



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE SÍNTESIS Y PRODUCTOS NATURALES

ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPECIE LIQUÉNICA *Pseudocyphellaria flavicans*

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

Gabriel Esteban Godoy Ibaceta

Director de tesis: Dra. Natalia Quiñones Sobarzo
Co-director: Mg. Cecilia Rubio Lagos

2018

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	10
3. OBJETIVOS.....	12
4. METODOLOGÍA.....	14
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSIÓN.....	29
7. CONCLUSIONES.....	32
8. REFERENCIAS.....	34
9. ANEXOS.....	39

RESUMEN

Los líquenes son organismos simbióticos compuestos por un hongo, el micobionte, y uno o más organismos fotosintéticos, el fotobionte. Cumplen un rol importante en el medio ambiente fijando nitrógeno atmosférico al suelo y facilitando la colonización de sitios carentes de vegetación.

Existe una gran cantidad de metabolitos secundarios liquénicos, muchos de ellos con importantes actividades biológicas, demostradas tanto *in vitro* como *in vivo*, dentro de las cuales destacan la actividad antibacteriana, antineoplásica y antifúngica. Lo que explica el interés de la industria farmacéutica por extractos y sustancias liquénicas.

Los metabolitos liquénicos proceden de rutas metabólicas conocidas y estudiadas, por lo que se clasifican en función de ellas, estas rutas son del ácido chiquímico, acetato-polimalonato y ácido mevalónico.

El género *Pseudocyphellaria* está ampliamente distribuido en Chile, se han descrito cincuenta y cuatro especies y su hábitat es desde a nivel de mar hasta bosques templados-lluviosos. Es un género altamente productivo y al mismo tiempo complejo por su diversidad química.

En este trabajo se investigaron los metabolitos secundarios acumulados por el líquen *Pseudocyphellaria flavicans* por métodos fitoquímicos convencionales y análisis espectroscópicos. Los productos aislados corresponden a Calicina (865 mg, 0,43%), Pseudocyphellarina A (1,117 g, 0,56%) y los estictanos 22 α -hidroxiestictan-3-ona (4,712 g, 2,35%) y 2 α -acetoxiestictan-3 β ,22 α -diol (3,694 g, 1,85%).

ABSTRACT

Lichens are symbiotic organisms composed of a fungus, the mycobiont, and one or more photosynthetic organisms, the photobiont. They play an important role in the environment, introducing atmospheric nitrogen to the soil and facilitating the colonization of the sites, lacking of the vegetation.

There is a large amount of secondary metabolic metabolites, many of them with important biological activities, demonstrated both *in vitro* and *in vivo*, among which the antibacterial, antineoplastic and antifungal activity stand out. What explains the interest of the pharmaceutical industry for extracts and lichen substances.

The metabolic metabolites come from metabolic routes known and studied, so they are classified according to them, these routes are chiquímico acid, acetate-polymalonate and mevalonic acid.

The genus *Pseudocyphellaria* is widely distributed in Chile, fifty-four species have been described and their habitat is from sea level to temperate-rainy forests. It is a highly productive genre and at the same time complex due to its chemical diversity.

In this work, secondary metabolites accumulated by lichen *Pseudocyphellaria flavicans* were investigated by conventional phytochemical methods and spectroscopic analysis. The isolated products correspond to calycin (865 mg, 0.43%), pseudocyphellarin A (1,117 g, 0.56%) and the stictans 22 α -hydroxystictan-3-one (4.712 g, 2.35%) and 2 α -acetoxiestictan-3 β ,22 α -diol (3.694 g, 1.85%).

1. INTRODUCCIÓN.

Los líquenes son organismos simbióticos compuestos por un hongo, el micobionte, y uno o más organismos fotosintéticos, el fotobionte (Nash, 2001). Se puede decir también que un líquen es un microecosistema, ya que en él conviven un productor primario y un consumidor primario. En esta asociación hongo-alga u hongo-cianobacteria, el hongo es el organismo dominante, por lo mismo, los nombres de las especies liquénicas están referidos respecto del hongo de la asociación (Purvis, 2000). Actualmente un estudio ha cuestionado este paradigma de dualidad sobre los líquenes ya que se encontraron levaduras del filo *basidiomicotas* integradas al córtex de hongos ascomicetas de los líquenes *Bryoria tortuosa* y *Bryoria fremontii*, muchos de los líquenes comunes que se pueden encontrar en la naturaleza están compuestos de un hongo ascomiceta conocido. (Spribille et al. 2016)

Los líquenes cumplen un rol importante en el medioambiente ya que tienen la capacidad de establecerse como pioneros durante la colonización de sitios rocosos carentes de vegetación y con el tiempo preparan el sustrato para el desarrollo sucesivo de distintas plantas, también muchos de los líquenes que tienen cianobacterias fijan el nitrógeno atmosférico elemental, enriqueciendo los suelos, principalmente en las regiones boreales y en bosques templados (Coutiño B. & Montañez A., 2000).

Por otra parte, los líquenes se han usado en distintas culturas en medicina tradicional, esto se debe a las importantes propiedades biológicas que presentan sus metabolitos secundarios.

Existe una gran cantidad de metabolitos secundarios liquénicos, muchos de los cuales son comunes con otros organismos y otros son metabolitos secundarios exclusivos de los líquenes (Elix, 1992). Se han descrito cerca de 1000 metabolitos distintos (Huneck & Yoshimura, 1996) muchos de ellos con importantes actividades biológicas, demostradas *in vitro* e *in vivo*, dentro de las cuales destacan: antibacteriana, antineoplásica y antifúngica (Quilhot, Rubio, & Fernández, 2007).

Por lo que se han utilizado como modelo para realizar modificaciones estructurales específicas y generar nuevos fármacos (anticancerígenos) (Kinston & Newman, 2005). Esto explica el aumento en el interés de la industria farmacéutica por extractos y sustancias liquénicas. Algunos de los compuestos liquénicos más utilizados son el ácido úsnico (**1**) y el ácido pulvínico (**2**), el primero es un compuesto natural liquénico usado en preparaciones farmacéuticas, activo contra microorganismos y virus, también actúa como un agente analgésico y antipirético (Proksa & Proksova, 1999). El ácido pulvínico (**2**), puede ser extraído desde algunos líquenes y algunos representantes del reino fungi, es un pigmento amarillo brillante o naranja con propiedades antioxidantes. (Jayanthi et al, 2012). La estructura de estos se muestra en la **Figura 1**.

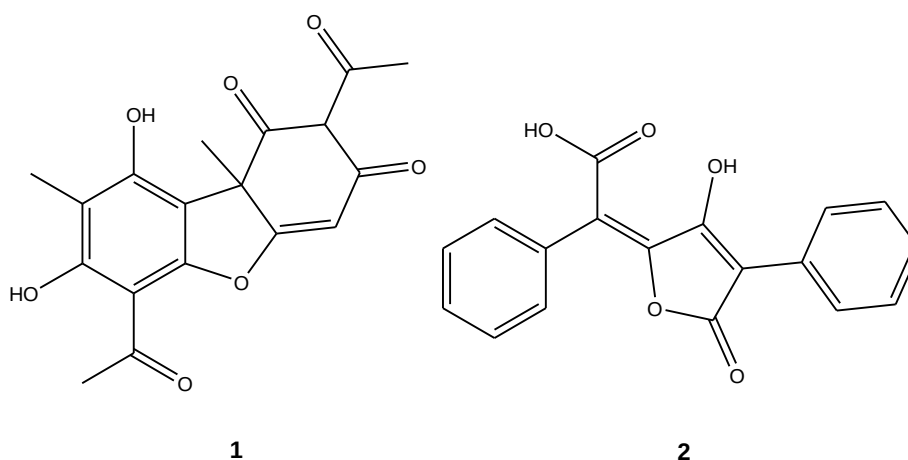


Figura 1. Estructuras del Ácido Úsnico y Ácido Pulvínico.

Los metabolitos secundarios liquénicos proceden de rutas metabólicas conocidas y estudiadas, por lo que se clasifican en función ellas. Estas rutas son las del ácido chiquímico, acetato-polimalonato y ácido mevalónico. **Tabla 1.**

Tabla 1. Principales clases de metabolitos secundarios en líquenes
(Quilhot, Rubio, & Fernández, 2007)

Acetato- Polimalonato	Ruta ácido mevalónico
1- Ácidos alifáticos secundarios, ésteres y derivados relacionados 2- Policétidos derivados de compuestos aromáticos 2-1 Compuestos fenólicos mononucleares 2-2 Derivados diaril y triaril de unidades fenólicas simples a) Dépsidos, tridépsidos y ésteres bencílicos b) Depsidonas y difeniléteres c) Depsonas d) Difenzofuranos, ácidos úsnicos y derivados 2-3 Antraquinonas 2-4 Cromonas 2-5 Naftaquinonas 2-6 Xantonas	1-Di-,sester y triterpenos 2-Esteroides
	Ruta ácido chiquímico
	1-Terfenilquinonas 2-Derivados del ácido pulvínico

Dentro de los metabolitos líquénicos derivados de la ruta del acetato-polimalonato, encontramos dépsidos, depsidonas, difeniléteres, dibenzofuranos, ácidos úsnicos y depsonas. (Elix, 2008, Mosbach, 1973). Estos se consideran metabolitos líquénicos exclusivos, porque raramente se encuentran en otros vegetales.

De la ruta del ácido chiquímico, (Mosbach, 1973) **Figura 2**, se generan compuestos, en general derivados del ácido pulvínico, tales como, epanorina y ácido rizocárpico. Por esta vía también se genera compuestos comunes con otras plantas vascularizadas y hongos no liquenizados.

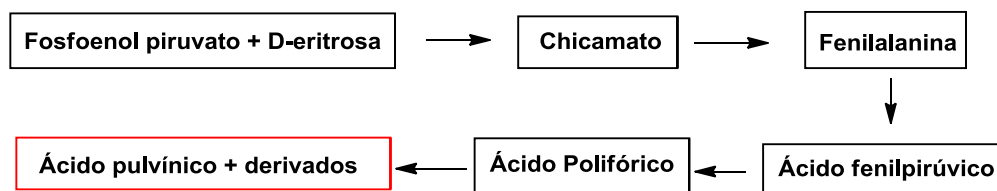


Figura 2: Esquema general ruta del ácido chiquímico.

Por último, de la ruta del ácido mevalónico se producen terpenos y esteroide, **Figura 3**, ambos provienen de la ruta del escualeno, se les diferencia pues los esteroides son generalmente tetracíclicos y los terpenoides son pentacíclicos.

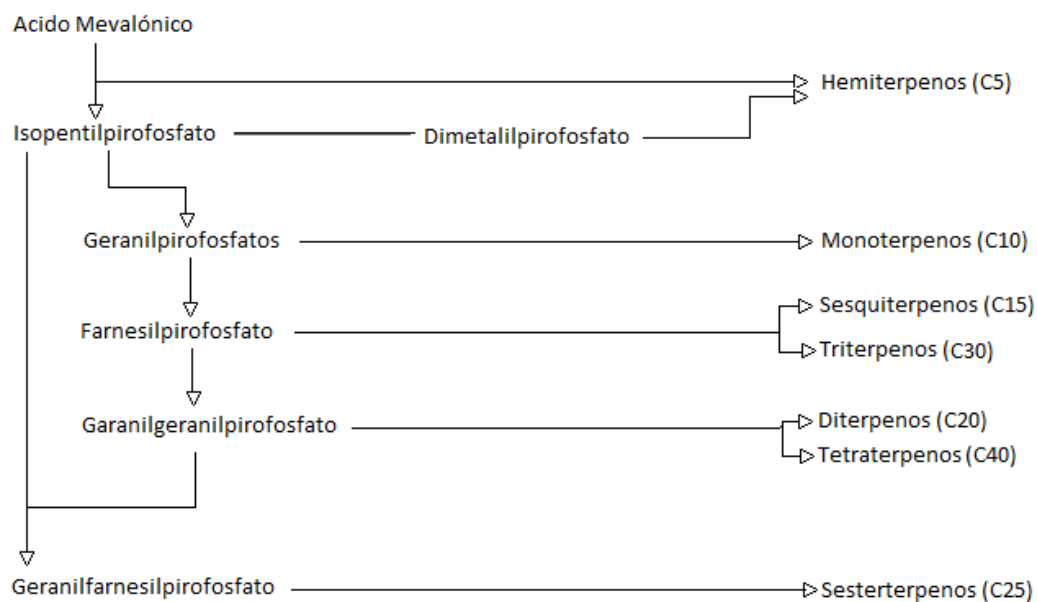


Figura 3: Esquema general biosíntesis de terpenos.

Algunos ejemplos de triterpenos acumulados por líquenes corresponden a la familia de las series del Hopano (3), Lupano (4), Oleano (5), Ursano (6) y Fernano (7) (Marcano & Hasegawa, 2002), **Figura 4**.

