Nuevos aportes en la investigación de metabolitos liquénicos*

WANDA QUILHOT P. (**), ERNESTO FERNANDEZ B., MARIA E. HIDALGO L., WENCESLAO PEÑA S. y EVA FLORES H.

Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

Resumen: Metabolitos fenólicos aislados de líquenes presentan características comunes a filtros solares: presencia de una unidad cromófora ortohidroxicarbonílica, alta absortividad de la radiación ultravioleta y estabilidad química y fotoquímica. Se discuten las funciones probables de estos compuestos en mecanismos adaptativos que se relacionan con la sobrevivencia de las especies liquénicas.

New contributions to lichen metabolites research

Summary: Phenolic compounds isolated from lichens have common characteristics with solar filters: the chromophor unit orthohydroxy-carbonile, high absorption of ultraviolet radiation, chemical and photochemical stability. The possible adaptative value of these compounds related to the survival of lichen species, is discussed.

Introducción

Los sistemas simbióticos necesitan mantener un delicado balance entre explotación y destrucción para tener éxito y permitir la coexistencia de los organismos que los integran. La morfología se mantiene por el equilibrio entre las tasas de crecimiento de los dos constituyentes; si uno de los integrantes del

PALABRAS CLAVES: Líquenes, productos secundarios, filtros solares, fluoróforos, radiación ultravioleta.
KEY WORDS: Lichens, secondary products, solar filters, phluorophors, ultraviolet radiation.

(*) Proyecto FONDECYT 92/926; Proyecto DICYT 12/91; Proyecto INACH Nº 110.
(**) Dirigir correspondencia a: Wanda Quilhot. Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso; Casilla 92-V, Valparaíso, Chile.

sistema crece aceleradamente o, por el contrario, si el crecimiento de uno de ellos está inhibido, se produciría la desintegración del sistema. La sobrevivencia depende de los dos simbiontes y no de respuestas individuales en condiciones locales (1). Es el caso de los líquenes, organismos formados por un hongo (Ascomycetes o Basidiomycetes), y algas unicelulares verdes o cianobacterias que funcionan como cloroplastos.

La interacción más importante entre los simbiontes, cuando se inicia la formación de un liquen, es la transferencia de carbohidratos desde el fotobionte al micobionte, prerrequisito para que la liquenización tenga éxito. El hongo es incapaz de obtener carbohidratos desde otras fuentes,en el hábitat del liquen. La glucosa producida por el fotobionte es transformada principalmente en manitol. El manitol ha sido aislado de la médula del talo donde no existen células del fotobionte (2).

Los líquenes no precisan de otros organismos ni del sustrato sobre el que se fijan para desarrollar su historia de vida porque las necesidades nutricias son satisfechas vía fotosíntesis realizada por el fotobionte. En consecuencia, el talo liquénico es considerado como un ecosistema (3) por la particularidad de participar de dos niveles tróficos: un productor primario (fotobionte) y un consumidor primario (micobionte), además de poseer ciertas características de comunidades maduras como son la estabilidad en el tiempo o longevidad y el crecimiento lento que se expresa en una baja productividad neta.

Cuando se habla de líquenes surge la comparación con otras plantas. Las características diferenciales más notables se relacionan con el origen, la reproducción y la síntesis de productos secundarios. Con respecto al origen, dos individuos diferentes se asocian para constituir una nueva unidad biológica con características propias en lo morfológico, fisiológico, químico y bioquímico. Este organismo simbiótico puede ser resintetizado a partir de cultivos puros de células del fotobionte y de esporas extraídas de un mismo talo (4). Los experimentos de resíntesis han permitido conocer nuevos mecanismos de interacción entre los simbiontes y diversos aspectos de la fisiología del talo (5).

La reproducción de un liquen es exclusivamente vegetativa y se realiza mediante órganos de dispersión, como isidios o soredios, o por trozos de talo que son diseminados por el viento, el agua o animales (6).

