

AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE UN COMPUESTO NITROGENADO Y DEL HAEMATOMATO DE ETILO DEL LIQUEN *Everniopsis trulla*

O.N. Castro M.^{1*}, J. Santiago², J. Álvarez²

RESUMEN

Del extracto clorofórmico del líquen peruano *Everniopsis trulla*, fueron aislados cuatro metabolitos, siendo tres ya reportados en la literatura (ácido úsnico, atranorina, haematomato de etilo) y uno nuevo, los cuales fueron identificados y elucidados por técnicas espectroscópicas monodimensionales (RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT) y bidimensionales (COSY, HMBC y NOESY), espectrometría de masas y espectroscopia UV e IR. Este trabajo es el primer estudio químico del líquen *Everniopsis trulla*.

Palabras clave: ácido úsnico, atranorina, *Everniopsis trulla*, haematomato de etilo, líquen.

ABSTRACT

The chloroform extract of the Peruvian lichen *Everniopsis trulla*, were isolated four metabolites, being three already reported in the literature (usnic acid, atranorin, Ethyl haematommate) and a new, which were identified and elucidated by one-dimensional spectroscopic techniques (¹H-NMR, ¹³C-NMR DEPT) and two-dimensional (COSY, HMBC and NOESY), mass spectrometry and IR and UV spectroscopy. This work is the first chemical study of lichen *Everniopsis trulla*.

Key words: usnic acid, atranorin, *Everniopsis trulla*, ethyl haematommate, lichen.

INTRODUCCIÓN

El líquen es un organismo simbiótico conformado por un hongo (micobionte) y un alga (ficobionte), donde el hongo se encarga del abastecimiento del agua y sales minerales mientras que el alga provee los productos fotosintéticos como los glúcidos. Los líquenes producen productos intracelulares, incluyendo proteínas, aminoácidos, carotenoides, polisacáridos y vitaminas, además producen metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos,

^{1*} Estudiante egresado del Doctorado en Ciencias Químicas, en la Escuela de Posgrado, Facultad de Química, de la UNMSM, ninocastro_2005@yahoo.com

² Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.

los cuales se acumulan en talos del líquen (dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos); este grupo de compuestos se considera propio de los líquenes¹, aunque también se han encontrado moléculas heterocíclicas con heteroátomo de nitrógeno^{2,3}.

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 muy altas típicamente serranas. Según referencias bibliográfica actuales, el papel más importante que desempeñan los líquenes, en relación a los seres humanos, es el de bioindicadores de la contaminación del ambiente; además, tienen propiedades farmacológicas, capacidad quelante, acción sobre reacciones fotoquímicas ligadas a cationes y usado también como pigmento^{3,4}.

El líquen *Everniopsis trulla* (*E. trulla*), tiene un talo gris a marrón pálido, que se adjunta por disco adhesivo basal; tiene, además, lóbulos en forma de cinta, dicotómicamente ramificados, de 2-3 mm de ancho, canaliculados. Las rizinas, cilios, isidios y soredios están ausentes⁵. La *E. trulla*, crece en Cajamarca, Ancash y Cusco⁶. Ramaut⁷ *et al*, en 1978, realizaron cromatografía de capa delgada CCD del extracto etanólico de dos líquenes *Everniopsis trulla* (recolectada de Zaire-África y de Apurímac-Perú) y compararon con sustancias patrones. Cabe mencionar que ellos contaron con apenas un gramo de muestra vegetal, justificando su estudio solo por CCD. Según este artículo, la *Everniopsis trulla* contiene ácido úsnico, atranorina, cloroatranorina y dos componentes no identificados. Elix⁸, en 1993, hizo una revisión de todos los géneros de la familia Parmeliaceae incluyendo información sobre las características básicas para cada especie. Para el caso de la especie *E. trulla* (Ach.) Nyl., relató que contiene atranorina y ácido úsnico en la parte superficial del talo mientras que en las paredes celulares hay polisacáridos no determinados, triterpenos y β -orcinol depsidonas en la parte medular del líquen. El ácido úsnico y la atranorina ya fueron identificados en diferentes especies de líquenes, como por ejemplo en *E. trulla*⁶, *Cladina*, *Stereocaulon*, etc.^{7,8}

