

ESTUDIO FITOQUIMICO DEL LIQUEN USNEA sp.

Patricia Morales B., Juana Robles C., Ana P. de Abram*
Kathleen Gallagher, Carmen Valdez Gauthier**

RESUMEN

A partir del líquen *Usnea* sp. de la zona de Ingenio, Huancayo, se logró aislar, aplicando técnicas de extracción, recristalización y cromatografía CCD y CC, seis compuestos: ácido (-)-úsrico (compuesto mayoritario), ácido 5-(β -oxopropil)-4-O-dimetilbarbático, 1'-oxo-4'-hidroxi-Filoquinona, 1'-oxo-4'-hidroxi-6'-eno-Filoquinona, un pigmento de naturaleza 1,4-naftoquinónica y un posible derivado ácido del orcinol. Todos ellos fueron analizados por sus propiedades físicas, cromatográficas y espectroscópicas.

INTRODUCCION

Según Huneck y Culberson [1,2], las sustancias líquénicas son productos metabólicos de los líquenes, los cuales son asociaciones simbióticas de algas y hongos.

Una de las características más importantes de las sustancias líquénicas es su marcada actividad biológica, conocida y comprobada desde hace muchos

* Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias, Sección Química.

** Universidad de New Hampshire, USA.

años; podemos mencionar por ejemplo, la actividad antituberculosa, cardiotónica, antitumoral, pedogénica, antibiótica, inhibitoria del crecimiento de plantas superiores, entre otras [1,3,4].

El producto liquénico más estudiado es el ácido úsnico. Todos los isómeros ópticos de este ácido muestran un amplio espectro de actividad. Son activos frente a neumococos, estreptococos y estafilococos. Además, presentan actividad antibiótica frente a los diferentes tipos de *Mycobacterium*. Asimismo, se ha conseguido ampliar considerablemente el espectro de antibiosis de estos ácidos por la obtención de diversos derivados, particularmente derivados nitrogenados [3].

En Sudamérica, particularmente en el Perú, se tiene una gran variedad de especies liquénicas, distribuidas en una diversidad de pisos botánicos. Se les puede encontrar al nivel del mar, o en zonas típicamente serranas. En nuestro país existe muy poca información relacionada al estudio de líquenes peruanos, de allí nuestro interés en iniciar esta línea de investigación.

PARTE EXPERIMENTAL

El líquen sometido a estudio fue clasificado como: *Usnea* sp. por la Dra. Emma Cerrate del Museo de Historia Natural "Javier Prado". La muestra botánica está depositada en el Herbario San Marcos, UNMSM.

Los instrumentos utilizados fueron:

- Espectrómetro Infrarrojo, Perkin Elmer 882 (PUCP)
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible, Lambda 2, Perkin Elmer (PUCP)
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, Bruker AM 360 (Universidad de New Hampshire, USA)
- Polarímetro de círculo con lámpara espectral de sodio, Carl Zeiss - Jena. Modelo 32-G-58 oa-1 (PUCP).

Se hicieron dos extracciones sucesivas con acetona a temperatura ambiente, usando 63 g de material vegetal limpio y seco, dejándolo secar antes de la segunda adición de solvente. El primer extracto se obtuvo después de dos días de maceración y el segundo después de cinco días. El marco, después de dejarse secar, fue macerado con metanol por 30 días.

Las soluciones acetónicas se unieron y se concentraron bajo presión reducida hasta sequedad, quedando 9,6 g de un residuo sólido, el cual fue extraído varias veces con diferentes sistemas de solventes. A partir de los extractos obtenidos se logró aislar seis compuestos que llamaremos: A, B, C, D, AS3 y E. En la Tabla 1 se presentan los sistemas de solventes utilizados y los compuestos aislados a partir de cada uno de los extractos obtenidos, controlados por CCD:

TABLA 1: Sistemas de solventes utilizados y compuestos aislados a partir de cada uno de los extractos del residuo sólido

Sistema de solvente	Compuestos aislados
Benceno	A
Bz-CHCl ₃ (1:1)	A
AcOEt	A, B, C, D
CHCl ₃ -EtOH (3:1)	A, C, D, AS3
CHCl ₃ -EtOH (1:1)	E
EtOH	E

El compuesto A fue mayoritario en los dos primeros extractos, éstos fueron llevados a sequedad y sometidos a sucesivas recrystalizaciones con diferentes sistemas de solventes: tolueno, benceno, benceno-cloroformo (1:1), acetona-etanol (10:1), obteniéndose finalmente el compuesto cristalino en forma de agujas amarillas, de punto de fusión 203°C, cuya pureza fue comprobada cromatográficamente.

