

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA *Psiloparmelia distincta* (NYL.) HALE

Olivio Nino Castro Mandujano^{1*}

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el aislamiento y estudio de sustancias líquénicas de la especie: *Psiloparmelia distincta* (Nyl.). Se hicieron extracciones sucesivas con acetona y metanol. Se separaron y purificaron algunos compuestos de los extractos; para ello se usaron solventes y mezclas de solventes de polaridad creciente, empleando diversas técnicas cromatográficas y recristalizaciones. Se elucidaron y se determinaron las estructuras de los compuestos obtenidos, analizando sus espectros de IR, RMN-H¹, RMN-C¹³, DEPT y EM; estos compuestos son: H (ácido 2-hidroxi-3-formil-4-etoxi-6-metil-benzoico), A (ácido fumarprotocetrárico).

Palabras clave: liquen, *Psiloparmelia distincta*, ácido 2-hidroxi-3-formil-4-etoxi-6-metil-benzoico, ácido fumarprotocetrárico.

CONTRIBUTION TO THE PHYTOCHEMISTRY STUDY OF THE *Psiloparmelia distincta* (NYL.) HALE

ABSTRACTS

In the present work was realized the isolation and study of lichen substances of the *Psiloparmelia distincta* (Nyl.). Successive extractions were done by acetone and methanol. It was separated and purified some compounds of the extracts, using solvents and mixtures of solvents of increasing polarity, in diverse chromatographic methods and recrystallizations. They were elucidated and decided the structures of the obtained compounds, analyzing his spectra of UV, IR, RMN-H¹, RMN-C¹³, DEPT and EM; these compounds are: H (acid 2-hydroxi-3-formil-4-etoxi-6-methyl-benzoic), A (acid fumarprotocetrárico).

Key words: Lichen, *Psiloparmelia distincta*, acid 2-hidroxi-3-formil-4-etoxi-6-metil-benzoic, fumarprotocetraric acids.

INTRODUCCIÓN

El liquen es un organismo simbiótico conformado por un hongo y un alga. Mientras el hongo se encarga del abastecimiento del agua y sales minerales, el alga provee los productos fotosintéticos, como los glúcidos. Los líquenes son consorcios biológicos de amplia difusión, que se encuentran en diversos tipos de climas, desde la región ártica hasta la región antártica; desde el nivel del mar hasta en las altas montañas; también se encuentran en los desiertos donde la temperatura es variable o en regiones polares donde las temperaturas son extremadamente bajas. Crecen^{1,2} sobre rocas, corteza, hojas de árboles, suelos, etc.

¹ Departamento de Ciencias, Pontificia Universidad Católica del Perú,
Av. Universitaria 1801, San Miguel, Lima, Perú

* ocastro@puccp.pe

Se aplica el término de “compuestos liquénicos” a todos los compuestos sintetizados exclusivamente por líquenes. Los tipos de compuestos liquénicos según su estructura son: Dépsidos, depsidonas, depsona, ácidos úsnicos y dibenzofuranos. Los líquenes son indicadores de la contaminación del ambiente, tiene las siguientes propiedades:

- Propiedades farmacológicas.
- Capacidad quelante.
- Participa en reacciones fotoquímicas ligadas a cationes.
- Capacidad pigmentante.

Para la especie liquénica en estudio, según encuesta a los lugareños de la zona de recolección, se reportó su uso medicinal en dolencias como tos, bronquitis, etc^{3,4}.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestra vegetal.- El líquen en estudio fue clasificado taxonómicamente por la Dra. Magdalena Pavlich de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y por la Dra. Mónica T. Adler de la Universidad de Buenos Aires – Argentina; ambas coincidieron con la siguiente clasificación taxonómica: *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale, familia Parmeliaceae.

La muestra en estudio (figura 1), constituye el líquen completo, el cual ha sido recolectado por Nino Castro, en el departamento de Junín, provincia de Jauja, en el pueblo Cachi-Cachi a una altitud de 4200 msnm, en marzo de 1998 (primera recolección para la identificación y estudios preliminares) y mayo de 2000 (segunda recolección para el aislamiento de compuestos liquénicos).