El objetivo de la presente investigación es aislar algunos metabolitos del líquen *Everniopsis trulla*.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección y secado de la muestra. La especie liquénica completa se colectó en el departamento de Ancash, provincia de Asunción, distrito de Chacas, pueblo de Canchas, a una altitud 3427 msnm. El líquen *Everniopsis trulla* fue identificado por la Dra. Magda Chanco, del Museo de Historia Natural - UNMSM. La muestra vegetal fue secada en una estufa (Memmert ®) a 40 °C, durante cinco días, se molió con un molino de casa y finalmente fue tamizado con malla 10.

Extracción y aislamiento de compuestos. Un kilogramo de líquen seco y molido fue macerado con 6 litros de cloroformo, por un periodo de tres días, con dos repeticiones, obteniéndose un volumen de 3,5 litros; este extracto se concentró hasta 400 mL y se dejó en reposo, a 0°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo, se observó la precipitación de un sólido

crystalino amarillo, el cual fue separado por filtración y el extracto orgánico fue reservado. El sólido amarillo fue recrystalizado hasta obtener cristales de color amarillo A (120 mg, 0,012%). El extracto orgánico fue evaporado a presión reducida hasta sequedad (se obtuvo 31,2 gramos, 3,12%) y se realizó una columna cromatográfica en columna (CC) bajo las siguientes condiciones:

Fase estacionaria:	Sílica gel para CC, malla 230
Datos de la columna:	Diámetro: 3,5 cm x 50 cm de largo; la columna rellena fue de 40 cm.
Fase móvil: Sistema:	CHCl ₃ -MeOH (0:10, 1:9, 2:8..... 9:1, 10:0) de cada sistema el volumen fue de 300 mL
Características de la fracción:	Cada fracción fue de 20 mL en tubos de ensayo, en total se obtuvieron 160 fracciones de un volumen aproximado de 20 mL.

Luego, las diferentes fracciones se agrupan teniendo en cuenta los resultados de las CCD realizadas a cada fracción, así se obtuvieron siete fracciones importantes: F1: tubo 3-14; F2: tubo 15-43; F3: tubo 44-71; F4: tubo 72-99; F5: tubo 100-123; F6: 124-141; F7: tubo 142-160. Cada fracción se recrystaliza empleando diferentes sistemas de solventes como el CHCl₃, CHCl₃-MeOH, acetona-MeOH y MeOH; se verifica su pureza realizando una cromatografía en capa delgada (CCD), usando cromatofolios de sílica gel bajo el sistema tolueno – AcOEt – ácido acético glacial (6:4:1), revelando con una solución de H₂SO₄ (10%) en MeOH, los resultados se encuentran en la tabla 1.

Reactivos y equipos. Para aislamiento se utilizaron los reactivos CHCl₃, acetona, metanol, tolueno, etanol, ácido acético glacial y ácido sulfúrico de grado reactivo (Merck, Darmstadt, Germany), cromatofolios de sílica gel de Merck. Los equipos empleados son espectrofotómetro IR-FT Cary spectrometer, espectrofotómetro UV-visible Lambda 25 Perkin Elmer de la UNMSM; espectrómetro de resonancia nuclear RMN Bruker Avance de 400 MHz de la Universidade Estadual de Campinas (SP-Brasil); espectrómetro de masas Applied Biosystems QSTAR XL de la Universidad de Salamanca de España.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La muestra vegetal (1 kg) del líquen peruano *E. trulla*, previamente seca y molida, fue sometida a extracción con cloroformo, rindiendo 31,2 g de extracto cloroformico (3,12%) y un sólido cristalino amarillo (1,2 gramos). Seguidamente, se realizó cromatografía de columna (CC) al extracto cloroformico, donde se obtuvo 160 fracciones y luego agrupadas en siete fracciones según la CCD.

Tabla 1. Fracciones obtenidas por CC del extracto clorofórmico de *E. trulla*

FRACCIÓN	Masa
F1	A: 30 mg
F2	B: 103, C: 550 mg
F3	D: 40 mg
F4	E: 34 mg; F: 14 mg
F5	F: 60 mg
F6	G: 55 mg; H: 22 mg
F7	H: 37 mg

A continuación se discute la elucidación estructural de los cuatro compuestos aislados (A, B, C y D).