En cuanto a la síntesis a partir de la ruta del acetato-malonato, los líquenes producen metabolitos fenólicos que responden a cinco estructuras básicas: dépsidos, depsidonas, éteres diarílicos, dibenzofuranos y ácidos úsnicos (7,8). Estos compuestos son sintetizados desde ácidos fenólicos precursores que también se encuentran en hongos de vida libre donde normalmente están decarboxilados (9). De pocos grupos de plantas se conoce tanto sobre su química

como de los líquenes. Se conocen la estructura, las rutas biogenéticas, la distribución en las especies y su rendimiento para un número considerable de metabolitos (8,10). Raramente se encuentran estos compuestos en hongos (11 a 13) o algas (14) de vida libre; son escasos los que han sido detectados en micobiontes aislados en cultivos puros (9); compuestos idénticos son producidos por especies con relaciones de parentesco lejanas (10).

Estos hechos han permitido concluir que son producto del estado simbiótico, aun cuando existen algunos géneros liquénicos que no los sintetizan o, quizás, no han sido detectados. De *Cora pavonia*, por ejemplo, un basidioliquen que se describía como carente de estos compuestos, recientemente se han aislado ácido úsnico y atranorina (Piovano, resultados no publicados).

Los líquenes sintetizan también otros metabolitos derivados de la ruta del acetato-malonato (xantonas, cromonas y antraquinonas), triterpenos y esteroles derivados de la ruta del ácido mevalónico y derivados del ácido shiquímico, entre otros productos, cuyas estructuras básicas son comunes a hongos de vida libre y otros vegetales (8,10).

Se ha relacionado el éxito ecológico de los líquenes con la síntesis y acumulación de productos secundarios. Si se considera que estos compuestos no tienen un valor adaptativo el costo energético relativamente alto de su síntesis podría conducir a su desaparición; la diversidad y las tasas de acumulación, a veces elevadas, llevan a pensar que la elaboración de estos compuestos representa la solución para un conjunto de problemos biológicos únicos de los líquenes (15).

Se han propuesto numerosos roles biológicos para estos productos (15,16); algunos son muy especulativos porque falta experimentación de terreno y de laboratorio para confirmarlos. Una de las mayores dificultades deriva de la imposibilidad de mantener talos enteros en condiciones de cultivo el tiempo suficiente para realizar experimentos controlados.

Observaciones en el terreno sobre los diferentes hábitats de los líquenes, el conocimiento de la estructura de los metabolitos y su distribución en las especies logrados a través de estudios químicos-sistemáticos de numerosos líquenes de nuestro territorio (17 a 27), y las hipótesis que se han formulado sobre los posibles roles en la relación liquen-ambiente, fueron incentivos para investigar el potencial adaptativo de estos compuestos en los organismos que los producen.

Metabolitos fenólicos e interacción con la luz

Cuando se observa la estructura de un talo se aprecian ciertas características al parecer desventajosas para las especies. Las células del fotobionte están aisladas del medio externo por la corteza talina; la cantidad de clorofila es muy inferior a la que existe en una hoja por unidad de superficie, entre 0,10 % y 0,25 %; el fotobionte, que ha sufrido modificaciones al pasar del estado libre al estado simbiótico, es muy sensible a la radiación, en particular a la radiación ultravioleta (UV) (28). Sin embargo, estos organismos son una de las alianzas más estables en la naturaleza.

Como otras plantas, los líquenes precisan de un rango tolerable de intensidad luminosa. Si la radiación se incrementa por sobre el nivel que satura la tasa fotosintética, puede ocurrir la destrucción del complejo proteína-pigmento al recibir una energía que excede a la que puede ser disipada por procesos fotoquímicos. Por la ubicación y las características de las células del fotobionte, los líquenes deben haber desarrollado estrategias adaptativas que resultan en la captura eficiente de la energía radiante y en la prevención de la fotooxidación bajo una radiación fuerte; en situaciones de baja radiación algún mecanismo endógeno debe asegurar el mantenimiento de la autotrofía.

Una primera hipótesis de trabajo se refiere a que metabolitos acumulados en la corteza del talo actúan como filtros de la radiación que alcanza al fotobionte. Compuestos coloreados depositados en la corteza aumentan su opacidad; alrededor del 50 % de la luz incidente puede ser absorbida o disipada por una corteza saturada. Estos compuestos protegerían al fotobionte de la radiación UV porque muestran una fuerte absorción en esa región del espectro solar. Lawrey (15) y Rundel (16) han resumido las ideas y trabajos experimentales y de terreno que permitieron formular esta proposición.