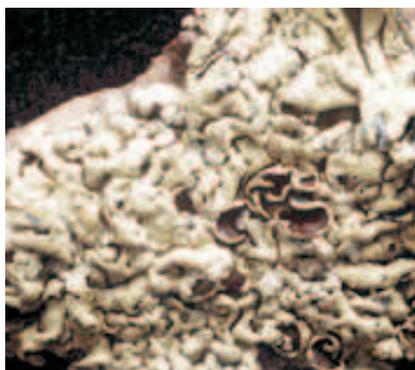


Figura 1: *Psiloparmelia distincta*

Se ha realizado una marcha fitoquímica según Lock, 1994; además, se ha llevado a cabo reacciones de coloración para los líquenes, según Robles, 1992.

Aislamiento. Un kilogramo de muestra limpia, seca y molida, se sometió a dos extracciones sucesivas por maceración con acetona; se extrajo dos veces con metanol; se concentraron los extractos y se obtuvo 65,2 g de extracto acetónico EA y 11,2 g de extracto metanólico EB. De cada extracto se fracciona por solubilidad en diversos solventes (hexano, cloroformo, acetona y etanol).

La fracción hexánica dio un residuo cremoso el que se purificó por recristalización con MeOH-acetona 1:1, hasta obtener 65 mg del compuesto H como cristales blancos, en forma de agujas muy finas, solubles en cloroformo y ligeramente solubles en metanol, con punto de fusión de 103-104 °C. Tienen reacción positiva con KOH (5% acuoso) dando una coloración amarilla.

La separación del extracto metanólico EB, se realizó aumentando la polaridad: hexano, cloroformo, acetona y metanol. La fracción metanólica se concentra y el sólido obtenido se disolvió con MeOH-acetona 1:1; se calentó y al dejarse en reposo a 0 °C se precipitó un sólido el cual fue recristalizado en el mismo sistema dando los cristales A, 100 mg.^{2,3,6}

Se realiza un análisis por HPLC, y se envía la muestra al Dr. J. Elix, químico orgánico (Universidad Nacional de Australia) especialista en plantas líquénicas quien tiene una base de datos para líquenes en el HPLC. La muestra fue disuelta en acetona fría, se decantó y se tomó una alícuota para inyectar al Cromatógrafo⁷. Las condiciones instrumentales fueron: Cromatógrafo HPLC Kontron HPLC, Systems-Data, detector UV-430, columna Spherisorb 5 ODS-2, Kontron 250 x 4,6 mm; estándares internos 20 mg de ácido benzoico y 20 mg de ácido solorínico por 1000 mL de acetona; la fase móvil es el agua bidestilada con 1% de ácido ortofosfórico, flujo 0,7 mL/min; volumen de inyección 5 µL, longitud de onda a 245 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cualitativo. Los resultados del análisis indican que el líquen en estudio posiblemente contiene ácidos fenólicos, depsidonas, dépsidos, ácidos úsnicos, fenoles y triterpenos y que no contiene alcaloides, flavonoides ni antraquinonas.

Elucidación estructural del compuesto H

El espectro IR del compuesto H (medido en KBr), mostró las absorciones como a 3478 cm⁻¹ alargamiento de OH, a 2997 cm⁻¹ alargamiento de C-H del CH₂, a 2448 cm⁻¹ alargamiento de C-H aldehídico, a 1738 cm⁻¹ alargamiento de C=O carboxilo, a 1700 cm⁻¹ flexión C=O aldehídico, a 1414 flexión C-O-H en el plano del COOH, y a 1395 cm⁻¹ flexión O-H carboxílico. La tabla de la composición elemental del espectro de masas, figura 2, se obtuvo la siguiente información: la fórmula global es C₁₁H₁₂O₅, su peso molecular es 224, el pico padre es 150, los fragmentos son 196 (pérdida de un CO), 178 (pérdida de H₂O a partir del fragmento 196), 150 (pérdida de CO a partir de 178).