Compuesto A. Es un cristal de color amarillo, soluble en cloroformo y acetona, parcialmente soluble en etanol e insoluble en agua y tiene un punto de fusión de 202,5 °C. El compuesto **A** fue cromatografiado en capa fina usando el sistema de solvente (tolueno/acetato de etilo/ácido acético glacial 6:4:1v/v/v), y se asperjó con una solución de H₂SO₄ en MeOH 10%, observándose una sola mancha con un R_f de 0,46 idéntico al de la sustancia patrón de ácido úsnico. Se midió la rotación óptica del compuesto, calculándose el $[\alpha]_D^{25}$ a 25°C de + 492, en cloroformo (c = 0,52). Según el espectro IR, el sólido **A** presenta los grupos funcionales OH, COOH, CHO, C-O-C. El espectro ultravioleta visible (UV/VIS) tiene dos bandas bien definidas cuyas máximas absorciones son 233 y 283 nm. Los espectros de RMN-H¹ y RMN-C¹³ del sólido **A** mostraron señales características del dibenzofurano ácido úsnico C₁₈H₁₆O₇, (figura 1) aislado de varios líquenes^{4,9-11}.

Compuesto B. El cristal de color blanco con punto de fusión de 198°C, soluble en CHCl₃ poco soluble en MeOH y acetona, reacciona con KOH formando una solución amarilla y con FeCl₃ dio rojo marrón, característico de los dépsidos. En el espectro UV-vis se observó dos bandas características, cuyas máximas longitudes de absorción son: 217 y 266 nm. El espectro de RMN-H¹ reveló la presencia de cuatro singuletes atribuidos a grupos metilos en δ 2,1 y 2,7 ppm (metilos aromáticos), en δ 2,5 ppm (COMe) y en δ 3,9 ppm (COOMe); asimismo, fueron observados dos singuletes en δ 6,4 y 6,5 ppm designados a dos protones aromáticos. Los singuletes en δ 11,9, 12,5 y 12,6 ppm fueron atribuidos a un protón de aldehído, y 2 protones oxidrilos. En el espectro RMN-C¹³ fueron identificados diecinueve carbonos diferentes. Con los datos obtenidos, se propone que el compuesto **B** es el dépsido atranorina, que fue aislado y elucidado de otras especies de líquenicas^{4,7,9,10}.

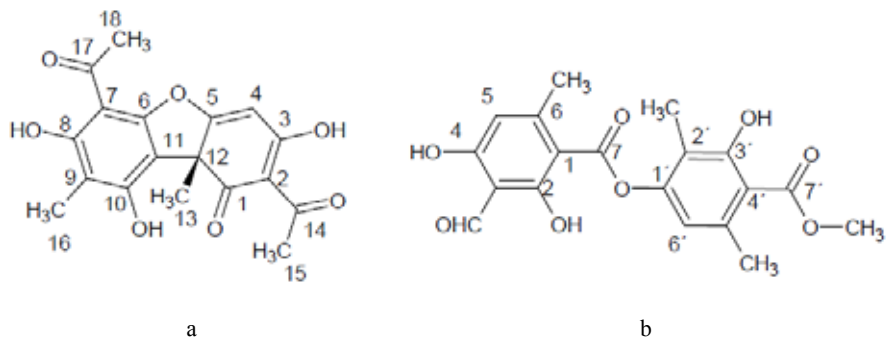


Figura 1. (a) Estructura del compuesto A **(b)** Estructura del compuesto B

Compuesto C. Es un cristal en forma de agujas con punto de fusión 103 oC. En el espectro IR se identificaron algunos grupos funcionales a partir de sus bandas de absorción como OH a 3478 cm^{-1} , CH y CH_3 a 2997 cm^{-1} ; C=O a 1651 cm^{-1} . En la figura 2 se muestran los desplazamientos para los diferentes tipos de hidrógenos.

