

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS POLIFENOLES DE *Hypogymnia tavaresii* D. Hawksw. & P. JamesElsa M. Rodríguez Pérez^a, Francisco J. Toledo Marante^{a,*}, Josefa Caballero Hernández^a, Jaime Bermejo Barrera^b y Francisco J. Estevez Rosas^c^aDepartamento de Química, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria 35017, España^bInstituto de Productos Naturales y Agrobiología, CSIC, Tenerife, 38206, España^cDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria 35017, España

Recebido em 29/10/2015; aceito em 21/12/2015; publicado na web em 28/03/2016

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOLS FROM *HYPOGYMNINGIA TAVARESII* D. HAWKSW. & P. JAMES. Lichen substances have more than one phenolic hydroxyl group attached to one or more benzene rings, thus qualifying them as polyphenols. The secondary metabolites isolated from the lichen *H. tavaresii* have been studied in a bid to find compounds protective against oxidative stress and free radical-induced damage. The compounds were identified based on their MS and ¹H-NMR spectra as well as retention factors of TLC analysis. In addition to the previously described metabolites (atranorin, chloroatranorin, physodic and physodalic acids) of *H. tavaresii*, a further three were identified in its thalli: 2'-O-methylphysodone, isophysodic and ursolic acids. The newly identified compounds of *H. tavaresii* thalli may be useful in the chemotaxonomic classification of this species. Antioxidant effectiveness of the acetone extract's fractions was measured. The compounds of the active fractions were purified and exhibited 180-800 fold less radical scavenging activity than the reference substance α -(+)-tocopherol in a DPPH• model expressed by IC₅₀ values.

Keywords: *Hypogymnia*; *tavaresii*; lichen; depsides; depsidones; scavengers.

INTRODUCCION

En la actualidad existe un gran interés sobre el daño producido por los radicales libres en la etiología de las enfermedades humanas. El daño oxidativo a las células y moléculas del cuerpo se ha propuesto ampliamente como la causa de enfermedades crónicas tales como las cardiovasculares, neurológicas, cataratas y algunos cánceres.¹

Como componentes liposolubles, los polifenoles han sido clasificados como factores que previenen dicho daño oxidativo.² Así, los polifenoles pueden interferir las etapas de propagación radicalaria en cadena destruyendo los radicales peroxídicos.³ Aunque sabemos que diferentes polifenoles presentan diferentes capacidades antioxidantes, el efecto de la estructura molecular sobre sus propiedades inhibitoras de radicales libres aún tiene que ser investigado en detalle.⁴

Hasta la actualidad se han propuesto diversos ensayos biológicos y químicos para medir la actividad antioxidante de los polifenoles.⁵ Entre ellos se ha aplicado con éxito el ensayo de peroxidación lipídica (*Lipid peroxidation assay*).⁶ También ha sido ampliamente utilizado el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) para medir la capacidad inhibitora de radicales libres de varios polifenoles contenidos en los alimentos (*DPPH• assay*).⁷ Puesto que el DPPH• es un radical libre estable y comercial, la ejecución de este último ensayo es más fácil que otros métodos de inhibición de radicales que implicarían el tener que generar los radicales en la misma experimentación.

Por otra parte, se sabe que aproximadamente el 21% de los hongos son capaces de asociarse simbióticamente con algas y/o cianobacterias en el proceso de liquenización.⁸ Las nuevas formas ecológicas creadas –los líquenes– se encuentran en una gran variedad de habitats y suponen un grupo de unas 18900 especies conocidas en el planeta.⁹ Sintetizan un importante grupo de compuestos orgánicos, con gran diversidad estructural, tanto mediante el metabolismo primario como el secundario. Los metabolitos secundarios, que son únicos de los hongos liquenizados, ha atraído el interés de los investigadores desde

el siglo XIX.¹⁰ El perfil de metabolitos secundarios es característico de cada especie líquénica, por lo que es crucial para su taxonomía, especialmente en especies que son difíciles de distinguir morfológicamente.¹¹ Debido a su diversa actividad biológica, también ha sido reivindicada la producción de estas sustancias para proveer a la industria farmacéutica.¹²

