

Factores Exógenos y Endógenos determinantes de la Acumulación de Acido Usnico en Líquenes *

W. QUILHOT**, G. LEIGHTON***, E. FLORES**, E. FERNANDEZ**,
W. PEÑA y G. GUZMAN****

RESUMEN. En poblaciones de *Protousnea malacea* (Stirt) Krog, líquen fruticuloso que crece en diferentes habitats, se estudiaron los niveles de acumulación de ácido úsnico —metabolito con propiedades antimicrobianas— en relación a factores ambientales y a la edad de los tejidos. El ácido úsnico se cuantificó mediante HPTLC. Las concentraciones variaron significativamente en individuos provenientes de distintos sitios forestales; al interior de los talos se observó un gradiente de concentración creciente desde los sectores de mayor edad a las ramificaciones más jóvenes.

SUMMARY. "Exogenous and endogenous conditions determining the accumulation levels of usnic acid in lichens". Using single populations of *Protousnea malacea* (Stirt) Krog, a fruticose lichen growing in different habitats, the study of the accumulation levels of usnic acid —a metabolite with antimicrobial properties— was undertaken. Environmental conditions and tissues age were considered in this research. The quantitative determination of usnic acid was done by HPTLC. The concentration values varied from different forestry sites; the content of usnic acid was much higher in young branchlets than in the old parts of the thallus.

INTRODUCCION

Dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos, ácidos úsnicos y éteres diarílicos son compuestos fenólicos considerados específicos de líquenes^{1, 2}. La estructura y distribución de estos productos natura-

les ha sido objeto de numerosos estudios^{3, 4}, pero son escasas las comunicaciones sobre las variaciones en los niveles de acumulación en poblaciones naturales. Se ha sugerido que factores del ambiente⁵⁻⁷ y otros propios del líquen⁸⁻¹⁰

* Trabajo presentado en el II Simposio Argentino y V Latinoamericano de Farmacobotánica. La Plata, Argentina, 26 de octubre al 1º de noviembre de 1986

** Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso. Casilla 92-V. Valparaíso, Chile

*** Laboratorio de Ecología, Instituto de Oceanología, Universidad de Valparaíso, Casilla 13-D, Viña del Mar, Chile

**** Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Playa Ancha de Ciencias de la Educación, Casilla 34-V, Valparaíso, Chile

PALABRAS CLAVE: Líquen fruticuloso; Talo; Acido úsnico; Forófito; Sitios forestales; Niveles de acumulación; Categorías de edad; Propiedades antimicrobianas

KEY WORDS: Fruticose lichen; Thallus; Usnic Acid; Phorophyte; Forestry Sites; Accumulation levels; Age Categories; Antimicrobial Properties

son los responsables de esta variabilidad.

El ácido úsnico (Fig. 1) es el metabolito más conocido y más frecuente en líquenes. Es un pigmento que se acumula en la corteza superior del talo ejerciendo la función de una pantalla que limita la penetración de las radiaciones luminosas al estrato algal, absorbiéndolas o dispersándolas¹¹. Algunos autores postulan que aumenta la permeabilidad de las células algales permitiendo, de este modo, el paso de los fotosimilados hacia el componente fúngico¹²; también se ha señalado su importancia como reserva lipídica en períodos de déficit nutricional¹³. Por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, el ácido úsnico es utilizado en formas farmacéuticas de uso tópico¹⁴.

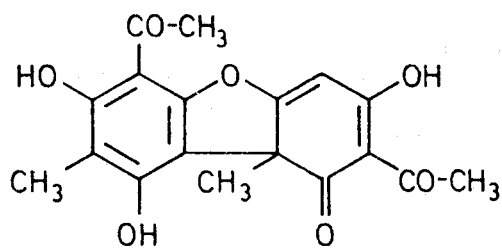


Figura 1. Ácido úsnico.

Para establecer un sistema de manejo frente a la explotación de este recurso natural es necesario realizar estudios sobre la variabilidad de las concentraciones en poblaciones naturales mono-específicas en relación, por una parte, con los factores del ambiente y, por otra, con factores endógenos como es la edad del talo.

