (Müll. Arg.) Vain. J.M. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Grupo Químico E - atranorin and norstictic acid – Collected in Patagonia, Argentina: A.A. Spielmann 12545 (CGMS), 51°6'39.61"S, 73°6'44.90"W.

4.4 Grupo IV- Atranorina, Ácidos perlatólico, anziáico e outro(s) composto(s).

Este grupo é representado por 19 (dezenove) exsicatas de líquens do gênero *Stereocaulon*. A **Figura 46** mostra o perfil cromatográfico de um extrato representativo do conjunto de amostras analisadas neste grupo juntamente com o extrato contendo atranorina e ácidos perlatólico e anziáico.

Figura 46 - Cromatografia em camada delgada do extrato acetônico de um espécime representativo do grupo IV de *Stereocaulon* no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v).



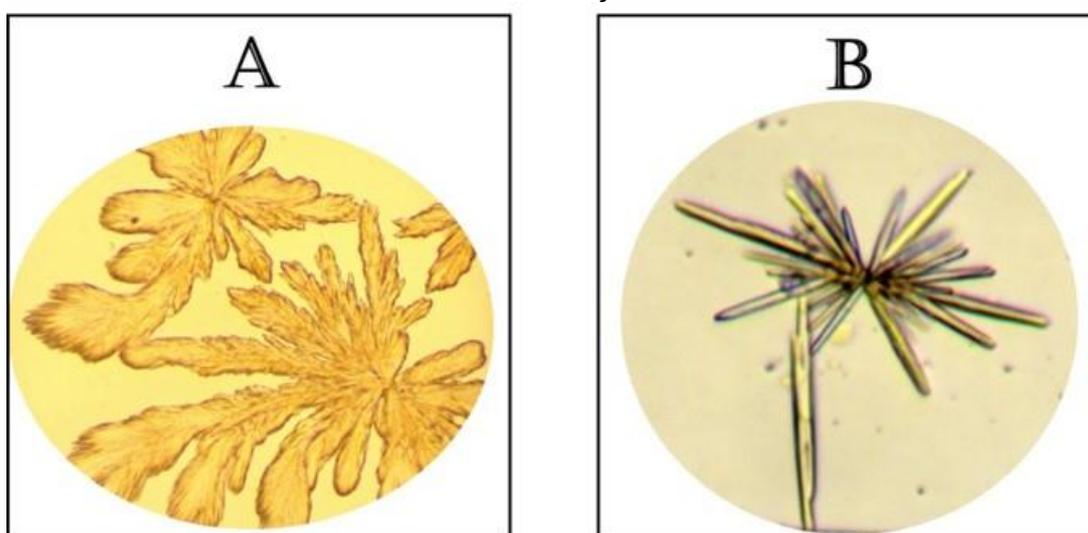
Fonte: própria autora.

Visualização das manchas na luz Ultravioleta em 254 nm (A e C); revelação com ácido sulfúrico 10% em metanol e aquecimento até o completo aparecimento das manchas (B e D); Ext.: extrato acetônico de *Stereocaulon* representativo do grupo IV.; Atr + Perl. + Anz.: extrato contendo atranorina, ácido perlatólico e ácido anziáico.

A análise cromatográfica (**Figura 46**) do extrato acetônico (Ext.) indicou a presença de manchas com comportamento cromatográfico idêntico à atranorina, aos ácidos perlatólico e anziáico, além de outra mancha de Rf menor que não foi identificada (mancha X).

Os extratos acetônicos de *Stereocaulon* também foram avaliados pela técnica de microcristalização. A análise da microcristalização em GAoT mostrou estruturas cristalinas características da atranorina e em GE 1:3 do ácido perlatólico. As estruturas observadas de atranorina são iguais as daquelas que já foram relatadas no **grupo I** conforme foi mostrado na **9A**. A **Figura 47** apresenta a foto dos cristais formados do ácido perlatólico.

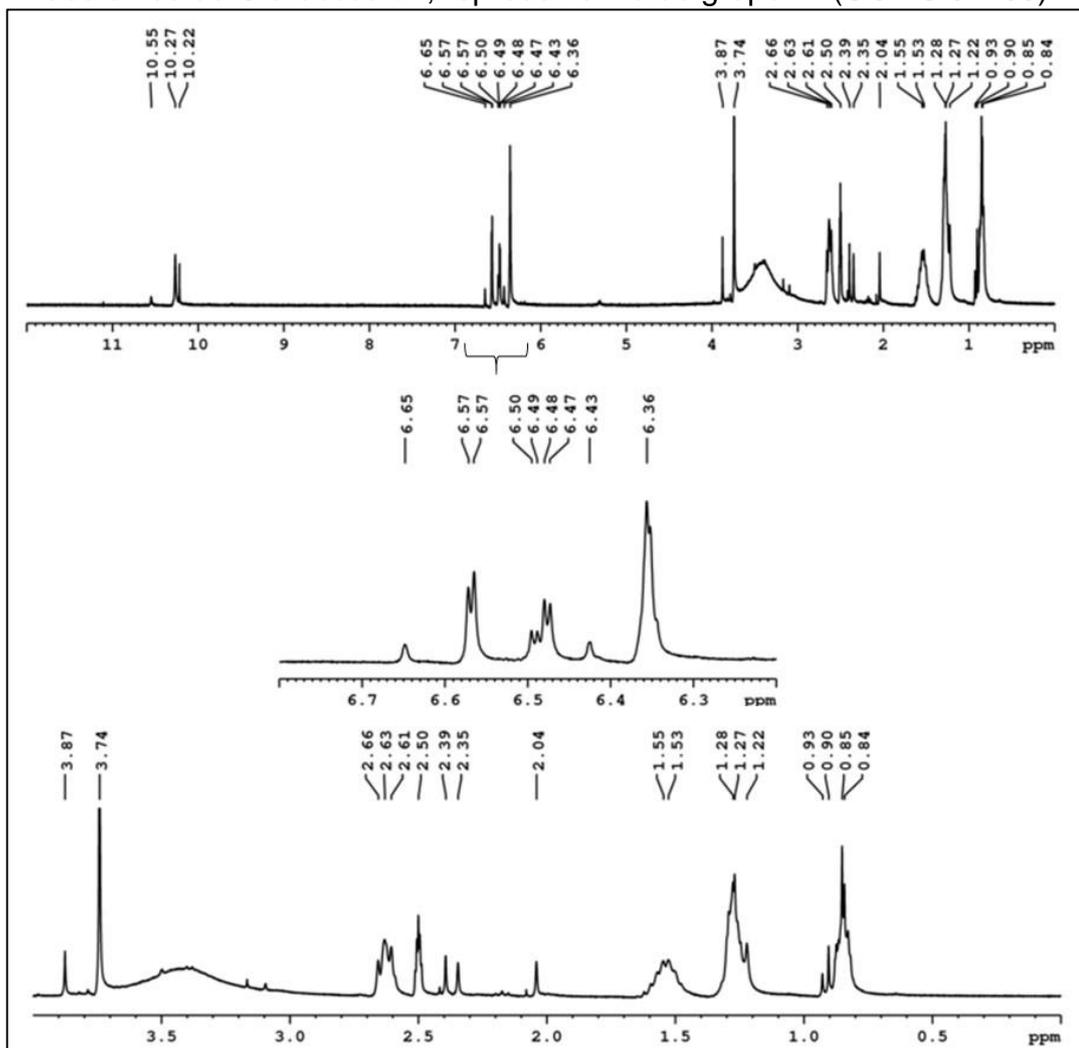
Figura 47 - Fotos das formações cristalinas resultantes do tratamento do extrato acetônico de *Stereocaulon* (grupo IV) com soluções de cristalização.



Fonte: própria autora.
Solução GE 1:3 (A), solução GE 3:1 (B).

O extrato acetônico representativo do **grupo IV** foi avaliado quanto seus dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C para análise da composição química. A **Figura 48** mostra os espectros de RMN de ^1H de um extrato acetônico de *Stereocaulon* representativo do **grupo IV**.

Figura 48 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo IV (CGMS 61166).

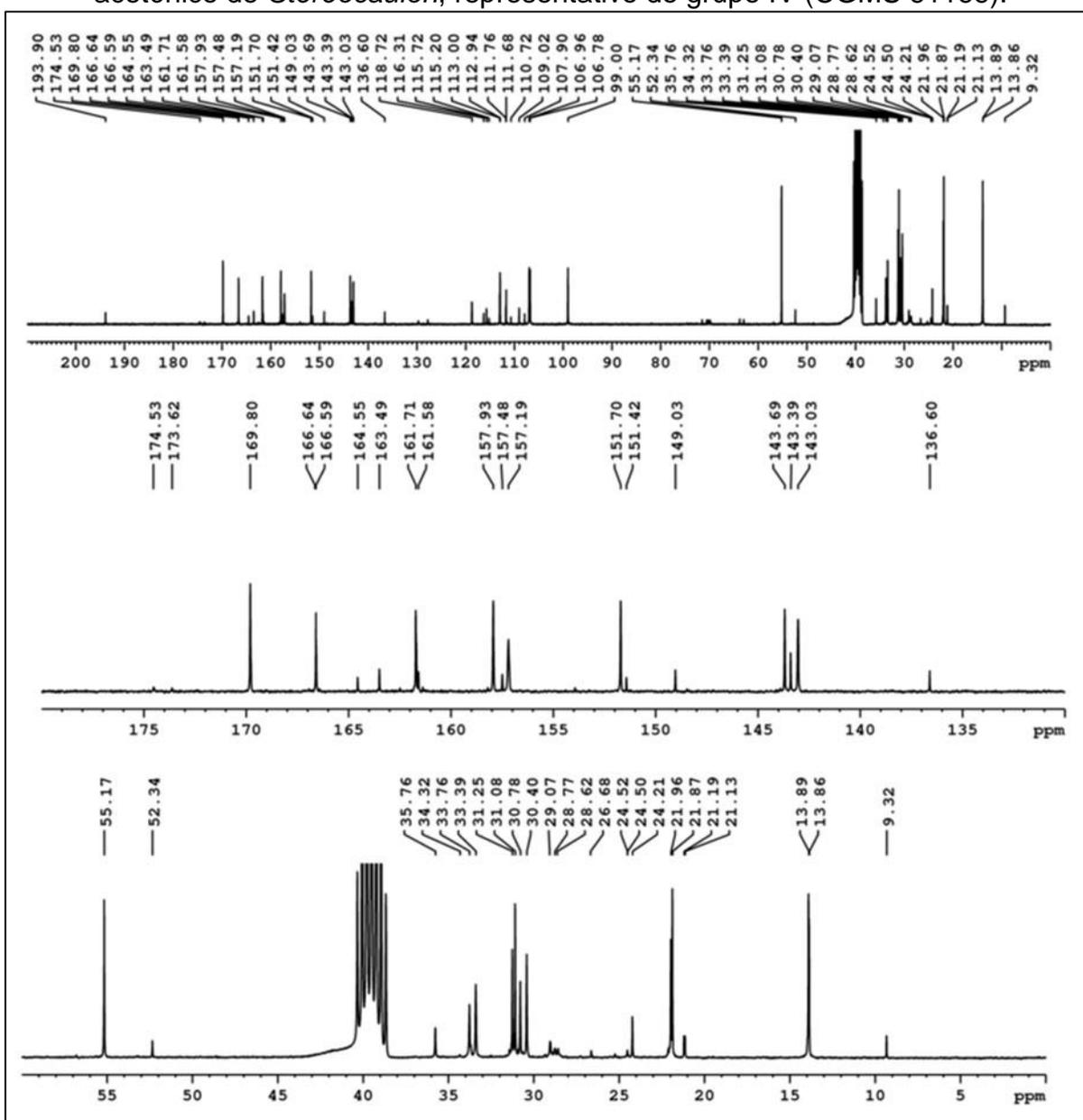


Fonte: própria autora.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 48**) apresentou três sinais na região mais desblindada do espectro: três singletos em 10,55 ppm, 10,27 ppm e 10,22 ppm, que podem ser atribuídos a hidrogênios aldeídicos e fenólicos. Entre 6 e 7 ppm, região típica de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, é possível notar seis sinais: um pequeno singleto em 6,65 ppm, três dubletos em 6,57 ppm ($J=1,7$ Hz), 6,50 ppm ($J=1,7$ Hz), 6,48 ppm ($J=1,9$ Hz), dois singletos em 6,43 ppm e 6,36 ppm. Na região mais blindada do espectro existem dois singletos em 3,88 ppm e 3,74 ppm que podem ser assinalados a grupos metoxilas. É possível notar um sinal largo (multipletos) em 2,63 ppm que sugere a presença de um grupo metilênico vizinho a grupo alquila. Próximo a esse sinal, na mesma região espectral, é possível visualizar três singletos em 2,39; 2,35 e 2,04 ppm que indicam a presença de metilas ligadas à anel aromático.

Existem dois multipletos em 1,55 ppm e 1,28 ppm de possíveis grupos metilênicos vizinhos a outros grupos metilênicos, e ainda, dois singletos em 0,93 e 0,90 ppm e um multipeto em 0,85 ppm.

Figura 49 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo IV (CGMS 61166).

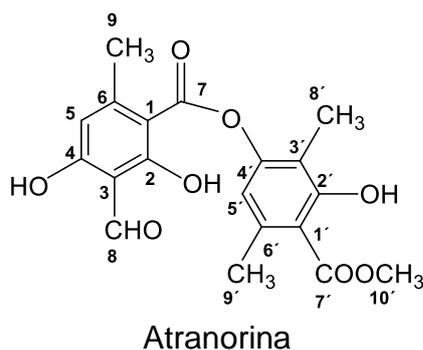


Fonte: própria autora.

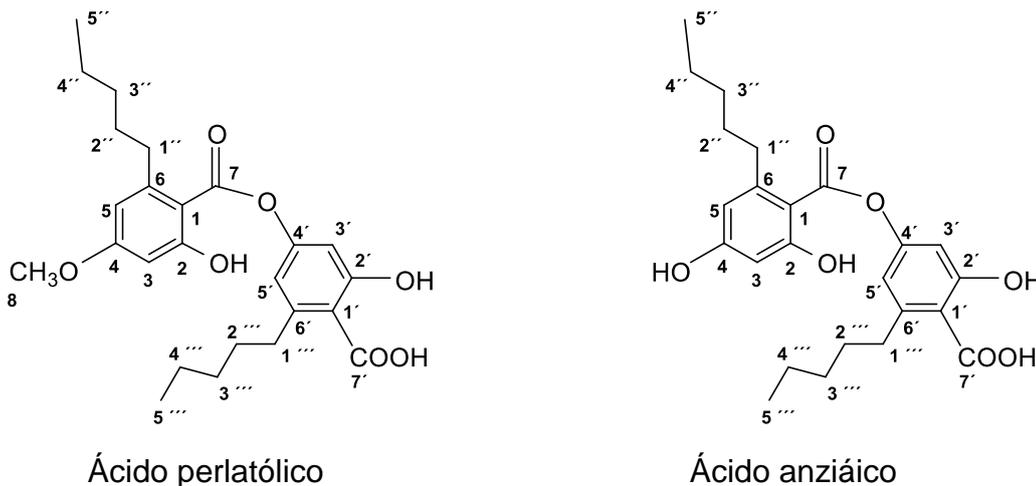
Os espectros de RMN de ^{13}C do extrato acetônico são mostrados na **Figura 49**. Observando o espectro a partir da região de maior deslocamento químico, é possível notar o sinal 193,9 ppm, região típica de carbonila aldeídica. À direita deste sinal, é observado um sinal intenso em 169,8 ppm que pode ser atribuído a uma

carbonila de grupo éster. É também observado um grupo sinais na faixa de 171 ppm a 100 ppm, característicos de carbonos aromáticos e/ou alcenos. Dois sinais, um intenso em 55,2 ppm e outro de menor intensidade em 52,3 ppm, podem representar grupos metoxilas. Na faixa entre 36 à 0 ppm existem dezenove sinais de prováveis carbonos de grupos alquila.