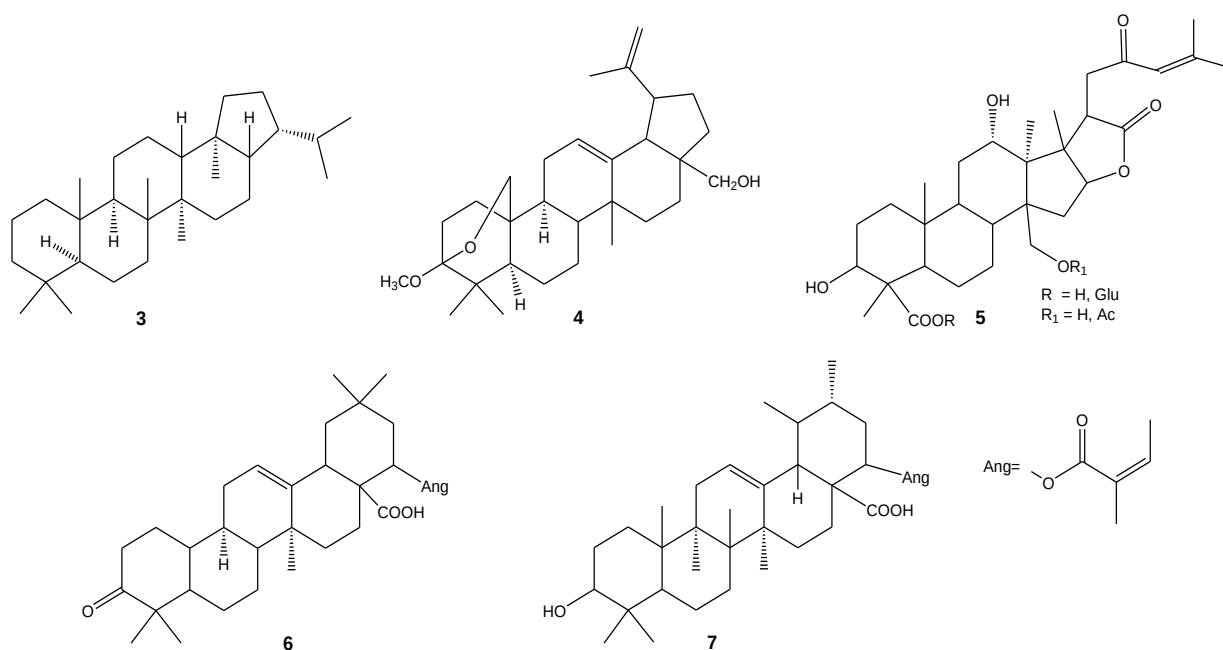


Figura 4: Esqueletos triterpénicos de las series: Hopano (**3**), Lupano (**4**), Oleano (**5**), Ursano (**6**) y Eufano (**7**). (Marcano & Hasegawa, 2002)

Algunos líquenes pertenecientes al género *Sticta* (ej. *S. flavicans*) Elaboran una clase de triterpenos los cuales han sido llamados estictanos. La biogénesis de este grupo ha sido racionalizada de un escualeno-2,3-epóxido plegado. **Figura 5.**

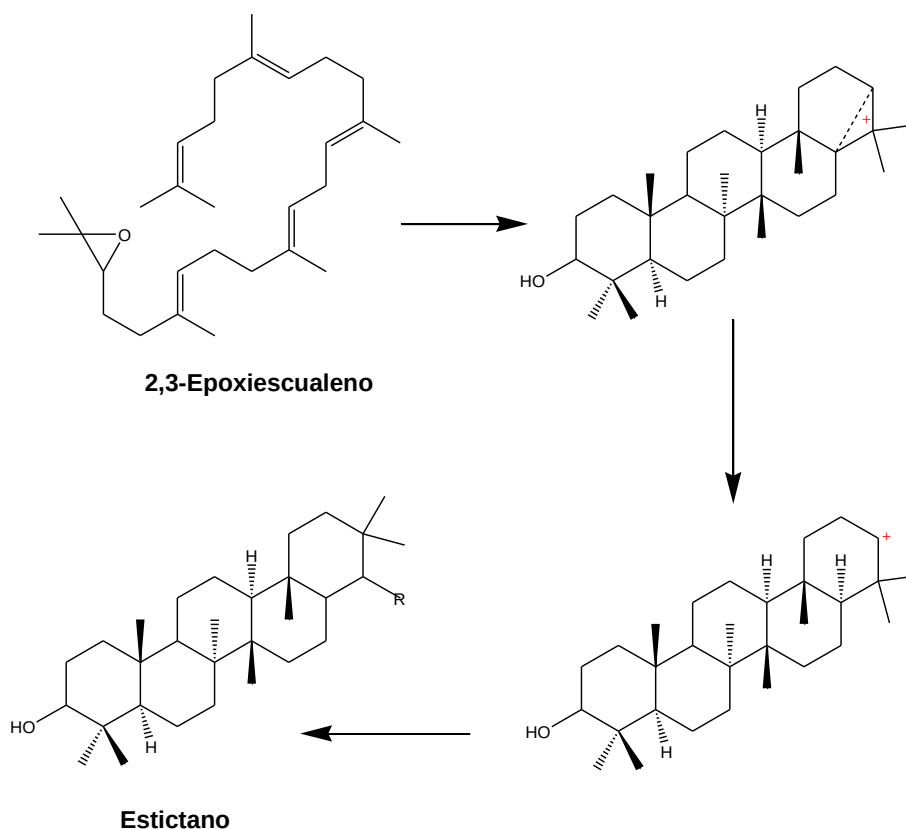


Figura 5. Ciclación de escualeno 2,3 epóxido a Estictano. (Sukh Dev. 2017)

Se tiene una estimación sobre el número de especies liquénicas existente en el mundo, este número ronda las 17.500 – 20.000 especies (Illiana & Esteban C. 2012). En Chile existe una abundante flora liquénica, en biodiversidad y biomasa, la cual según “Checklist of Chilean lichenforming and lichenicolous fungi” estaba representada por 1.450 especies (Galloway & Quilhot 1998). Al día de hoy se conocen más de 1600 especies y se espera que el número siga en aumento (Quilhot conv. pers.).

En nuestro país las áreas de mayor abundancia liquénica se encuentran en el Altiplano de la I Región (Galloway 1998), en los oasis de neblina costeros (Redón & Lange 1983), en los bosques valdivianos (Galloway 1994), en los bosques subantárticos, en el archipiélago de Juan Fernández (Redón & Quilhot 1977) y en el Territorio Antártico (Redón 1985).

El género liquénico *Pseudocyphellaria* es un género incluido en la familia *Lobariaceae*, junto a *Sticta* y *Lobaria*. Recibe su nombre por la ausencia de córtex (recubrimiento del talo) y la interrupción de este generando poros también llamados pseudocifelas. Este género es el más productivo de la familia *Lobariaceae* en cuanto a número de metabolitos secundarios y al mismo tiempo más complejo por su diversidad química (Galloway 1992). Se han descritos cincuenta y cuatro especies en Chile (Bjerke 2003). Y su distribución de hábitat es desde, a nivel de mar, en oasis y bosques templado-lluviosos. Teniendo registro desde Cerro Moreno (Antofagasta) hasta el Cabo de Hornos (Galloway 1992).

La especie *Pseudocyphellaria flavicans* (*P. flavicans*) es una especie endémica de Sudamérica, epífita en *Araucaria araucana* y *Nothofagus spp.* se encuentra en hábitat de alta humedad y lluvia, abiertos y con alta luminosidad. Se caracteriza por formar rosetas irregulares o esparcidas en la corteza de árboles y en ocasiones en rocas, posee una medula amarilla y un fotobionte verde. En Chile se ha reportado desde Isla Mocha hasta Tierra del fuego. (Galloway 1992, Quilhot et al. 2010) y en el Archipiélago de Juan Fernández.



Foto 1: *Pseudocyphellaria flavicans*.

Los metabolitos secundarios producidos por *Pseudocyphellaria flavicans* han sido estudiados anteriormente mediante cromatografía en capa fina, con esta técnica se ha informado la presencia de calicina, dilactona pulvínica, triterpenoides del estictano y pseudocyphellarina A (Galloway 1992). **Figura 6**

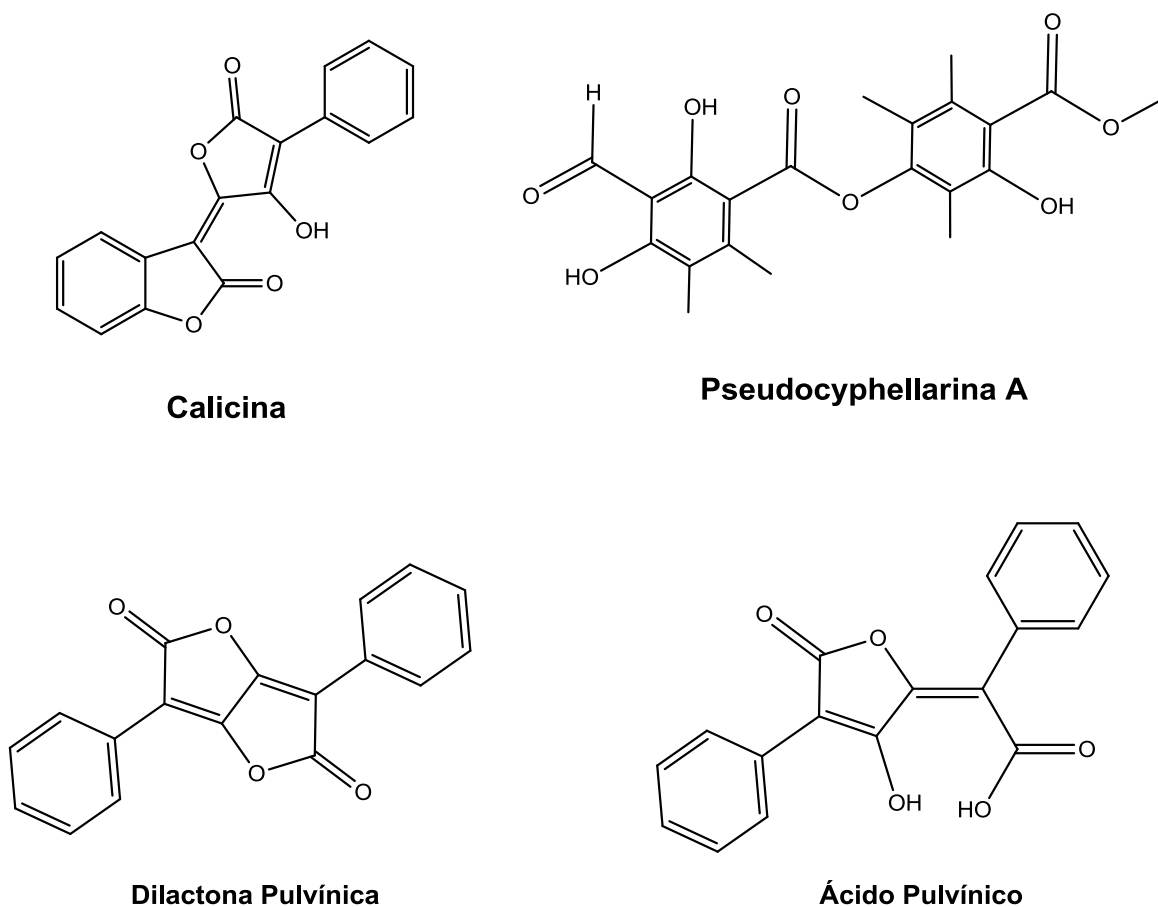


Figura 6: Metabolitos informados para *Pseudocyphellaria flavicans* (*P. flavicans*)

En este trabajo se propone continuar el estudio de *P. flavicans* por métodos macroquímicos para la identificación y caracterización de metabolitos secundarios de *Pseudocyphellaria flavicans*, con el fin de ampliar el conocimiento de las especies *Pseudocyphellaria* que están presentes en nuestro país.

2. HIPÓTESIS.

En especies del género *Pseudocyphellaria* se han identificado mediante métodos microquímicos, metabolitos secundarios derivados de las rutas biosintéticas acetato-polimalonato, ácido mevalónico y ácido chiquímico. Por lo tanto, la revisión química de *Pseudocyphellaria flavicans* permitirá aislar e identificar compuestos derivados de estas rutas biosintéticas y caracterizarlos por métodos macroquímicos.

3. OBJETIVOS.

Objetivos Generales:

Ampliar el estudio químico de las especie del género *Pseudocyphellaria*, que están presentes en Chile.

Objetivos Específicos:

1. Aislar e Identificar metabolitos secundarios presentes en *Pseudocyphellaria flavicans* mediante métodos fitoquímicos convencionales.
2. Caracterizar triterpenos presentes en *Pseudocyphellaria flavicans*.

4. METODOLOGÍA

Materiales

- ✓ Columna cromatográfica.
- ✓ Sílice gel Merck 60 G de 0.032-0.063 nm.
- ✓ Hexano grado p.a.
- ✓ Diclorometano grado p.a.
- ✓ Acetato de etilo grado p.a.
- ✓ Metanol grado p.a.
- ✓ Hanesian.
- ✓ Ácido Sulfúrico 15% v/v.
- ✓ Cromatoplasmas de sílice gel Merck 60 F254.
- ✓ Tubos de ensayos.
- ✓ Balones de 250 y 100 mL.
- ✓ Embudos.
- ✓ Pipeta Pasteur.
- ✓ Propipeta.
- ✓ Pipetas (1mL, 5mL, 10mL).