Para estos fines se utilizaron poblaciones de *Protousnea malacea* (Stirt) Krog, líquen fruticuloso y dominante en la precordillera andina de Chile central-sur, en bosques de *Nothofagus* y *Araucaria*¹⁵; en algunos sitios forestales constituye el 96% de la biomasa total de epífitos en *N. pumilio*¹⁶. Por vía de la macroextracción se ha informado un rendimiento de 0,69% de ácido úsnico en muestras provenientes de la zona de Chillán¹⁷.

MATERIALES Y METODOS

En seis sitios forestales de la precordillera andina (Tabla 1) se recolectaron especímenes de *P. malacea* creciendo sobre *Nothofagus antarctica*, *N. glauca*, *N. pumilio* y *Araucaria araucana*. Los talos se agruparon para establecer comparacio-

Número del sitio	Localidad
1	Laguna Amarga (36° 26' S), Parral; 850 m s.n.m. Terreno montuoso con <i>Nothofagus glauca</i> como forófito dominante.
2	Cajón del Diguillín (36° 50' S), Chillán; 1040 m s.n.m. Sitio abierto con <i>N. antarctica</i> como forófito dominante.
3	El Purgatorio (36° 26' S), Chillán; 1500 m s.n.m. Colinas sombrías con <i>N. pumilio</i> como forófito dominante.
4	Shangri-La (36° 50' S), Chillán; 1500 m s.n.m. <i>N. pumilio</i> , creciendo en mesetas asoleadas.
5	Las Trancas (36° 50' S), Chillán; 1250 m s.n.m. Sitio abierto con <i>N. antarctica</i> como forófito dominante.
6	El Hoyón (38° 38' S), Temuco; 1160 m s.n.m. Bosque mixto de <i>N. antarctica</i> y <i>A. araucana</i> en una meseta abierta.

Tabla 1. Características de los sitios forestales.

nes entre las concentraciones de ácido úsnico y factores del habitat, considerando: a) el forófito sobre el cual crecían los talos y el sitio forestal; b) la orientación norte-sur de los talos; c) la localización de los talos al interior del forófito, relacionada con la distancia al suelo, tanto en troncos como en ramas; d) la alta o baja cobertura liquénica.

Muestras aleatorias de cada talo, entre 0,1 y 0,5 g (materia seca) se sometieron a extracción con acetona durante 48 horas a temperatura ambiente. Los extractos se evaporaron a sequedad, se redisolviaron en acetona y se sembraron en placas de Silica Gel 60 F₂₅₄ mediante un aplicador Linomat III; las placas se eluyeron con tolueno-ácido fórmico-acetato de etilo (35:0,5:5 v/v). La determinación cuantitativa del ácido úsnico se realizó en fotodensitómetro HPTLC Camag UV con lámpara de Hg, ($\lambda = 313$ nm) según espectro de absorción del ácido úsnico en acetona, 326 nm.

Se analizaron un total de 132 muestras de diferentes sitios forestales. La variación entre grupos se determinó por análisis de la varianza (ANOVA)¹⁸.

De poblaciones de *P. malacea*, recolectadas en el sitio forestal El Hoyón, creciendo sobre *N. antarctica*, se sectorizaron talos en tres categorías de edad

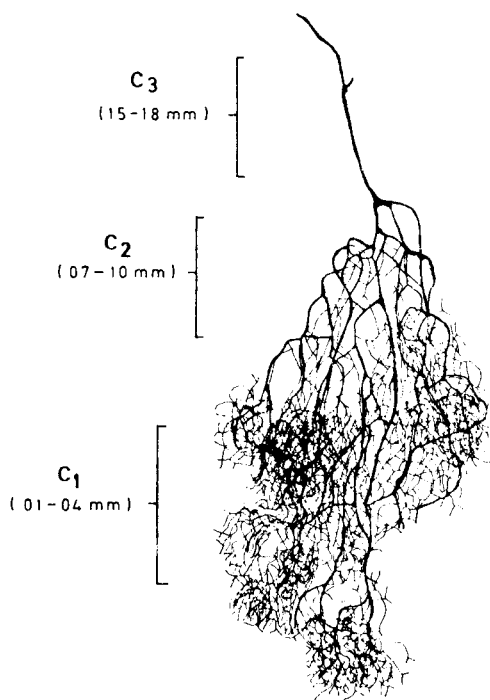


Figura 2. Categorías de edad según diámetro de las ramificaciones en *P. malacea*.