La intensidad luminosa parece influir la producción de ácido úsnico, el metabolito de mayor ocurrencia en líquenes, cuya concentración aumenta en individuos de una misma población de *Cladonia subtenuis* que crecen en gradientes de luz, y que alcanzan los valores más elevados en aquellos que soportan la mayor irradiación solar (29).

Otro antecedente importante es que las tasas de acumulación de ácido úsnico son mayores en los tejidos jóvenes (en líquenes de diferentes zonas climáticas) donde también el metabolismo es más activo (30 a 32). Estos resultados sugieren que la sintesis de ácido úsnico influye la productividad fotosintética del fotobionte.

En nuestro laboratorio se han realizado estudios de solubilidad y de las conductas fotofísica y fotoquímica de metabolitos fenólicos (Fig. 1) que tienen la

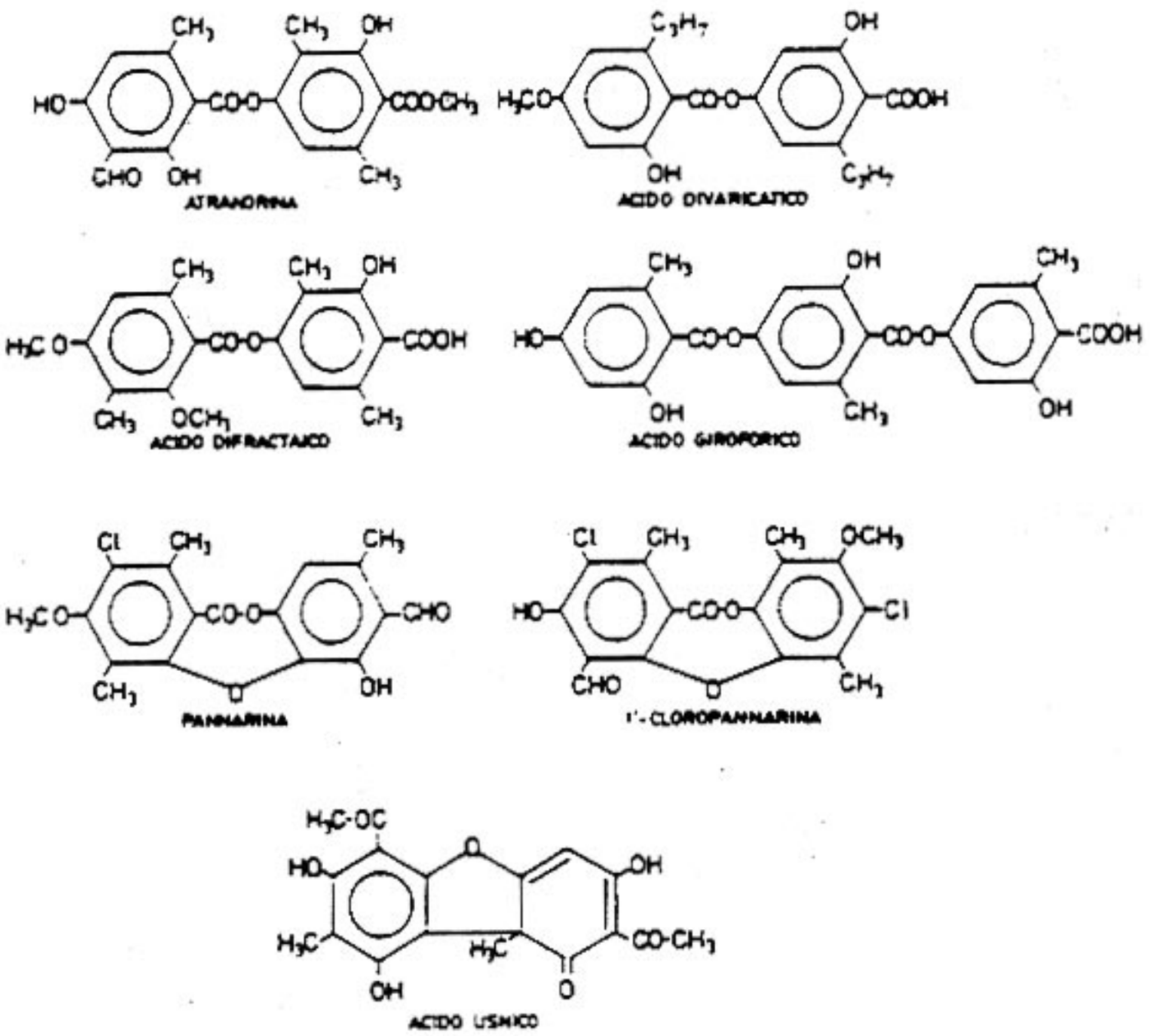

FIGURA 1:
Estructura de los fenoles liquénicos

unidad cromófora formada por un carbonilo (C=O) unido a un anillo aromático y uno o dos grupos ortohidroxilo (-OH) (33,34,35) que caracteriza a los filtros solares (36). El grupo C=O puede provenir de un éster, como en los ácidos divaricático, difractaico y girofórico; de un aldehido, como en la atranorina, la pannarina y la 1'-cloropannarina; o de una cetona como en el ácido úsnico.

En solventes orgánicos - etanol, cloroformo y acetonitrilo - en soluciones micelares y en estado sólido, los compuestos absorben en el UV-A, en el UV-B y en UV-C con emisiones en el visible, con excepción del ácido úsnico que no emite fluorescencia. En la Tabla 1 se muestran los máximos de absorción y de emisión de los compuestos en estado sólido y disueltos en etanol.

Además de la similitud estructural, otras propiedades son comunes a los filtros solares y a los fenoles liquénicos: cortos tiempos de vida de los estados excitados, entre 2,1 y 3,2 nseg., lo que es consistente con un estado triplete corto excitado (37); bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia, del orden de 10^{-3}; rendimientos cuánticos de consumo cercanos a cero, que ponen en evidencia la estabilidad fotoquímica de los compuestos; baja solubilidad en agua, entre 0,002 a 0,21 µM a pH ácido y entre 14,00 y 19,00 µM a pH básico.

