Ser. Cient. INACH 43:73-79, 1993

Estudio de líquenes chilenos. XIX. Investigaciones de metabolitos secundarios en líquenes antárticos[1]

JUAN A. GARBARINO[2]

RESUMEN

Se presentan los resultados de las macroextracciones de los metabolitos secundarios de 28 especies liquénicas recolectadas en las islas Shetland del Sur. Se analiza la heterogeneidad estructural y los rendimientos de los 33 compuestos aislados entre ellos 2 nuevos dépsidos y tridépsidos, y sus relaciones fotoquímicas.

Se confirma el carácter de producto natural del peroxiergosterol mediante análisis in situ *de 29 especies y su alta frecuencia podría ser consecuencia de la radiación ultravioleta.*

Palabras claves: Líquenes antárticos, metabolitos secundarios, peroxiergosterol.

Studies on Chilean lichens. XIX. Research on secondary metabolites in antarctic lichens[1]

JUAN A. GARBARINO[2]

ABSTRACT

Results of secondary metabolites macroestraction from 29 lichen species, collected on South Shetland Islands, are presented. Structural heterogeneity and yields of the 33 lichen compounds isolated is analysed, as well as their relations with photochemical aspects. Among them 2 depsides and 1 tripside were obtained for the first time.

The natural product character of ergosterol peroxide is confirmed by means of an in situ *analysis of 29 species; its high frequency might be a consequence of the ultraviolet radiation increase.*

Key words: Antarctic lichens, secondary metabolites, ergosterol peroxide.

[1] Conferencia dictada en VIII Reunión Nacional de Botánica, Octubre 1991, Santiago.

[2] Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad Técnica Federico Santa María, Casilla 110-V, Valparaíso-Chile.

INTRODUCCIÓN

Los líquenes -ejemplo relevante de asociaciones simbióticas naturales- acumulan compuestos que han sido estudiados, desde el punto de vista químico, por diversos investigadores desde fines del siglo XIX (Zopf, 1907; Hesse, 1912). Posteriormente, investigadores japoneses (Asahina y Shibata, 1953), a partir de 1934, extendieron sus trabajos por dos décadas y establecieron una clasificación de las substancias liquénicas basada en estructuras químicas definitivamente establecidas. Tras este trabajo pionero, se han realizado amplias revisiones sobre el tema (Culberson, 1970, 1979; Huneck, 1973; Culberson *et al.*, 1977; Elix *et al.*, 1984).

Como ha sucedido en todas las áreas de la química de los productos naturales, el perfeccionamiento de los métodos de detección, aislamiento y purificación de metabolitos de líquenes y las correspondientes dilucidaciones estructurales de estos compuestos, por medio de las diversas técnicas espectrométricas, han resultado decisivas en el conocimiento que hoy se ha alcanzado sobre estos compuestos.

Los clásicos métodos de degradación y en particular la síntesis total, han progresado velozmente con el uso de modernos reactivos y métodos sintéticos. Basta citar, como ejemplo que, en 1971, no se habían sintetizado depsidonas de origen natural, pero en la década siguiente se sintetizaron 15 compuestos de este tipo (Elix *et al.*, 1984). Por su parte, los éteres diarílicos se descubrieron en 1978 y hoy se conocen 10 compuestos liquénicos con esta estructura (Elix *et al.*, 1978; Fiedler *et al.*, 1986).

La investigación química de los líquenes antárticos chilenos fue realizada, hasta 1984, por especialistas extranjeros (Lindsay, 1974; Huneck *et al.*, 1984).

Entre las diversas líneas de investigaciones fitoquímicas de especies autóctonas que realiza nuestro Laboratorio, el estudio de los líquenes representa un área de especial interés a causa de los metabolitos secundarios específicos que ellos acumulan y que resultan de importancia por su aporte a estudios taxonómicos, como antecedentes para emprender sus funciones en los talos y sus relaciones con el ambiente, y sus actividades frente a microorganismos patógenos.