Os sinais no espectro de RMN de ^1H (**Figura 48**) podem ser atribuídos às estruturas da atranorina (Atr) e dos ácidos perlatólico (Per) e anziáico (Anz). Os três sinais na região de 10 ppm pode ser atribuído ao hidrogênio aldeídico H8-Atr e as às hidroxilas fenólicas (Atr, Per e/ou Anz). É provável que os singletos de menor intensidade 6,65 ppm e 6,43 ppm sejam atribuídos aos hidrogênios ligados a carbonos aromáticos H5- e H5'- Atr, o singlete em 3,88 ppm seja do éster metílico H10'- Atr. e os singletos 2,39 ppm, 2,35 ppm e 2,04 ppm sejam relacionados as metilas ligadas ao anel aromático H9, H8' e H9'- Atr.



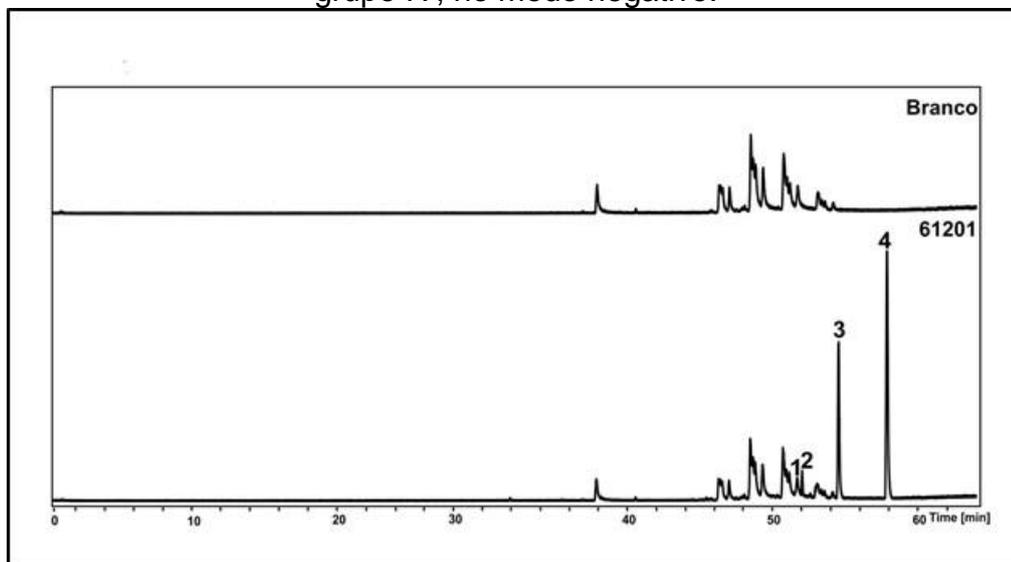
Os três dubletos em 6,57 ppm ($J=1,7$ Hz), 6,50 ppm ($J=1,7$ Hz), 6,48 ppm ($J=1,9$ Hz) e um singlete intenso em 6,36 ppm são correspondentes aos hidrogênios ligados a carbonos aromáticos H5-Per, H3-Per, H5-Anz e H3-Anz. O intenso singlete em 3,74 ppm se refere aos hidrogênios da metoxila H8-Per. O multiplete 2,63 ppm deve corresponder aos hidrogênios metilênicos da cadeia alquílica H1''-Per e H1'''- Anz, os multipletos em 1,55 ppm e 1,27 ppm são dos hidrogênios metilênicos H2''-Per, H3''-Per, H4''-Per, H2'''-Anz, H3'''-Anz e H4'''- Anz, e o multiplete em 0,85 ppm do grupo metila da cadeia H5''-Per e H5'''-Anz.



O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 49**) também apresentou sinais que compatíveis às estruturas da atranorina (Atr) e dos ácidos perlatólico (Per) e anziáico (Anz). O sinal mais desblindado do espectro pode ser atribuído para o carbono aldeídico C8-Atr. O sinal mais intenso do espectro, 169,8 ppm, pode ser resultado de sobreposição de sinais referentes ao C2-Atr, C7-Atr, C7-Per e C7-Anz. Os sinais encontrados entre 167 ppm e 99 ppm são compatíveis com os carbonos das três substâncias. Não é possível atribuir todos os sinais aos carbonos específicos, pois muitos deles apresentam valores de deslocamento químico muito próximos, pois são desídeos com estruturas parecidas, principalmente os ácidos perlatólico e anziáico. Além disso, devido à baixa concentração do ácido anziáico no extrato, alguns sinais de deslocamento químico não aparecem nos espectros. O ácido perlatólico está em maior proporção no extrato. Os sinais 55,2 ppm e 52,3 ppm podem ser atribuídos às metoxilas C8-Per e C10'-Atr, respectivamente. O sinal 55,2 ppm bem mais intenso que o 52,3 ppm indica que o ácido perlatólico está em maior proporção no extrato que a atranorina. Na região entre 36 à 0 ppm foram observados os sinais: 35,8; 33,8; 33,4; 31,3; 31,1; 30,8; 30,4; 29,1; 24,2; 21,2; 21,1; 22,0 e 21,9 ppm que são compatíveis aos carbonos metilênicos da cadeia alifática dos ácidos perlatólico e anziáico e metilas da atranorina (C9 e C8'). Os sinais 13,9 ppm e 13,9 ppm podem ser atribuídos as metilas da cadeia alifática dos ácidos perlatólico e anziáico e o sinal 9,3 ppm da metila ligada ao anel aromático da atranorina (C9').

Um extrato acetônico do grupo IV foi analisado também por CLAE-DAD-EM utilizando ionização eletrospray. O cromatograma obtido está representado na **Figura 50**.

Figura 50 - Cromatograma do pico base obtido por CLAE-DAD-EM do extrato acetônico de *Stereocaulon* (CGMS 61201) representativo do grupo IV, no modo negativo.

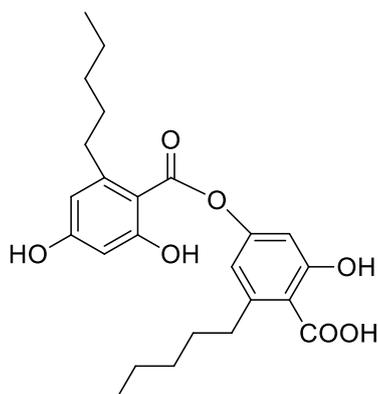


Fonte: própria autora.

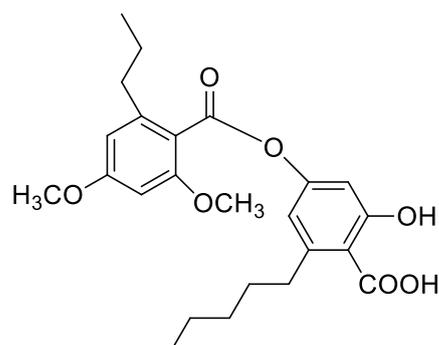
1- 4 representam substâncias do extrato acetônico analisado.

A análise do cromatograma (**Figura 50**) aponta 4 substâncias no extrato acetônico de *Stereocaulon* (61201), as quais foram avaliadas através dos dados espectrais de massas (**tabela 7**).

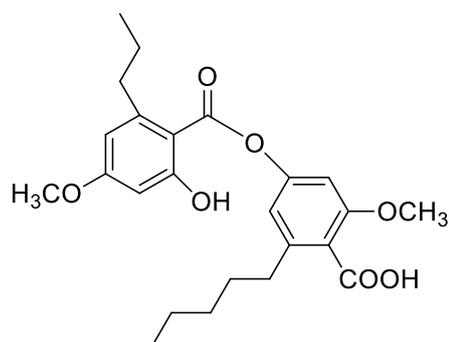
A substância eluída no pico **1** apresentou $[M-H]^-$ de m/z 429,1919 de fórmula $C_{24}H_{29}O_7$, além dos seguintes fragmentos de segunda ordem de m/z 223,0973, m/z 205,0874 e m/z 179,1059 (**tabela 7**). O éter difenílico metil-norlobariol e os depsídeos: ácidos anziáico, 2-O-metilestenospórico, 2'-O-metilestenospórico e 2'-O-metilimbricárico apresentam a mesma fórmula molecular e estão entre as possibilidades para a identificação da substância eluída nesse pico (**1**).



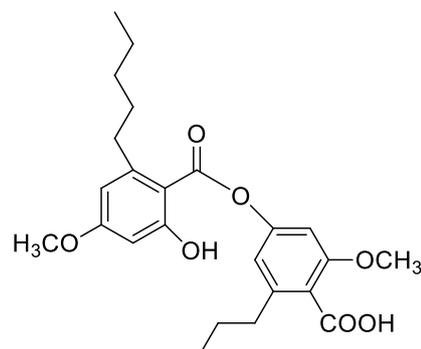
Ácido anziáico



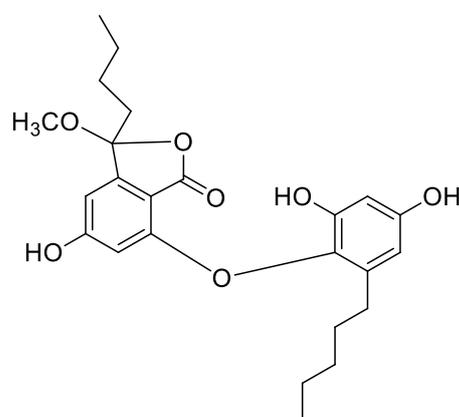
Ácido 2-O-metilestenospórico



Ácido 2'-O-metilestenospórico



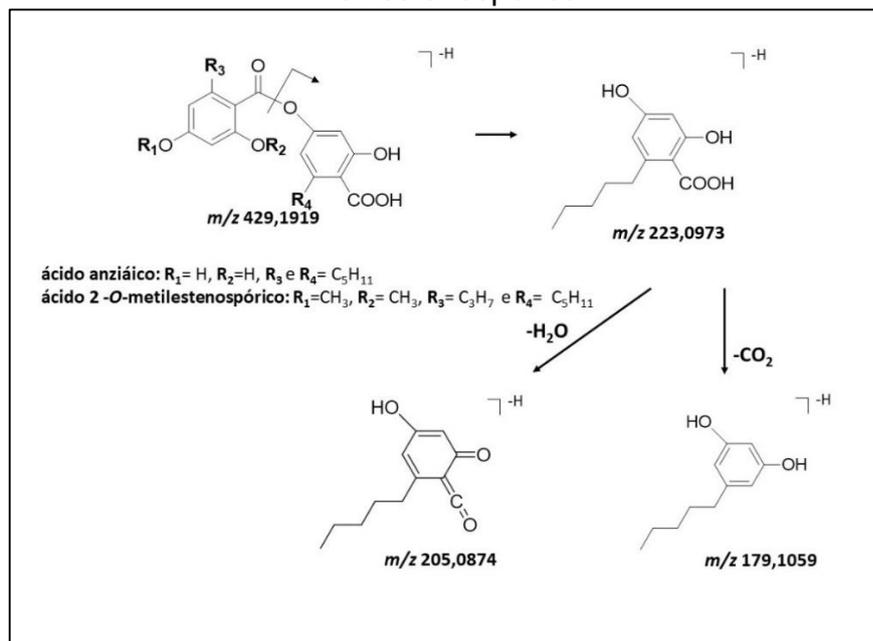
Ácido 2'-O-metilimbricário



Pseudo éster metilnorlobariol

Fazendo a correlação entre as possíveis estruturas com base na fórmula molecular $C_{24}H_{30}O_7$ e os fragmentos gerados pela fragmentação da substância eluída no pico **1**, têm-se que o fragmento de m/z 223,0973 pode ser gerado pela quebra da ligação éster entre os dois anéis aromáticos provavelmente somente dos ácidos anziáico e 2-O-metilestenospórico. Os fragmentos de m/z 205,0874 e m/z 179,1059 podem ter sido produzidos pela desidratação ($-H_2O$) e descarboxilação ($-CO_2$) do fragmento anterior, respectivamente. A **Figura 51** mostra as propostas de fragmentação destes depsídeos.

Figura 51 - Proposta de fragmentação dos ácidos anziáico e 2-*O*-metilestenospórico.



Fonte: própria autora.

Embora a análise espectral de massas indique duas substâncias possíveis para o pico **1** (ácidos anziáico e 2-*O*-metilestenospórico), a análise cromatográfica confirma a presença do ácido anziáico no extrato de *Stereocaulon*. O ácido 2-*O*-metilestenospórico apresenta valor de R_f maior que os ácidos anziáico no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v), **tabela 5**.

Tabela 5 - Dados cromatográficos dos ácidos anziáico, 2-*O*-metilestenospórico e perlatólico no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v).

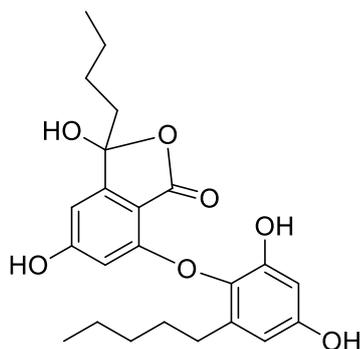
Nome das substâncias	R_f	Cor da revelação*
Ácido anziáico	33	amarelo alaranjado
Ácido 2- <i>O</i> -metilestenospórico	49	amarelo
Ácido perlatólico	54	amarelo alaranjado

Fonte: adaptado de ELIX, 2014.

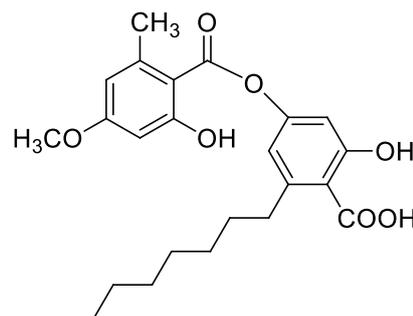
* cor observada após revelação com ácido sulfúrico 10% e aquecimento.

A substância eluída no pico **2** possui $[M-H]^-$ de m/z 373,0878 ($C_{19}H_{17}O_8$) e os fragmentos de segunda ordem de m/z 177,0194 e m/z 163,0397 (**tabela 7**). A análise desses fragmentos (m/z 177 $[M-C_{10}H_{11}O_4-H]^-$ e m/z 163 $[M-C_9H_7O_4-CH_3OH-H]^-$) confirma a estrutura da atranorina.

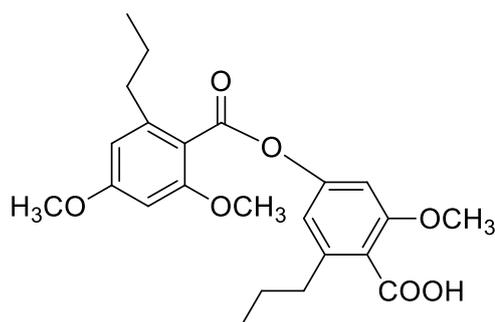
A substância eluída no pico **3** possui $[M-H]^-$ de m/z 415,1759 ($C_{23}H_{27}O_7$) e fragmentos de segunda ordem m/z 223,0974, m/z 205,0856 e m/z 179,1085 (**tabela 7**). Para essa fórmula molecular existem 8 possíveis estruturas: o éter difenílico norlobariol, e os depsídeos: esferoforina e os ácidos: 2,2'-dimetildivaricático, imbricário, isosférico, 2-O-metilnorimbricário, 2-O-metilnoestenosporico e estenosporico.