El rendimiento en sustancias líquénicas es bastante alto –la extracción rinde entre un 5 y un 25 % del peso del talo líquénico seco-.¹³ Una de las fuentes más abundantes de estas sustancias la constituye el líquen *Hypogymnia tavaresii* D. Hawksw. & P. James. Este líquen, de la familia *Parmeliaceae*, es un endemismo del archipiélago canario (citado solamente para las islas occidentales (El Hierro, La Gomera, La Palma y Tenerife) y está formado por un ficobionte del género *trebouxia*, aparece sobre brezos (*Erica arborea*) del bosque de Laurisilva y ramas de plantas del género *Ilex*, en las que se asocia con *Parmelia horrescens* Tayl. y una especie indeterminada de *Usnea*. Se encuentra bajo la Cruz del Carmen en el monte de Las Mercedes, Tenerife y se denominó así en honor del profesor de Ciencias Naturales Tavares, quien realizó importantes contribuciones a la descriptiva de los líquenes Macaronésicos.

Los ensayos de semimicroquímica llevaron a describir la presencia en el talo líquénico de esta especie de los metabolitos atranorina (1), cloroatranorina (2), ácido fisódico (5) y ácido fisodálico (7).¹⁴ Este último componente químico es un carácter químico que le diferencia de otras especies íntimamente relacionadas como *H. madeirensis* y *H. billardieri*, que carecerían de él. Así, esta especie sintetizaría al menos cuatro metabolitos secundarios que incluirían para-dépsidos del β -orcínol (atranorina, 1 y cloroatranorina, 2), depsidonas del orcinol (ácido fisódico, 5) y depsidonas del β -orcínol (ácido fisodálico, 7), todos los cuales son biosintetizados por la ruta de los policétidos.¹⁵ Los depsidos se sintetizan a partir de dos unidades fenólicas monocíclicas mediante una reacción de esterificación catalizada por dépsido-hidrolasas.⁶ Las depsidonas son estructuralmente similares a los dépsidos, pero sus dos unidades monocíclicas están enlazadas tanto por enlaces ester como por éteres.¹⁶ Como para la mayoría de las

*e-mail: franciscojavier.toledo@ulpgc.es

especies líquénicas, los metabolitos secundarios de *H. tavaresii* son fabricados por el hongo y depositados extracelularmente, en forma cristalina, en la superficie de las hifas –las depsidonas en la médula y los dépsidos en la corteza-.¹⁵ Recientemente se ha aportado que estas sustancias se difunden más allá del talo líquénico llegando a penetrar las semillas de las plantas herbáceas⁶ y las ramas de los árboles que epifitizan.¹⁶ Es esta riqueza en polifenoles lo que nos llamó la atención, llevándonos a su reestudio con el objeto de analizar sus propiedades antioxidantes. Ya nuestro grupo había demostrado que los metabolitos fenólicos líquénicos –entre ellos la atranorina (1)- protegen a estos organismos de la peroxidación radicalaria provocada por el alto estrés oxidativo existente en las regiones de elevada irradiación solar.⁶ Así, se planteó como objetivo de este trabajo el desarrollar un procedimiento para medir y comparar la actividad antioxidante de las fracciones ricas en polifenoles extraídas del talo líquénico de *H. tavaresii*, compararlas con la melatonina por el ensayo de peroxidación lipídica y, además, tras aislar, purificar y elucidar la estructura de dichos polifenoles, comparar su actividad antioxidante con la del α -(+)-tocoferol mediante el ensayo de inhibición del radical libre DPPH•.