TABLA 1

Máximos de absorción y de emisión de los fenoles liquénicos

Compuestos		Absorción (nm) UVC	UVB	UVA	Emisión (nm) visible
Dépsidos					
Atranorina	E	266		340	452
	S			340	475
Ac. divaricático	E	270	307		430
	S			330	430
Ac. difractaico	E		305		630
Ac. girofórico	E		295		430
Depsidonas					
Pannarina	E	265	303	370	485
	S			340	475
1'-Cloropannarina	E	265	310	364	480
	S			360	475
Ac. úsnico	E		285		

E = EtOH; S = estado sólido

Los datos experimentales evidencian las propiedades filtrantes de los fluoróforos liquénicos; estas propiedades favorecen el mantenimiento de la integridad del talo y, por ende, de los pigmentos fotosintéticos. Los valores de absorción de los compuestos en estado sólido cobran importancia porque en ese estado se acumulan en la superficie externa de las hifas de la corteza y de la médula.

La segunda hipótesis de trabajo fue formulada por Rao y Le Blanc (38). Los autores informaron que la atranorina disuelta en tolueno emite fluorescencia a 425 nm; no se indican los rendimientos cuánticos de fluorescencia. La coincidencia entre el espectro de emisión de la atranorina y el espectro de absorción de las clorofilas les llevó a proponer para este dépsido una función como pigmento accesorio de la fotosíntesis.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los fenoles estudiados son del orden de 10^{-3}, al parecer muy bajos para ser eficientes. Esta aparente ineficiencia sería compensada por las tasas de acumulación que en numerosas especies supera el 2% del peso seco (10,31). En líquenes antárticos las concentraciones son bajas, en general menores que 1% (39 a 41); pero teniendo en consideración la estabilidad química y fotoquímica de los compuestos, la energía disponible vía fluoróforo pareciera no ser despreciable.