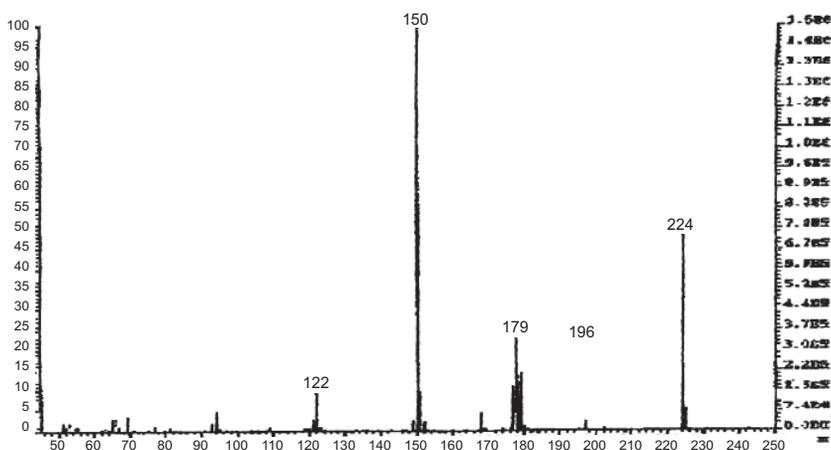


Figura 2: Espectro de masas del sólido H

Analizando los espectros de RMN-¹³C y del RMN-DEPT, figuras 3 y 4, se logró identificar la presencia de los grupos, =CH, -CH₂-, -CH₃; carbonos sp² del tipo bencénico, ácido y aldehídico; la información está resumida en la tabla 1. El espectro DEPT a 90° reconoce las señales del tipo C-H asignadas al carbono que contiene el único H aromático y al carbono aldehídico; el DEPT 135° diferencia los tipos de carbono: 2 del tipo CH₃, uno del tipo CH₂ y dos del tipo CH; hay 5 carbonos cuaternarios⁸⁻¹¹.