- ✓ Bureta 50ml+/- 0,05mL.
- ✓ Probetas (100 mL +/- 1 mL, 50mL+/- 1 mL, 10 mL+/-0.2 mL).
- ✓ Vaso Precipitados de 50mL, 250mL y 500mL.

Equipos

- ✓ Lámpara UV (254nm y 365 nm) ViberLourmat.
- ✓ Rotavapor Büchi R-210.
- ✓ Balanza analítica Sartorius Basic.
- ✓ Espectrofotómetro (RMN) Bruker Spectrometer ® model AVANCE 400.
- ✓ Punto de Fusión Stuart Melting Point ® model smp 30.

Glosario

CCF: Cromatografía en capa fina.

CC: Cromatografía en Columna.

RMN: Resonancia magnética Nuclear.

^1H -RMN: Resonancia magnética Nuclear de Protones.

^{13}C -RMN: Resonancia magnética Nuclear de Carbono.

AcOet: Acetatato de Etilo.

Hex: Hexano.

p.f.: Punto de fusión.

Metodología

Cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF se realizaron en placas de aluminio con gel de sílice Merck ® 60 F 254. La cromatografía se realizó con mezclas de solventes (Hex/AcOet y AcOet/Metanol) en las proporciones adecuadas para cada caso. La CCF se revelaron con luz ultravioleta (254 nm y 365nm), con Hanessian y/o H_2SO_4 al 15% v/v y calentando posteriormente a 120°C.

Cromatografía en columna (CC)

Las CC se realizaron en gel de sílice Merck ® 60 G de 0,032- 0,063mm, y fueron eluidas con mezclas de solvente de polaridad creciente (Hex/AcOet).

Extracción y purificación de Compuestos liquénicos

La muestra de *P. flavicans* fue obtenida del herbario de líquenes de la Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso. Recolectada en el año 2009 en Isla Mocha, VIII región, Chile.

El material liquénico se limpió bajo lupa para eliminar restos orgánicos e inorgánicos, luego se secó a 60°C para obtener su peso seco, el cual fue de 200 g posteriormente se trituró y maceró con solventes orgánicos en polaridad creciente (Hex, CH₂Cl₂, AcOet) en extracciones sucesivas de 72 horas cada una, posteriormente estos fueron concentrados a presión reducida. representados en la **Figura 7**.

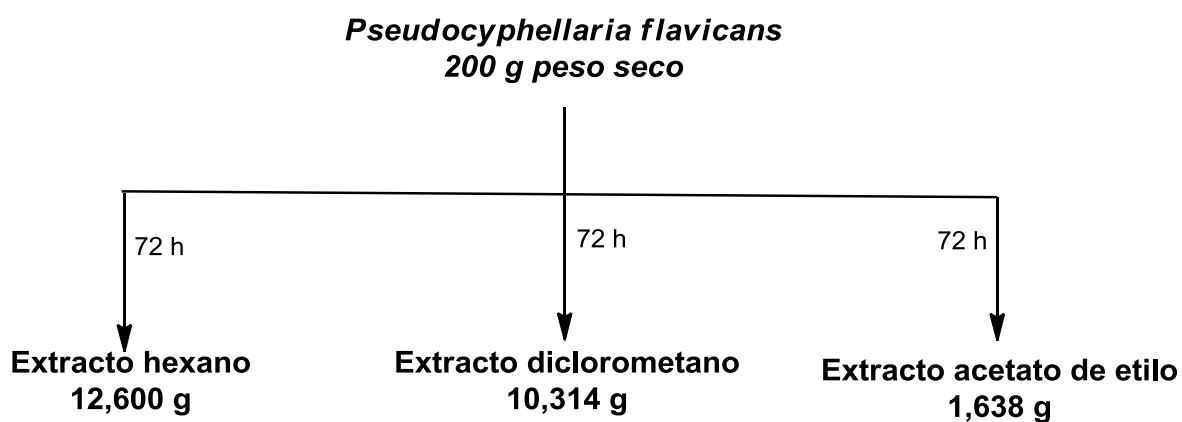


Figura 7: Diagrama de separación de los extractos.

Los extractos fueron analizados por separado. Y su comparación fue a través de CCF. Los metabolitos principales de cada extracto fueron purificados por CC. Posteriormente la caracterización e identificación de estos metabolitos se realizó por técnicas de RMN.

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN), se registraron en un Espectrofotómetro Bruker Spectrometer ® model AVANCE 400; ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100,623 MHz. Las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado (CDCl_3). Los desplazamientos químicos se expresan en escala de ppm (partes por millón) y las constantes de acoplamiento J , en Hz.

Abreviaturas RMN

s: Singlete.

dd: Doble Doblete.

m: Multiplete.

Hz: Hertz.

ppm: Partes Por Millón.

J : Constante de Acoplamiento.

1. Análisis Extracto Hexano.

Para el análisis del extracto de hexano (12,600 g) se realizaron 3 columnas cromatográficas, de 4,1680g, 4,0834g y 4,3987g respectivamente, las cuales fueron eluídas con mezclas de Hex/AcOet en polaridad creciente y se recogieron en fracciones de aproximadamente 5mL. **Figura 8.**

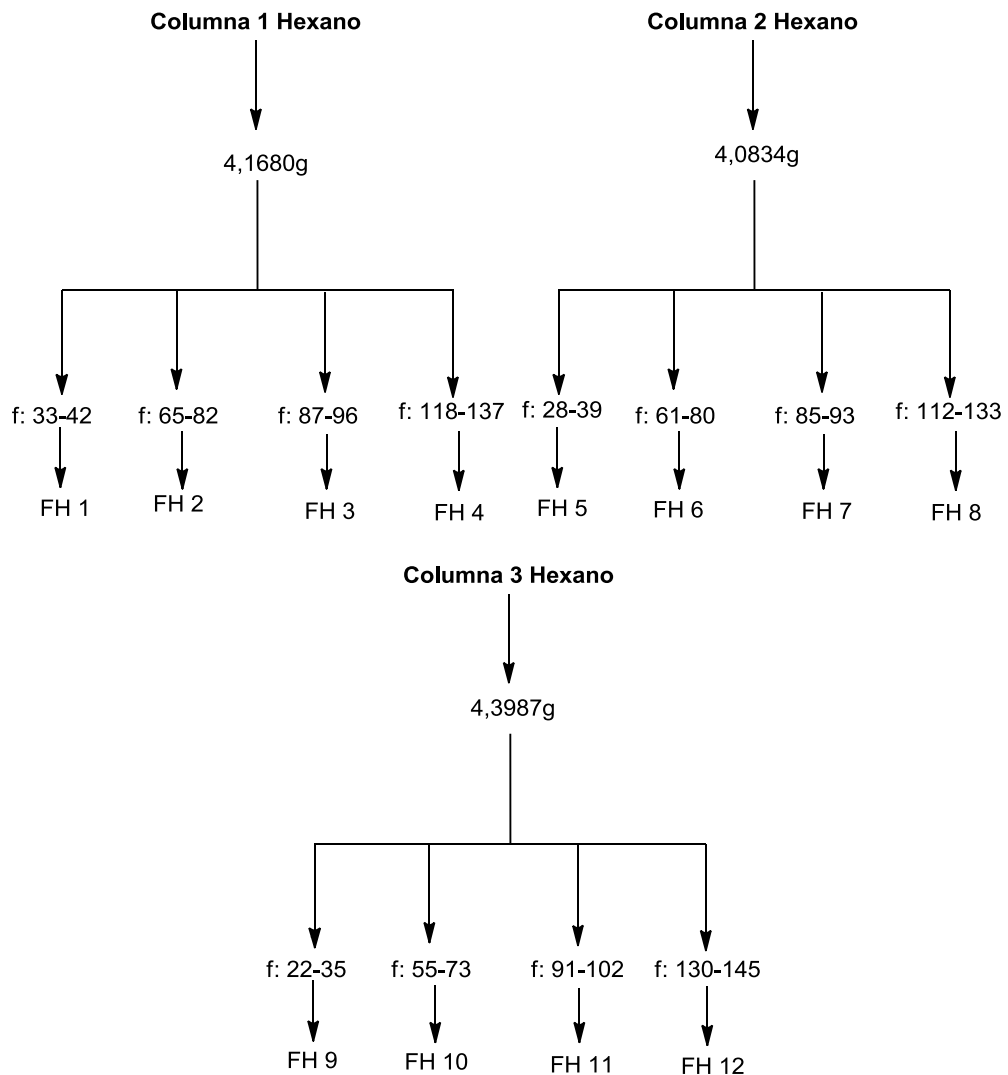


Figura 8: Diagrama columna cromatográfica hexano

Las fracciones se analizaron por CCF y se agruparon según patrones de similitud. Posteriormente se compararon las fracciones obtenidas en las diferentes columnas y se rotularon como:

- FH 1 (213 mg), FH 5 (184 mg) y FH 9 (254 mg) fueron agrupados como **GG02** (651 mg) un sólido blanco.
- FH 2 (1.125 mg), FH 6 (867 mg) y FH 10 (1.352 mg) agrupados en **GG03** (3.344 mg). Un sólido blanco que cristaliza en forma de agujas.
- FH 3 (82 mg), FH 7 (101 mg) y FH 11 (96 mg) agrupados como **GG01** (279 mg) un sólido fino de color naranja el cual cristaliza en forma de agujas.
- FH 4 (749 mg), FH 8 (680 mg) y FH 12 (853 mg) agrupados como **GG05** (2.282 mg) un sólido blanco fino.

2. Análisis extracto Diclorometano.

Para la purificación del extracto de diclorometano (10,314 g) se realizaron 2 CC eluídas en polaridad creciente con Hex-AcOet. Se recogieron fracciones de aproximadamente 5 mL. **Figura 9.**

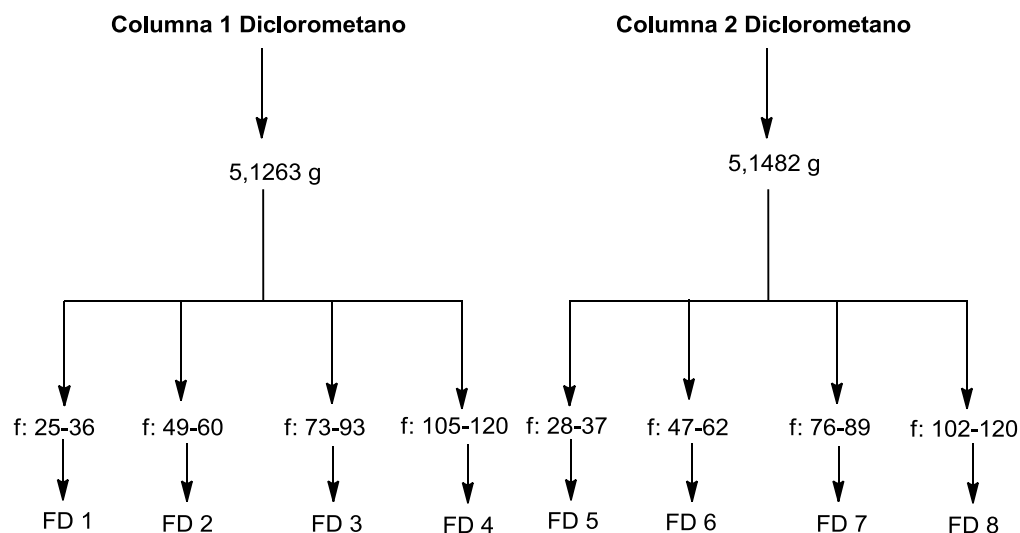


Figura 9: Diagrama Columna Cromatográfica Diclorometano.

Las fracciones se analizaron por CCF y se agruparon según patrones de similitud. Posteriormente se compararon las fracciones obtenidas en las diferentes columnas y se rotularon como:

- FD 1 (213 mg) y FD 5 (253 mg) se agruparon en **GGD01**.
- FD 2 (660 mg) y FD 6 (708 mg) se agruparon en **GGD02**.
- FD 3 (326 mg) y FD 7 (260 mg) se agruparon en **GGD03**.
- FD 4 (780 mg) y FD 8 (632 mg) se agruparon en **GGD04**.

Se compararon con las fracciones de Hexano y se establecieron las siguientes equivalencias:

- **GGD01**: Corresponde a **GG02**.
- **GGD02**: Corresponde a **GG03**.
- **GGD03**: Corresponde a **GG01**.
- **GGD04**: Corresponde a **GG05**.