PARTE EXPERIMENTAL

Compuestos químicos

Todos los reactivos químicos [hexano, acetato de etilo (AcOEt), cloroformo, metanol, tolueno, ácido acético glacial, y ácido sulfúrico fueron de grado analítico o superior, de la marca Panreac y fueron adquiridos a Medina Cejudo (Las Palmas de Gran Canaria, España). El dimetil sulfóxido y los patrones antioxidantes melatonina y α -(+)-tocoferol, así como el radical libre estable DDPH• y los disolventes deuterados para espectroscopía de resonancia magnética nuclear se compraron de la marca Sigma-Aldrich y fueron adquiridos a Biosigma (Santa Cruz de Tenerife, España). El agua se produjo mediante el sistema *Milli-Q water* (Millipore, Bedford, MA, USA). La sílica gel para cromatografía en columna fue de la marca *Scharlau* y fue adquirida a Melcan (Santa Cruz de Tenerife, España).

Recolección e identificación del líquen

El material fue recolectado en Cruz del Carmen, Las Mercedes, Tenerife, España (800 – 850 m.s.m.) el 26-9-1998 y clasificado por C. Hdez Padrón y P. L. Pérez como *Hypogymnia tavaresii* D. Hawksw. & P. James (familia *Parmeliaceae*). Una muestra del mismo se guarda en el herbolario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de La Laguna (TFT Lich. 2332). Varias fotografías de la especie se aportan en el “Graphical Abstract” y en la Figura 1S del material suplementario.

Aparatos y métodos analíticos diversos

La cromatografía en capa fina analítica se realizó usando folios POLYGRAM_SIL G/UV₂₅₄, 10x10 cm ó 10x20 cm, de la marca Macherey–Nagel (Alemania).

La cromatografía en columna en fase normal se realizó sobre sílica gel (*Scharlau*) con un tamaño de partícula de 0.06-0.2 mm para el adsorbente de la cabeza cromatográfica y de 0.04-0.06 mm para la fase estacionaria. La cromatografía se realizó tanto a media presión (*Büchi Chromatography System*) como a baja presión con motores de la marca *Fluid Metering* (USA) conectados en serie a columnas cromatográficas de la marca *Ace Glass* (USA). El motor fue equipado con una membrana reguladora de pulsos para estabilizar la presión. Los eluyentes fueron mezclas de hexano, AcOEt y metanol, combinados de forma que se fuese incrementando la polaridad del

mismo de forma progresiva (primero mezclas de hexano - AcOEt de composición x:100-x seguidas de mezclas de AcOEt - metanol también de composición x:100-x, de forma que se comenzó eluyendo con hexano y se acabó con metanol).

La cromatografía de líquidos analítica (HPLC) se realizó usando un sistema Shimadzu consistente en una bomba LC-9A conectada en línea con un detector UV SPD-6AV ($\lambda = 254$ nm). La columna fue la μ -Bondapak-C₁₈ y como eluyente se utilizó una mezcla de ácido acético/agua/metanol (0.4:19.6:80.0 v/v/v) a un flujo de 0.8 mL min⁻¹.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón, incluidos los bidimensionales (COSY) se recorrieron con un aparato AMX Bruker de 300 MHz. El calibrado de la escala δ se realizó con la señal del tetrametilsilano, incorporado siempre como patrón interno ($\delta = 0$) en los disolventes deuterados.

La espectrometría de masas (EIMS) se realizó con un espectrómetro de masas de impacto electrónico común (FISONS VG Micromass Autospec). Se aplicó el modo positivo a 70 eV con alcohol 3-nitrobenzílico (NBA) como matriz.

La rotación óptica se realizó en un aparato de la marca Perkin Elmer y los puntos de fusión se midieron con un aparato Gallenkamp y están sin corregir.

Los bioensayos de inhibición de la peroxidación lipídica se realizaron mediante un *Lipid peroxidacion kit* de la marca Calbiochem (La Jolla, CA).

Las medidas de absorbancia en los ensayos de inhibición del radical estable DPPH• se realizaron mediante un espectrofotómetro UV-3100PC de la marca VWR controlado desde ordenador por el programa “UV-Vis Analyser”.