Los líquenes corresponden a las especies vegetales macroscópicas más importantes del territorio antártico. A pesar de que se reconocen alrededor de 200 especies (Redón, 1985), el estudio estructural químico de sus metabolitos secundarios ha sido escaso. La mayoría de las investigaciones se refiere a microcristalizaciones, reacciones coloreadas y análisis de cromatografía en capa delgada de los compuestos (Hertel y Leuckert, 1969). En los últimos cuatro años nuestras investigaciones se han dirigido a macroextracciones (Quilhot *et al.*, 1989; Piovano *et al.*, 1991) con los objetivos siguientes:

- Evaluar la variación química en especies liquénicas de la zona más austral del país con especial interés en la identificación de nuevas estructuras.
- Establecer relaciones quimiotaxonómicas entre especies de diversos géneros liquénicos.
- Realizar ensayos biológicos de los metabolitos aislados.

MATERIALES Y MÉTODOS

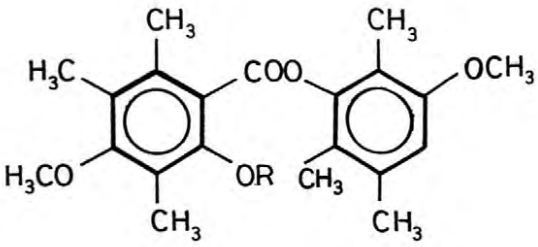
Se recolectaron 28 especies de líquenes en las islas Robert y Rey Jorge del Archipiélago de las Shetland del Sur, durante las Expediciones Científicas Antárticas XXIII (1986-1987) y XXV (1988-1989) (Cuadro 1).

Cuadro 1

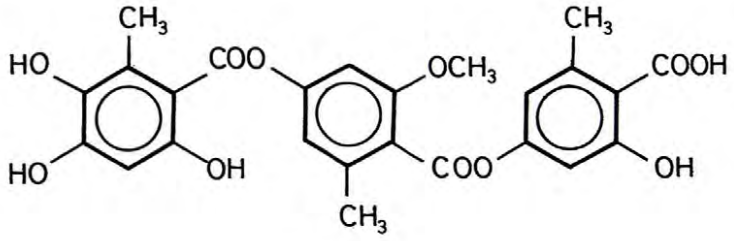
COMPOSICIÓN Y CONTENIDO (% PESO SECO) DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN 28 ESPECIES DE LÍQUENES CHILENOS

	Ac. girofórico	Ac. lecanórico	Ac. 2'-o-metilliáscico	Enfaeroforina	Ac. barbático	Atranorina	Brialmontina 1	Brialmontina 2	Cloroatranorina	Ac. alectorónico	Ac. α-collatólico	Ac. lobárico	Ac. variolárico	Ac. 2'-o-demetilpsorómico	Ac. estíctico	Ac. fumarprotocetrárico	Ac. norstíctico	Ac. psorómico	Ac. salazínico	Porfilirato de metilo	Ac. úsnico	Ac. tiofanínico	Artotelina	2,4-dicloronorliquexantona	2,7-dicloronorliquexantona	Liquexantona	Parietina	Ac. protoliquesterínico	β -orcinolcarboxilato de metilo	Ac. rhizocárpico	Zeorina	Ergosterol	Peroxiergosterol
Acarospora macrocyclos						tr										0.022																tr
Bruória chalibeyformis																0.003																0.033
Buellia anisomera						tr															0.009	0.450			0.037							tr
B. cladocarpiza						0.980																										
Caloplaca regalis																										0.229				tr		tr
Catillaria corymbosa			0.150			0.160			0.030																							
Cladonia cornuta	tr	tr				0.405									0.087					tr								0.006			0.008	0.003
C. gracilis						0.260														tr												0.015
C. lepidophora					0.240															0670												tr
Cornicularia aculeata																				0.002							0.860					
Haematomma erythromma						0.138									0.062								0.051	0.005	0.016					tr		tr
Lecania brialmontii							0.050	0.020																								
Lecanoria atra						0.020				0.020	0.020																					
Ochrolechia antarctica		0.005										0.0220								0.002												
O. frigida	0.760					tr														0.030										tr		
O. parella*	0.214					tr				0.307		5.000								tr												tr
Pannaria hookeri						tr																										0.012
Parmelia saxatilis						0.070												0.280		0.005										0.002		
Placopsis contortuplicata	0.580																															
Psoroma hypnorum						0.013														0.008												0.028
P. tenue var. tenue						0.003													0.130													
Ramalina terebrata																				0.170												
Rhizoplaca aspidophora															0.008					1.000										1.130		
Rhizocarpon geographicum						tr							0.032				0.479												0.090			0.019
Rinodina petermanii																0.017																0.008
Sphaerophorus globosus				0.160																0.002												
Stereocaulon alpinum						0.302					0.460									tr												tr
Umbilicaria rufidula**	0.920					0.030														0.030												0.007