Cuando se analizan los metabolitos presentes en especies de diferentes zonas geográficas y climáticas llama la atención la frecuencia de fluoróforos que filtran la radiación UV absorbiéndola, y de otros fluoróforos que emiten la radiación absorbida en zonas espectrales en que absorben las clorofilas. En miembros del género *Protousnea*, por ejemplo, *P. malacea* acumula ácido úsnico y ácido divaricático (20) que fluorece a 430 nm; en *P. magellanica* el ácido devaricático ha sido reemplazado por el ácido difractaico (22) que emite fluorescencia a 630 nm.

En líquenes antárticos, el ácido úsnico y la atranorina coexisten en numerosas especies (26,40,41). *Stereocaulon alpinum* acumula atranorina, ácido lobárico y ácido úsnico en muy baja concentración (41); el ácido lobárico, que absorbe a 262 nm y 294 nm sin emisión fluorescente, cumpliría con la función filtrante del ácido úsnico. *Sphaerophorus globosus* acumula ácido úsnico y esfaeroforina (41); este compuesto presenta la unidad cromófora C=O-orto-hidroxilo, por lo que podría esperarse que actúe como atranorina u otro fluoróforo estructuralmente relacionado.

En otras especies, como *Umbilicaria rufidula*, existe una clara adaptación morfo-funcional que facilita la captura de una mayor cantidad de energía radiante disponible en su hábitat.

U. rufidula es una especie de hábito folioso que se une al sustrato mediante un ombligo central; la corteza inferior está poblada de abundantes ricines, órganos considerados históricamente como de fijación al sustrato y que en esta especie no cumplen tal función.

Los talos jóvenes tienen forma aplanada; los adultos tienen forma de copa o de roseta. La especie acumula ácido úsnico y atranorina en la corteza y en los ricines, y ácido girifórico en la médula (32). A causa de la forma del talo la superficie más expuesta a la radiación es la corteza inferior; allí los ricines aumentan extraordinariamente la superficie de absorción de la luz. La presencia de fluoróforos, tanto en la corteza superior como en la inferior y en la médula, parece ser un mecanismo adaptativo que se relaciona con la productividad fotosintética de esta especie que se desarrolla en ambientes con climas rigurosos.

Desde un punto de vista teórico el sistema aparece como muy eficiente. Pero aún no ha sido posible demostrar la transferencia de energía desde los fluoróforos a la clorofila.

La tercera hipótesis fue formulada por Vicente y colaboradores (42). Los autores observaron un descenso en el contenido en ácido úsnico en talos de *Evernia prunatri* mantenidos en estado de sequedad o en agua destilada y en oscuridad; concluyeron que el ácido úsnico puede ser una sustancia de reserva posible de ser movilizada en condiciones críticas de déficit de nutrientes. Más tarde se aisló una dehidrogenasa que cataliza el ácido úsnico (43).

Esta proposición tiene especial significado en líquenes de climas rigurosos como en la Antártida, en que la luminosidad está severamente restringida por los niveles de nubosidad imperante en ese territorio, la longitud de los días y la cubierta de nieve y hielo que es permanente sobre los líquenes durante la mayor parte del año.

Si la luz no llega a la superficie del talo la autotrofía no podría expresarse y los líquenes morirían de inanición. Se ha calculado que la radiación que atraviesa una capa de nieve de 30 a 40 cm de espesor es de 20 - 30 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, suficiente para una fotosíntesis neta positiva (44); si el espesor de la cubierta aumenta los metabolitos fenólicos serían el sustrato utilizado para mantener la actividad metabólica.

Un estudio sobre la variación temporal del ácido úsnico en talos individuales de una población de *Usnea aurantiaco-atra*, recolectados mensualmente durante tres años, reveló que los niveles de acumulación del metabolito decrecen significativamente entre junio y diciembre de cada año (45). El descenso en el contenido en ácido úsnico, en los meses en que la cubierta de nieve y hielo impide el paso de la luz a los talos demostraría que el metabolito es degradado para suplir déficits energéticos. Si el ácido úsnico no es catabolizado las concentraciones deberían permanecer más o menos constantes a lo largo del año en individuos de una misma población. Sobre la base del análisis de las temperaturas medias y de las horas sol mensuales en el mismo período la disponibilidad de luz parece ser el factor más importante en la degradacion del ácido úsnico.