El espectro de RMN- C^{13} (figura 3), presenta once picos atribuidos a once carbonos diferentes. En base a los datos espectroscópicos de RMN- H^1 y C^{13} , se propone que el compuesto C se trata del compuesto conocido 2,4-dihidroxi-3-formil-6-metilbenzoato de etilo (figura 4).^{3,9,10}

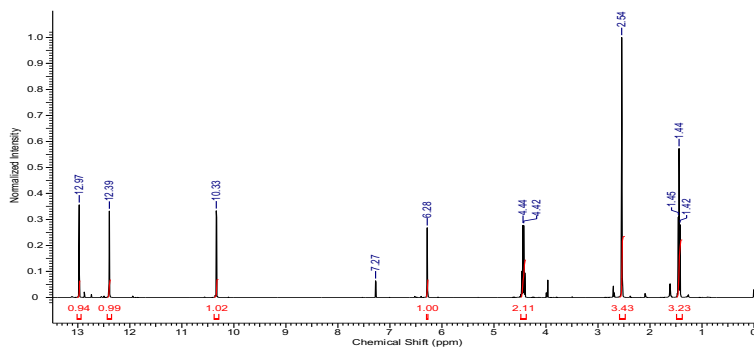


Figura 2. Espectro de RMN- H^1 del compuesto C

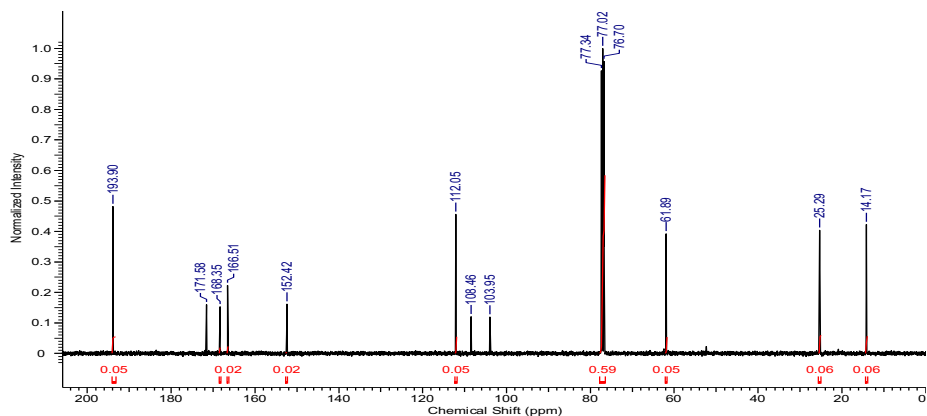


Figura 3. Espectro de RMN- H^1 del compuesto C

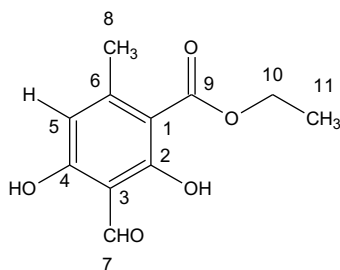


Figura 4. Estructura del compuesto C

Compuesto D. Es un cristal de color blanco que cristaliza en forma de hilos, cuyo punto de fusión es de 112°C y es soluble en CHCl_3 , acetona y metanol. No reacciona con KOH ni con FeCl_3 , sugiriendo que no se trata de un dépsido ni de una depsidona. En el espectro de RMN-H, figura 5, se observan los diferentes hidrógenos, que en forma resumida estos datos están en la tabla 2.^{9,10}

En el espectro de RMN- C^{13} , figura 6, se observan los 11 carbonos, como a los metilos a 14,32 y 25,46 ppm; un grupo metileno a 62,04 ppm y grupo aldehído a 194,04 ppm, etc. Ver tabla 2.