* Ochrolechia deceptionis
** Umbilicaria antarctica
tr = trazas



[1] R = CH_3
[2] R = H



[3]

Fig. 1. Estructura de nuevos compuestos aislados.

Las especies se trabajan según el procedimiento usual (Quilhot *et al.*, 1989; Piovano *et al.*, 1991). Se secan (temperatura ambiente), trituran, pesan y extraen con nafta (60-80°C), diclorometano y acetona, durante 24 h. Los extractos respectivos se concentran a presión reducida y los residuos se fraccionan por cromatografía en columna sobre gel de sílice (E. Merck) o por cristalización, monitoreados por cromatografía en capa delgada. Los compuestos puros se identifican por comparación con patrones y las técnicas espectrométricas (IR, RMN-^{1}H, RMN^{-13}C y EM) habituales.

Las muestras de las especies se encuentran en el herbario de la Escuela Química y Farmacia, Universidad de Valparaíso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de las estructuras de los 33 metabolitos secundarios aislados de esas especies muestra su heterogeneidad obteniéndose 25 substancias específicas como dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y ácido (+)-úsnico. Entre ellos, se ha comunicado el aislamiento y estructura de tres nuevos compuestos. Fig. 1. Las brialmontinas 1 [1] y 2 [2], dépsidos de la serie del β-orcinol, aisladas de *Lecania brialmontii* (Vinet *et al.*, 1990, a) y el ácido 2'-O-metilhiássico [3], y tridépsido de la serie del orcinol, obtenido de *Catillara corymbosa* (Vinet *et al.*, 1990), ambas especies recolectadas en caleta Coppermine, isla Robert.

Entre los aspectos fotoquímicos de las substancias liquénicas, se mencionan estudios recientes (Hidalgo *et al.*, 1991); Quilhot *et al.*, 1991) que han demostrado que la presencia del sistema cromóforo formado por un grupo carbonilo vecino a un hidroxilo fenólico, provoca la emisión de la radiación ultravioleta absorbida en una zona del espectro correspondiente a la absorción de la clorofila, con el consiguiente beneficio por el aumento de la productividad en zonas de baja intensidad luminosa. Entre estas substancias se encuentra la atranorina y los ácidos psorómico, norstíctico y fumarprotecetrárico.