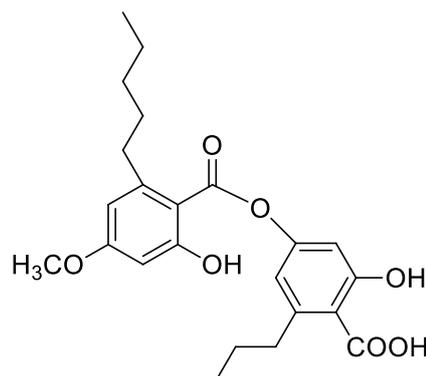
Norlobariol



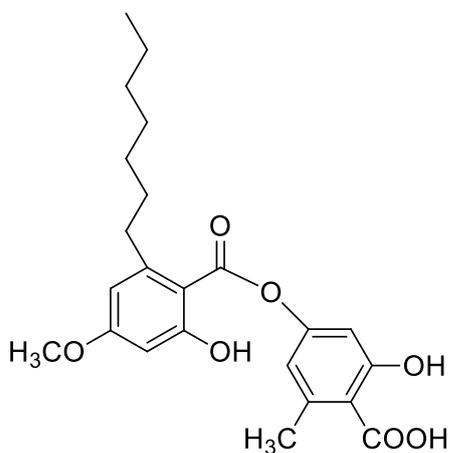
Esferoforina



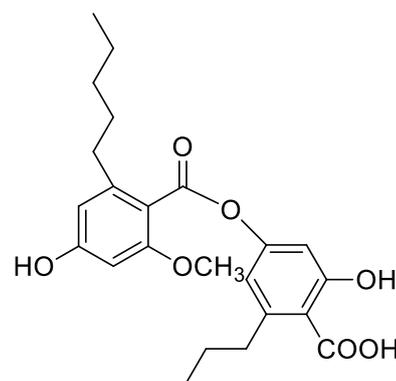
Ácido 2,2'-dimetildivaricático



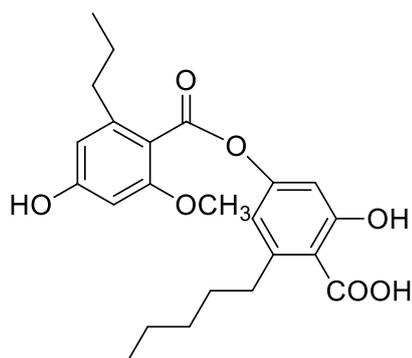
Ácido imbricário



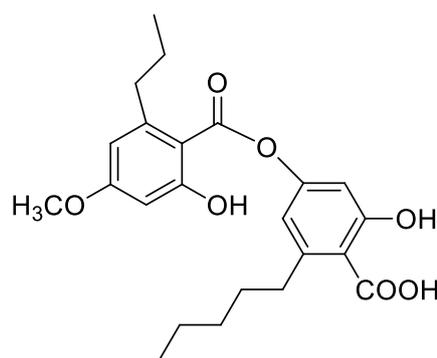
Ácido isosférico



Ácido 2-O-metilnorimbricário



Ácido 2-O-metilnoestenosporico



Ácido estenosporico

Entre essas substâncias, apenas os ácidos estenosporico e 2-O-metilnoestenosporico podem gerar o fragmento de m/z 223, pela quebra da ligação éster, que por desidratação e descarboxilação sequencial desse fragmento dá origem aos fragmentos m/z 205 e m/z 179, respectivamente. Seguindo a mesma proposta de fragmentação para os ácidos anziáico e 2-O-metilestenosporico (**Figura 51**) não foi possível definir qual substância está eluindo no pico 3, porém, comparando dados cromatográficos citados na literatura para esses compostos (**tabela 6**) com a CCD da **Figura 46**, é possível que esses dois ácidos (ácidos estenosporico e 2-O-metilnoestenosporico) estejam coleuindo no pico **3** e assim estejam presentes no extrato acetônico representativo do **grupo IV**.

O ácido estenosporico possui um R_f ligeiramente menor que o ácido perlatólico, podendo a mancha se sobrepor junto ao ácido perlatólico. A mancha correspondente deste ácido é evidenciada no cromatograma realizado para avaliação da atividade antioxidante com solução de DPPH (Item 4.5.2).

Além desse ácido, é possível notar nos cromatogramas do extrato (**Figura 46**) que substância indicada como X apresenta R_f compatível ao ácido 2-O-metilnoestenosporico. Sendo assim, consideraremos que os ácidos estenosporico e 2-O-metilnoestenosporico estejam presentes no extrato acetônico de *Stereocaulon* do **grupo IV**.

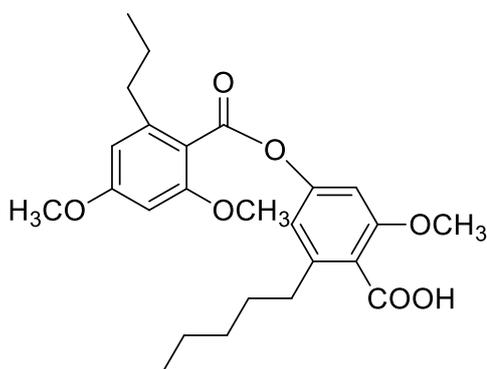
Tabela 6 - Dados cromatográficos dos ácidos perlatólico, 2-O-metilnoestenosporico e estenosporico no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v).

Nome das substâncias	Rf	Cor da revelação*
Ácido perlatólico	54	Amarelo alaranjado
Ácido 2-O-metilnoestenosporico	29	amarelo pálido
Ácido estenosporico	52	laranja

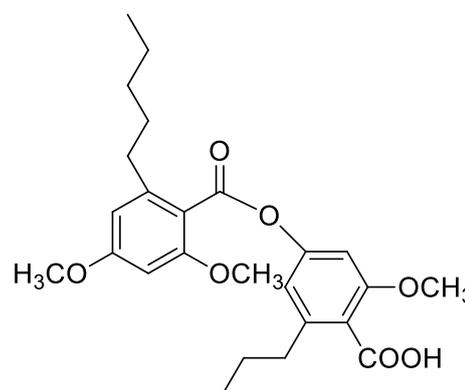
Fonte: adaptado de ELIX, 2014.

* cor observada após revelação com ácido sulfúrico 10% e aquecimento.

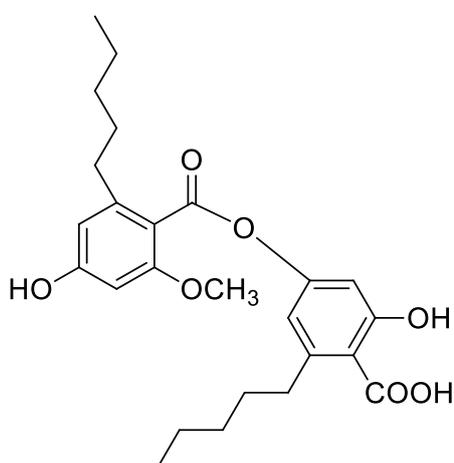
A substância eluída no pico 4 apresenta $[M-H]^-$ de m/z 443,2082 de fórmula $C_{25}H_{31}O_7$ e fragmentos de segunda ordem de m/z 223,0965, m/z 205,0862 e m/z 179,1078 (**tabela 7**). Há cinco possibilidades de substâncias encontradas em líquens para fórmula molecular $C_{25}H_{32}O_7$, os depsídeos: ácidos 2-2'-Di-O-metilimbricárico, 2-2'-Di-O-metilestenosporico, 2-O-metilanziaico, 2'-O-metilanziaico e perlatólico levando em conta a fórmula molecular.



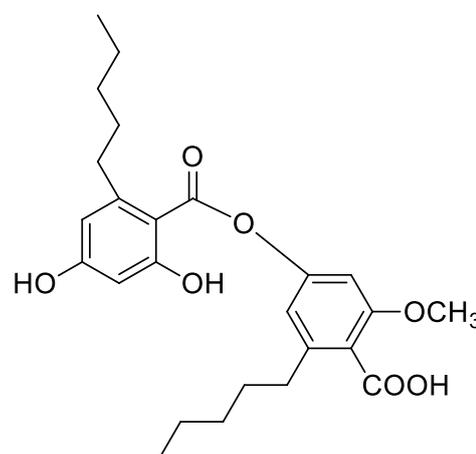
Ácido 2-2'-Di-O-metilimbricárico



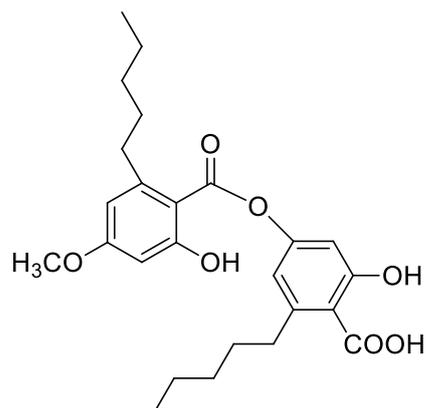
Ácido 2-2'-Di-O-metilestenosporico



Ácido 2-O-metilanziaico



Ácido 2'-O-metilanziaico



Ácido perlatólico

Analisando os fragmentos gerados para esta substância (**pico 4**), apenas os ácidos 2-*O*-metilanzíaco, 2'-*O*-metilanzíaco e perlatólico podem gerar o fragmento de m/z 223 que contém uma cadeia alifática $-C_5H_{11}$, duas hidroxilas e uma carboxila ligadas a um anel aromático. Este fragmento através da desidratação e descarboxilação sequencial do fragmento m/z 223 produz os fragmentos m/z 205 e m/z 179, respectivamente. A formação destes fragmentos segue a mesma proposta ilustrada na **Figura 51**. Assim, analisando apenas os dados espectrais de massas não é possível identificar qual dos depsídeos foi eluído no **pico 4**. Entretanto, o ácido perlatólico já havia sido identificado através das análises cromatográficas, de microcristalização e de RMN. Dessa forma podemos inferir que no **pico 4** foi eluído o ácido perlatólico.

Tabela 7 - Dados de CLAE-DAD-EM do extrato acetônico de *Stereocaulon* representativo do grupo IV (continua).

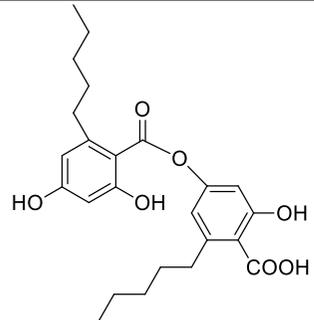
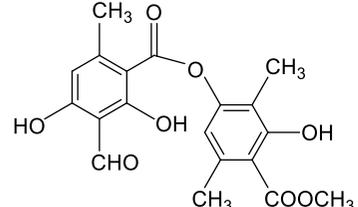
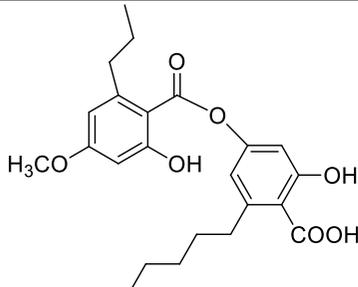
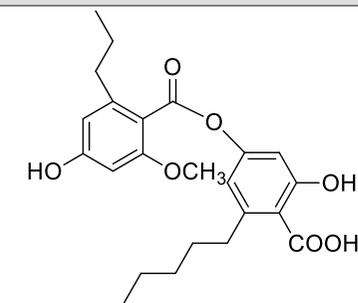
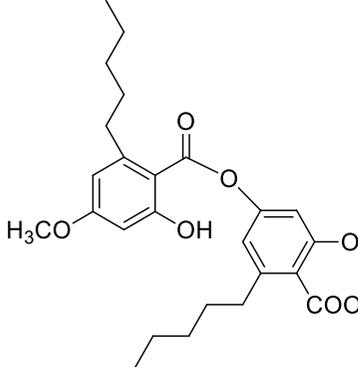
Pico	Tempo de Retenção (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Íon (s) - Fragmento (s) MS/MS (m/z)	Identificação da Substância	Estrutura química
1	51,7	429,1919	C ₂₄ H ₂₉ O ₇	223,0973 (C ₁₂ H ₁₅ O ₄) 205,0874 (C ₁₂ H ₁₃ O ₃) 179,1059 (C ₁₁ H ₁₅ O ₂)	Ácido anziáico	
2	52,7	373,0898	C ₁₉ H ₁₇ O ₈	177,0194 (C ₉ H ₅ O ₄) 163,0397 (C ₉ H ₇ O ₃)	Atranorina	
3	54,6	415,1759	C ₂₃ H ₂₇ O ₇	223,0974 (C ₁₂ H ₁₅ O ₄) 205,0856 (C ₁₂ H ₁₃ O ₃) 179,1085 (C ₁₁ H ₁₅ O ₂)	Ácidos estenospórico	

Tabela 7 - Dados de CLAE-DAD-EM do extrato acetônico de *Stereocaulon* representativo do grupo IV (conclusão).

Pico	Tempo de Retenção (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Íon (s) - Fragmento (s) MS/MS (m/z)	Identificação da Substância	Estrutura química
					2-O-metilnorestenospórico	
4	57,9	443,2082	C ₂₅ H ₃₁ O ₇	223,0965 (C ₁₂ H ₁₅ O ₄) 205,0862 (C ₁₂ H ₁₃ O ₃) 179,1078 (C ₁₁ H ₁₅ O ₂)	Ácido perlatólico	

Fonte: própria autora.

As 18 exsiccatas de líquens deste **grupo IV** apresentaram a mesma composição química e 17 foram identificadas como a espécie *Stereocaulon ramulosum* e uma como *Stereocaulon argus*.

Segue abaixo as espécies identificadas com suas respectivas exsiccatas, composição química, número de coletor, número de herbário (CGMS) e local de coleta:

Stereocaulon ramulosum Raeusch. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Atranorin, perlatolic, anziaic, stenosporic e 2-O-methylnorstenosporic acids. Specimen analysed collected in Minas Gerais, Brazil: C. Valério-Júnior 16 (CGMS 61125), 20° 25' 0.12"S, 41° 49' 18.84"W. Collected in Minas Gerais, Brazil: C. Valério-Júnior 24 (CGMS 61133), 20° 25' 12"S, 41° 48' 19.8"W. Collected in Minas Gerais, Brazil: C. Valério-Júnior 38 (CGMS 61147), 20°24'24.84"S, 41°50'14.28"W. Collected in Minas Gerais, Brazil: C. Valério-Júnior 39 (CGMS 61148), 20°24' 24.84"S, 41°50'14.28"W. Collected in Espírito Santo, Brazil: C. Valério-Júnior 56, 57 (CGMS 61165, 61166), 20°27'57.49"S, 41°48'33.94"W. Collected in Espírito Santo, Brazil: C. Valério-Júnior 65, 66 (CGMS 61174, 61175) 20°27'34.73"S, 41°48'36.41"W. Collected in Espírito Santo, Brazil: C. Valério-Júnior 71, 77 (CGMS 61180, 61181), 20°29'21.01"S, 41°49'18.35"W. Collected in Minas Gerais, Brazil: C. Valério-Júnior 87 (CGMS 61196), 22°22'57.73"S, 44°41'6.51"W. Collected in Minas Gerais, Brazil: C. Valério-Júnior 89 (CGMS 61198), 22°21'35.77"S, 44°44'13.56"W. Collected in Minas Gerais, Brazil: C. Valério-Júnior 92 (CGMS 61201), 22°21'52.17"S, 44°43'29.05"W. Collected in Minas Gerais, Brazil: C. Valério-Júnior 96 (CGMS 61205), 22°21'35.77"S, 44°44'13.56"W. Collected in Minas Gerais, Brazil: C. Valério-Júnior 99 (CGMS 61208), 22°22'0.87"S, 44°44'20.98"W. Collected in Minas Gerais, Brazil: C. Valério-Júnior 101 (CGMS 61210), 22°22'7.34"S, 44°44'54.95"W. Collected in Rio Grande do Sul, Brazil: A.A. Spielmann 10191 (CGMS 40957), 29°09'27.3"S, 50°04'49.8"W.

Stereocaulon argus Hook. f. & Taylor. Identified by J.M. Torres & A.A. Spielmann. Chemical composition: Atranorin, perlatolic, anziaic, stenosporic e 2-O-methylnorstenosporic acids. Specimen analysed collected in Terra del Fuego, Chile: A.A. Spielmann 12542 (CGMS), 54°51'29.22"S, 68°30'31.85"W.

4.5 Atividade biológica

4.5.1- Atividade antibacteriana

Os extratos de *Stereocaulon* avaliados frente às bactérias *S. aureus*, *E. faecium* e *E. coli* apresentaram atividade antibacteriana e os valores de CMI são mostrados na **tabela 8**.

Tabela 8 - Valores da CMI ($\mu\text{g/mL}$) de extratos de *Stereocaulon* frente à quatro linhagens de bactérias.