(Fig. 2), tomando en consideración que el grosor de las ramificaciones es un criterio válido para establecer categorías de edad en líquenes fruticulosos^{19, 20}.

Las concentraciones de ácido úsnico, en cada sector de edad, se determinaron por HPTLC en la forma ya descrita. Se analizó un total de 21 muestras.

Sitio	Forófito	Muestras analizadas (n)	Concentración ácido úsnico (%)		
			Rango	Media	cv
Laguna Amarga	<i>N. glauca</i>	7	0,74 - 2,84	1,46 ± 0,66	0,45
Cajón del Diguillín	<i>N. antarctica</i>	7	0,96 - 1,49	1,11 ± 0,17	0,15
El Purgatorio	<i>N. pumilio</i>	21	0,14 - 2,18	0,79 ± 0,46	0,59
Shangri-La	<i>N. pumilio</i>	27	0,24 - 2,09	0,76 ± 0,49	0,64
Las Trancas	<i>N. antarctica</i>	39	0,38 - 2,44	1,38 ± 0,61	0,44
El Hoyón	<i>N. antarctica</i>	15	1,92 - 4,71	3,08 ± 0,85	0,27
	<i>A. araucana</i>	16	0,47 - 4,09	1,46 ± 1,08	0,73

Tabla 2. Concentraciones de ácido úsnico en poblaciones de *P. malacea* en los forófitos y sitios estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla 2 señala los rangos de las concentraciones de ácido úsnico para el total de muestras analizadas. Se observa que los valores son variables para muestras provenientes de un mismo forófito y sitio forestal: en *A. araucana*, por ejemplo, los valores fluctuaron entre 0,47 y 4,09%. La variabilidad también se manifiesta en el caso de muestras provenientes del mismo forófito pero de sitios forestales diferentes: los coeficientes de variación (c.v.) para muestras provenientes de *N. antarctica*, de las localidades Cajón del Diguillín y Las Trancas fueron de 0,15 y 0,44 respectivamente.

Los resultados de los diferentes ANOVA están contenidos en la Tabla 3. Las comparaciones entre forófitos no muestran diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de áci-

do úsnico determinadas en especímenes de *P. malacea* que crecen sobre *N. antarctica*, *N. glauca*, *N. pumilio* y *A. araucana* (Comparación 1). La misma situación se observa al comparar las muestras provenientes de sustratos expuestos al norte, donde la radiación es mayor en el hemisferio sur, con muestras expuestas al sur donde la radiación es menos intensa y mayor la humedad (Comparación 2). Estos resultados indican que la relación forófito-liquen no es una determinante en el proceso de acumulación del metabolito en *P. malacea*. La zona altimétrica del árbol, o altura sobre el suelo, tampoco sería un factor preponderante en la acumulación (Comparación 3). El gradiente altitudinal dentro de un árbol implica variaciones microclimáticas conjuntas tales como insolación, vientos, temperatura y humedad; Rundel⁵ encontró en *Cl-*