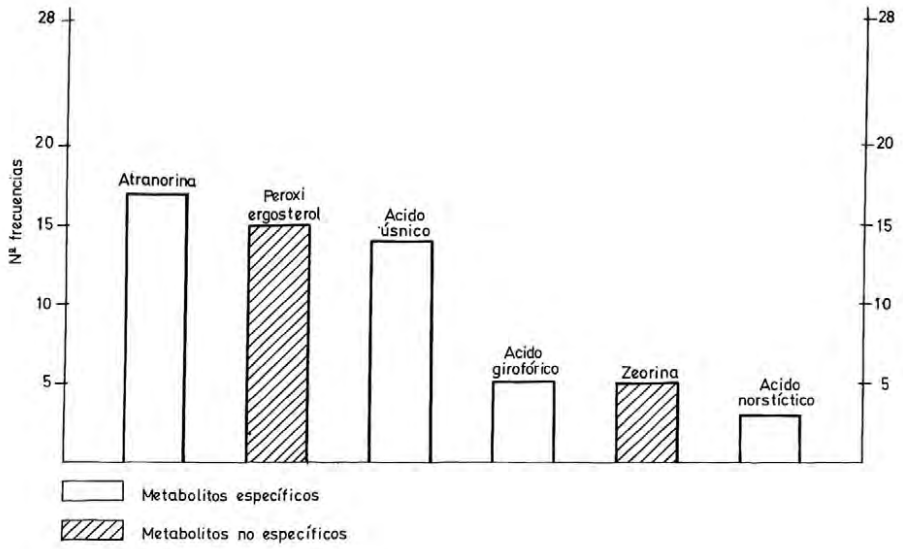


Fig. 2. Presencia y frecuencia de metabolitos secundarios mayoritarios en 28 especies de líquenes chilenos.

La figura 2 presenta la frecuencia de los metabolitos secundarios mayoritarios aislados, resultando particularmente notoria la presencia reiterada de peroxiergosterol, compuestos no específico de líquenes. Al respecto, debe señalarse que durante la XXV Expedición Científica Antártica (enero 1989), se realizaron ensayos *in situ*, por cromatografía en capa delgada, en 29 especies diferentes recolectadas en isla Robert de las cuales 27 contenían peroxiergosterol (Piovano *et al.,* 1991): estos ensayos demuestran su carácter de producto natural.

Por otra parte, la literatura informa sobre la obtención de peroxiergosterol por la acción de la radiación ultravioleta sobre una solución de ergosterol, en presencia de diversas substancias fluorescentes, entre ellas la clorofila (Windaus y Brunken, 1928).

La presencia de peroxiergosterol en estas especies y su obtención en laboratorio (Windaus y Brunken, 1928), conduce a reflexionar si el adelgazamiento de la capa de ozono en la Antártica, con el consecuente aumento de la radiación ultravioleta, incide en la frecuencia de este metabolito en las especies que crecen en ese hábitat.

CONCLUSIONES

1. Los resultados nos han llevado a extender nuestros estudios utilizando líquenes de zonas septentrionales del territorio nacional para investigar la presencia de peroxiergosterol.

2. La planificación de esta investigación no sólo conduce al conocimiento estructural de los metabolitos secundarios aislados, sino también a alcanzar conclusiones taxonómicas que requerirá ampliar el número de especies analizadas que, hasta el momento, alcanza sólo a un 15%.

3. La acción de los compuestos liquénicos ante agentes patógenos (Vartia, 1973), han permitido enviar muestras de diversos compuestos aislados para su estudio hacia el Nuclear Cancer Institute (EE.UU.) y al Instituto Biológico de Altura (Francia-Bolivia).

AGRADECIMIENTOS

Estas investigaciones han sido financiadas por el Instituto Antártico Chileno y la Dirección de Investigación y Postgrado de la Universidad Técnica Federico Santa María. El autor agradece al Prof. G. Guzmán (Universidad de Playa Ancha de Ciencias de la Educación, Valparaíso) por la determinación de diversas especies y a los Dres. E. Gros (Universidad de Buenos Aires), H. Dahn (Universidad de Lausanne), P. Manitto (Universidad de Milán), M. Nicoletti (Universidad de Roma) y B. Didyk (Refinería de Petróleos de Concón) por la preparación de espectros de resonancia magnética nuclear y masa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASAHINA, Y. y S. SHIBATA, 1953. Chemistry of Lichen Substances, Gustav Fischer, Jena. 240 págs.

CULBERSON, CH. F., 1970. Supplement to Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. Bryologist 73: 177-377.

CULBERSON, CH. F., W. L. CULBERSON y A. JOHNSON, 1977. Second Supplement to Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. The Amer. Bryol. Lich. Soc. Missouri Botanical Garden, St. Louis. 400 págs.

CULBERSON, CH. F., 1979. Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. O. Koeltz Sc. Publ. Koenigsteien, Alemania. 628 págs.

ELIX, J. A., U. ENGKANINAN, A. J. JONES, C. L. RASTON, M. V. SARGENT y A. H. WHITE, 1978. Chemistry and Crystal Structure of Leprolomin, a Novel Diphenyl Ether from the Lichen *Psoroma leprolonum*. Aust. J. Chem. 31: 2057-2068.