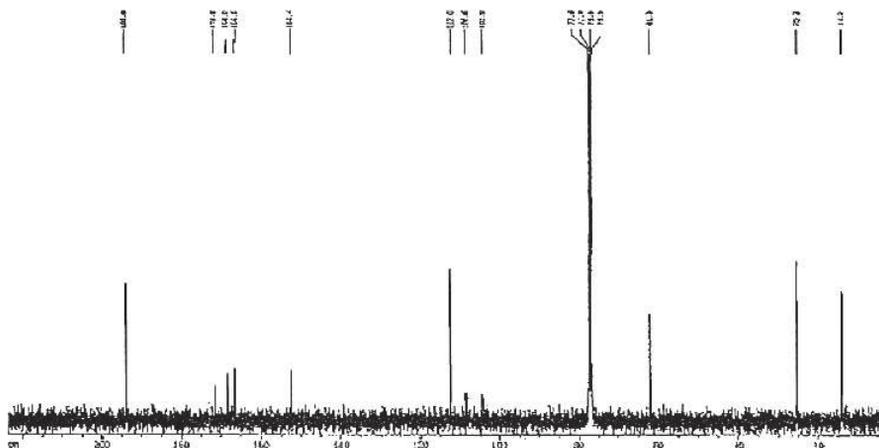


Figura 3: Espectro de RMN-C¹³ del sólido H

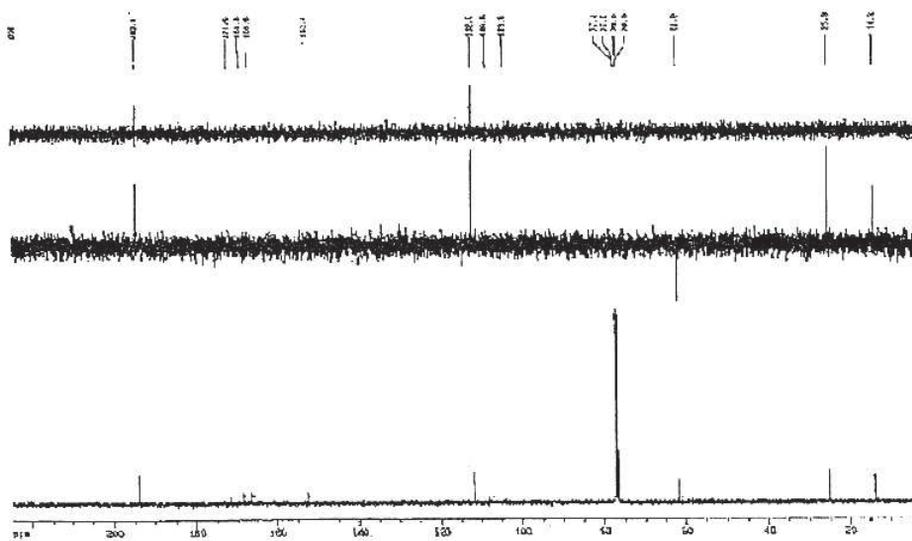


Figura 4: Espectro de RMN-C¹³ DEPT del sólido H

Tabla 1: Datos del espectro de RMN-¹³C del compuesto H

δ (ppm)	Asignación
1,5	3H, t, -CH ₃
2,5	3H, d, -CH ₃
4,4	2H, c, -CH ₂ -
6,3	1H, s, aromático
10,3	1H, s, -CHO
12,4	1H, s, Φ -OH
12,9	1H, s, -COOH

Analizando el espectro de RMN-¹H, figura 5, y comparando con las tablas espectroscópicas⁹, se observa que hay un protón aromático a 6,3 ppm, 3 protones singuletes a 10,3, 12,4 y 12,9 ppm, que podrían ser del tipo aldehídico, alcohólico o carboxílico; además, tenemos 2 grupos metílicos a 1,5 y 2,5 ppm, triplete y doblete, respectivamente; esto implica que el metil triplete está acoplado con dos protones de un CH₂ el cual a su vez presenta un cuarteto a 4,4 ppm.¹¹. Toda esta información se resume en la tabla 2.

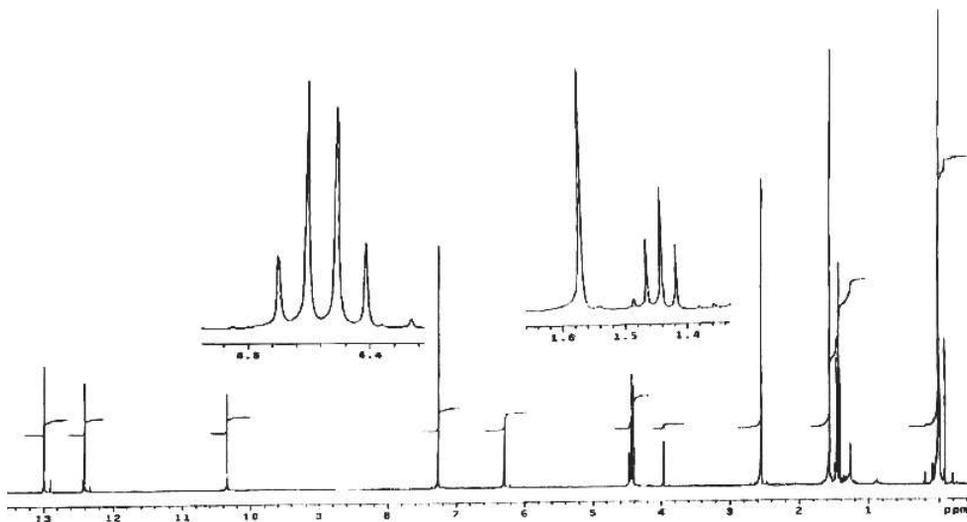
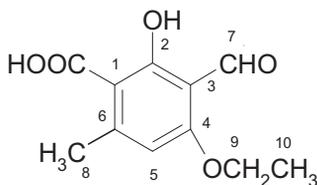
**Figura 5:** Espectro de RMN-H¹ del sólido H