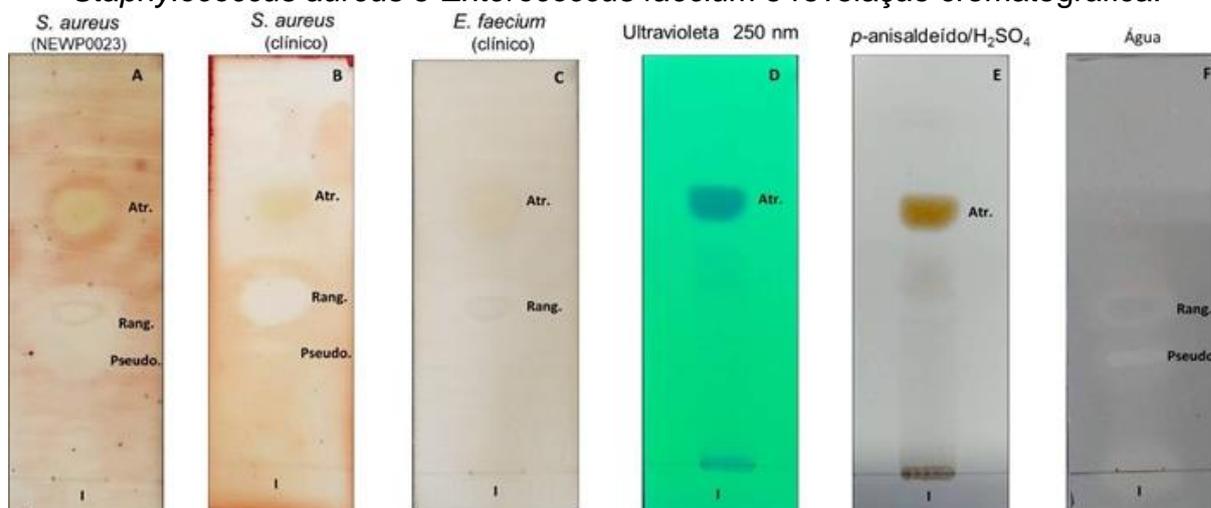
Extrato de <i>Stereocaulon</i>	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>S. aureus</i> (NEWP0023)	<i>S. aureus</i> (clínico)	<i>E. faecium</i> (clínico)	<i>E. coli</i> (NEWP 0022)
Grupo I	≥ 500	250	250	≥ 250
Grupo II	250	250	125	≥ 250
Grupo III	250	250	250	≥ 250
Grupo IV	31,25	31,25	125	≥ 250
gentamicina	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	3,75	≥ 500

Fonte: própria autora.

Os resultados da atividade antibiótica (**tabela 8**) mostram que todos os extratos acetônicos de *Stereocaulon* (**grupos I, II, III e IV**) apresentaram CMI $\geq 250 \mu\text{g/mL}$ para bactéria Gram negativa *E. coli*. Entre os extratos, o do **grupo IV** foi o mais ativo, com CMI de $31,25 \mu\text{g/mL}$ para às duas cepas de *S. aureus* (clínica e NEWP0023). Os demais extratos apresentaram CMI de $125 \mu\text{g/mL}$ e $250 \mu\text{g/mL}$ para as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecium*), com exceção do extrato do **grupo I** que apresentou CMI $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus* (NEWP0023). De acordo com KUETE (2010), extratos com valores de CMI abaixo de $100 \mu\text{g/mL}$ possuem significativa atividade antibacteriana. Sendo assim, dos quatro extratos testados, apenas o do **grupo IV** apresentou atividade antibacteriana relevante (*S. aureus* – cepa clínica e NEWP0023).

Os extratos também foram avaliados qualitativamente quanto a atividade antibacteriana usando a técnica de bioautografia para obter informações das substâncias ativas dos extratos. A bioautografia dos extratos e os cromatogramas são mostrados nas **Figuras 52, 53, 54 e 55**.

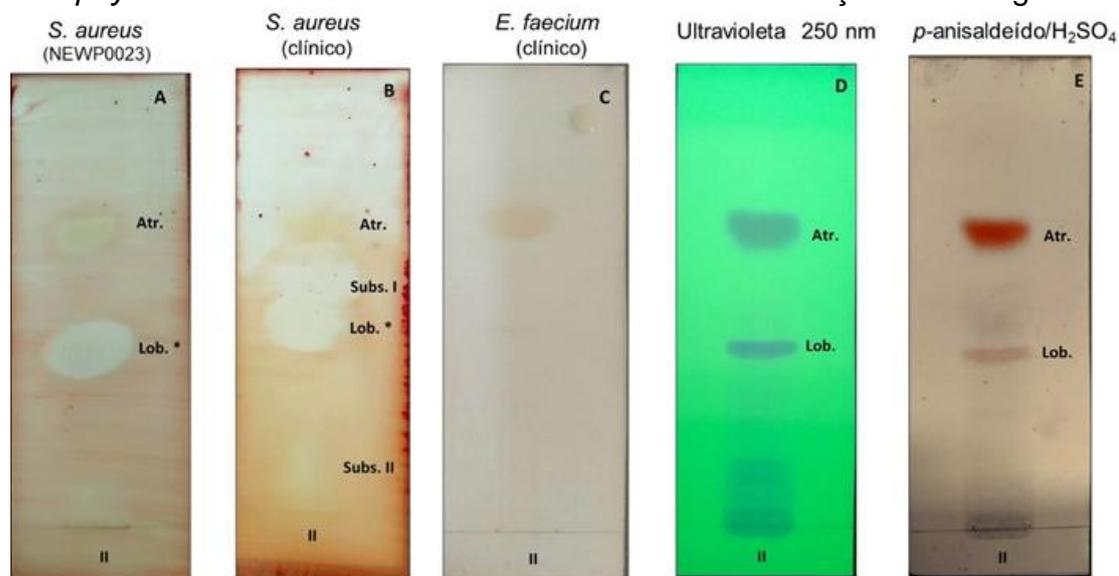
Figura 52 - Bioautografia do extrato acetônico de *Stereocaulon* do grupo I frente a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* e revelação cromatográfica.



Fonte: própria autora.

Staphylococcus aureus (A e B) (revelação com solução de trifetil tetrazólio); *Enterococcus faecium* (C). Revelação com UV₂₅₄ (D), *p*-anisaldeído/H₂SO₄ e aquecimento (E), revelação com água (F). Eluente: tolueno: ácido acético (85:15 v/v). Atr.: Atranorina; Rang.: ácido rangifórmico; Pseudo.: ácido pseudonrangifórmico.

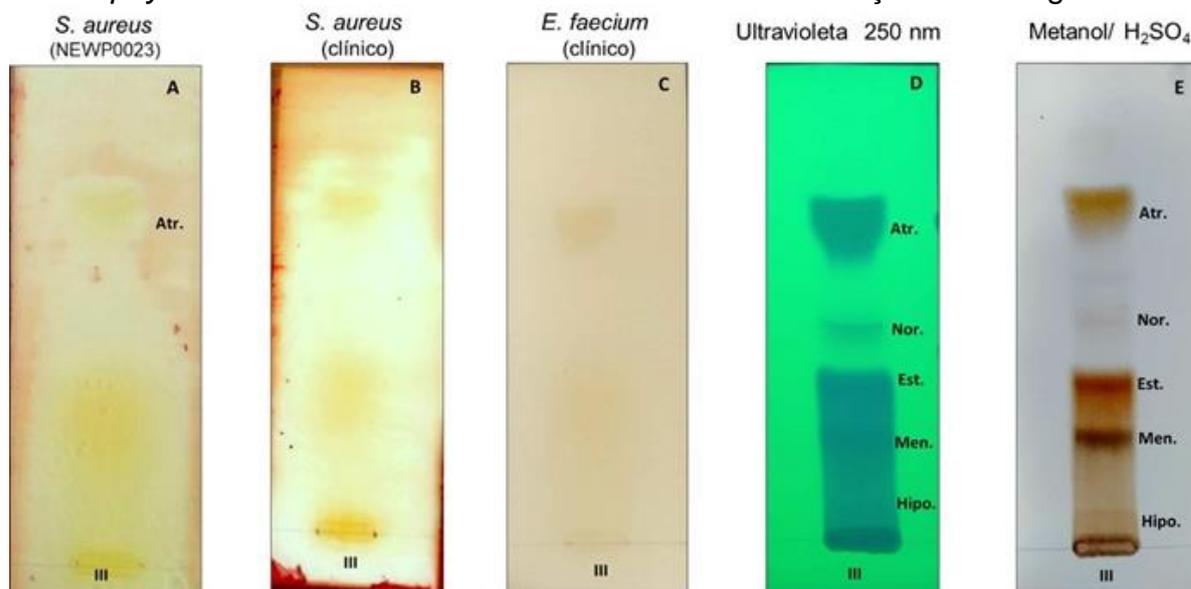
Figura 53 - Bioautografia do extrato acetônico de *Stereocaulon* do grupo II frente a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* e revelação cromatográfica.



Fonte: própria autora.

Staphylococcus aureus (A e B) (revelação com solução de trifetil tetrazólio); *Enterococcus faecium* (C). Revelação com UV₂₅₄ (D), *p*-anisaldeído/H₂SO₄ e aquecimento (E). Eluente: tolueno: ácido acético (85:15 v/v). Atr.: Atranorina; Lob.*: ácido lobárico e/ou outra(s) substância(s) presente(s) no extrato; Subs. I e Subs. II.: substância(s) presente(s) no extrato: estrepsilina e/ou lobarina e/ou oxisifulina e/ou ácido girofórico e/ou ácido vinapraesorediósico e/ou ácido bourgeânico e/ou ácido colensóico e/ou outras substâncias presentes no extrato.

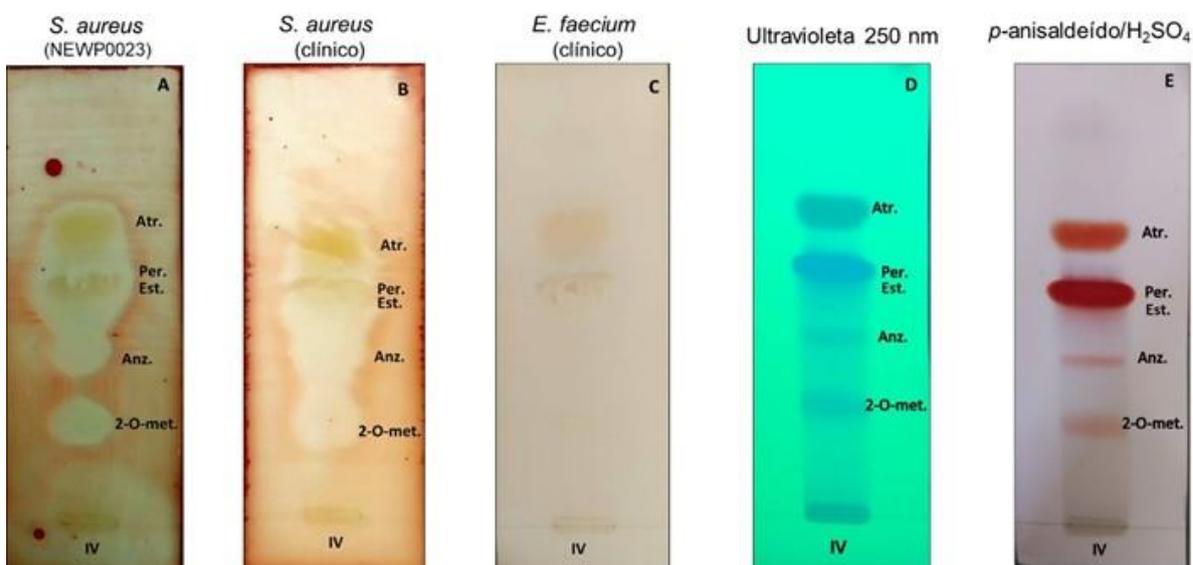
Figura 54 - Bioautografia do extrato acetônico de *Stereocaulon* do grupo III frente a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* e revelação cromatográfica.



Fonte: própria autora.

Staphylococcus aureus (A e B) (revelação com solução de trifetil tetrazólio); *Enterococcus faecium* (C). Revelação com UV₂₅₄ (D), *p*-anisaldeído/H₂SO₄ e aquecimento (E). Eluente: tolueno: ácido acético (85:15 v/v). **Atr.**: Atranorina; **Nor.**: ácido norstítico; **Est.**: ácido estítico; **Men.**: ácido menegaziáico; **Hipo.**: ácido hipoconstítico.

Figura 55 - Bioautografia do extrato acetônico de *Stereocaulon* do grupo IV frente a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* e revelação cromatográfica.



Fonte: própria autora.

Staphylococcus aureus (A e B) (revelação com solução de trifetil tetrazólio); *Enterococcus faecium* (C). Revelação com UV₂₅₄ (D), *p*-anisaldeído/H₂SO₄ e aquecimento (E). Eluente: tolueno: ácido acético (85:15 v/v). **Atr.**: Atranorina; **Per.**: ácido perlatólico; **Est.**: ácido estenospórico; **Anz.**: ácido anziáico; **2-O-met.**: ácido 2-O-metilnoestnospórico.

É possível notar nas **Figuras 52, 53, 54 e 55** que a atranorina, presente em todos os extratos, inibiu o crescimento das duas cepas da bactéria *S. aureus* (NEWP0023 e clínico). O ácido rangifórmico presente no extrato do **grupo I** foi ativo contra as duas bactérias: *S. aureus* (NEWP0023 e clínico) e *Enterococcus faecium* (clínico). Já o ácido pseudonorrangifórmico foi ativo apenas para *S. aureus* (NEWP0023 e clínico), embora a CMI do extrato do **grupo I** tenha sido de 250 a ≥ 500 $\mu\text{g/mL}$.

Do **grupo II**, o ácido lobárico foi ativo também somente frente a bactéria *S. aureus* (NEWP0023 e clínico). Neste extrato, além do ácido lobárico e atranorina, estão presentes também outras substâncias não reveladas nos cromatogramas, algumas delas de Rf muito próximos ao ácido lobárico. É possível notar na **Figura 53A e B** que a mancha de inibição do ácido lobárico (**Lob.**) é mais extensa que àquela da revelação química (**Lob.- Figura 53D e E**), fato que levou a pensar que a inibição do ácido lobárico frente a bactérias *S. aureus* (NEWP0023 e clínico) pode corresponder não só a ação desse ácido, como também de uma ou mais substâncias presentes no extrato e com migração cromatográfica próxima à do ácido lobárico.

A mancha de inibição frente a cepa clínica de *S. aureus*, observada na **Figura 53B**, localizada entre a atranorina e o ácido lobárico (**Subs.I**) e também próximo ao ponto de aplicação (**Subs. II**), corresponde a(s) outra(s) substância(s) presente(s) no extrato.

As substâncias presentes no extrato do **grupo III**, com exceção da atranorina, não puderam ser avaliadas quanto à atividade antibacteriana frente à bactéria *S. aureus* (NEWP0023 e clínico), pois não foi possível observar o crescimento bacteriano em toda placa, como pode ser observado na **Figura 54**.

Os ácidos perlatólico e estenospórico apresentam valores de Rf muito próximos no eluente tolueno: ácido acético (85:15 v/v), com valores de 54 e 52, respectivamente. Observando a **Figura 55**, é possível notar que a mancha de inibição do ácido perlatólico é extensa, chegando àquela do ácido anziáico. Esse fato pode indicar que o ácido estenospórico também é ativo frente às duas cepas de *S. aureus* (NEWP0023 e clínico), assim como os ácidos anziáico e 2-O-metilnoestenospórico presentes no extrato do **grupo IV**.

Não foi possível avaliar a atividade antibacteriana por bioautografia da atranorina e das substâncias dos **grupos I, II, III e IV** para a bactéria *Enterococcus faecium* (clínico), devido à falta de nitidez do crescimento bacteriano sobre a placa

cromatográfica, entretanto é possível notar uma pequena mancha de inibição do ácido rangifórmico, presente no extrato do **grupo I** na **Figura 52C**, indicando que esse ácido é ativo frente essa bactéria.

A **tabela 9** apresenta as substâncias ativas de cada extrato analisado de acordo com as análises realizadas de bioautografia.

Tabela 3 - Substâncias ativas presentes nos extratos de *Stereocaulon* (grupos I, II, III e IV) frente às bactérias *S. aureus* (NEWP0023 e clínico) e *E. faecium* (clínico).