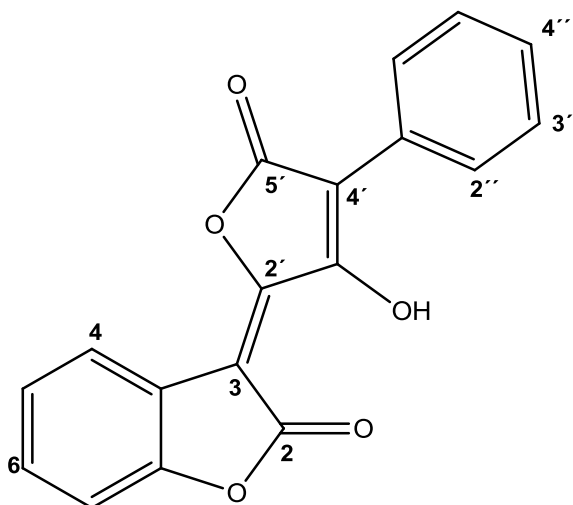
3. Análisis extracto Acetato de etilo

El extracto de acetato de etilo se analizó por CCF. Se observó que corresponde a una mezcla compleja de productos. Se realizó una CC (1,638 g) eluídas en polaridad creciente con Hex-AcOet pero las fracciones obtenidas resultaron ser mezclas de compuestos imposibles de separar.

5. RESULTADOS.

Aislación e identificación de metabolitos liquénicos:

GG01: Calicna (C₁₈H₁₀O₅)



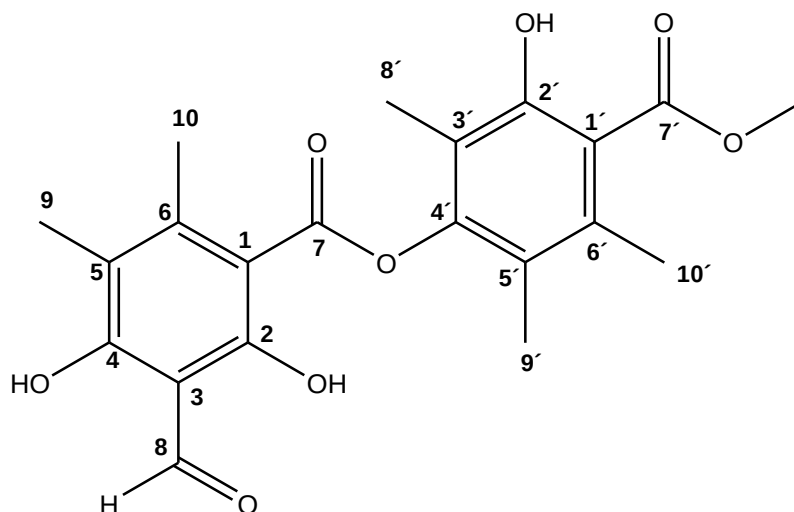
La muestra **GG01** (865 mg) corresponde a un sólido amarillo fino de punto de fusión 248,7 °C.

¹H- RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 12,59 (1H, s, OH); 8,17 (2H, d, *J*= 7.6 Hz, H-2'', H-6''); 7,97 (1H, d, *J*= 7.6 Hz, H-4); 7,49-7,44 (3H, m, H-6, H-3'', H-5''); 7,39 (1H, dd, 7,4- 7,4 Hz, H-4''); 7,32 (1H, dd, *J*= 7,6- 7,7Hz, H-5); 7,22 (1H, d, *J*= 8,12 Hz, H-7).

¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 173,1 (C-5'); 165,4 (C-2); 160,0 (C-3'); 153,7 (C-2'); 128,4 (C-1''); 125,8 (C-7a); 121,7(C-3a); 114,6(C-3); 111,3(C-3''); 106,3(C-4'); 8 C-H aromático: 131,4, 129,0, 128,6, 128,2, 125,9.

Los datos físicos y espectroscópicos corresponden según literatura (Huneck & Yoshimura, 1996; Salinas, Mollinedo & Vila, 2012).

GG02: Pseudocyphellarina A (C₂₁H₂₂O₈)



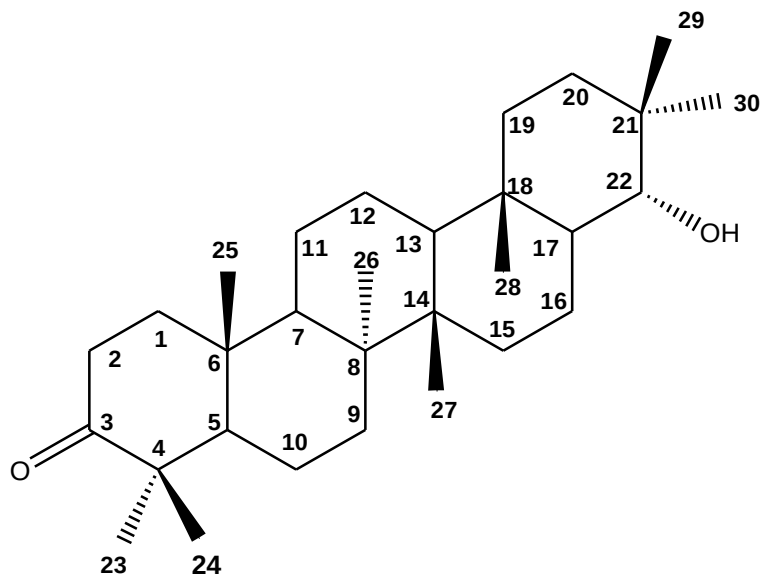
La muestra GG02 (1,117 g) corresponde a un sólido blanco de punto de fusión 180,1 °C.

¹H- RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 13,09 (1H, s, OH); 12,40 (1H, s, OH); 11,13 (1H, s, OH); 10,38 (1H, s, CHO); 3,98 (3H, s, CH₃-O₂C); 2,71 (3H, s, CH₃-Ar); 2,47 (3H, s, CH₃-Ar); 2,19 (3H,s, CH₃-Ar); 2,09 (3H, s, CH₃-Ar); 2,07 (3H, s, CH₃-Ar).

¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 194,0 (C-8); 172,1 (C-7'); 169,8 (C-7); 166,9 (C-2); 166,1 (C-4); 158,9 (C-2'); 151,5 (C-4'); 150,1 (C-6); 137,6 (C-5'); 120,5 (C-6'); 118,2 (C-3'); 116,2 (C-3); 111,8 (C-5); 107,9 (C-1'); 102,8 (C-1); 52,3 (CH₃O₂C); 20,5 (C8'); 18,9 (C10'); 13,2 (C10); 10,8 (C9); 9,8 (C9').

Los datos físicos y espectroscópicos corresponden según literatura (Huneck & Yoshimura, 1996).

GG03: 22α-hidroxiestictan-3-ona (C₃₀H₅₀O₂)



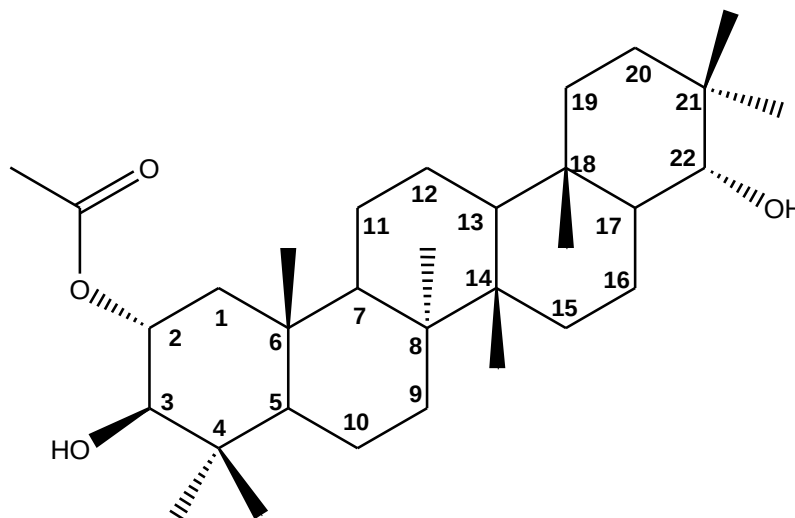
La muestra **GG03** (4,712 g) corresponde a un sólido blanco de punto de fusión 223,1 °C.

¹H- RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 3,14 (1H, d, J=11.0 Hz, H-22); 1,16 (3H, s, Me-26); 1,05 (3H, s, Me-23); 1,04 (3H, s, Me-24); 1,01 (3H, s, Me-30); 0,97 (3H, s, Me-27); 0,86 (3H, s, Me-29); 0,74 (3H, s, Me-25); 0,72 (3H, s, Me-28).

¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 220,5 (C-3); 76,4 (C-22); 49,0 (C-17); 48,5 (C-13); 47,3 (C-9); 46,9 (C-4); 43,2 (C-5); 42,1 (C-14); 41,9 (C-8); 38,4 (C-18); 36,1 (C-10); 35,7 (C-21); 35,0 (C-20); 34,7 (C-19); 33,8 (C-2)*; 33,7 (C-7)*; 31,6 (C-1)'; 31,5 (C-15)'; 30,0; (C-20); 29,3 (C-23), 23,3 (C-25); 22,0 (C-11)^; 22,0 (C-26)^; 21,2 (C-12); 20,5 (C-6); 19,5 (C-24); 19,2 (C-16); 18,5 (C-30); 17,1 (C-27); 13,5 (C-28). (*)(')(^): Señales intercambiables

Los datos físicos y espectroscópicos corresponden según literatura (Huneck & Yoshimura, 1996. Wilkins et al, 1989)

GG05: 2α-acetoxiestictan-3β,22α-diol (C₃₂H₅₄O₄)



La muestra **GG05** (3,694 g) corresponde a un sólido blanco de punto de fusión (p.f.) 216,3 °C.

¹H- RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 5,01 (1H, dt, *J*=4,9, 10,6 Hz, H-2); 3,20 (1H, d, *J*= 9,9 Hz H-3), 3,14 (1H, d, *J*= 11,1 Hz, H-22) 2,07 (3H, s, OCOMe) 1,13, 1,03, 0,99, 0,98, 0,90, 0,86, 0,85, 0,72 (24H, 8-s, 8-Me)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 171,6 (OCOMe); 81,5 (C-3); 76,4 (C-22); 75,1 (C-2); 49,0 (C-13); 48,5 (C-17); 47,8 (C-5); 46,3 (C-9); 42,5 (C-14); 41,8 (C-8); 39,4 (C-4); 38,9 (C-1); 38,4 (C-18); 37,6 (C-10); 35,7 (C-21); 34,9 (C-20); 34,8 (C-19); 34,1 (C-7); 31,7 (C-15); 29,8 (C-29); 29,5 (C-23); 23,6 (C-25), 22,7 (C-11); 22,5 (C-26); 21,4 (OCOCH₃)*; 21,3 (C-12)*; 19,3 (C-16); 18,8 (C-6); 18,5 (C-30); 17,2 (C-27); 17,0 (C-24); 13,5 (C-28). (*): Señales intercambiables

Los datos físicos y espectroscópicos corresponden según literatura (Huneck & Yoshimura, 1996, Wilkins et al, 1989)

Rendimientos Experimentales

Los rendimientos totales obtenidos a partir del peso seco de la muestra inicial son los siguientes expresados en la **Tabla 2**.

Metabolitos	Masa total (g)	Rendimiento (%)
Calicina	0,865	0,43
Pseudocyphellarina A	1,117	0,56
22α-hidroxiestictan-3-ona	4,712	2,35
2α-acetoxiestictan-3β,22α-diol	3,694	1,85

Tabla 2: Rendimientos totales de metabolitos aislados.

6. DISCUSIÓN.

El género *Pseudocyphellaria* presenta la mayor diversidad y complejidad química de la familia Lobariaceae. En este trabajo se estudiaron los metabolitos secundarios del taxón *Pseudocyphellaria flavicans* recolectada en el año 2009 en Isla Mocha, VIII región, Chile.

En reportes anteriores mediante métodos microquímicos (Galloway, 1992) se informó para esta especie, la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: Calicina, Pseudocyphellarina A, dilactona pulvínica, ácido pulvínico y triterpenos de la serie del estictano.

En este estudio se aislaron mediante métodos macroquímicos, los siguientes metabolitos: Calicina y Pseudocyphellarina A. Además, se logró caracterizar por técnicas espectroscópicas de RMN dos triterpenos de la serie del estictano: 22 α -hidroxiestictan-3-ona, 2 α -acetoxiestictan-3 β ,22 α -diol. Un tercer estictano fue aislado, pero debido a su baja concentración no pudo ser caracterizado correctamente por técnicas espectroscópicas, sin embargo, con la información obtenido del espectro de ^1H -RMN se presume que corresponde a estictan-3 β ,22-diol.

No se descarta la presencia de ácido pulvínico y dilactona pulvínica, es probable que se encuentren presentes en bajas concentraciones, dentro de la mezcla compleja de separar obtenida del extracto de acetato de etilo.

En las especies de este género se encuentran metabolitos secundarios de las tres rutas biogénicas universales. De la ruta del ácido chiquímico, se encuentran calicina, ácido pulvínico, ácido calicínico y dilactona pulvínica, comunes en especies de médula amarilla tales como *P. colensoi*, *P. coronata*, *P. crocata* y *P. pickeringii*. De la ruta de acetato-polimalonato dépsidos como pseudocyphellarina A (*P. endochrysa*), dépsidonas como ácido salazínico (*P. granulata*), tridépsidos

como teniurina (*P. sulphurera*) y de la ruta del ácido mevalónico los triterpeneos de la serie del estictano, lupano y hopanos (Galloway, 1988).