Tabla 2: Datos del espectro de RMN-¹H del compuesto H

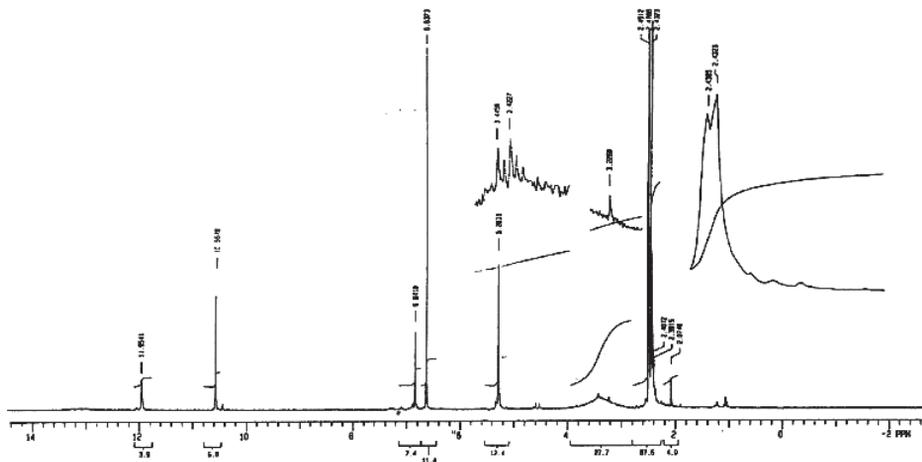
δ (ppm)	Asignación
14	CH ₃
25,6	CH ₃ – Φ
61,5	- CH ₂ – O – Φ
109,6	C aromático, cuaternario
110,1	C aromático, cuaternario
112	=CH
153	C aromático, cuaternario
166	C aromático
168	=C-CO
171	COOH
193	CHO

En base a la información presentada, se propone la siguiente estructura para el compuesto H:



Elucidación estructural del compuesto A.- El compuesto A es un sólido que cristaliza en agujas blancas, reacciona con KOH dando coloración marrón y con FeCl₃ da coloración morada, propia de las depsidonas; tiene punto de fusión 260-262 °C con descomposición. Sus longitudes de onda máximas en el espectro UV-V en etanol, son: 240 y 320 nm. Del espectro IR se determinó que el compuesto A, presenta absorciones de los grupos: OH a 3400 cm⁻¹, -CH=CH- a 987 y 701 cm⁻¹, -COOH a 1744 cm⁻¹, C=O aldehído a 1700 cm⁻¹ y C-O-C a 1207 cm⁻¹.

Analizando el espectro RMN-¹H del compuesto A, figura 6, se observó que se pueden identificar protones de: -COOH a 11,95 ppm, y el del grupo CHO a 10,57ppm; un protón aromático a 6,63 ppm, un singulete a 5,28 ppm de los hidrógenos del grupo -CH₂, un hidrógeno del tipo =CH a 6,84 ppm y dos metilos a 2,49 y 2,43 ppm; no se observa las absorciones de los grupos OH ni COOH ya que éstos tienen desplazamientos mayores de 12 ppm.



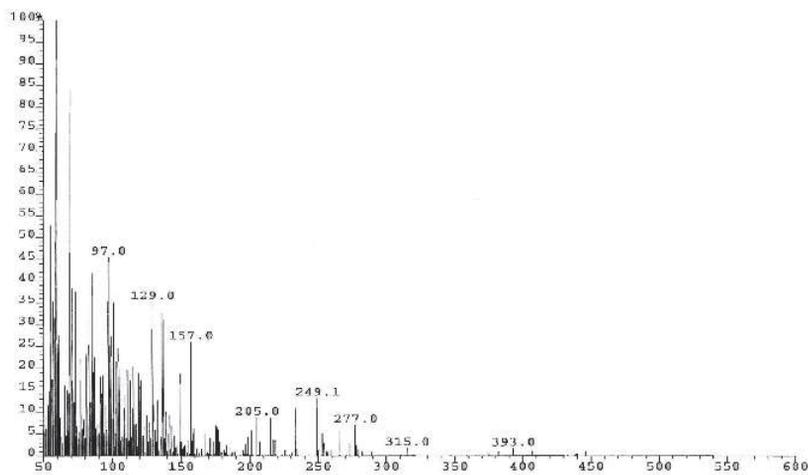


Figura 7: Espectro de masas del sólido A

El cromatograma de HPLC, Figura 10, corroboró en la identificación del compuesto A como el ácido fumarprotocetrárico¹².