Extrato	Substâncias ativas		
	<i>S. aureus</i> (NEWP0023)	<i>S. aureus</i> (clínico)	<i>E. faecium</i> (clínico)
Grupo I	atranorina, ác. rangifórmico e ác. pseudonorrangifórmico	atranorina, ác. rangifórmico e ác. pseudonorrangifórmico	ác. rangifórmico
Grupo II	atranorina e ác. lobárico	Atranorina, ác. lobárico e outras substâncias presentes no extrato	-
Grupo III	atranorina	atranorina	-
Grupo IV	atranorina, ác. perlatólico, ác. estenospórico, ác. anziáico e ác. 2-O-metilnoestenospórico	atranorina ác. perlatólico e/ou ác. estenospórico e ác. anziáico	-

Fonte: própria autora.

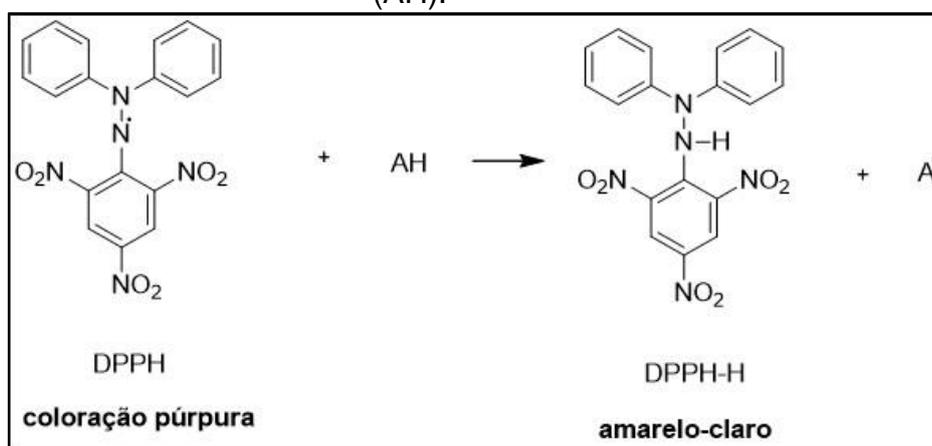
O extrato do **grupo IV** foi o extrato mais ativo, com CMI de 31,25 µg/mL e todas as substâncias presentes no extrato são responsáveis pela atividade frente às duas cepas de *S. aureus* (clínica e NEWP0023): atranorina, os ácidos perlatólico, estenospórico, anziáico e 2-O-metilnoestenospórico.

O trabalho de MICHELETTI *et al.* (2021) avaliaram a atividade antibiótica do extrato acetônico de *S. ramulosum* frente as bactérias *S. aureus* e *E. faecalis*. Verificaram que atranorina, os ácidos perlatólico e anziáico foram as substâncias responsáveis pela atividade antibiótica do extrato e determinaram que o ácido perlatólico é um potencial antibacteriano com CMI entre 3,9 à 7,8 µg/mL para essas bactérias.

4.5.2 - Atividade antioxidante

Extratos de *Stereocaulon* (**grupos I, II, III e IV**) foram avaliados quanto à atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH. O DPPH é um radical estável de nitrogênio de coloração púrpura e por ação do antioxidante (AH) é reduzido (DPPH-H) mudando de cor para amarelo-clara (KARADAG *et al.* 2009; GÜLÇİN, 2012), conforme mostra a **Figura 56**.

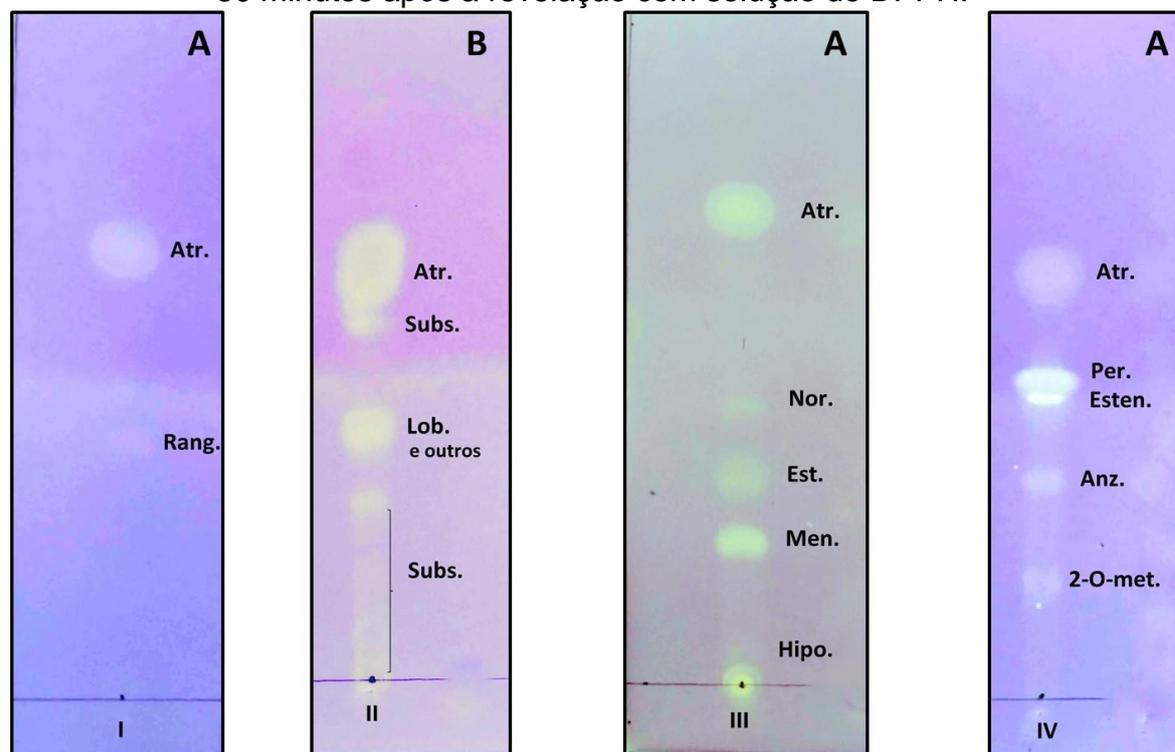
Figura 56 - Reação de redução do DPPH por um antioxidante (AH).



Fonte: própria autora.

A **Figura 57** mostra os cromatogramas de um extrato representativo de cada grupo (**I, II, III e IV**). A identificação das substâncias antioxidantes foi feita com base em cromatogramas dos mesmos extratos revelados sob luz UV₂₅₄, H₂SO₄ aquecimento e/ou *p*-anisaldeído com reaquecimento.

Figura 57 - Cromatogramas dos extratos de *Stereocaulon* dos grupos I, II, III e IV, 30 minutos após a revelação com solução de DPPH.



Fonte: própria autora.

I- Extrato do grupo I; II – Extrato do grupo II; III – Extrato do grupo III; IV – Extrato do grupo IV, Atr.- Atranorina, Rang.- ácido rangifórmico, Lob. e outros- Ácido lobárico e outras substâncias, Sub.- outras substâncias presentes no extrato, Nor.- Ácido norstítico, Est.- Ácido estítico, Men.- Ácido menegaziáico, Hipo.- Ácido hipoconstítico, Per.- Ácido perlatólico, Esten.- Ácido estenospórico, Anz.- Ácido anziáico, 2-O-met.- Ácido 2-O-metilnoestenospórico, A- tolueno: ácido acético (85:15 v/v) e B- tolueno: dioxano: ácido acético (90:25:4 v/v/v).

A análise dos resultados da atividade antioxidante dos extratos de *Stereocaulon* (**Figura 57**) indicou que a atranorina, presente em todos os extratos (**grupos I, II, III e IV**), possui atividade antioxidante frente a DPPH. Dos ácidos graxos presentes no **grupo I**, apenas o rangifórmico foi ativo.

No extrato do grupo **II** foi possível identificar que o ácido lobárico apresenta atividade antioxidante. Como os extratos do **grupo II** contém substâncias estruturalmente relacionadas ao ácido lobárico que devem apresentar valores de Rf próximos àquele do ácido lobárico, não é possível determinar se a atividade antioxidante apresentada é devida apenas ao ácido lobárico ou também às outras substâncias. Neste extrato, é possível notar também que há outras manchas amarelas esbranquiçadas, uma logo abaixo da mancha da atranorina, e várias outras abaixo do ácido lobárico, indicando que há outras substâncias ativas presentes.

No extrato do **grupo III**, todas as substâncias presentes apresentaram atividade antioxidante: os ácidos norstítico, estítico, menegaziáico e hipoconstítico. Todas as substâncias presentes no extrato do **grupo IV** - ácidos perlatólico, estenospórico, anziáico e 2-O-metilnoestenospórico – foram ativas. No cromatograma deste grupo é possível identificar a presença do ácido estenospórico que migra muito próximo ao ácido perlatólico.

Não foi possível quantificar a atividade antioxidante dos extratos devido devido ao pouco material disponível. O tamanho das amostras (parte de exsiccadas) foi uma parte muito desafiadora do trabalho. Ainda assim, dados da literatura indicam que alguns desses compostos apresentam fraca atividade sequestradora do radical DPPH, como os ácidos norstítico e estítico isolados da espécie *Stereocaulon montagneanum* e o ácido lobárico presente em *S. alpinum* (ISMED *et al.* 2017; BHATTARAI *et al.* 2013).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise química dos extratos acetônicos das 151 exsiccatas de *Stereocaulon* realizadas pelas técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), microcristalização, RMN de ^1H e ^{13}C e por CLAE-DAD-EM/EM permitiu identificar 24 substâncias, das quais quatro são ácidos graxos, seis depsidonas, seis depsídeos, um dibenzofurano, um éter difenílico, uma cromona (oxisifulina), além de 5 compostos ainda não citados na literatura – os ácidos 2''-eno lobárico, 3''-eno lobárico e 4''-eno lobárico (depsidonas) e duas substâncias de estruturas não definidas.

As informações sobre a composição química e a análise morfológica de cada uma das 151 exsiccatas permitiu a identificação em 9 táxons diferentes: *Stereocaulon corticatum*, *Stereocaulon alpinum*, *Stereocaulon melanopotamicum*, *Stereocaulon implexum*, *Stereocaulon tomentosum*, *Stereocaulon tomentosum* var. *capitatum*, *Stereocaulon glabrum*, *Stereocaulon ramulosum* e *Stereocaulon argus*.

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos mostrou que apenas o do **grupo IV** apresentou atividade significativa, com CMI de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ frente às duas cepas de *S. aureus* (clínica e NEWP0023). A atranorina, os ácidos perlatólico, anziáico, estenosporico e 2-O-metilnoestenosporico são as substâncias responsáveis pela atividade frente a essa bactéria. Os demais extratos, apesar de apresentarem uma ou mais substâncias ativas para *S. aureus* apresentaram CMI de 125 $\mu\text{g/mL}$ à 250 $\mu\text{g/mL}$ para as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecium*), com exceção do extrato do **grupo I** que apresentou CMI ≥ 500 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus* (NEWP0023).

A avaliação dos extratos quanto a atividade antioxidante com DPPH indicou mais de dez substâncias ativas, entre elas atranorina, ácidos lobárico, norstítico, estítico, menegaziáico, hipoconstítico, perlatólico, estenosporico, anziáico, 2-O-metilnoestenosporico.

Concluindo, reiteramos que as informações sobre a composição química de líquens, especialmente com relação aos compostos do metabolismo secundário são importantes para a definição taxonômica das espécies. Na maioria dos casos o uso de *spot test*, cromatografia em camada delgada e microcristalização são suficientes para definir a composição química, entretanto, no caso de líquens do gênero *Stereocaulon*, especialmente as espécies que contêm ácido lobárico, a definição mais precisa da composição exige o uso de técnicas mais avançadas como a EM. Neste trabalho, embora com estruturas de duas substâncias ainda a serem confirmadas,

apresentamos uma definição mais precisa da composição química, em termos de substâncias do metabolismo secundário, de nove espécies do gênero *Stereocaulon*.

REFERÊNCIAS

- ARCHER, A.W. Quantitative distribution of lichen products in Australian scyphose *Cladonia* species. **Lichenologist**, 13(3), 259-263, 1981.
- ARUP, U.; EKMAN, S.; LINDBOM, L.; MATTESSON, J.E. High Performance thin layer chromatography (HPTLC), an improved technique for screening lichen substances. **Lichenologist**, 25, 61-71, 1993.
- BENN, M.H.; LORIMER, S.D.; PERRY, N.B. Revision of Structure of Rangiformic acid. **Phytochemistry**, 47(8), 1649-1658, 1998.
- BHATTACHARYYA, S.; DEEP, P.R.; SINGH, S.; NAYAK, B. Lichen Secondary Metabolites and Its Biological Activity. **American Journal of PharmTech Research**, 6(6), 28-44, 2016.
- BHATTARAI, H.D.; KIM, T.; OH, H.; YIM, J.H. A new pseudodepsidone from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum* and its antioxidant, antibacterial activity. **The Journal of Antibiotics**, 66, 559–561, 2013.
- BOEKHOUT, T. Studies on Colombian cryptogams XVIII. The genus *Stereocaulon* (Schreber) Hoffmann (Lichenès). **The Journal Hattori Botany Laboratory**, 53, 483-510, 1982.
- BOUSTIE, J.; GRUBE, M. Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. **Plant Genetic Resources**, 3(2), 273–287, 2005.
- BRAKNI, R.; AHMED, M.A.; BURGER, P.; SCHWUING, A.; MICHEL, G.; POMARES, C.; HASSEINE, L.; BOYER, L.; FERNANDEZ, X.; LANDREAU, A.; MICHEL, T. UHPLC-HRMS/MS Based Profiling of Algerian Lichens and Their Antimicrobial Activities. **Chemistry & Biodiversity**, 15(4), 2018.
- BUCAR, F.; SCHNEIDER, I.; ÖGMUNSDÓTTIR, H.; INGÓLFSDÓTTIR, K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. **Phytomedicine**, 11, 602-606, 2004.
- BRISDELLI, F.; PERILLI, M.; SELITRI, D.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.A.; NICOLETTI, M.; BOZZI, A.; AMICOSANTE, G.; CELENZA, G. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study. **Phytotherapy Research**, 27(3), 431-437, 2012.
- BÜDEL, B.; SCHEIDEGGER, C. Tallus morphology and anatomy. *In*: NASH, T.H. (org.). **Lichen Biology**, 2. ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2008, p. 38–68.
- CALCOTT, M.J.; ACKERLEY, D.F.; KNIGHT, A.; KEYZERS, R.A.; OWEN, J.G. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. **Chemical Society Reviews**, 47, 1730-1760, 2018.

CARPENTIER, C.; BARBEAU X.; AZELMAT, J.; VAILLANCOURT, GRENIER, D.; LEGÜE, P.; VOYER, N. Lobaric acid and pseudodepsidones inhibit NF- κ B signaling pathway by activation of PPAR- γ . **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 26(22), 5845-5851, 2018.

CASTRO, O.N.; BENITES, J.; RODILLA, J.; SANTIAGO, J.C.; SIMIRGIOTIS, M.; SEPULVEDA, B.; ARECHE, C. Metabolomic Analysis of the Lichen *Everniopsis trulla* Using Ultra High Performance Liquid Chromatography Quadrupol Orbitrap Mass Spectrometry (UHPLC QOT MS). **Chromatographia**, 80, 967–973, 2017.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P.L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, 89,137–146, 2002.

CÓRDOBA, C. V. **Fisiología de las substâncias liquénicas**. Madrid. Alhambra S.A., 1975.

CORNEJO, A.; SALGADO, F.; CABALLERO, J.; VARGAS, R.; SIMIRGIOTIS, M.; ARECHE, C. Secondary Metabolites in *Ramalina terebrata* Detected by UHPLC/ESI/MS/MS and Identification of Parietin as Tau Protein Inhibitor. **International Journal of Molecular Sciences**, 17, 1303-1315, 2016.

CULBERSON, C.F. **Chemical and Botanical Guide to lichen products**. United States of America. The University of North Carolina Press.,1969.

CULBERSON, C.F. Improved conditions and new data for identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. **Journal of Chromatography A**, 72, 113-115, 1972.