Tabla 2. Datos de RMN- H_1 y RMN- C^{13} del compuesto **D**

Nro. Posición	H	Características del H	C	Características del C
1	-	-	166,65	-C=O
2	12,97	S, 1H	-	
3	-	-	168,48	-C=O
4	-	-	104,08	=C-
5	-	-	152,56	=CH
6	12,39	d, J=0,8Hz, 1H	-	
7	2,54	-	25,46	CH ₃
1'	-	-	108,60	=C-
5'	6,28	t, J=0,8 Hz, 1H	112,19	=CH
7'	-	-	171,72	-C=O
8'	10,33	d, J=0,6Hz, 1H	194,04	CHO
1''	4,43	q, J=7,1 Hz, 2H	62,04	-CH ₂ -
2''	1,43	t, J= Hz, 3H	14,32	CH ₃

En las figuras 7 - 10, se observan los espectros bidimensionales como el COSY, lo cual revela que el H del C1'' está acoplado con el H del C2''. Del espectro HMBC, tenemos los acoplamientos de C1 con los hidrógenos de los dos nitrógenos adyacentes N2 y N6; también se observa el acoplamiento de estos mismos con el C4. En el espectro HSQC se observa la relación directa de cada hidrógeno con su carbono: H-C7, H-C5' y H-C9'. Finalmente, el espectro NOESY confirma las relaciones obtenidas de los diferentes espectros 2D, siendo lo más evidente la relación del H-C7. La información revelada por NOESY corrobora la estructura química propuesta.

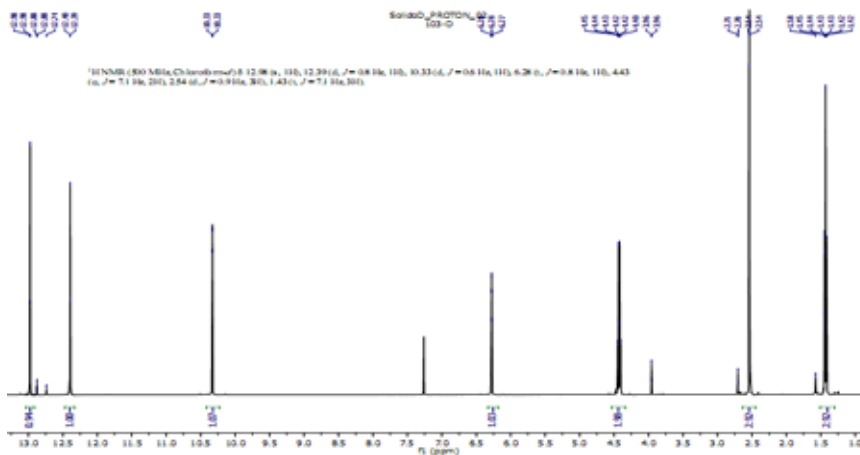


Figura 5. Espectro de RMN-H del compuesto D

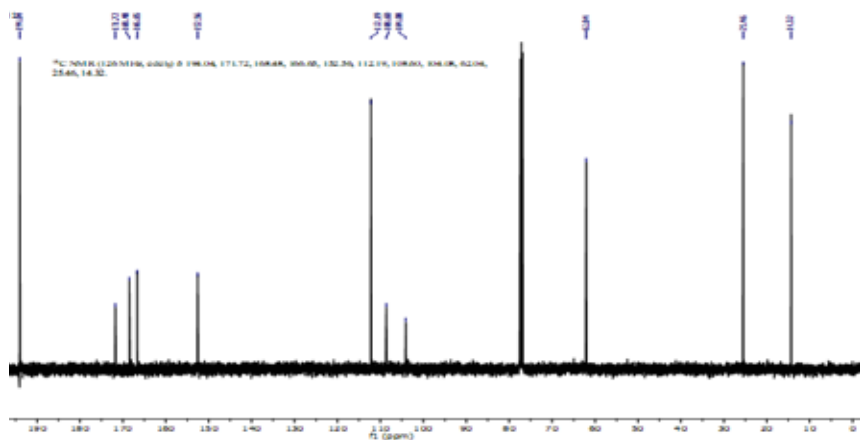
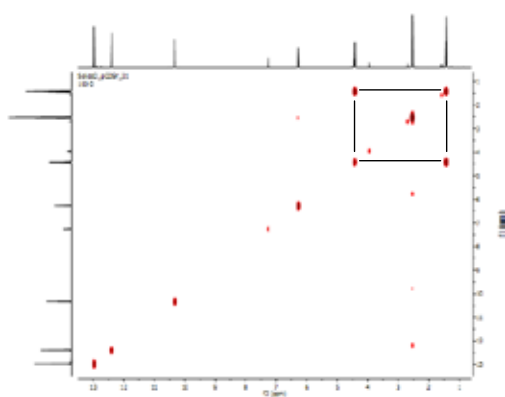