Los triterpenos son muy frecuentes en líquenes que tienen algas verdes y/o cianobacterias como fotobionte primario o secundario (Budel & Scheidegger, 1996).

Calicina, un compuesto derivado del ácido pulvínico, ha sido reportada en distintos géneros liquénicos, por ejemplo, *Candelaria*, *Candelaria concolor* (Salinas, Mollinedo & Vila, 2012), *Candelaria reflexa* y *Candelaria xantostigma* (Paz & Burgaz, 2009). Este compuesto presenta importante capacidad de absorción UV, como actividad biológica, funcionando como filtro para el exceso irradiación UV-B. (Bhattacharyya et. al., 2016).

7. CONCLUSIONES.

La revisión química de *Pseudocyphellaria flavicans* permitió aislar e identificar compuestos derivados de las rutas de ácido chiquímico, ácido mevalónico y acetato-polimalonato.

Mediante métodos macroquímicos se asilaron del liquen *Pseudocyphellaria flavicans* los compuestos calicina (865 mg, 0,43 %), pseudocyphellarina A (1,117 g, 0,56%) y dos triterpenos derivado del estictano.

Los triterpenos se caracterizaron por técnicas espectroscópicas y corresponden a: 22 α -hidroxiestictan-3-ona (4,712 g, 2,35%) y 2 α -acetoxiestictan-3 β ,22 α -diol (3,694 g, 1,85 %).

No se logró aislar ácido pulvínico ni dilactona pulvínica, aunque no se descarta que se encuentren presentes dentro de la mezcla compleja de separar obtenida del extracto de acetato de etilo.

Los metabolitos secundarios aislados en la muestra de *Pseudocyphellaria flavicans* recolectada en 2009 (Isla Mocha, Chile), coinciden con aquellos informados anteriormente, por métodos microquímicos, para la especie.

8. REFERENCIAS.

BHATTACHARYYA S., PRATIBHA R. D., SUNITA S. & BINATA N. (2016). Lichen Secondary Metabolites and Its Biological Activity. American journal of pharmtech research pag 28-44.

BUDEL B., SCHEIDEGGER C. (1996) Thallus morphology and anatomy. En; T.H. Nash III (ed.). Lichen Biology, 37-64, Cambridge University Press.

COUTIÑO, B. & MONTAÑEZ A. (2000). Revista de Ciencias pág. 64-65. Laboratorio de Etnobotánica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

DÍAZ, B., UGARTE, R., QUILHOT, W., VERA, A., & GAMBARO, V. (1988). Actividad antibacteriana in vitro de la depsidona clorada 1'-cloropinarina. *Revista latinoamericana de microbiología* , 30-79.

DEV S. (2017) Handbook of Terpenoids. Volume I: Triterpenoids pag 46-53.

ELIX J.A. (1992). Lichen chemistry. Flora of Australia 54: 23-29.

ELIX J.A. (1996). Biochemistry and secondary metabolites. En: T.H. Nash III (ed.). Lichen Biology; pp. 154-180. Cambridge University Press.

ELIX, J.A. (2008). Biochemistry and secondary metabolites. En H. Thomas, *Lichen Biology* págs. 104-133. Cambridge: Cambridge University Press.

GALLOWAY, D.J. & W. QUILHOT. (1998). Checklist of Chilean lichenforming and lichenicolous fungi. Gayana Botanica 55: 111-185.

GALLOWAY, D.J. (1998). The lichens of Chile: Present knowledge and future prospects. In: M.P. Marcelli & M.R.D. Seaward, (eds.) *Lichenology in Latin America: History, Current Knowledge and Applications*, p. 87-100. CETESB. Sao Paulo.

GALLOWAY, DJ. (1992). Studies in *Pseudocyphellaria* (lichens) III. The South American species. *Bibliotheca Lichenologica* 46: 1-275.

GERARD J. TORTORA, B. R. (2007). Eucariontes: Hongos, algas, protozoos y helmitos. En *Introducción a la Microbiología* pág. 355. México: Panamericana.

GUZMÁN, G. (2008). Líquenes. En J. Rovira, *Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos* págs. 376-377. Santiago, Chile: Comisión nacional del medio ambiente.

HAGER, A., BRUNAUER, G., TURK, R., STOCKER-WORGOTTER, E. (2008). Production and bioactivity of common lichen metabolites as exemplified by *Heteridea muelleri* (Hampe) Nyl. *J Chem Ecol.* 34: 113-120.

HUNECK S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissen.* 86: 559-570.

HUNECK, S., & YOSHIMURA, I. (1996). *Identification of lichen substances*. Berlin, Alemania: Springer.

ILLANA-ESTEBAN, C. (2012). Lichens used in traditional medicine. *Bol. Soc. Micol.* Madrid 36: 163-174.

JAYANTHI, S., PRIYA, P., MÓNICA D., BENILA & SMILY, J.M., (2012). Lichens: Origin, types, secondary metabolites and applications. *J Acad Indus Res.*1(1): 45-49.

KOSANIC, M., RANKOVIC, R., & SUKDOLAK, S. (2010). Antimicrobial activity of lichen *lecanora frustulosa* and *Parmeliopsis hyperopta* and their divaricatic acid and zeorin constituents. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 885-890.

MARCANO, D., & HASEGAWA, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas, Universidad Central de Venezuela.

MENDEL, P. (2008). Metabolitos liquénicos y derivados con potencial actividad antineoplásica. *Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico*. Valparaíso: Universidad de Valparaíso.

MOSHBACH K. (1973). Biosynthesis of lichens substances. En: V. Ahmadjian & M. Hale (eds.). *The Lichens*; pp. 523-542. Academic Press, New York & London.

NASH, T. H. (2001). *Lichen Biology*. Cambridge, United Kingdom: Press syndicate of the university of Cambridge.

PAZ G., BURGAZ A. (2009). Liqueños epíticos del hayedo de Montejo de la Sierra (Madrid). Editorial Complutense.

PROKSA B, PROKSOVA A. (1999) Lichens metabolites. Usnic acid and its biological activity. *Farm Obz.* 68: 139-143.

PURVIS, W. (2000). *Lichens*. (L. Series, Ed.) London: The Natural History Museum.

REBOLLEDO, B. (2011). Aislamiento e Identificación de metabolitos secundarios acumulados por *Pseudocyphellaria malmeana* DJ. Galloway. Tesis para optar al grado de Licenciado en Química y Farmacia. Pp, 1-30.

REDÓN, J. y O.L. LANGE. (1983). Epiophytische flechten um bereich einer chilenischen "Nebeloasen" (Fray Jorge). I. Vegetationskundliche gliederung und standortsbedingungen. *Flora*, 174: 213-243.

REDÓN, J. (1985). Líquenes Antárticos. Instituto Antártico Chileno. Santiago, Chile.

REDÓN, J. y W. QUILHOT (1977). Los líquenes de isla Navarino. 1. Estudio sistemático y ecológico preliminar. *Serie Científica Instituto Antártico Chileno* 5: 65-79.

SALINAS, J., MOLLINEDO, P., & Vila, J. (2012). Calycin and physcion from the lichen *Candelaria concolor*. *Revista Boliviana de Química*, 29(1), 94-96.

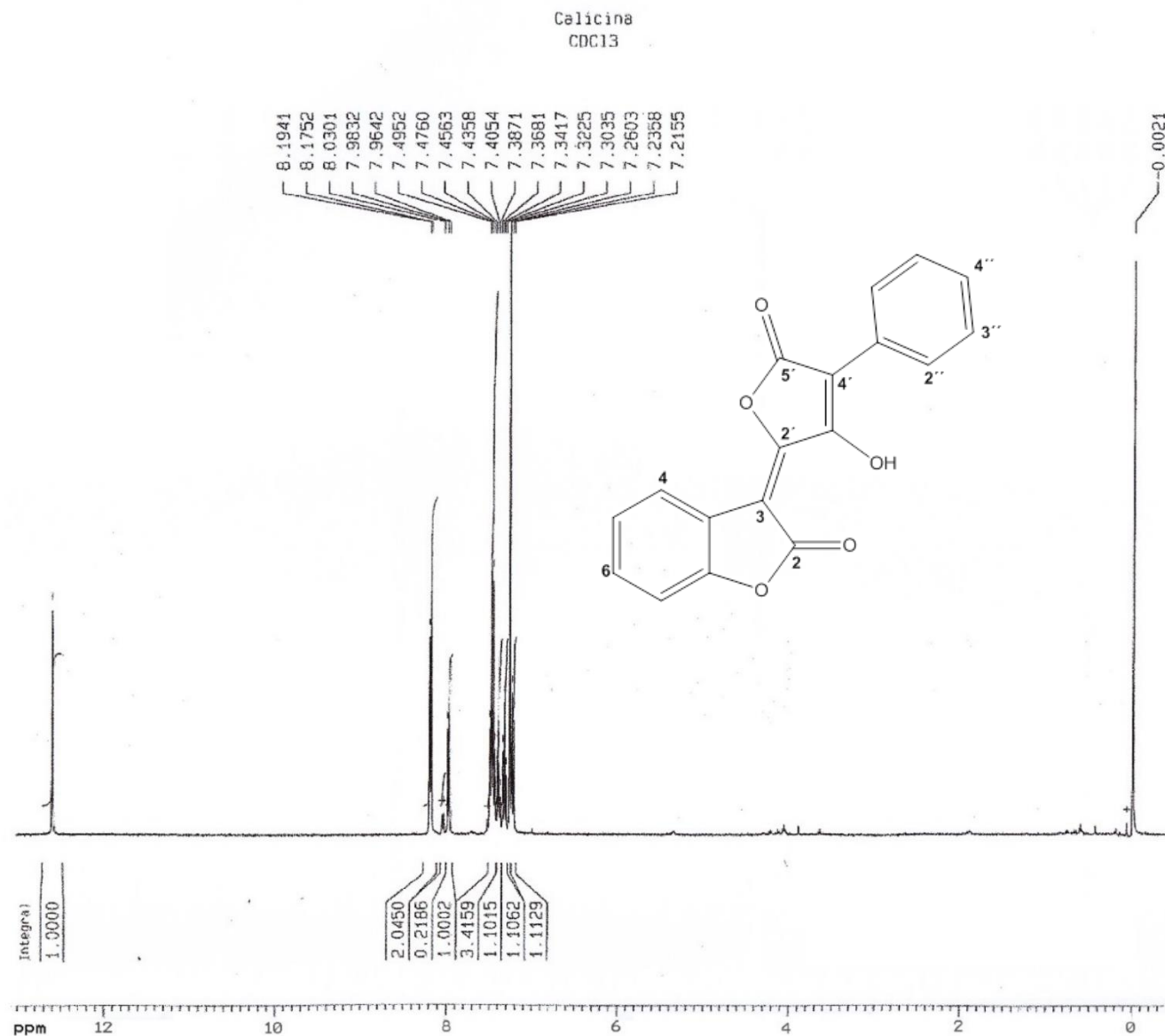
SPRIBILLE T., TOUVINEN V., RESL P., VANDERPOOL D., WOLINSKI H., AIME C., SCHNEIDER K., TOOME-HELLER M., THOR G., MARYHOFER H., JOHANNESSON H. & MCCUTCHEON J. (2016). *Basidiomycete yeast in the cortex of ascomycete macrolichens*. pages 488-491. *Science*.

QUILHOT W., CUELLAR M., DÍAZ R., RIQUELME F. & RUBIO C. (2010). Estudio preliminar de la flora líquénica de Isla Mocha, sur de Chile. *Gayana Botanica* 67: 194-200.

QUILHOT, W., RUBIO, C., & FERNÁNDEZ, E. (2007). Lichens Products. En K. Ramawat, & J. Merillon, *Biotechnology: secondary metabolites plants and microbes* págs. 391-415. Plymouth: Science Publisher.

WILKINS A., BREMER J., RALPH J., HOLLAND P., RONALDSON K., JAGER P. BIRD P. (1989). *A one and two dimensional ¹³C and ¹H N.M.R. study of some triterpenes of hopane, stictane and flavicene groups*. *Aust. J. Chem.* 42, pages 243-257.