CULBERSON, C. F. Biogenetic Relationships of the Lichen Substances in the Framework of Systematics. **The Bryologist**, 89(2), 91-98, 1986.

CULBERSON, C.F.; CULBERSON, W.L.; JOHNSON, A. A standardized TLC Analysis of β -orcinol depsidones. **The Bryologist**, 84(1), 16-29, 1981.

CULBERSON, C. F.; JOHNSON, A. A standardized two-dimensional thin-layer chromatographic method for lichen products. **Journal of Chromatography**, 128, 253-259, 1976.

CULBERSON, C.F.; KRISTINSSON, H. A standardized method for the identification of lichen products. **Journal of Chromatography**, 46, 85-93, 1970.

ELIX, J. A. **A Catalogue of Standardized Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances**. 3. ed. Canberra: Published by the author, 2014.

ELIX, J. A.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E. **Biochemistry and secondary metabolites**. In: **Lichen Biology**, 2. ed., Cambridge: University Press, 2008.

- ELKHATEEB, W.A.; ELNAHAS, M.O.; DABA, G.M. Lichentherapy: Highlights on the Pharmaceutical Potentials of Lichens. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, 6(2), 1-10, 2021.
- FEIGE, G.B.; LUMBSCH, H.T.; HUNECK, S.; ELIX, J.A. Identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid chromatographic method. **Journal of Chromatography**, 646, 417-427, 1993.
- FOO, L.Y.; GALLOWAY, D. Pseudodepsidones and Other Constituents from *Xanthoparmelia scabrosa*. **Phytochemistry**, 18, 1977-1980, 1979.
- FRIEDL, T.; BÜDEL, B. Photobionts. In: *In: NASH, T.H. (org.). Lichen Biology*, 2. ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2008, p. 9–26.
- GONZÁLEZ, A. G.; PÉREZ, E.M.R.; PADRÓN, C.E.H.; MARRERA, J.B. Chemical Constituents of the Lichen *Stereocaulon azureum*. **Zeitschrift für Naturforschung**, 47c, 503-507, 1992.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, 26, 345-391, 2012.
- GUPTA, V.K.; DAROKAAR, M.P.; SHANKER, K.; NEGI, A.S.; SRIVASTAVA, S.K.; GUPTA, M.M.; KHANUJA, S.P.S. Rapid and Sensitive HPLC Method for the Determination of Polyphenols in Various Lichen Species of Himalayan Origin. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 30(1), 97-111, 2007.
- HALE, M. E. Growth. In: AHMADJIAN, V.; HALE, M. E. (org.). **The Lichens**. London: Academic Press, 1973, p. 473-492.
- HALE, M. E. **The Biology of Lichens**. 3. ed. London: Edward Arnold Ltd., 1983.
- HARALDSDÓTTIR, S.; GUOLAUGSDÓTTIR, E.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; ÖGMUNDSÓTTIR, H.M. Anti-Proliferative Effects of Lichen-Derived Lipoxigenase Inhibitors on Twelve Human Cancer Cell Lines of Different Tissue Origin in vitro. **Planta Medica**, 70, 1098-1100, 2004.
- HAWKSWORTH, D.L., GRUBE, M. Lichens redefined as complex ecosystems. **New Phytologist**, 227, 1281-1283, 2020.
- HOLZMANN, G.; LEUCKERT, C. Applications of Negative Fast Atom Bombardment and MS/MS to Screening of Lichen Compounds. **Phytochemistry**, 29(7), 2277-2283, 1990.
- HONDA, N.K.; VILEGAS, W. A química dos liquens. **Química Nova**, 21(6), 110-125, 1998.
- HONDA, N.K.; GONÇALVES, K.; BRANDÃO, L.F.G.; COELHO, R.G.; MICHELETTI, A.C.; SPIELMANN, A.A.; CANÊZ, L.S. Screening of Lichen Extracts Using Tyrosinase Inhibition and Toxicity Against *Artemia salina*. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, 8 (3), 181-188, 2016a.

HONDA, N. K.; FREITAS, D. S.; MICHELETTI, A. C.; CARVALHO, P. N. C.; SPIELMANN, A. A.; CANÊZ, L. S. *Parmotrema screminiae* (Parmeliaceae), a Novel Lichen Species from Brazil with Potent Antimicrobial Activity. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, 8 (6), 334-340, 2016b.

HONEGGER, R. The symbiotic-phenotype of lichen-forming ascomycetes and their endo- and epibionts. In: HOCK, B. **The Mycota**. 2. ed. Berlin: Springer, 2012, p. 287–339.

HONEGGER, R. Mycobionts. In: NASH, T.H. (org.). **Lichen Biology**, 2. ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2008, p. 27–39.

HONG, J.; SUH, S.; KIM, T.K.; KIM, J.E.; HAN, S.J.; YOUN, U.J.; YIM, J.H.; KIM, I. Anti-Cancer Activity of Lobaric Acid and Lobarstin Extracted from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum*. **Molecules**, 23(3), 658-668, 2018.

HUNECK, S. The Significance of Lichens and Their Metabolites. **Naturwissenschaften**, 86, 559–570, 1999.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. **Identification of Lichen Substances**. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

HUSNUNNISA.; ISMED, F.; TAHER, M.; ICHWAN, S.J.A.; BAKHTIAR, A.; ARBAIN, D. Screening of some Sumatran medicinal plants and selected secondary metabolites for their cytotoxic potential against MCF-7 and HSC-3 cell lines. **Journal of Research in Pharmacy**, 23(4), 770-776, 2019.

INGOLFSDOTTIR, K.; GISSURARSON, S.R.; MÜLLER-JAKIC, B.; BREU, W.; WAGNER, H. Inhibitory effects of the lichen metabolite lobaric acid on arachidonate metabolism in vitro. **Phytomedicine**, 2 (3), 243-246, 1996.

ISMED, F.; DÉVÉHAT, F.L.; ROUAUD, I.; FERRON, S.; BAKHTIAR, A.; BOUSTIE, J. NMR reassignment of stictic acid isolated from a Sumatran lichen *Stereocaulon montagneanum* (Stereocaulaceae) with superoxide anion scavenging activities. **Zeitschrift für Naturforschung C**. 72(C), 55-62, 2017.

JIN, Y.; MA, Y.; XIE, W.; HOU, L.; XU, H.; ZHANG, K.; KHANG, L.; DU, Y. UHPLC-Q-TOF-MS/MS-oriented characteristic components dataset and multivariate statistical techniques for the holistic quality control of *Usnea*. **RSC Advances**, 8, 15487-15500, 2018.

JOO, Y.A.; CHUNG, H.; YOON, S.; PARK, J. I.; LEE, J. E.; MYUNG, C.H.; HWANG, J.S. Skin Barrier Recovery by Protease-Activated Receptor-2 Antagonist Lobaric Acid. **Biomeolecules & Therapeutics**, 24(5), 529-535, 2016.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods**, 2, 41-60, 2009.

KARUNARATNE, V.; BOMBUWELA, K.; KATHIRGAMANATHAR, S.; THADHANI, V. M. Lichens: A chemically Important Biota. **Journal of National Science Foundation Sri Lanka**, 33(3), 169-186, 2005.

KIM, S.; JO, S.; LEE, H.; KIM, T.U; KIM, I.; YIM, J.H.; CHUNG, H.Y. Lobarstin Enhances Chemosensitivity in Human Glioblastoma T98G Cells. **Anticancer Research**, 33, 5445-5452, 2013.

KNON, L.; YIAM, J.; LEE, H.; PYO, S. Lobaric acid inhibits VCAM-1 expression in TNF- α -stimulated vascular smooth muscle cells via modulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways. **Biomolecules & Therapeutics**, 24(1), 25-32, 2016.

KOKUBUN, T.; SHIU, W. K. P.; GIBBONS, S. Inhibitory Activities of Lichen-Derived Compounds against Methicillin- and Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Planta Medica**, 73(2), 176-179, 2007.

KONOREVA, L.; PROKOPIEV, I.; FROLOV, I.; CHESNOKOV, S.; ROZHINA, S.; PORYADINA, L.; SHAVARDA, A. Metabolite profiling of the Cladonia lichens using gas chromatography-mass Spectrometry. **Biochemical Systematics and Ecology**, 85, 3-12, 2019.

KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Medica**, 76(14), 1479-1491, 2010.

KUMAR, K.; SIVA, B.; SARMA, V. U. M.; MOHABE, S.; REDDY, A. M.; BOUSTIE, J.; TIWARI, A. K.; RAO, N.R.; BABU, K.S. UPLC-MS/MS Quantitative analysis and structural fragmentation study of five *Parmotrema* lichens from the Eastern Ghats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 156, 45-57, 2018.

LAMB, I. M. A conspectus of the lichen genus *Stereocaulon* (Schreb..) Hoffm. **The Journal Hattori Botany Laboratory**, 43, 191-355, 1977.

LAMB, I. M. On the morphology, phylogeny, and taxonomy of the lichen genus *Stereocaulon*. **Canadian Journal of Botany**, 29, 522-584, 1951.

LATKOSKA, E.; BOBER, B.; CHRAPUSTA, E.; ADAMSKI, M; KAMINSKI, A.; BIALCZYK, J. Secondary metabolites of the lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. and their presence in spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) bark. **Phytochemistry**, 118, 116-123, 2015.

LE POGAM, P.; SCHINKOVITZ, A.; LEGOUIN, B.; LAMER, A. L.; BOUSTIE, J.; RICHOMME, P. Matrix-Free UV-Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry as a Versatile Approach for Accelerating Dereplication Studies on Lichens. **Analytical Chemistry**, 7(20), 10421-10428, 2015.

LEE, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, H.; PYO, S. Anti-Inflammatory Activity of Lobaric Acid via Suppressing NF- κ B/MAPK Pathways or NLRP3 Inflammasome Activation. **Planta Medica**, 85(4), 302-311, 2018.

- LEE, K.; YIAM, J.; LEE, H.; PYO, S. Inhibition of VCAM-1 expression on mouse vascular smooth muscle cells by lobastin via downregulation of p38, ERK ½ and NF- κ B signaling pathways. **Archives of Pharmacal Research**, 39(1), 83-93, 2016.
- LÜCKING, R.; HODKINSON, B. P.; LEAVITT, S. D. Corrections and amendments to the 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota. **The Bryologist**, 130(1), 58-69, 2017.
- MALHOTRA, S.; SUBBAN, R.; SSINGH, A. Lichens- Role in Traditional Medicine and Drug Discovery. **The Internet Journal of Alternative Medicine**, 5(2), 1-6, 2007.
- MARCELLI, M. P. Fungos Liquenizados. *In*: FILHO, L. X.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. (org.). **Biologia de Liqueus**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2006, p. 25-74.
- MICHELLETTI, A. C.; HONDA, N.K.; RAVAGLIA, L.M.; MATAYOSHI, T.; SPIELMANN, A.A. Antibacterial potential of 12 Lichen species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 93(4), 2021.
- MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. **Zeitschrift für Naturforschung**, 65c, 157-173, 2010.
- MORITA, H.; TSUCHIYA, T.; KISHIBE, K.; NOYA, S.; SHIRO, M.; HIRASAWA, Y. Antimitotic activity of lobaric acid and a new benzofuran, sakisacaulon A from *Stereocaulon sasakii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 19(13), 3679-81, 2009.
- MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 56(1-2), 9-16, 2001.
- MUSHARRAF, S.G.; KANWAL, N.; THADHANI, V.M.; CHOUDLARY, M.L. Rapid identification of lichen compounds based on the structure–fragmentation relationship using ESI-MS/MS analysis. **Analytical Methods**, 7, 6066-6076, 2015.
- MUSHARRAF, S.G.; SIDDIQI, F.; ALI, A.; THADHANI, V.M. Sensitive analysis of bioactive secondary metabolites in lichen species using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 146, 279-284, 2017.
- NASH III, T.H. Introduction. *In*: NASH, T.H. (org.). **Lichen Biology**, 2. ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2008, p. 1-8.
- NOROUZI, H.; AZIZI, A.; GHOLAMI, M.; SOHRABI, M.; BOUSTIE, J. Chemotype variations among lichen ecotypes of *Umbilicaria aprina* as revealed by LC-ESI-MS/MS: a survey of antioxidant phenolics. **Environmental Science and Pollution Research**, 27, 40296-40308, 2020.
- ÖGMUNDSÓTTIR, H.M.; ZOËGA, G.M.; GISSURARSON, S.R.; INDÓLFSDÓTTIR, K. Anti-proliferative Effects of Lichen-derived Inhibitors of 5-Lipoxygenase on

Malignant Cell-lines and Mitogen-stimulated Lymphocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 50, 107-115, 1998.

OLIVER-JIMENEZ, D.; KRUGLER, M. C.; RONDEAU, D.; BENIDDIR, M. A.; FERRON, S.; DELHAYE, T.; ALLARD, P. M.; WOLFENDER, J. L.; SIPMAN, H. J. M.; LÜCKING, R.; BOUSTIE, J.; POGAM, P. L. A Database of high-resolution MS/ MS spectra for lichen metabolites. **Scientific Data**, 6, 294, 2019.

OSET, M. The lichen genus *Stereocaulon* (Schreb.) Hoffm. in Poland – a taxonomic and ecological study. **Monographiae Botanicae** 104, Wrocław. Polish Botanical Society, 1-81, 2014.

PARK, J.S.; PARK, C.; PARK, S.; OH, S.; JAYALAL, U.; HUR, J. Revision of the Lichen Genus *Stereocaulon* (Stereocaulaceae, Ascomycota) in South Korea. **Mycobiology**, 46(2), 101-113, 2018.

PARROT, D.; JAN, S.; BAERT, N.; GUYOT, S.; TOMASI, S. Comparative metabolite profiling and chemical study of *Ramalina siliquosa* complex using LC-ESI-MS/MS approach. **Phytochemistry**, 89, 114-124, 2013.

PEJIN, B.; IODICE, C.; BOGDANOVIC, G.; KOJIC, V.; TESEVIC, V. Stictic acid inhibits cell growth of human colon adenocarcinoma HT-29 cells. **Arabian Journal of Chemistry**, 10, S1240-S1242, 2017.

PERICO-FRANCO, L. S.; SORIANO-GARCÍA, M.; CERBÓN, M.A.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, I.; VALENCIA-ISLAS, A.N. Secondary metabolites and cytotoxic potential of *Lobariella pallida* and *Stereocaulon strictum* var. *compressum*, two lichens from Colombian páramo region. **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, 3(4), 31-38, 2015.

RANKOVIĆ, B.; KOSANIĆ, M. Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. In: RANKOVIĆ, B. (org.). **Lichen Secondary Metabolites Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential**. Springer International Publishing, 2015, p. 1-26.

RAVAGLIA, L.M.; GONÇALVES, K.; OYAMA, N.M.; COELHO, R. G.; SPIELMANN, A.A.; HONDA, N.K. In vitro radical-scavenging activity, toxicity against *A. salina*, and NMR profiles of extracts of lichens collected from Brazil and Antarctica. **Química Nova**, 37 (6), 1015-1021, 2014.

REDDY, S.D.; SIVA, B.; KUMAR, K.; BABU, V. S. P.; SRAVANTHI, V.; BOUSTIE, J.; NAYAK, V. L.; TIWARI, A. K.; SRIDHAR, B.; SHASHIKALA, P.; BABU, K. S. Comprehensive Analysis of Secondary Metabolites in *Usnea longissima* (Lichenized Ascomycetes, Parmeliaceae) Using UPLC-ESI-QTOF-MS/MS and Pro-Apoptotic Activity of Barbatic Acid. **Molecules**, 24(12), 2270-2288, 2019.

RIDDLE, L.W. The North American Species of *Stereocaulon*. **Botanical Gazette**, 50 (4), 285-304, 1910.

RINCÓN-ESPITIA, A.; MATEUS, N. Caracterización Morfológica y Anatómica del Género *Stereocaulon* Hoffmann (Ascomycetes-Liquenizados) en Colombia. Morphological and anatomical characterization of the genus *Stereocaulon* Hoffmann (Lichenized Ascomycetes) in Colombia. **Botánica-Morfología**, 35(2), 241-260, 2013.