FIEDLER, P., V. GAMBARO, J. A. GARBARINO y W. QUILHOT, 1986. Epiphorellic acids 1 and 2, two Diaryl Ethers from the Lichen *Cornicularia epiphorella*. Phytochemistry 25: 461-465.

HERTEL, H. y C. LEUCKERT, 1969. Uber Flechtenstoffe und Systematik einingen Arten der Gattungen Lecidea, Placopsis und Trapelia mit rot reagierenden Thallus. Willdenowia 5: 369-383.

HESSE, O., 1912. Die Flechtenstaffe. En: Biochemisches Handlexikon. Ed. Aberhalden E. Julius Springer, Berlin. vol. VII.

HIDALGO, M. E., E. A. LISSI, E. FERNÁNDEZ y W. QUILHOT, 1991. Solubization and photophysical and photochemical behaviour of depsidones in water and Brij-35 solutions at differents pHs. J. Photochem. Photobiol., en prensa.

HUNECK, S., 1973. Nature of Lichen Substances. En: The Lichens. Ed. Ahmadjian, V. y M.E. Hale. Academic Press., N. York, 495-522.

HUNECK, S., M. SAINSBURY, T. M. A. RICKARD y R. I. LEWIS SMITH, 1984. Ecological and Chemical Investigations of Lichens from South Georgia and the Maritime Antarctic. Journ. Hattori Bot. Lab. 56: 461-480.

LINDSAY, D. C., 1974. The macrolichens of South Georgia. Brit. Antarct. Surv. Sci. Rep. 89: 1-91.

LINDSAY, D. C., 1971. Vegetation of the South Shetland Islands. Br. Antarct. Surv. Bull. 25: 59-83.

PIOVANO, M. M J. A. GARBARINO, M. C. CHAMY, V. ZÚÑIGA, C. MIRANDA, E. CÉSPEDES, P. FIEDLER, W. QUILHOT y G. ARAYA, 1991. Studies on Chilean Lichens. XVI. Secondary metabolites from Antarctic lichens. Ser. Cient. INACH 41: 79-90.

QUILHOT, W., J. A. GARBARINO, M. PIOVANO, M. C. CHAMY, V. GAMBARO, M. L. OYARZÚN, C. VINET, V. HORMAECHEA y P. FIEDLER, 1989. Studies on Chilean Lichens. XI. Secondary metabolites from Antarctic lichens. Ser. Cient. INACH 39: 75-89.

QUILHOT, W., M. E. HIDALGO, E. FLORES, E. FERNÁNDEZ y W. PEÑA, 1991. Possibilités d'utilisation de substances lichéniques comme protecteurs solaires. 3éme. Symposium sur les Substances Naturelles d'intéret Biologique de la Région Pacifique-Asie, Nueva Caledonia, 84.

REDÓN, J., 1985. Líquenes Antárticos. Instituto Antártico Chileno, Santiago, 121 págs.

VARTIA, K. O., 1973. Antibiotics in Lichens. En: The Lichens, ed. V. Ahmadjian y M.E. Hale, Academic Press, N. York, 547-561.

VICENTE, C., J. L. RUÍZ y M. P. ESTEVEZ, 1980. Mobilization of usnic acid in *Evernia prunastri* under critical conditions of nutrient availability. Phton 39: 15-20.

VINET, C., W. QUILHOT, V. GAMBARO y J. A. GARBARINO, 1990(a). Studies on Chilean Lichens. XIII. Pholysubstituted Depsides from *Lecania brialmontii* J. Nat. Prod. 53: 500-502.

VINET, C., W. QUILHOT y J. A. GARBARINO, 1990(b). Studies on Chilean Lichens. XIV. 2'-0-methylhiascic acid, a new Tridepside in *Catillaria corymbosa*. J. Nat. Prod. 53: 1025-1027.

WINDAUS, A. y J. BRUNKEN, 1928. Photochemical oxidation of ergosterol. Ann. 460: 225-235.

ZOPF, W., 1907. Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung. Gustav Fischer, Jena.

Recibido: 27.01.92. Aprobado: 05.11.92.