9. ANEXOS.



Current Data Parameters
NAME M. Cuellar
EXPNO 33
PROCNO 1

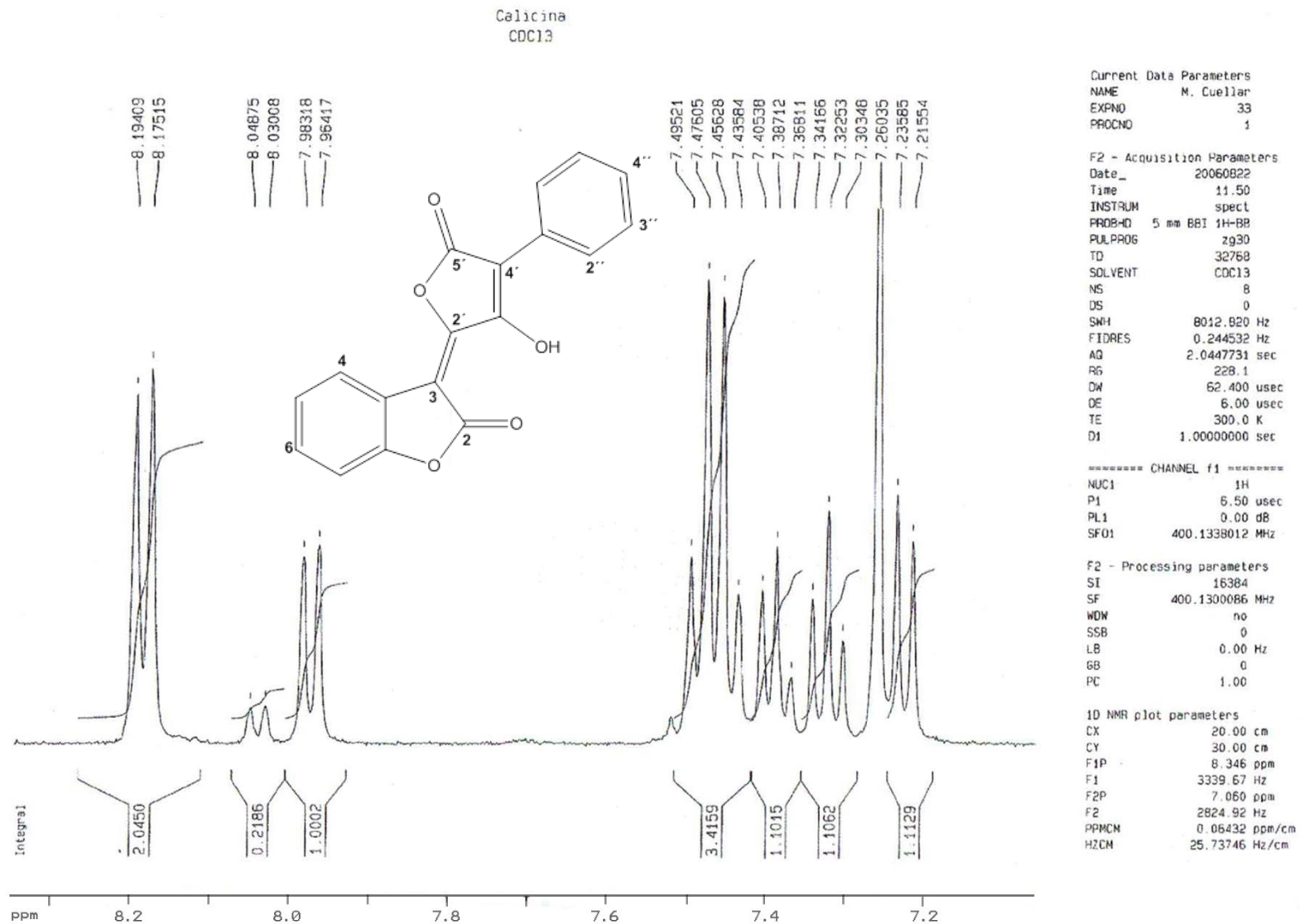
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20060822
Time 11.50
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDCl₃
NS 8
DS 0
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 2.0447731 sec
RG 228.1
DW 62.400 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec

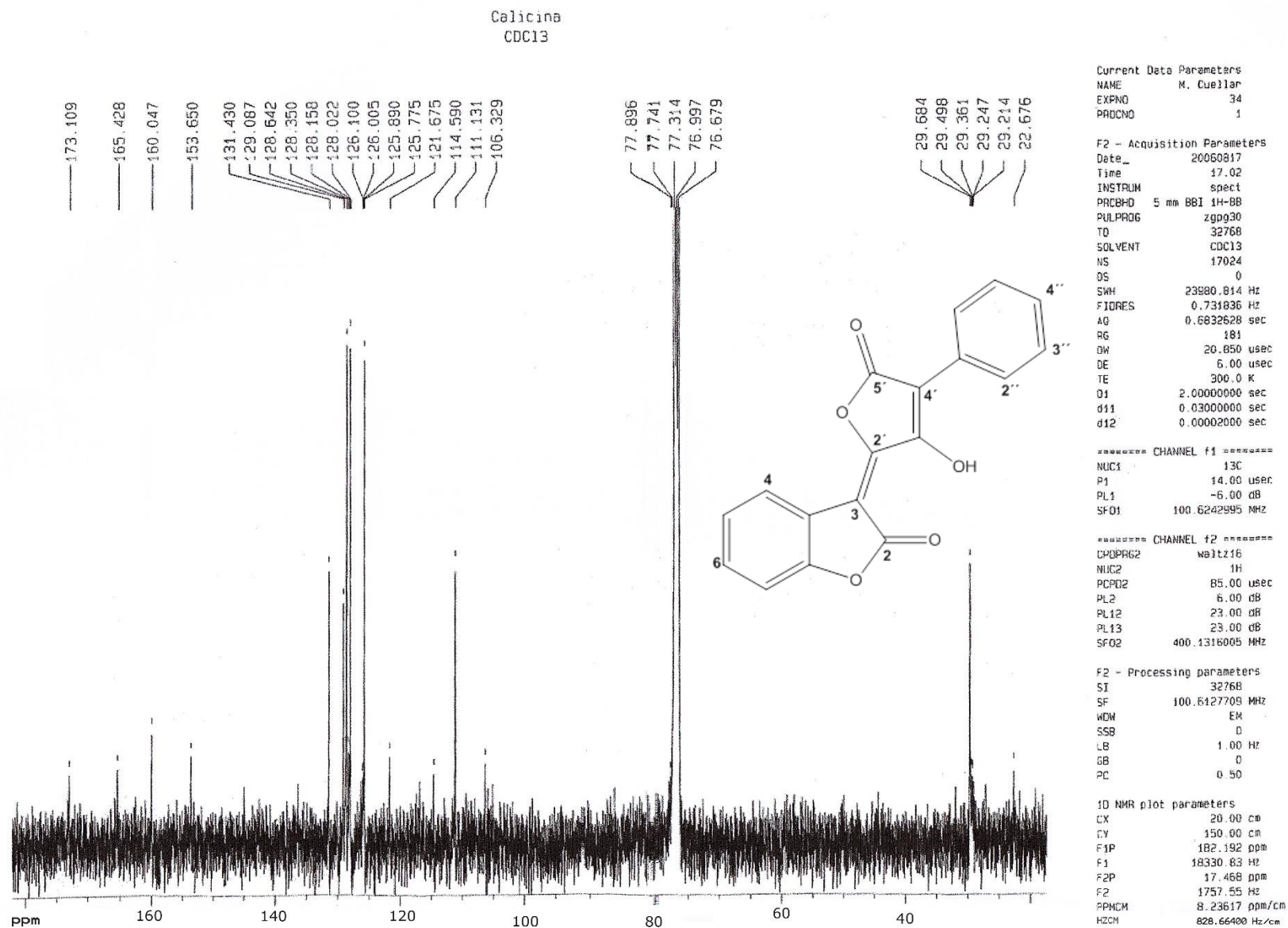
***** CHANNEL f1 *****
NUC1 1H
P1 6.50 usec
PL1 0.00 dB
SF01 400.1338012 MHz

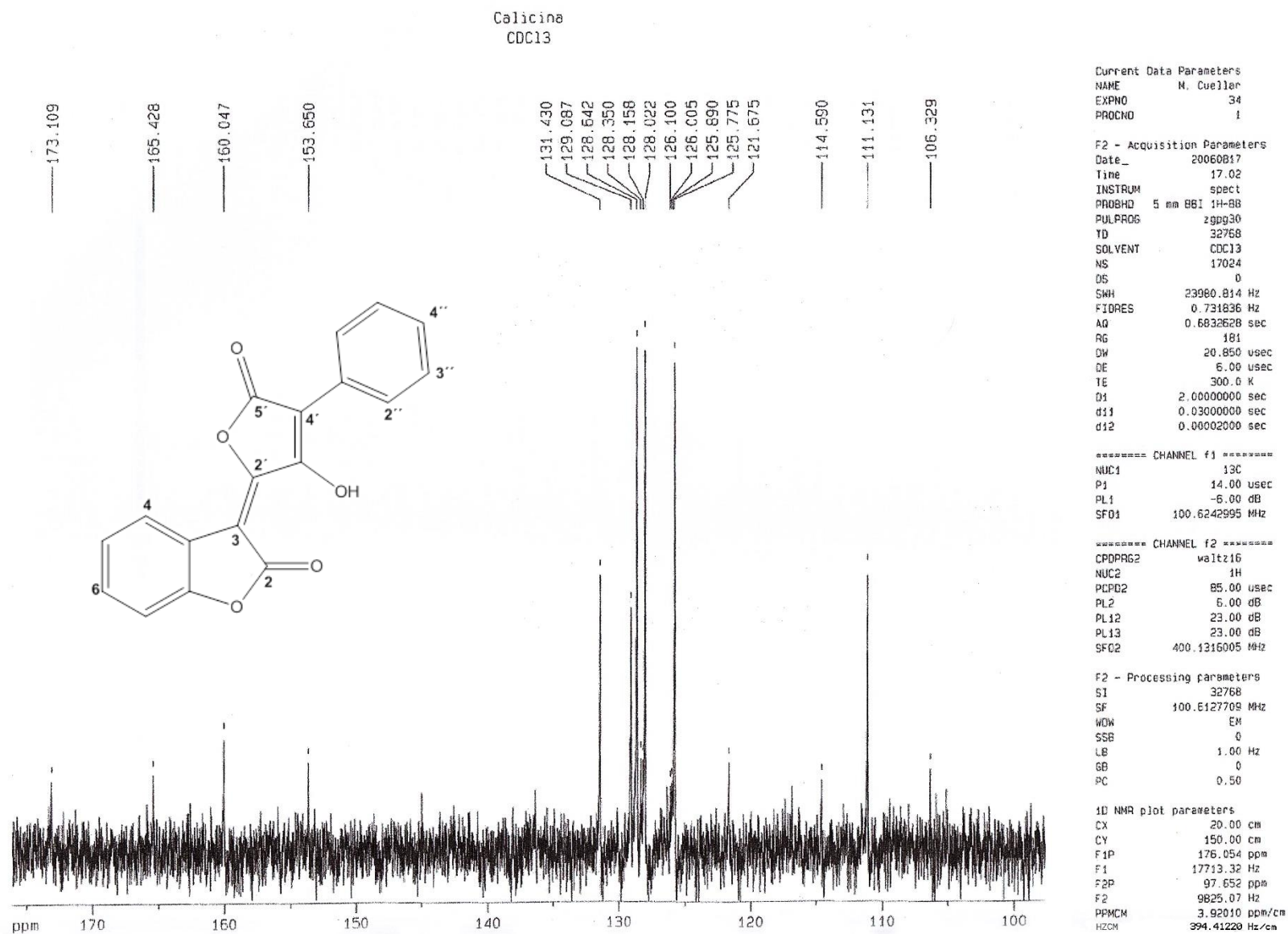
F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 400.1300086 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 20.00 cm
CY 15.12 cm
F1P 13.017 ppm
F1 5200.32 Hz
F2P -0.390 ppm
F2 -156.03 Hz
PPMCH 0.67033 ppm/cm
HZCM 268.21759 Hz/cm

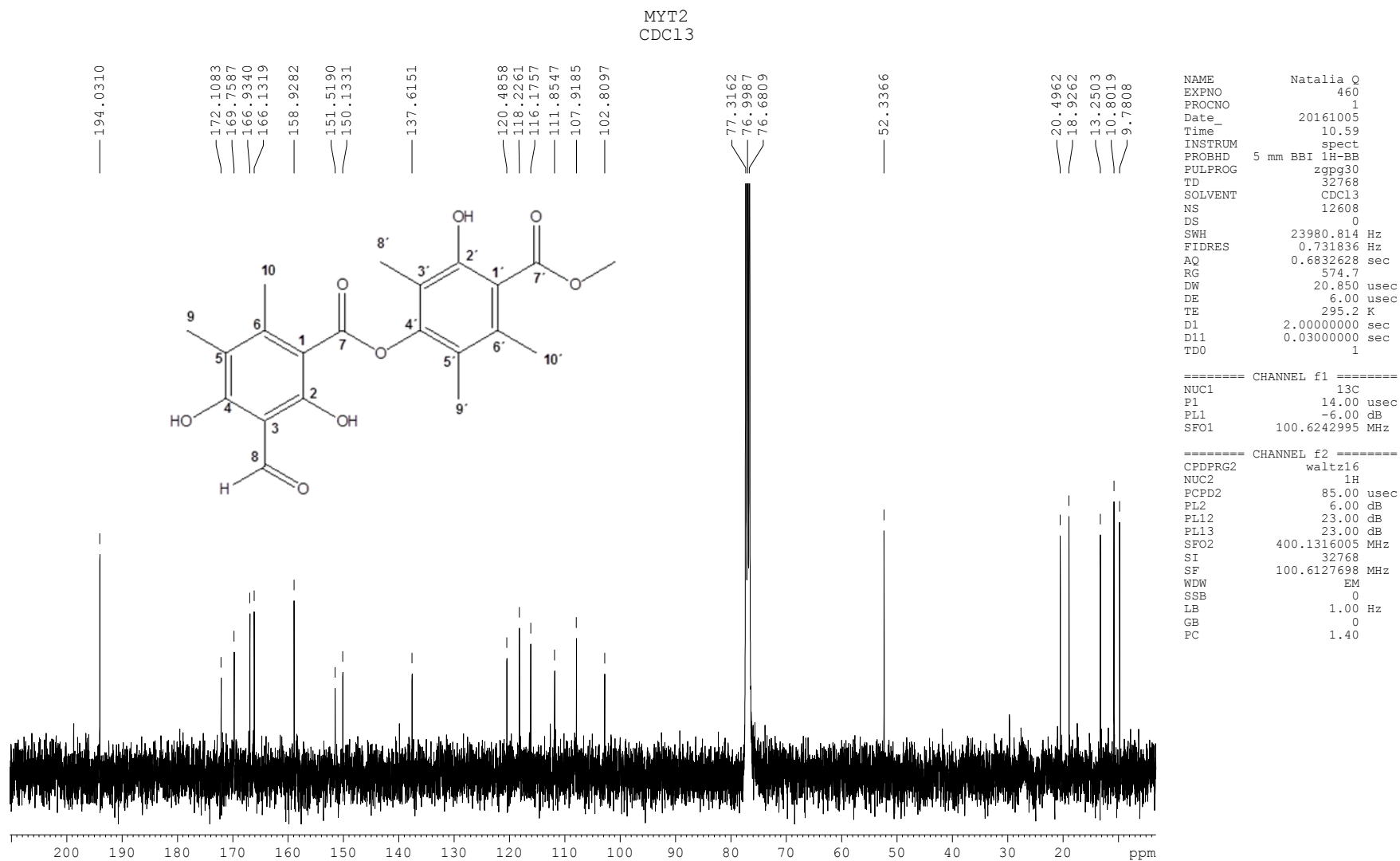
¹H- RMN de Calicina (GG01)