Figura 6. Espectro de RMN-C¹³ del compuesto D

En la figura 11 se observa el espectro de masas e indica la masa molecular y la fórmula molecular del compuesto D, el cual es: $C_{11}H_{13}N_6O_4$, con un m/z de 293,0993; y la estructura química propuesta está en la figura 12. En la figura 13 se tienen las interacciones de los diferentes átomos en base a los datos de los espectros bidimensionales, ver tabla 3. Por otro lado, se hizo una búsqueda en la base de datos de Science Finder y la estructura propuesta para D no está registrada. Esta última información confirma que el compuesto D es inédito^{9,10}.

Tabla 3. Datos de RMN-H¹, RMN-C¹³ y sus interacciones según los espectros bidimensionales del compuesto **D**

Nro. posición	H	COSY	HMBC	HSQC	NOESY
1	-	-	-	-	-
2	12,97	-	168,48	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	12,39	-	166,65	-	-
7	2,54	-	-	25,46	6,28
1'	-	-	-	-	-
5'	6,28	-	108,60; 166,65	112,19	2,54
7'	-	-	-	-	-
8'	10,33	-	166,65; 112,19; 108,60	194,04	-
1''	4,43	1,43	168,48; 14,32	62,04	1,43
2''	1,43	4,43	-	14,32	4,43