En el tercer y cuarto extractos, la presencia del compuesto A fue un inconveniente para la separación de los otros compuestos. Después de llevarlos a sequedad, fue necesario someterlos a continuos lavados con solventes como tolueno, cloroformo, tolueno-AcOEt (1:1) para separar al compuesto A, éste fue luego recrystalizado en acetona -EtOH (10:1). De los licores madre provenientes de estas recrystalizaciones, se logró aislar en muy pequeña cantidad el compuesto B, sólido de color blanco y el compuesto AS3, de color naranja, separado por CC en sílica - gel G-60 usando como eluente un sistema gradiente de CHCl₃-MeOH.

Los residuos que quedaron después de los lavados, fueron sometidos a CCDP, sobre Sílica-gel-60 GF₂₅₄ utilizando como eluente el sistema AcOEt-EtOH (8:1), lográndose separar los compuestos C y D. Ambos compuestos se obtuvieron en muy pequeña cantidad.

Los dos últimos extractos mostraron un comportamiento similar al analizarse cromatográficamente, por lo que se unieron y se sometieron a CC en sílica-gel G-60 usando como eluente un sistema gradiente de CHCl₃-MeOH, lográndose separar una pequeña cantidad del compuesto E en forma de agujas finas incoloras.

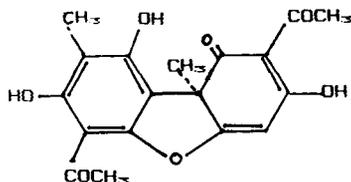
El análisis cromatográfico del extracto metanólico mostró que los compuestos fenólicos habían sido extraídos prácticamente en su totalidad en las dos primeras extracciones con acetona.

RESULTADOS Y DISCUSION

Compuesto A: agujas amarillas de punto de fusión 203°C, con un valor de $[\alpha]_D^{25,5^\circ C} = -490^\circ$ (2% en THF), solubles en CHCl₃, Bz y acetona. $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ (nm): 234,4 ; 284,2.; $\nu_{\text{C=O}}$ (cm⁻¹): 1684, 1621.

Estas características presentan coincidencia con lo reportado para el ácido (-)-úsico [1,3]. La comparación cromatográfica del compuesto A con el ácido úsico aislado del líquen *Alectoria scrobiculata* [5] en diferentes sistemas de solventes, mostró en ambos idénticos valores de R_f.

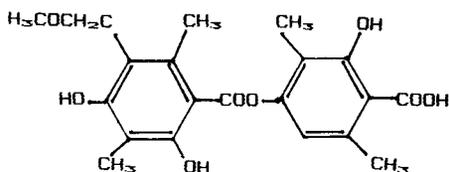
La recuperación cuantitativa del compuesto A, a partir de las diferentes fracciones y licores madre obtenidos en el proceso de separación y purificación, dio un total de 2,400 gramos, que viene a ser aproximadamente el 3,81 % del peso inicial de material vegetal.



Acido (-)-úsico

Compuesto B: sólido de color blanco ; hRf: 21,43 en CHCl₃-MeOH (9:1), violeta a 254 nm y con fluorescencia blanca a 366 nm, comportamiento característico de los para-dépsidos de las series del orcinol y β-orsinol [3].

δ (ppm) (MeOD): 1,20 (s,3H); 2,18 (s,6H); 2,40 (s,6H); 3,40 (s,2H) ; 6,68 (s,1H). Al no haber señales en el rango 3,70 - 4,05 ppm, podemos pensar que los grupos OH no se encuentran metoxilados. En base a lo reportado para este tipo de compuestos [6], se puede asignar la señal a 2,18 ppm a dos grupos metilo en las posiciones 3 y 3'; la señal a 2,40 ppm a dos grupos metilo en las posiciones 6 y 6' y la señal a 6,68 ppm, para un protón aromático en posición 5'. La señal a 3,40 ppm, podría corresponder a un grupo Ar-CH₂-CO- y la señal a 1,20 ppm podría corresponder al grupo -CO-CH₃. De acuerdo a esto proponemos como posible estructura para el compuesto B:



Acido 5-(β-oxopropil)-4-O-dimetilbarbático

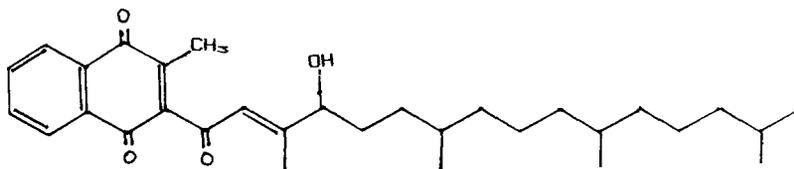
Sin embargo se tendrían que considerar otros análisis para poder confirmar o modificar esta proposición; la pequeña cantidad obtenida impidió realizarlos.