Comparaciones	Grado de libertad		F _{observ.}
	Tratamiento	grupos	
1. Forófitos <i>N. glauca</i> , <i>N. pumilio</i> , <i>N. antarctica</i> y <i>A. araucana</i>	3	125	1,51
2. Exposiciones norte y sur <i>N. pumilio</i> (Sitios 3 y 4) y <i>A. araucana</i> (Sitio 6)	1	32	1,72
3. Alturas sobre el suelo			
a) Sobre tronco			
<i>N. antarctica</i> , Sitio 5	3	6	2,66
<i>N. pumilio</i> , Sitio 3	3	14	0,61
<i>N. pumilio</i> , Sitio 4	3	11	1,16
<i>A. araucana</i> , Sitio 6	2	5	0,35
b) Sobre ramas			
<i>N. antarctica</i> , Sitio 5	2	22	1,37
<i>N. antarctica</i> , Sitio 5	2	10	0,65
<i>N. antarctica</i> , Sitio 6	2	12	2,06
4. Cobertura liquénica <i>N. pumilio</i> ; alta cobertura vs. baja cobertura liquénica (Sitio 4)	1	13	8,29
5. <i>N. antarctica</i> de diferentes sitios forestales (Sitios 2, 5, 6)	2	58	25,63*

* Significativo a un nivel de probabilidad de 0,1

Tabla 3. ANOVA de los resultados de la concentración de ácido úsnico en poblaciones de *P. malacea*

donia subtenuis valores de 0,13% de ácido úsnico en un microhabitat con baja intensidad luminosa y de 2,8% en un sitio abierto. Pero, de acuerdo a nuestros resultados, en un gradiente ambiental dentro de un forófito, este efecto se debilitaría por la influencia de otros factores del ambiente. No está claro que a mayor altura del árbol exista, también una mayor iluminación ya que en los sitios forestales estudiados hay nieve sobre el suelo durante varios meses del año. La nieve refleja energía solar; por lo tanto, la radiación aumentaría en las áreas más cercanas al suelo durante el otoño y el invierno. Sin embargo esta hipótesis se contrapone con lo informado por Fahselt²¹, quien no observó variaciones en el contenido en ácido úsnico ni en la atranorina en poblaciones de *Cladonia* mantenidas en condiciones naturales y controladas, sugiriendo que la concentración de los metabolitos es independiente del ambiente. La alta o baja cobertura líquénica (Comparación 4) no afectaría los niveles de acumulación del metabolito.

Sin embargo cuando se compara la producción de ácido úsnico en especímenes de *P. malacea* que crecen sobre un mismo forófito, *N. antarctica*, pero en diferentes sitios forestales (Comparación 5), existen diferencias significativas en la acumulación. El sitio 6, El Hoyón, presenta un ambiente muy diferente, el período nival tiene una duración aproximada de siete meses, mientras que en los restantes sitios forestales alcanza a cinco meses; la temperatura y la humedad también varían, por lo que, en esta situación, sería un factor relacionado a la ubicación geográfica el que determinaría los diferentes grados de acumulación del metabolito.

Se han observado diferencias cuantitativas en los productos secundarios con

el avance en edad o envejecimiento del talo. Huneck *et al.*¹⁰ comunicaron que en tres especies de *Usnea* se observa un gradiente de distribución creciente de ácido úsnico desde la base al ápice de los talos, que corresponden a las zonas más jóvenes o de crecimiento activo. Fahselt⁹ obtuvo similares resultados en poblaciones de *Cladonia stellaris* recogidas de distintos sitios de muestreo; atribuye las variaciones en la concentración de ácido úsnico más a factores genéticos que a factores ambientales. En una población de *Usnea pusilla*, ordenada según peso y longitud total de los individuos, Quilhot *et al.*²² comunicaron que la concentración de ácido úsnico es significativamente mayor en los especímenes de menor peso o de menor edad; al interior de los talos, es más elevada en las ramificaciones de menor grosor.

La acumulación de ácido úsnico varía notablemente en las categorías de edad en *P. malacea* (Fig. 3), observándose una mayor concentración en las ramificaciones de diámetro menor y un gradiente de concentración decreciente desde las categorías de menor edad a las más antiguas en el total de individuos analizados; los valores son significativamente diferentes en los distintos sectores de edad (Tabla 4).