Conclusiones

Los resultados experimentales que se han presentado muestran que productos secundarios fenólicos sintetizados por liquenes estarían involucrados en mecanismos adaptativos que se relacionan con el incremento de la productividad y la sobrevivencia de las especies.

Frente al aumento de la radiación UV, a causa de los hoyos generados en la capa de ozono, los líquenes estarían protegidos por estos metabolitos que filtran selectivamente la radiación además de existir la posibilidad de utilizar la energía emitida como fluorescencia en trabajo fotosintético.

Como una consecuencia natural del conocimiento sobre la interacción de los fenoles liquénicos con la luz se está evaluando la capacidad fotoprotectora de los metabolitos fenólicos frente a la radiación UV-A y UV-B en modelos biológicos con miras a una posible aplicación de estos productos en formulaciones cosméticas.

Bibliografía

1. Remmer, S.B., Ahmadjian, V. y Livdahl, T.P. (1986). **Lichen Physiol. and Biochem.** 1: 1-25.
2. Richardson, D.H.S. (1985). In: **Lichen Physiology and Cell Biology** (C. Vicente, D.H.Brown y M.E. Legaz, ed.) Universidad Complutense de Madrid: 25-126.
3. Farrar, J.A. (1976). In: **Lichenology; Progress and Problems** (D.H. Brown, D.L. Hawksworth y R.H. Bailey, ed.); Academic Press, NY and London: 385-406.
4. Ahmadjian, V., Jacobs, J.B. y Russell, L.A. (1978). **Science** 200: 1062-1064.
5. Ahmadjian, V. y Jacobs, J.B. (1981). **Nature** 289: 169-172.
6. Jahns, H.M. (1973). In: **The Lichens** (Ahmadjian y M.E. Hale, ed), Academic Press NY: 147-182.
7. Vicente, C. (1975). **Fisiología de las Sustancias Liquénicas.** Alhambra S.A: 1-158.
8. Elix, J.A., Sargent, M.V. y Whitton, A.A. (1984). In: **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, Springer Verlag: 103-124.
9. Culberson, Ch.F. y Ahmadjian, V. (1980).**Mycologia** 72: 90-109.
10. Culberson, Ch.F., Culberson, W.L. y Johnson, A. (1976). **Second Supplement to Chemical and Botanical Guide to Lichen Products**. Am. Bryol. Lichenol. Soc., Missouri Bot. Gardens, St. Louis: 1-400.
11. Umezawa, H., Shibamoto, N., Naganawa, H., Ayukawa, S., Matzusaki, M., Takeuchi, T., Kono, K. y Sakamoto, T. (1976). **J. Antibiot**. 27: 587-596.
12. Yamamoto, Y., Nishimura, K. y Kiriyama, N. (1976). **Chem. Pharm. Bull.** 24: 1853-1859.

13. Xavier Filho, L., Paulo, M.Q., Pereira, E.C. y Vicente, C. (1985). **Phyton** 45: 187-190.

14. Legaz, M.E., Vicente,C. y Xavier Filho, L. (1985) **Cryptogamie: Algologie** 6: 265-272.

15. Lawrey, J.D. (1986). **Bryologist** 89: 111-122.

16. Rundel, P.W. (1978). **Biol. System. Ecol.** 6: 157-170.

17. Huneck, S., Redon, J. y Quilhot, W. (1973). **J. Hattori Bot. Lab.** 37: 539-562.

18. Quilhot, W., Garbarino, J.A. y Gambaro, V. (1983). **J. Nat. Prod.** 46: 594-595.

19. Quilhot, W., Didyk, B., Gambaro, V. y Garbarino, J.A. (1983).**J. Nat. Prod.** 46: 942-943.

20. Chamy, M:C., Gambaro, V., Garbarino, J.A. y Quilhot, W. (1985). **J. Nat. Prod.** 48: 307-309.

21. Fiedler, P., Gambaro, V., Garbarino, J.A. y Quilhot, W. (1986).**Phytochemistry** 25: 461-465.

22. Garbarino, J.A., Chamy, M.C., Gambaro, V., Quilhot, W., Naranjo, O. y Bolt, E. (1987). **J. Nat. Prod.** 50: 745-747.