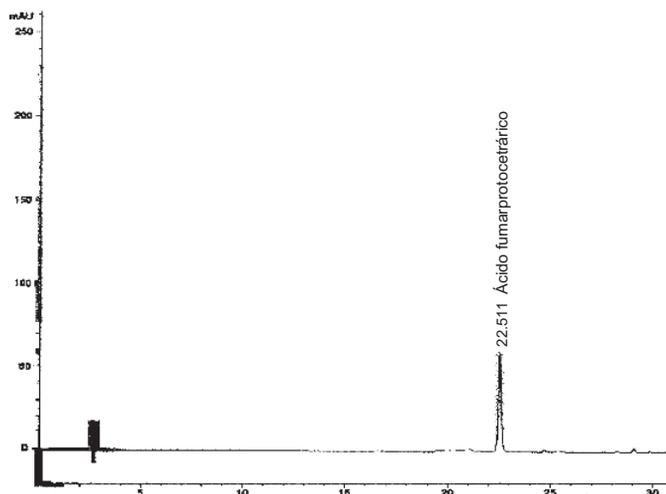
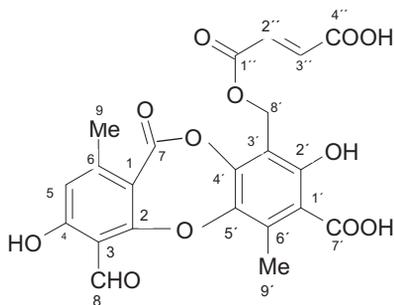


Figura 8: Cromatograma de HPLC del compuesto A

Todas estas informaciones espectroscópicas y cromatográficas nos permiten proponer que el compuesto sería el ácido fumarprotocetrárico, con la siguiente estructura:



CONCLUSIÓN

Se aisló y se determinó la estructura de 2 compuestos liquénicos; éstos son: compuesto H (ácido 2-hidroxi-3-formil-4-etoxi-6-metil-benzoico) y el compuesto A (ácido fumarprotocetrárico). En el análisis cualitativo por HPLC del compuesto liquénico aislado, el tiempo de retención es de 22,5 minutos del compuesto A (ácido fumarprotocetrárico).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada gracias a la colaboración de la Dra. Magdalena Pavlich de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Agradezco igualmente a las siguientes personas a la Dra. Mónica T. Adler de la Universidad Nacional de Buenos Aires-Argentina, por la identificación botánica del líquen estudiado; al Dr. Arturo San Feliciano (Universidad de Salamanca- España) por la realización del análisis de RMN- H^1 , RMN- C^{13} y EM; al Dr. John Elix de la Universidad Nacional de Australia por los análisis de HPLC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vicente, C., Fisiología de las sustancias liquénicas, Ed. Alhambra, Madrid, (1975), pag 22-45, 68-97.
2. Robles, C., J.; Pastor, A.; Morales, P., Líquenes y sustancias liquénicas, *Revista Química* – PUCP, (1992), 6, 65-76.
3. Reinhold, L. D. ; Preiss, A., *Progress in Phytochemistry*, (1968), pag 225, 236 y 238.
4. Kika H. N; Vilegas, W., A química dos líquenes, *Química Nova*, Brasil, (1998), 21, 110 – 124.
5. Lock de Ugaz, O., Investigación Fitoquímica, Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, (1994), pag 110-169.
6. Randerath, K., Cromatografía de capa fina, Ed. Urmo, Bilbao, España, (1965), pag 23-25.
7. Feige, G. B.; Lumbsch, H.T., Identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid chromatographic method, *J. Chromatog.*, (1993), 646, 417-427.
8. Robles, C., Pastor, A.; Morales, P., Líquenes y sustancias liquénicas – Segunda parte, *Revista Química*, PUCP, (1992), 6, 192-200.
9. Huneck, S., and Yoshimura, I., Identification of the lichen substances, Ed. Springer, Berlin, (1996), pag 54-57, 78-82, 114-119.
10. Silverstein, R.M., Spectrometric identification of organic compounds, 5TH. Edition, Ed. John Wiley, (1991), pag 56-116.
11. Pretsch, F., Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos, Ed. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, (1998), pag 67-69, 111-126.
12. Shibata, S., Chiang, H. C., The structure of fumarprotocetraric acid, *Phytochemistry*, (1965), 4, 137-139.