Análisis por cromatografía en capa fina en fase normal (TLC)

El residuo seco del extracto bruto del talo de *H. tavaresii* ó de las sucesivas fracciones cromatográficas (4 mg) se redisolvió en 40 μ L de acetona y luego, 3 μ L de las disoluciones resultantes se aplicaron en placas de gel de sílice para cromatografía en capa fina (TLC). El cromatograma se eluyó con la mezcla de disolventes estándar C (tolueno: ácido acético; 170: 30, v/v).¹⁰ Un extracto acetónico del talo de *Lethariella canariensis* (Ach.) Krog se utilizó como estándar para los para-dépsidos atranorina (1) y cloroatranorina (2) según nuestro grupo había descrito previamente.⁶ Las placas se secaron al aire a 23 °C y luego fueron analizadas bajo luz UV ($\lambda = 254$ nm); luego se les aplicó un aerosol de *oleum* (ácido sulfúrico, 4% + ácido acético, 80% + agua, 16%) y se calentaron a 120 °C durante 20 min. Finalmente, las manchas fueron analizadas con la luz del día. Los metabolitos se identificaron en las placas por comparación de sus coloraciones características y los factores de retención relativos (Rf x 100) (Tabla 1S).

Extracción, fraccionamiento cromatográfico y obtención de las fracciones cromatográficas con actividad antioxidante (fracciones 7 y 9)

El talo líquenico seco (150 gramos) se sometió a maceración con acetona (3 x 5 litros, 2 días c/u) a temperatura ambiente (23 °C). Después de filtrar y eliminar el disolvente en rotavapor se obtuvieron 15 g de un material semicristalino que se redisolvió en cloroformo, mezcló con 70 g de sílica gel (0.06-0.2 mm), eliminó el disolvente en rotavapor y montó como cabeza de una columna cromatográfica construida con 450 g de sílica gel (0.04-0.06 mm). La cromatografía a media presión en un cromatógrafo BUCHI con hexano y cantidades incrementales de AcOEt primero y AcOEt y cantidades incrementales de metanol después rindió once fracciones de polaridad progresiva que resultaron de reunir y concentrar en rotavapor las de comportamiento

análogo en TLC analítica. En dicha cromatografía se incrementó la proporción de AcOEt primero y de metanol después en un 5% cada 1000 mL eluidos. La fracción cromatográfica n° 7 es la que se eluyó con hexano- AcOEt, de composición variable, desde 80:20 hasta 50:50, y se visualizó por TLC analítica ($R_f=0.33$ hasta $R_f=0.76$ con el eluyente estándar C).¹⁰ La fracción cromatográfica n° 9 es la que se eluyó con hexano- AcOEt, también de composición variable, desde 50:50 hasta 40:60, y se visualizó por TLC analítica ($R_f=0.15$ hasta $R_f=0.25$ con el eluyente estándar C).¹⁰

Ensayos biológicos de actividad antioxidante (*Lipid peroxidation assay*)

Homogeneizados de cerebro de rata (400 μ l) se incubaron durante 60 minutos a 37 °C con H_2O_2 (150 μ mol L^{-1}) / $FeSO_4$ (15 μ mol L^{-1}) para inducir la peroxidación lipídica, en ausencia (control C2) ó presencia de las fracciones cromatográficas anteriores (fracciones n° 1 al n°11) de productos naturales (0.8 mmol L^{-1} ; para su cálculo se utilizó un peso molecular medio de 417) en un volumen final de 600 μ l. El compuesto control (melatonina, MEL) y las fracciones ensayadas se trataron con la misma cantidad de DMSO y su concentración fue siempre inferior al 0.25%. Después de la incubación, las reacciones se pararon por enfriamiento (baño de hielo, 10 minutos), se centrifugaron (10000 x g, 10 min, 4 °C) y los líquidos obtenidos se sometieron a determinación analítica de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenas (4-HDA) mediante un reactivo cromogénico (N-metil-2-fenilindol) que reacciona con MDA y 4-HDA a 45 °C produciendo un grupo cromóforo estable cuyo máximo de absorbancia en el espectro visible está centrado a 586 nm de longitud de onda.