Compuesto C: de color amarillo, con hRf: 66,67 en AcOEt-EtOH (8:1). λ_{máx}^{MeOH} (nm): 224, 277.

δ (ppm) (CD₂Cl₂): 0,9 (d,12H); 1,26 (s,19H); 2,60 (s,6H); 3,35 (s,1H); 4,18 (t,1H); 5,32 (1H); 7,55 y 7,69 (m,4H).

Las absorciones en el UV nos indican la presencia de un grupo cromóforo. Las señales en el RMN para los protones aromáticos son características de un sistema A₂B₂, que corresponderían a un anillo de benceno disustituído en orto. Esto se confirma con los valores de las constantes de acoplamiento encontradas: J_{ab} = J_{ba'} = 5,7 (orto) y J_{ab} = J_{ba'} = 3,3 (meta). La señal en 0,9 ppm se puede asignar a cuatro grupos metilo, la señal a 1,26 ppm a grupos -CH₂- y -CH-

de cadena larga, la señal a 2,60 a metilos enlazados a un grupo C=C, la señal a 3,35 a un OH alifático, la señal a 4,18 a un protón enlazado a un grupo carbinol y la señal a 5,32 a un protón vinílico. Según esto, proponemos para el compuesto C la siguiente estructura:

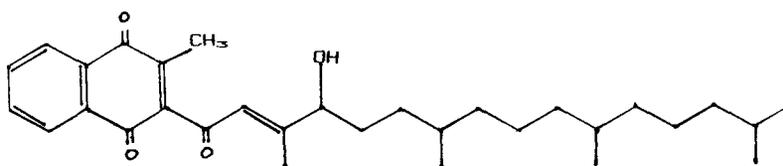


1'-oxo-4'-hidroxi-Filoquinona

Compuesto D: de color rojizo, con hRf: 82,96 en AcOEt-EtOH (8:1). Presenta las mismas absorciones en el UV que el compuesto C, al igual que las señales en el espectro $^1\text{H-RMN}$ en donde sólo se diferencian en las integraciones:

δ (ppm) (CD_2Cl_2): 0,9 (d,9H); 1,26 (s,16H); 2,60 (s,9H); 3,35(s,1H); 4,18 (t,1H) ; 5,32 (2H); 7,55 y 7,69 (m,4H).

La estructura propuesta para el compuesto D es:



1'-oxo-4'-hidroxi-5'-eno-Filoquinona

Compuesto AS3: de color naranja, se obtuvo en muy pequeña cantidad por lo que sólo se pudo obtener su espectro UV-Visible: $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 260h, 287h, 334,6 y 425h. De acuerdo a lo reportado [7], estos valores sugieren que podría tratarse de un compuesto quinónico, probablemente de tipo 1,4-naftoquinona.

Compuesto E: Obtenido también en muy pequeña cantidad, se presenta en forma de agujas finas incoloras, con hRf: 21,79 en CHCl_3 -MeOH (9:1). El análisis cualitativo de su espectro $^1\text{H-RMN}$ nos muestra señales a 0,8 y 1,18 ppm correspondientes a grupos metilo, una señal a 1,809 ppm que correspon-

dería a grupos metileno, un multiplete a 3,54 ppm que podría corresponder a un grupo $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R}$, señales de protones aromáticos $\sim 7,5$ ppm y una señal a 8,5 ppm correspondiente a un grupo -COOH . En base a esto, podríamos pensar en un ácido derivado del orcinol ya que se presentan con frecuencia en los líquenes [1,3].

REFERENCIAS

1. Reinhold, L., Liwschitz Y. (editores) (1968) **Progress in Phytochemistry**. Interscience Publishers, Londres, p.223
2. Culberson, C. (1969) **Chemical and Botanical Guide to Lichen Products**. Chapel Hill, USA
3. Vicente, C. (1975) **Fisiología de las Sustancias Liquénicas**. Ed. Alhambra S.A., Madrid
4. Nishitoba, Y. (1987) *Phytochemistry*, **26**, 3181
5. Robles, J. (1990) **Estudio Fitoquímico del Líquen Alectoria scrobiculata**. Tesis para optar el Grado de Bachiller en Ciencias con mención en Química, PUCP, Lima
6. Zalewski, R., Skolik, J. (editores)(1985) **Studies in Organic Chemistry 20 - Natural Products Chemistry**. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
7. Thomson, R. (1971) **Naturally Occurring Quinones**. Academic Press, Londres