Ampliación ¹H- RMN de Calicina (GG01)

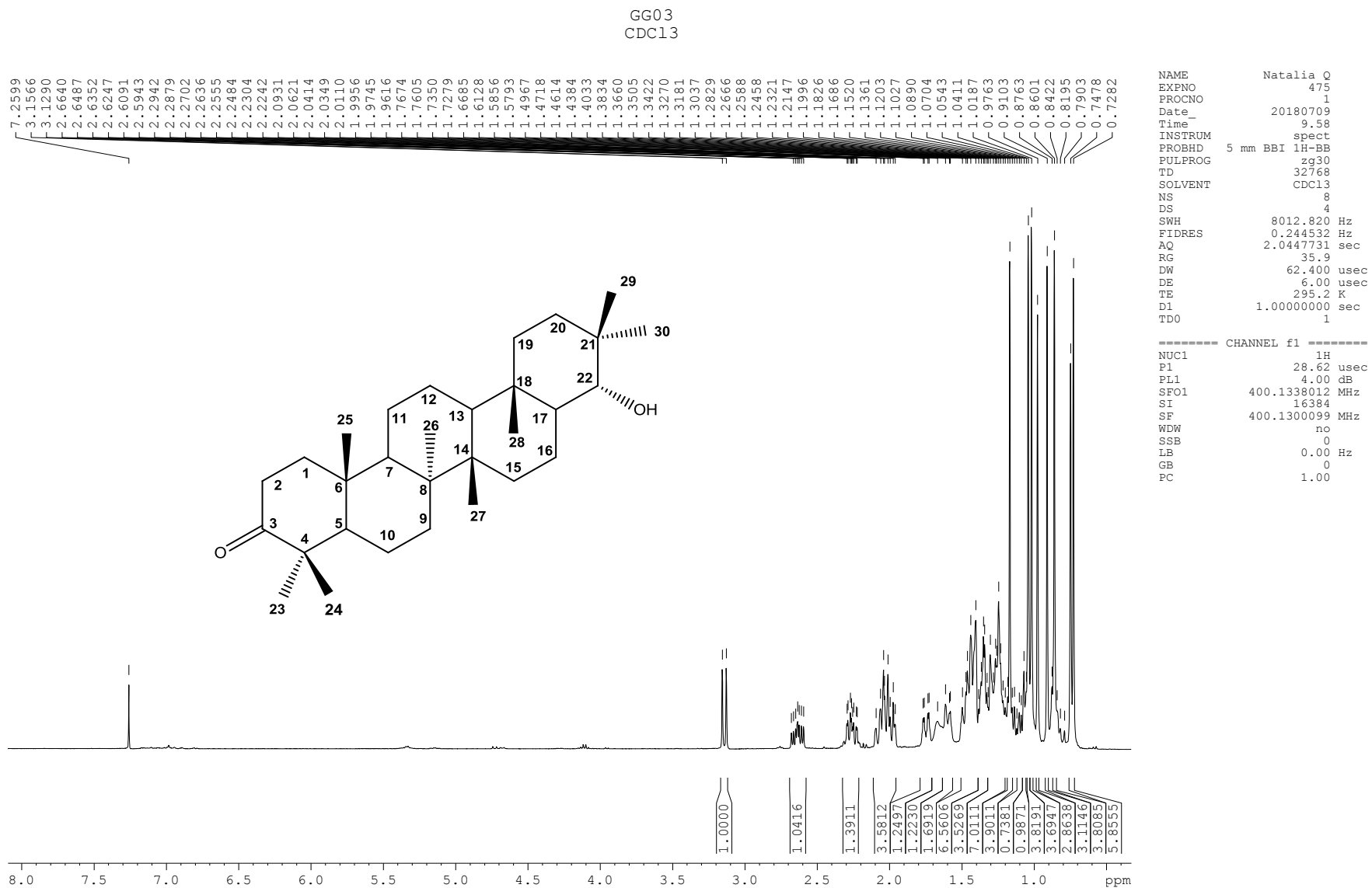
¹³C-RMN de Calicina (GG01)

Ampliación ¹³C-RMN de Calicina (GG01)

**¹H- RMN de Pseudocyphellarina A (GG02)**

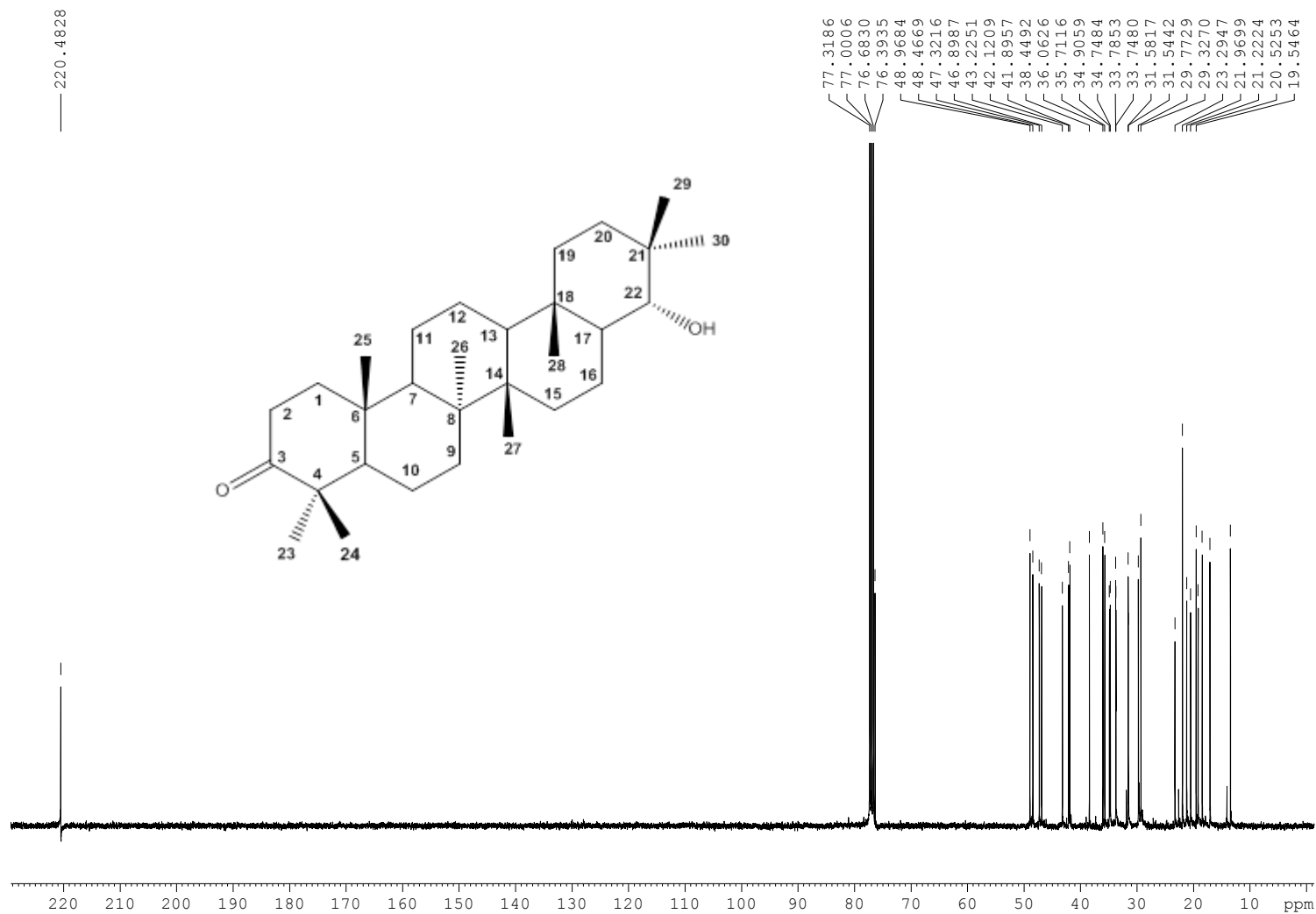


¹³C-RMN de Pseudocyphellarina A (GG02)