Estudios sobre biomasa y contenido en ácido úsnico de poblaciones de *P. malacea*, en éstos y otros sitios forestales (resultados no publicados)²³, han permitido calcular el rendimiento en ácido úsnico por hectárea (Tabla 5). Recientemente, en nuestro país se ha elaborado una forma farmacéutica que tiene como base este metabolito líquénico²⁴. Estos antecedentes son importantes para ingresar el ácido úsnico al arsenal terapéutico pero, para decidir su explotación futura, se precisa conocer la velocidad de creci-

miento de *P. malacea* y de otras especies productoras a fin de no alterar las comunidades naturales y provocar la extinción del recurso natural.

AGRADECIMIENTOS. Los autores agradecen a la Corporación Nacional Forestal (CONAF) IX Región por la ayuda prestada en el trabajo de terreno. Proyecto UV 22/83, Dirección de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad de Valparaíso.

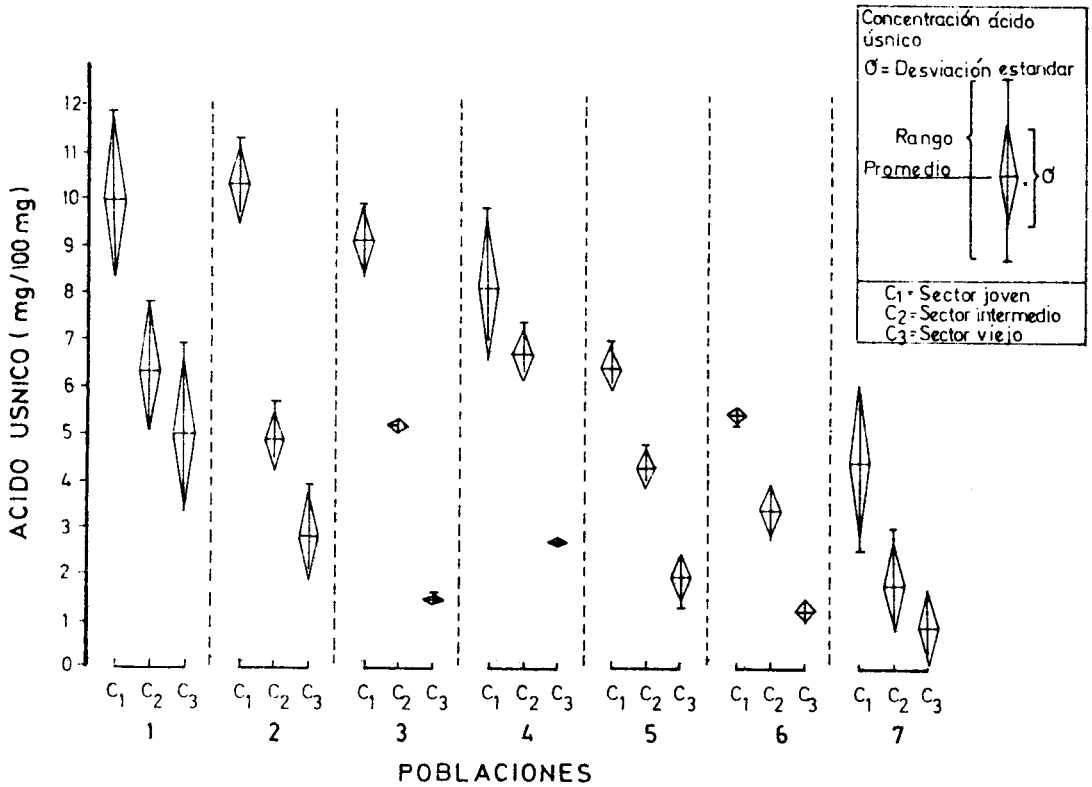


Figura 3. Niveles de ácido úsnico en diferentes categorías de edad en talos de *P. malacea*.

Acido úsnico	Categorías de Edad		
	C ₁	C ₂	C ₃
(mg/100 mg de talo)	7,68	4,76	2,30

Nota: Todos los valores consignados son significativamente diferentes.