SALGADO, F.; ALBORNOZ, L.; CORTÉZ, C.; STASHENKO, E.; URREA-VALLEJO, K.; NAGLES, E.; GALICIA-VIVIESCAS, C.; CORNEJO, A.; ARDILES, A.; SIMIRGIOTIS, M.; GARCÍA-BELTRÁN, O.; ARECHE, C. Secondary Metabolite Profiling of Species of the Genus *Usnea* by UHPLC-ESI-OT-MS-MS. **Molecules**, 23, 54-69, 2018.

SANTOS, L.S.; SORIANO, M. P. C.; GALLARDO, Y. M.; CARRASCO-SANCHEZ, V.; NACHTIGALL, F. M.; PEREIRA, I.; PEREIRA, E. Chemotaxonomic Fingerprinting of Chilean Lichens Through Maldi and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 58(2), 244-253, 2015.

SEO, C.; YIM, J. H.; LEE, H. K.; PARK, S. M.; SOHN, J.; OH, H. Stereocalpin A, a bioactive cyclic depsipeptide from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. **Tetrahedron Letters**, 49(1), 29-31, 2008a.

SEO, C.; SOHN, J. H.; PARK, S. M.; LEE, H. K.; OH, H. Usimines A-C, Bioactive Usnic Acid Derivatives from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum*. **Journal of Natural Products**, 71(4), 710-712, 2008b.

SEO, C.; SOHN, J. H.; AHN, J. S.; YIM, J. H.; LEE, H. K.; OH, H. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory effects of depsidone and pseudodepsidone metabolites from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 19, 2801-2803, 2009.

SHIBATA, S. Yasuhiko Asahina (1880-1975) and His Studies on Lichenology and Chemistry of Lichen Metabolites. **The Bryologist**, 103(4), 710-719, 2000.

SHUKLA, V.; JOSHI, G. P. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. **Phytochemistry Reviews**, 9, 303-314, 2010.

SMITH, R. I.; ØSTEDAL, D. O. The lichen genus *Stereocaulon* in Antarctica and South Georgia. **Polar Biology**, 11, 91-102, 1991.

SPIELMANN, A. A. Fungos Liquenizados (Liquens). Instituto de Botânica – IBt. São Paulo. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Texto didático geral), 2006.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. **Natural Product Reports**, 25, 188-200, 2008.

STRACK, D.; FEIGE, G.B.; KROLL, R. Screening of Aromatic Secondary Lichen Substances by High Performance Liquid Chromatography. **Zeitschrift für Naturforschung**, 34C, 395-698, 1979.

TABBABI, K.; KARMOUS, T. Characterization and Identification of the Components Extracted from 28 Lichens in Tunisia by High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC), Morphologic Determination of the Species and Study of the Antibiotic Effects of Usnic Acid. **Medicinal & Aromatic Plants**, 5(4), 1-8, 2016.

THAKUR, M.; CHANDER, H. Potential of Lichens: A Review of Bioactive Compounds with Biological Activities. **Biological Forum – An International Journal**, 13(1), 39-47, 2021.

TORRES-BENÍTEZ, A.; RIVERA-MONTALVO, M.; SEPÚLVEDA, B.; CASTRO, O.N.; NAGLES, E.; SIMIRGIOTIS, M.J.; GARCÍA-BELTRÁN, O.; ARECICHE, C. Metabolomic Analysis of Two Parmotrema Lichens: *P. robustum* (Degel.) Hale and *P. andinum* (Müll. Arg.) Hale Using UHPLC-ESI-OT-MS-MS. **Molecules**, 22(11), 1861, 2017.

VITIKAINEN, O. Great Discoveries in Bryology and Lichenology. William Nylander (1822–1899) and Lichen Chemotaxonomy. **The Bryologist**, 104(2), 263-267, 2001.

WISASTRA, R.; DEKKER, F.J. Inflammation, Cancer and Oxidative Lipoxygenase Activity are Intimately Linked. **Cancers**, 6, 1500-1521, 2014.

XU, M.; HEIDMARSSON, S.; THORSTEINSDOTTIR, M.; EIRIKSSON, F. F.; OMARSDOTTIR, S.; OLAFSDOTTIR, E.S. DNA barcoding and LC-MS metabolite profiling of the lichen-forming genus *Melanelia*: Specimen identification and discrimination focusing on Icelandic taxa. **Plos One**, 12(5), e0178012, 2017.

YOUN, U. J.; SO, J. E.; KIM, J. H.; HAN, S. J.; PARK, H.; KIM, C. I.; YIM, J. H. Chemical constituents from the Antarctic lichen, *Stereocaulon caespitosum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 80, 73-75, 2018.

YOSHIMURA, I.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y.; HUNECK, S.; YAMADA, Y. Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. **Phytochemical Analysis**, 5, 197-205, 1994.

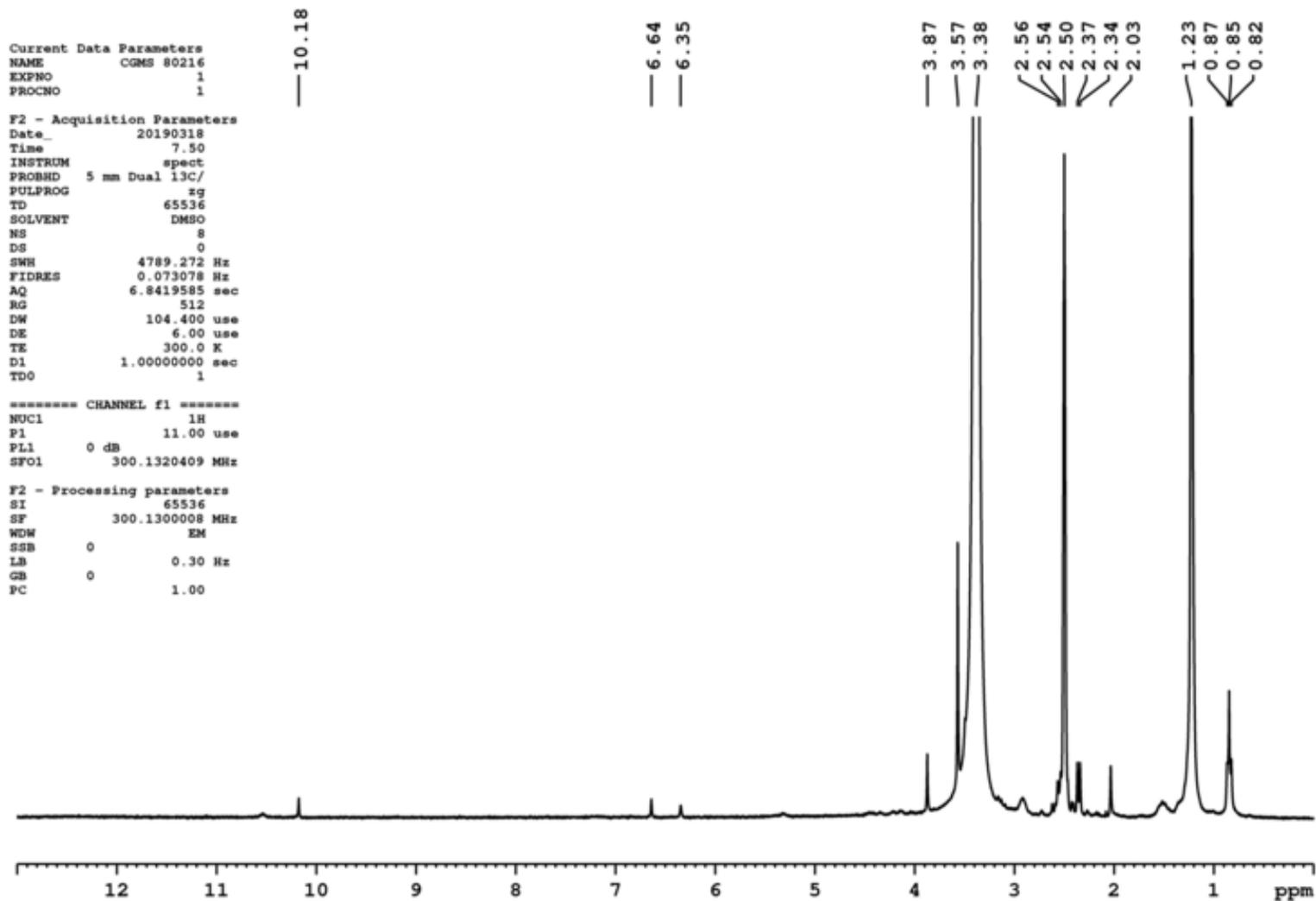
ZAMBARE, V. P.; CHRISTOPHER, L. P. Biopharmaceutical potential of lichens. **Pharmaceutical Biology**, 50(6), 778–798, 2012.

ZEDDA, L.; RAMBOLD, G. The Diversity of Lichenised Fungi: Ecosystem Functions and Ecosystem Services. *In*: UPRETI, D.K.; DIVAKAR, P. K.; SUKLA, V.; BAJPAI, R. (org.). **Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques**. v.2. India: Springer, 2015, p. 121–145.

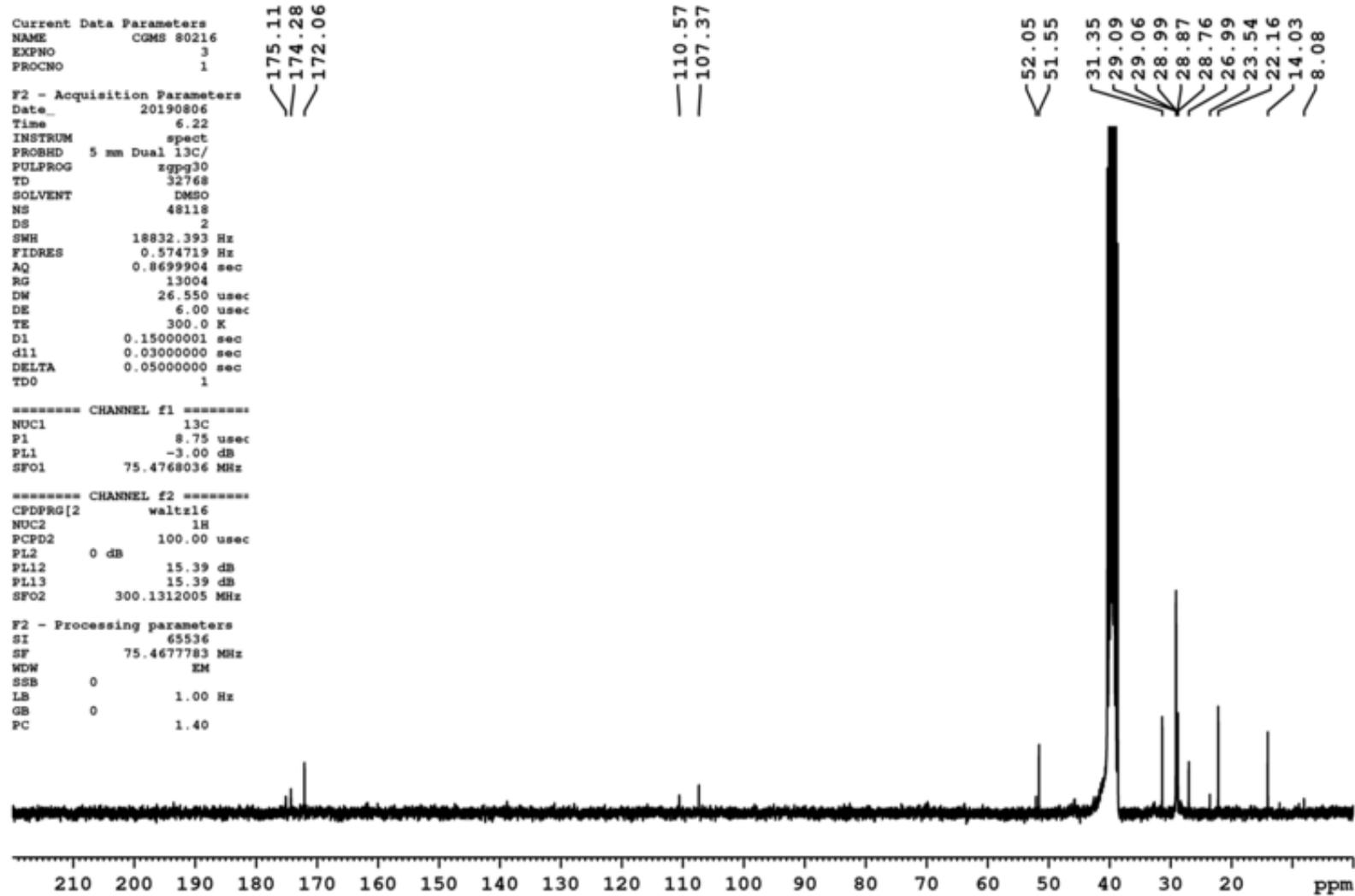
VU, T.H. **Etude des acides gras du genre *Stereocaulon* et étude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe**. 2014. Tese de Doutorado. Université Rennes, 2014.

APÊNDICE

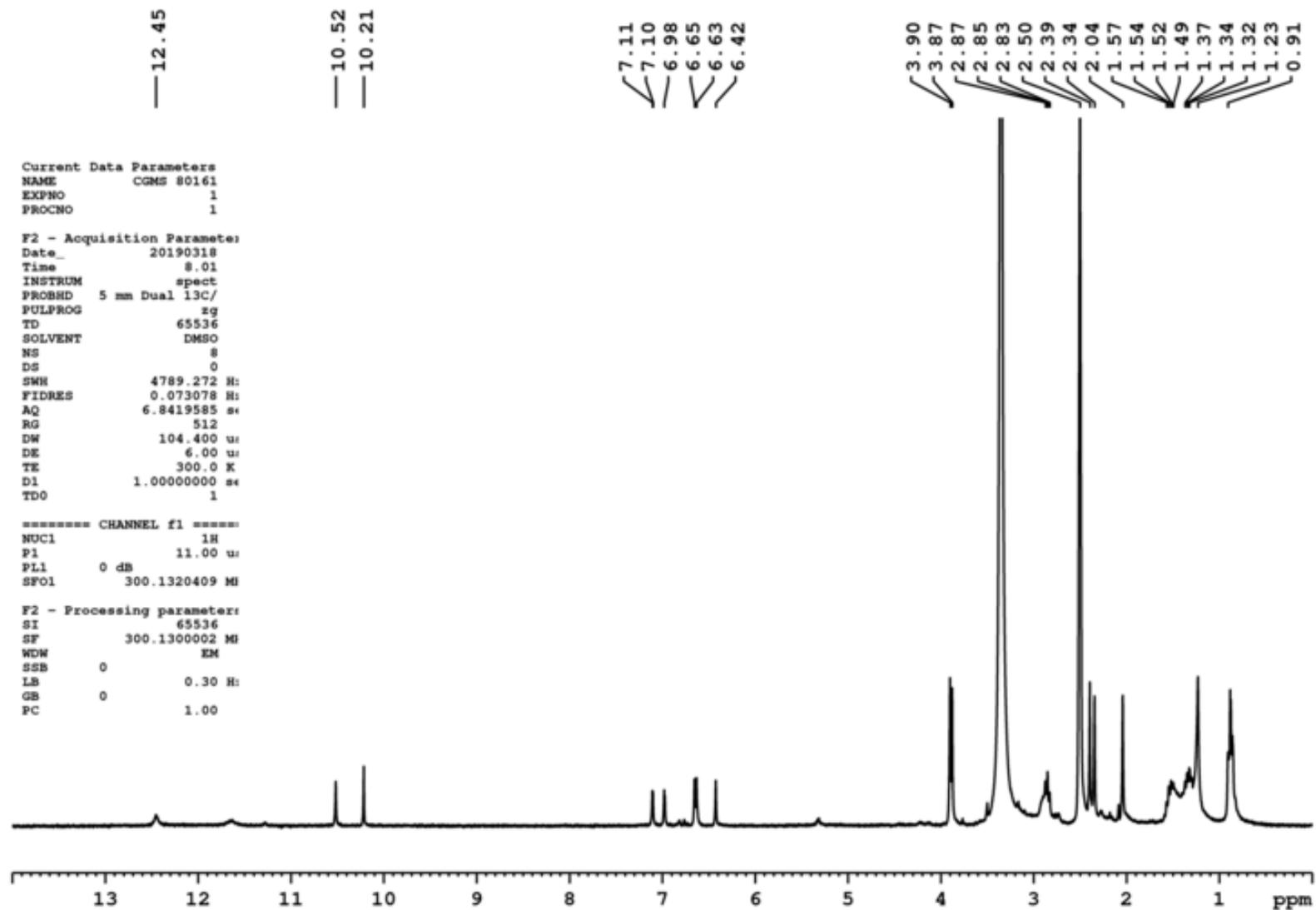
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo I (CGMS 80216)