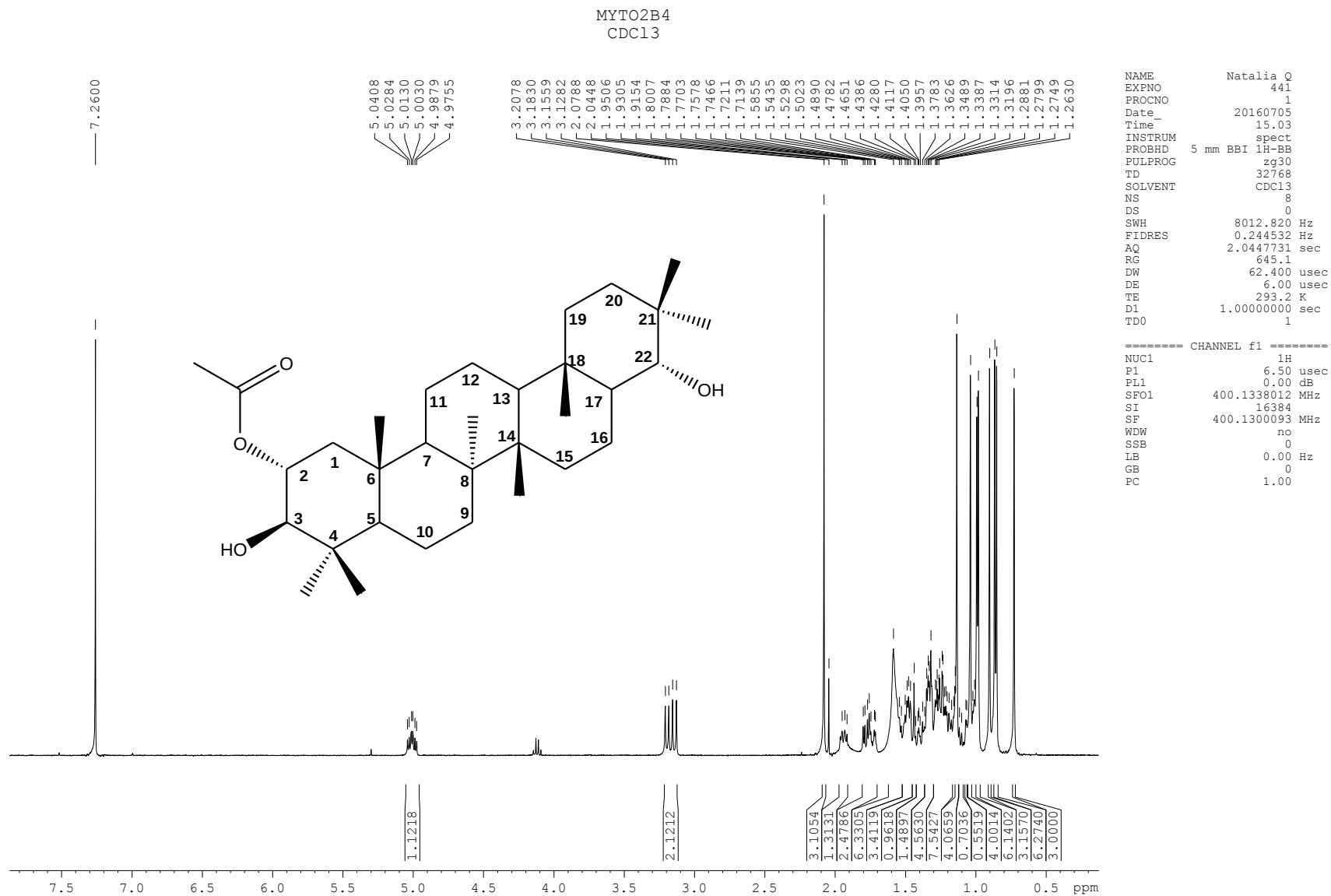


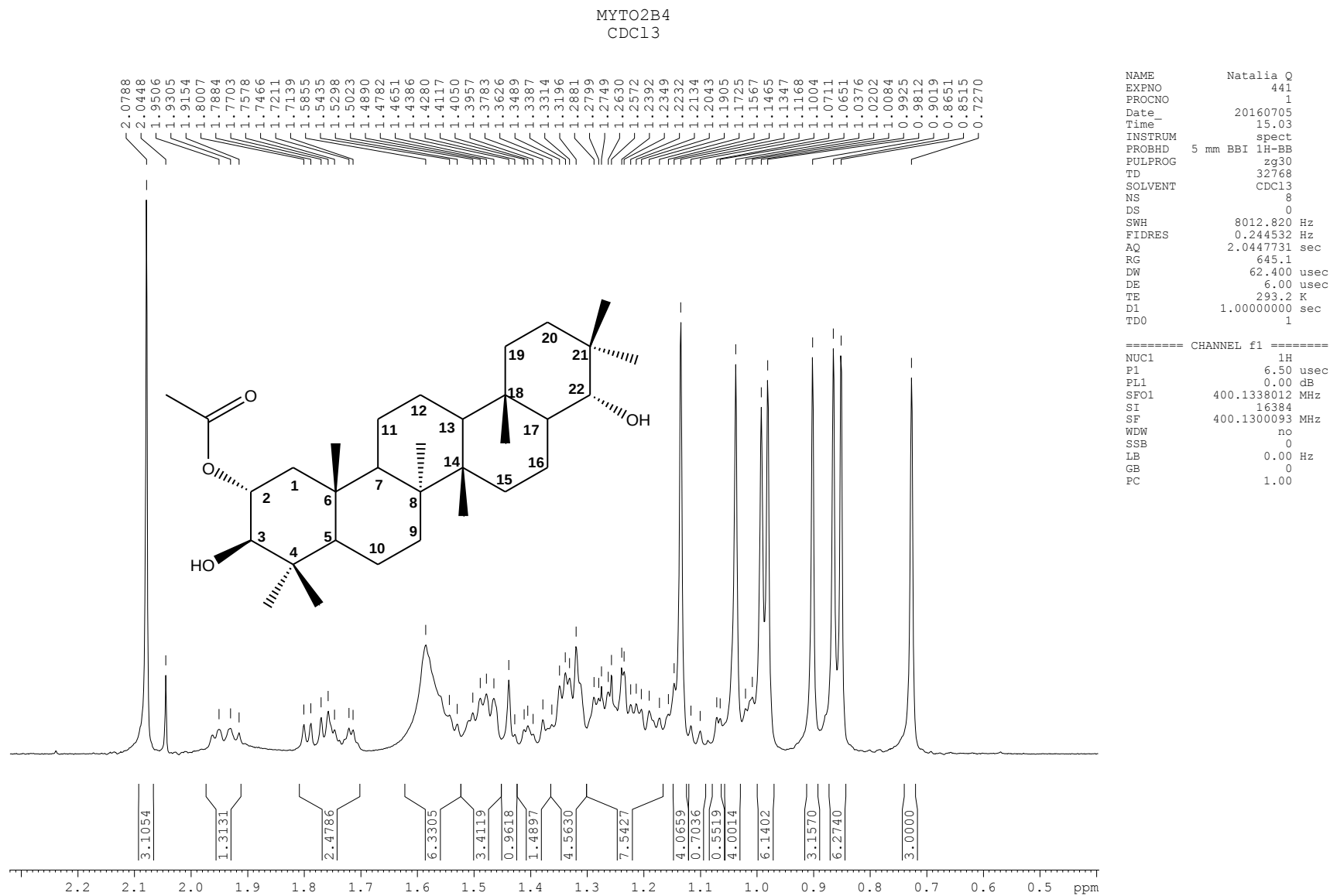
¹H- RMN de 22 α -hidroxiestictan-3-ona (GG03)

GG03
CDC13



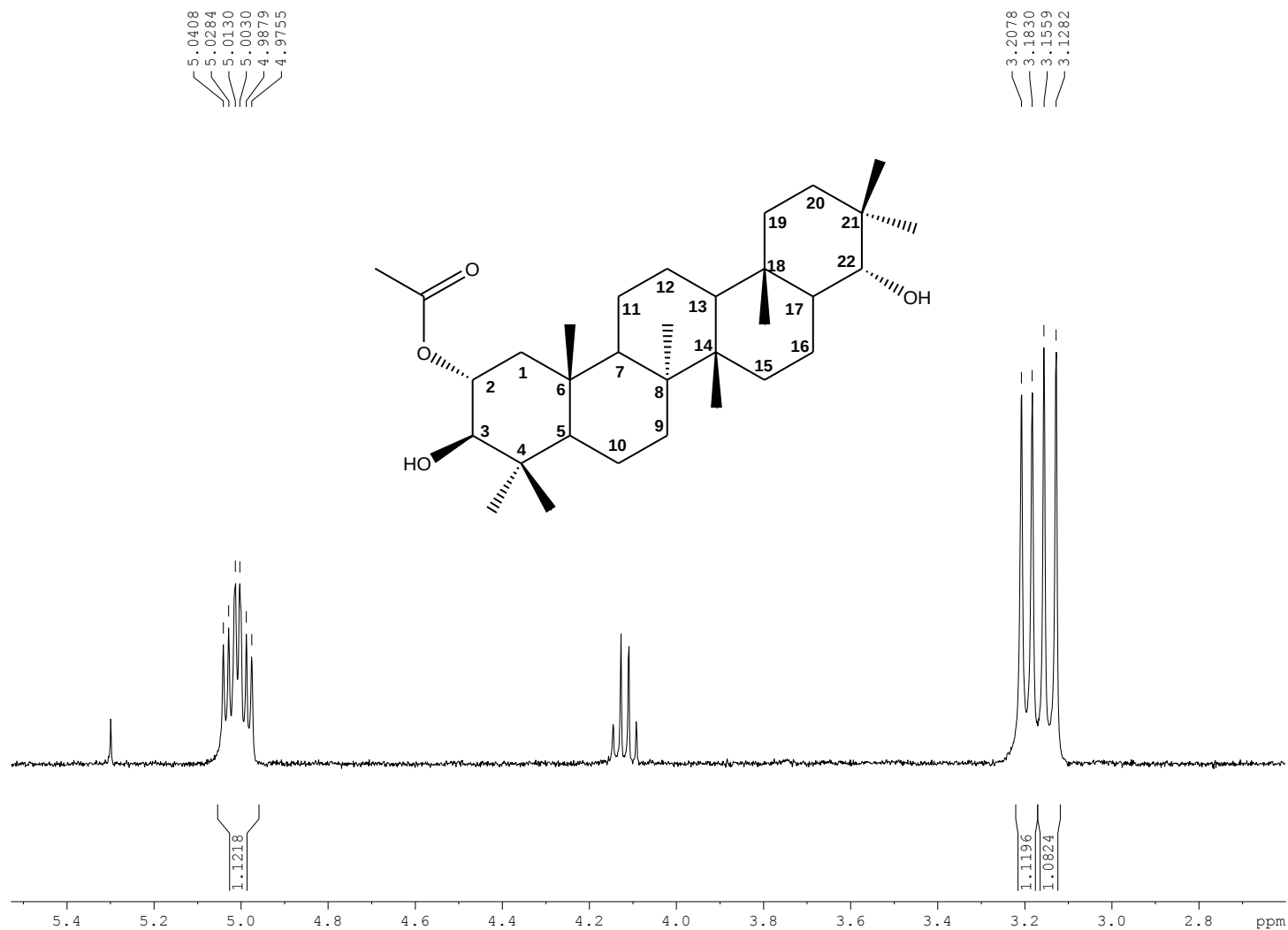
¹³C-RMN de 22 α -hidroxiestictan-3-ona (GG03)

¹H- RMN de 2 α -acetoxiestictan-3 β -22 α -diol (GG05)



Ampliación ^1H - RMN de 2 α -acetoxiestictan-3 β -22 α -diol (GG05)

MYT02B4
CDC13



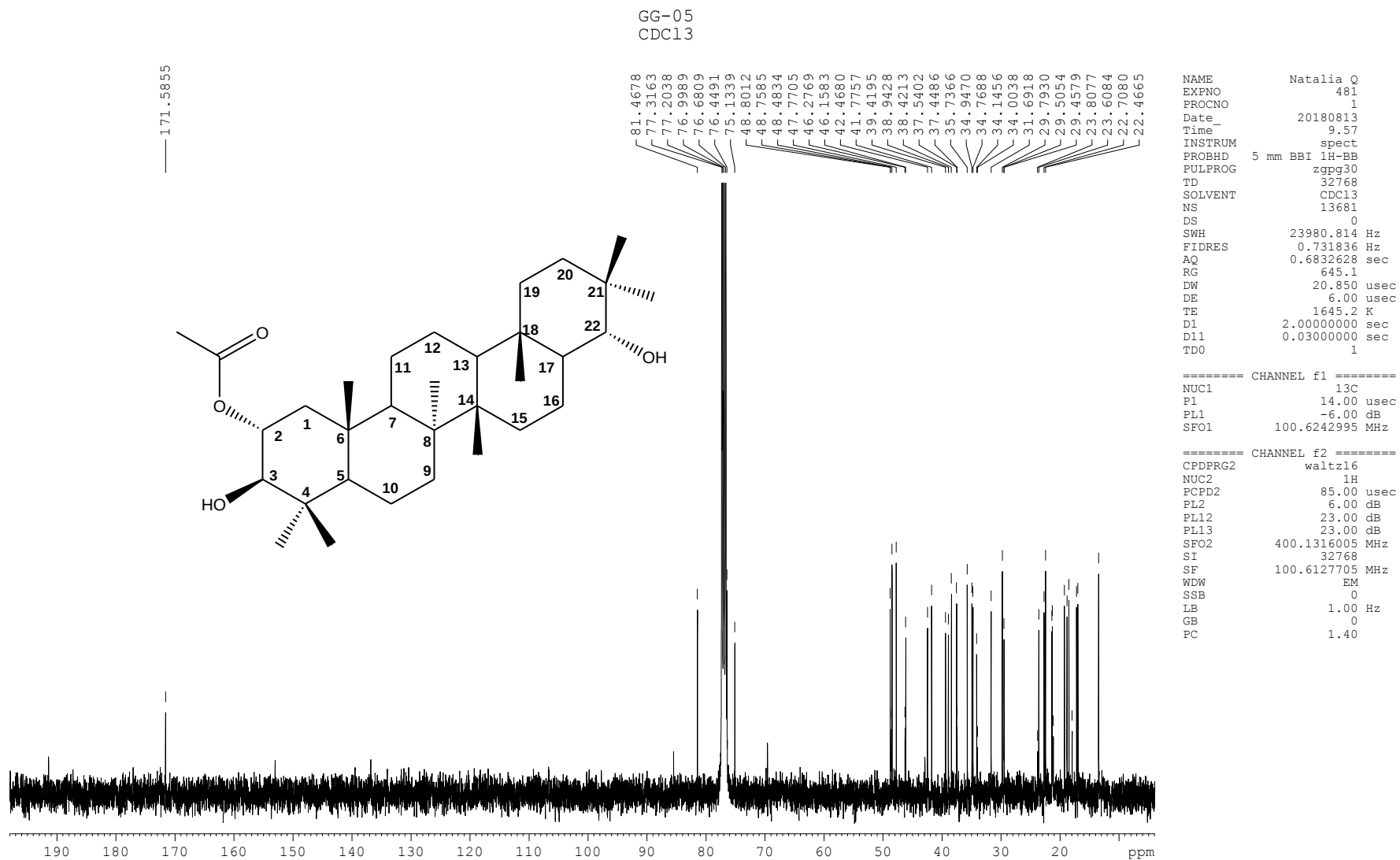
```

NAME      Natalia Q
EXPNO     441
PROCNO    1
Date_     20160705
Time      15.03
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBI 1H-BB
PULPROG   zg30
TD         32768
SOLVENT   CDC13
NS         8
DS         0
SWH        8012.820 Hz
FIDRES     0.244532 Hz
AQ         2.0447731 sec
RG         645.1
DW         62.400 usec
DE         6.00 usec
TE         293.2 K
D1         1.00000000 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         6.50 usec
PL1        0.00 dB
SFO1       400.1338012 MHz
SI         16384
SF         400.1300093 MHz
WDW        no
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

```

Ampliación ^1H - RMN de 2α-acetoxiestictan-3β-22α-diol (GG05)

¹³C-RMN de 2α-acetoxiestictan-3β-22α-diol (GG05)