Tabla 4. Test de Duncan²⁵ ($p = 0,05$) para las concentraciones de ácido úsnico, valores promedio, de cada categoría de edad en talos de *P. malacea*.

Sitio	Biomasa líquenes (kg/ha)	Biomasa <i>P. malacea</i> (kg/ha)	Acido úsnico (kg/ha)
Laguna Amarga	605,0	43,84	0,64
El Purgatorio	601,1	582,73	4,60
Las Trancas	114,1	101,64	1,40
Shangri-La	95,9	92,02	0,70
Cajón Diguillín	2,8	0,74	0,01
El Hoyón	541,3	326,74	8,70
Camino Interpretación	3316,0	3155,81	80,15
Captren	971,1	239,17	7,18

Tabla 5. Rendimiento en ácido úsnico en ocho sitios forestales de la precordillera andina de Chile central-sur.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Vicente, C. (1975) *Fisiología de las sustancias líquénicas*. Alhambra, S.A.
- Fiedler, P., V. Gambaro, J.A. Garbarino y W. Quilhot (1986) *Phytochemistry* 25: 461-5
- Culberson, Ch.F. (1969) *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*. The University of North Carolina Press-Chapel Hill
- Culberson, Ch.F., W.L. Culberson y A. Johnson (1977) *Second Supplement to Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*. The American Bryological and Lichenological Society, St. Louis
- Rundel, P.W. (1969) *Bryologist* 72: 40-5
- Culberson, Ch.F., W.L. Culberson y A. Johnson (1983) *Biochem. System. Ecol.* 11: 77-84
- Hamada, N. (1984) *Lichenologist* 16: 96-9
- Mirando, M. y D. Fahselt (1978) *Can. J. Bot.* 56: 1499-1504
- Fahselt, D. (1984) *Bryologist* 87: 50-6
- Huneck, S., M. Sainsbury, T.M.A. Rickard y R.I.L. Smith (1984) *J. Hattori Bot. Lab.* 56: 461-80
- Rundel, P.W. (1978) *Biochem. System. Ecol.* 6: 157-70
- Kinraide, W.T.B. y V. Ahmadjian (1970) *Lichenologist* 4: 234-47
- Vincente, C., D.H. Brown y M.E. Legaz (1980) *Phyton* 39: 15-20
- Vartia, K.O. (1973) *Antibiotics in Lichens* (V. Ahmadjian y M.E. Hale, eds.), Academic Press, págs. 547-61
- Krog, H. (1976) *Norw. J. Bot.* 23: 83-106
- Leighton, G., W. Quilhot, G. Guzmán, E. Flores y M. Montt (1984) *Resúmenes V Reunión Nacional de Botánica*, La Serena, Chile, pág. 50
- Chamy, M.C., V. Gambaro, J.A. Garbarino y W. Quilhot (1985) *J. Nat. Prod.* 48: 307-9
- Rudolph, L.K. y J.L. Ciminera (1975) en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (J.E. Hoover, managing ed.), 15th. edition, Mack Pub. Co., págs. 132-6
- Culberson, Ch.F. y V. Ahmadjian (1980) *Mycologia* 72: 90-109
- Lechowicz, M.J. (1983) *Plant Physiol.* 71: 893-5

21. Fahselt, D. (1981) *Lichenologist* 13: 87-91
22. Quilhot, W., M. Goddard, G. Leighton y G. Guzmán (1986) *Resúmenes IV Congreso Latinoamericano de Botánica*, Medellín, Colombia, pág. 186
23. Quilhot, W., G. Leighton, G. Guzmán, L. Vallejos y O. Bustamante (1984) *Reunión Nacional Química de Productos Naturales*, Valdivia, Chile, págs. 9-10
24. Costa, E., M. Escobar, P. Rodríguez y W. Quilhot (1986) *III Reunión Latinoamericana de Ciencias Farmacéuticas*, Montevideo, Uruguay, pág. 116
25. Dixon, W.J. y F.J. Massey (1979) *Introducción al análisis estadístico*, 3ra. ed., Mc Graw-Hill, New York