Tabla 1. Oxidación lipídica de un homogeneizado de cerebro de rata, medida como nmoles de (MDA + 4HDA) por mg de proteína

Ensayo	MDA + 4HDA (nmol/ mg proteína) (media \pm DE)
Control C1	4.65 \pm 0.21
Control C2	9.54 \pm 0.10
Melatonina (MEL)	6.37 \pm 0.10
Fracción 7 de <i>H. tavaresii</i>	2.64 \pm 0.09
Fracción 9 de <i>H. tavaresii</i>	3.39 \pm 0.18

Investigación de la composición química de la fracción cromatográfica antioxidante 7

La moderada actividad antioxidante de esta fracción (Tabla 1) polarizó nuestra atención hacia la elucidación de su composición química. Por TLC (hexano / AcOEt 7:3, *oleum*, 120 °C, 20 minutos) se presentó como una mezcla de cuatro sustancias, procediéndose a su separación por cromatografía en columna. A tal objeto se adsorbieron los 490 mg obtenidos de la separación cromatográfica anterior sobre 2 g de SiO_2 (0.06-0.2 mm) y se colocó como "cabeza cromatográfica" sobre una columna de baja presión rellena con 10 g de SiO_2 (0.04-0.06 mm) en húmedo (hexano) y aplicó el eluyente (hexano / AcOEt 100-x : x, x=0-100) mediante un motor, incrementando la proporción de AcOEt en un 5% cada 500 mL eluidos. La monitorización de las sucesivas fracciones por TLC (hexano/ AcOEt/ AcOH 70:30:00 y 80:20:5, *oleum*, 120 °C, 20 minutos) nos permitió diferenciar las fracciones que contenían las cuatro sustancias puras. La atranorina (**1**) se eluyó de la columna cromatográfica anterior con con hexano/ AcOEt (80:20); evaporación del disolvente de las fracciones que lo contenían en rotavapor rindió 35 mg del metabolito ($R_f=0.74$ con el eluyente estándar C).¹⁰ Una mezcla (80:20) de atranorina (**1**) y cloroatranorina

(**2**) (mezcla A-C) se eluyó de la columna cromatográfica anterior con hexano/ AcOEt (75:25); evaporación del disolvente de las fracciones que lo contenían en rotavapor rindió 40 mg de la mezcla de metabolitos ($R_f=0.74$ y 0.76 con el eluyente estándar C).¹⁰ El ácido ursólico (**6**) se eluyó de la columna cromatográfica anterior con hexano/ AcOEt (70:30); evaporación del disolvente de las fracciones que lo contenían en rotavapor rindió 33 mg del metabolito ($R_f=0.49$ con el eluyente estándar C).¹⁰ Finalmente, la 2'-O-metilfisodona (**3**) se eluyó de la columna cromatográfica anterior con hexano/ AcOEt (60:40); evaporación del disolvente de las fracciones que lo contenían en rotavapor rindió 25 mg del metabolito ($R_f=0.33$ con el eluyente estándar C).¹⁰ Dichas cuatro sustancias fueron identificadas por espectroscopía. Las constantes físicas y los datos espectroscópicos de estos compuestos se aportan en el material suplementario.

Investigación de la composición química de la fracción cromatográfica antioxidante 9