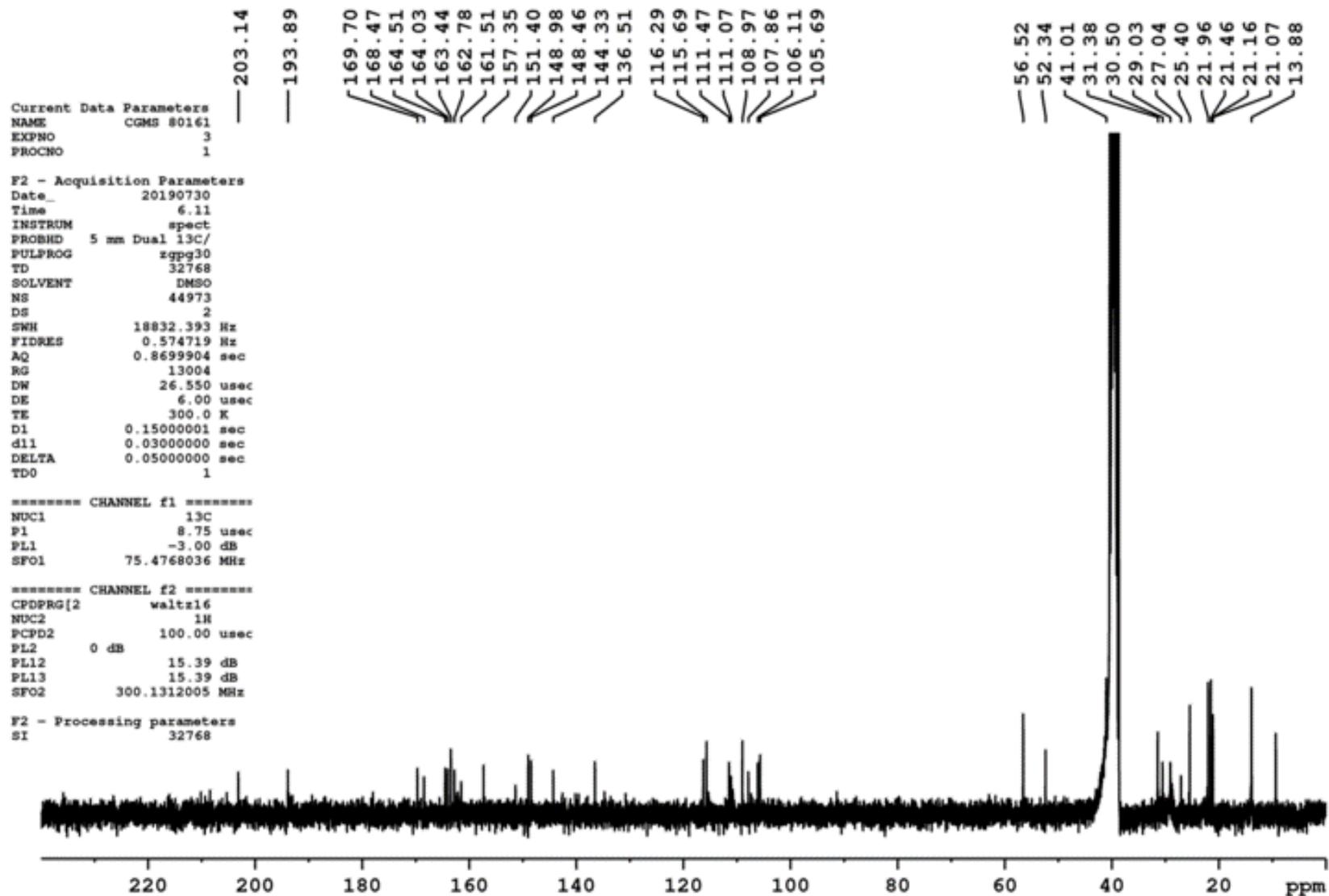
Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo I (CGMS 80216)



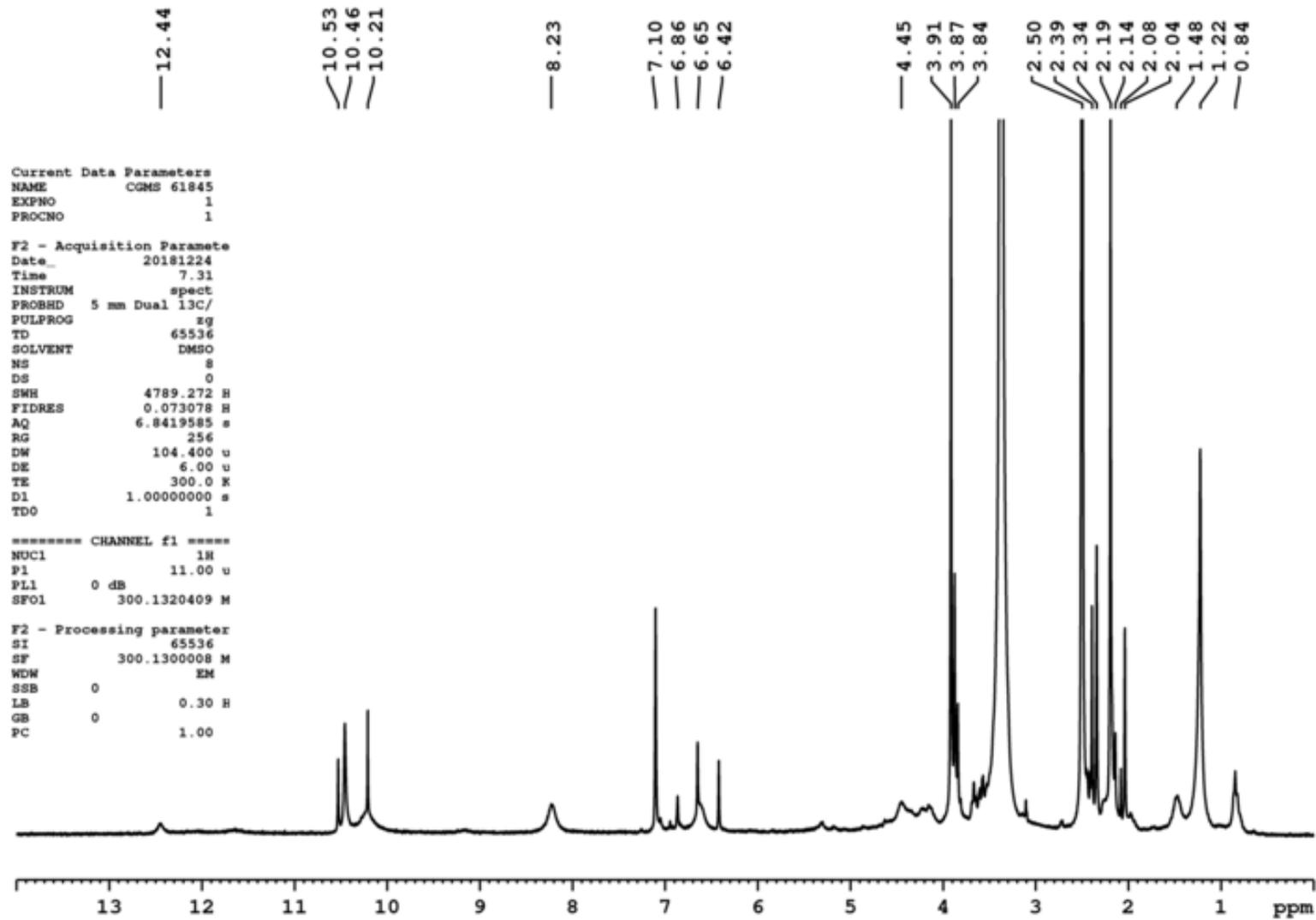
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo II (CGMS 80161)



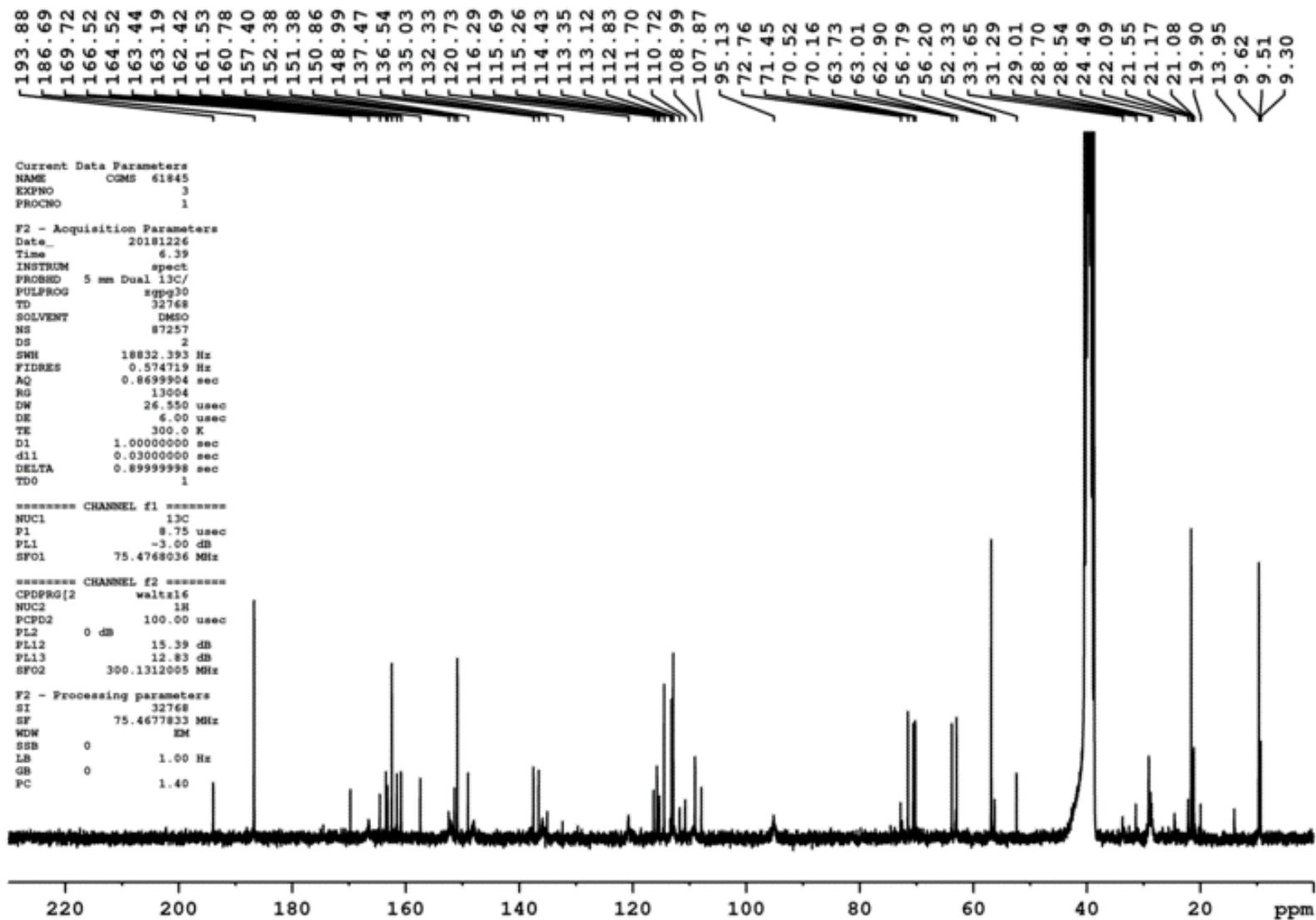
Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo II (CGMS 80161)



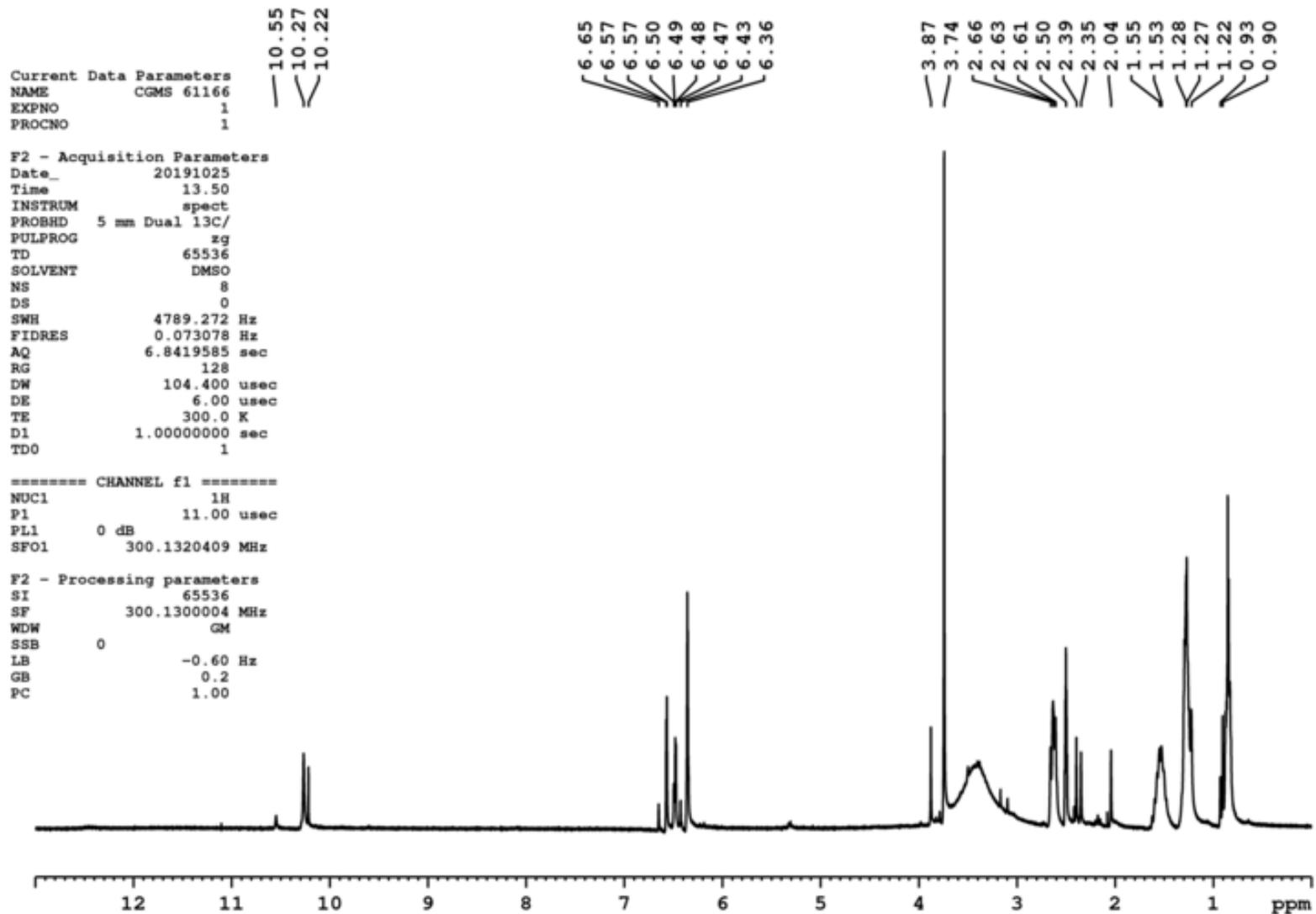
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo III (CGMS 61845)



Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo III (CGMS 61845)



Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo IV (CGMS 61166)



Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do extrato acetônico de *Stereocaulon*, representativo do grupo IV (CGMS 61166)