23. Quilhot, W., Piovano, M., Arancibia, H., Garbarino, J.A. y Gambaro, V. (1989). **J. Nat. Prod.** 53: 1025-1027.

24. Vinet, C., Quilhot, W. y Garbarino, J.A. (1990) **J. Nat. Prod.** 52: 191-192.

25. Vinet, V., Quilhot, W., Gambaro, V. y Garbarino, J.A. (1990). **J. Nat. Prod.** 53: 500-502.

26. Garbarino, J.A., Piovano, M., Céspedes, E. y Quilhot, W. (1990) **Bol. Soc. Química Perú** 56: 21-25.

27. Garbarino, J.A., Quilhot, W. Piovano, M. y Rubio, C. (1991) **Bol. Soc. Chil. Quím.** 36: 229-231.

28. Vicente, C., Estévez, M.P. y Xavier Filho, L. (1978). **Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.)** 76: 13-23.

29. Rundel, P.W. (1969). **Bryologist** 72: 40-43.

30. Fahselt, D. (1984). **Bryologist** 87: 50-56.

31. Quilhot, W., Leighton, G., Flores, E., Fernández, E., Peña, W. y Guzmán, G.(1987). **Acta Farm. Bonaerense** 6: 15-22.

32. Quilhot, W., Sagrero, M.G., Campalans, E., Hidalgo, M.E., Peña, W., Fernández, E. y Piovano, M. (1991) **Scr. Cient. INACH** 41: 91-97.

33. Quilhot, W., Hidalgo, M.E., Flores, E., Fernández, E. y Peña, W. (1991). **Troisieme Symposium sur les Substances Naturelles d'Interet Biologique de la Région Pacifique-Asie**; Nouméa, Nueva Caledonia. 89.

34. Quilhot, W., Hidalgo, M.E., Fernández, E., Peña, W. y Flores, E. (1992). **Ser. Cient. INACH** 42: 53-59.

35. Hidalgo, M.E., Lissi, E.A., Fernández, E. y Quilhot, W. (1992), **J. Photochem. Photobiol** (en prensa).

36. Shaath, N. (1987). **Cosmetic and Toiletries** 102: 69-81.

37. Nagaoka, S., Hiroto, M., Sumitami, M., Yoshiare, K., Lipinska-Kochany, E. y Iwamura, H. (1983) **J. Am. Chem. Soc.** 105: 4220-4226.

38. Rao, D.N. y Le blanc, F. (1965). **Bryologist** 68:284-289.

39. Huneck, S., Sainsbury, M., Rickard, T.M.A. y Lewis Smith, R.I. (1984) **J. Hattori Bot. Lab.** 56: 461-480.

40. Quilhot, W., Garbarino, J.A., Piovano, M., Chamy, M.C. Gambaro, V., Oyarzún, M.L., Vinet, C., Hormaechea, V. y Fiedler, P. (1989) **Ser. Cient. INACH** 39: 75:89.

41. Piovano, M., Garbarino, J.A., Chamy, M.C., Zúñiga, V., Miranda, E., Céspedes, E., Fiedler, P., Quilhot, W. y Araya, G. (1991) **Ser. Cient. INACH** 41: 79-90.

42. Vicente, C., Ruiz, J.L. y Estévez, M.P. (1980). **Phyton** 39: 15-20.

43. Estévez, M.P., Legaz, M.E., Olmeda, L., Pérez, F.J. y Vicente, C. (1981). **Z. Naturforsh., Teil C** 36: 35-39.

44. Lösch, R., Kappen, L. y Wolf, A. (1983). **Polar Biology** 1: 243-248.

45. Quilhot, W., Peña, W., Flores, E., Hidalgo, M.E., Fernández, E. y Leighton, G. (1991). **Ser. Cient. INACH** 41: 99- 106.