**Figura 7.** Espectro COSY H-H del compuesto **D**

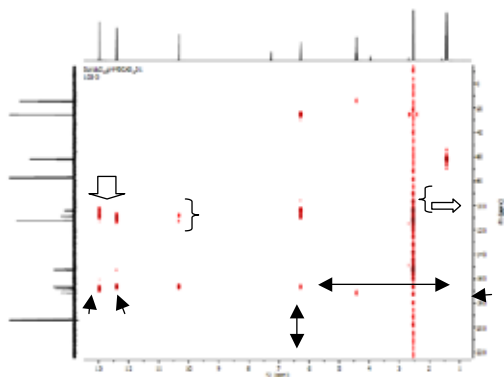


Figura 8. Espectro HMBC del compuesto **D**

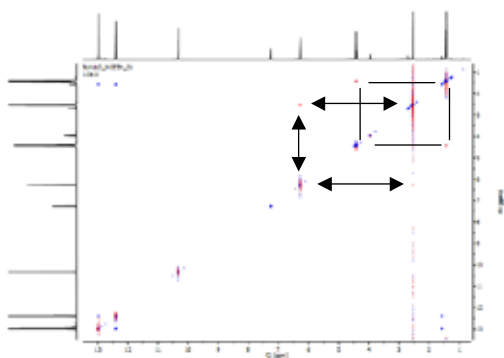


Figura 9. Espectro NOESY del compuesto **D**

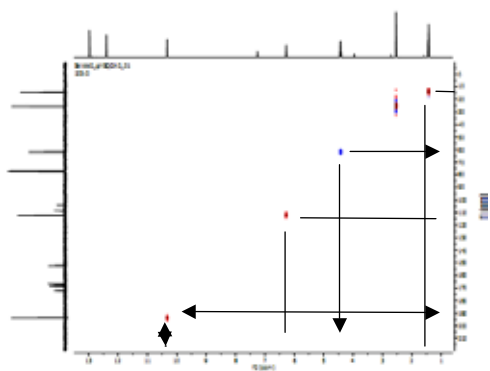


Figura 10. Espectro HSQC del compuesto **D**

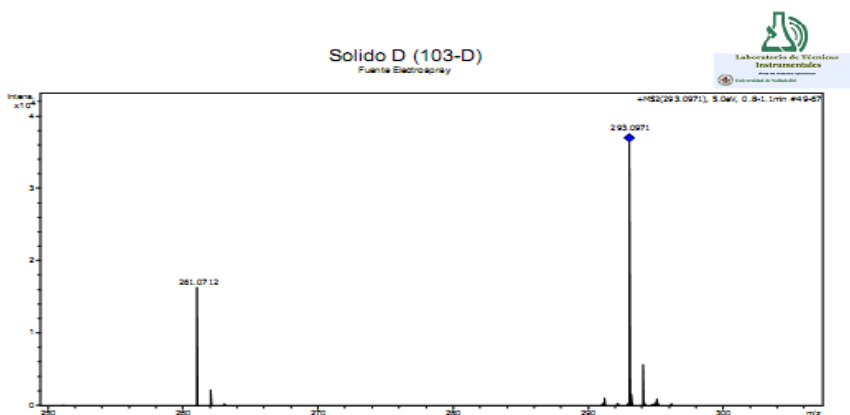


Figura 11. Espectro de masas del compuesto D

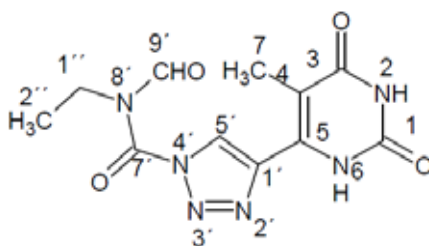


Figura 12. Estructura del compuesto D

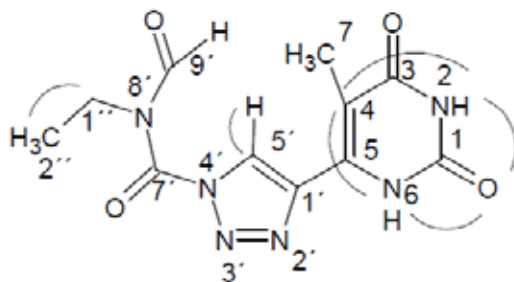


Figura 13. Estructura química del compuesto D con los acoplamientos

CONCLUSIONES

Se realizó un estudio fitoquímico preliminar de la especie *Everniopsis trulla*, donde se aislaron y elucidaron tres compuestos conocidos, como son el ácido úsnico, la atranorina, el 2,4-dihidroxi-3-formil-6-metilbenzoato de etilo o haematomato de etilo y un heterocíclico nuevo, en base a los datos espectroscópicos de RMN mono y bidimensionales, espectros de masas y espectros UV e IR.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a la Dra. Magda Chanco, por la identificación botánica; a la Dra. María Caramantín Soriano por los análisis de RMN, al Dr. Arturo San Feliciano por los análisis de espectrometría de masas; y al Dr. Carlos Areche (Universidad de Chile) por los espectros de RMN H^1 y C^{13} .

BIBLIOGRAFÍA

1. Kika N, Vilegas WA. Química dos líquenes. Química Nova – Brasil. 1998; 21: 110 – 124.
2. Vila J, Mollamedo P, Flores Y. 1,3,7-trimetilguanina from the lichen *Stereocaulon ramulosum*. Rev Bol Quím. 2008; 25(1): 1-3.
3. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. Berlin: Ed. Springer-Verlag GmbH; 1996.
4. Zambare VP, Christopher LP. Review article: biopharmaceutical potential of lichens. Pharm Biol. 2012; 50(6): 778-798.
5. Elix, JA. Progress in the generic delimitation of *Parmelia sensu lato* lichens (Ascomycotina: Parmeliaceae) and a Synoptic key to the Parmeliaceae. The Bryologist. 1993; 96(3): 359-383.
6. Ramos D. Lista de especies de líquenes y hongos liquenícolas del Perú. Glalia. 2014; 6(2): 16.
7. Ramaut JL, Brouers M, Serusiaux E, Corvisier M. Separation of mixtures of atranorina and chloroatranorin by thin layer chromatography. J Chromatogr. 1978; 155: 450-453.
8. Seo C, Hak SJ, Min PS, Han YJ, Kum LH, Oh H. Usimines A-C, bioactive usnic acid derivatives from the antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. J Nat Prod. 2008; 71: 710-712.
9. Silverstein R M. Spectrometric identification of organic compounds. 6th Edition. New York: John Wiley; 1997.
10. Pretsch E. Structure determination of organic compounds: tables of spectral data. New York: Springer; 2009.
11. Rashid M, Majid M, Quader M. Complete NMR assignments of (+) usnic acid, Fitoterapia, 1999; 70(1): 113-115.