La moderada actividad antioxidante de esta fracción (Tabla 1) nos llevó a averiguar su composición química. Por TLC (hexano / AcOEt 7:3, *oleum*, 120 °C, 20 minutos) se presenta como una mezcla de dos sustancias mayoritarias, procediéndose a su separación por cromatografía en columna. A tal objeto se adsorbieron los 500 mg obtenidos de la separación cromatográfica anterior sobre 2 g de SiO_2 (0.06-0.2 mm) y se colocó como "cabeza cromatográfica" sobre una columna de baja presión rellena con 10 g de SiO_2 (0.04-0.06 mm) en húmedo (hexano) y aplicó el eluyente (hexano / AcOEt 100-x : x, x=0-100) mediante un motor, incrementando la proporción de AcOEt en un 5% cada 500 mL eluidos. La monitorización de las sucesivas fracciones por TLC (hexano / AcOEt / AcOH 70:30:00 y 80:20:5, *oleum*, 120 °C, 20 minutos) nos permitió diferenciar las fracciones que contenían las dos sustancias puras. El ácido isofisódico (**4**) se eluyó de la columna cromatográfica anterior con hexano/ AcOEt (50:50); evaporación del disolvente de las fracciones que lo contenían en rotavapor rindió 250 mg del metabolito ($R_f=0.20$ con el eluyente estándar C).¹⁰ El ácido fisódico (**5**) se eluyó de la columna cromatográfica anterior con hexano/ AcOEt (40:60); evaporación del disolvente de las fracciones que lo contenían en rotavapor rindió 100 mg del metabolito ($R_f=0.18$ con el eluyente estándar C).¹⁰ Ambos metabolitos fueron identificados por espectroscopía. Las constantes físicas y los datos espectroscópicos de estas dos sustancias se aportan en el material suplementario.

Ensayos químicos de inhibición radicalaria (*Scavenging of the stable radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl – DPPH• assay*)

Una disolución en benceno 6.31×10^{-5} mol L^{-1} del radical libre estable DPPH• (3.9 ml), preparada diariamente, se colocó en una cubeta espectrofotométrica de cuarzo, y se adicionaron 100 μ L de la disolución metanólica de cada polifenol (a diferentes concentraciones en el intervalo 0.125 – 250 mmol L^{-1}). Se midió la caída de la absorbancia a 515 nm continuamente, con captura de datos a intervalos de 30 seg durante 50 min. La caída de la absorbancia con respecto al control (3.9 ml de DPPH• + 100 μ L de metanol) correspondiente al momento en el que se alcanzó la plataforma horizontal en cada curva de tipo absorbancia = f (t) se utilizó para calcular los datos de la Tabla 2. Aunque experimentalmente se trabajó a escala μ mol L^{-1} dentro de la cubeta espectrofotométrica, las concentraciones inhibitorias del 50% del radical inicial (IC_{50}) se han expresado como mmol L^{-1} , como ha sido propuesto.¹⁷ En la Figura 4 pueden observarse las curvas producidas por el polifenol más activo, que resultó ser la mezcla A-C [atranorina (**1**, 80%) + cloroatranorina (**2**, 20%)]. Como estándar positivo se utilizó experimentalmente el α -(+)-tocoferol.

Tabla 2. Destrucción del radical libre estable DPPH• por los cinco polifenoles aislados de *H. tavaresii* en comparación con el α -(+)-tocoferol (vitamina E) y el trolox.

Producto ensayado	IC ₅₀ , mmol L ⁻¹ (media \pm DE)
α -(+)-Tocoferol	7.59 \pm 0.25
Trolox	41.44 \pm 0.40 ¹⁸
Mezcla A-C	1400.00 \pm 4.48
2'-O-metil-fisodona (3)	3960.00 \pm 12.67
Atranorina (1)	4315.00 \pm 13.81
Ácido fisódico (5)	6273.60 \pm 20.08
Ácido isofisódico (4)	3782.00 \pm 12.10

La mezcla A-C corresponde a atranorina (1, 80%) + cloroatranorina (2, 20%). Los IC₅₀ son las concentraciones finales que neutralizan la mitad del DPPH• 61.52 mmol L⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de las fracciones con actividad antioxidante y su análisis químico

El talo líquénico seco se extrajo por maceración con acetona a temperatura ambiente. Se obtuvo así un material semicristalino (10% w/w) que se fraccionó por polaridad por cromatografía a media presión sobre SiO₂ con hexano y cantidades incrementales de acetato de etilo primero y acetato de etilo y cantidades incrementales de metanol después, lo que rindió once fracciones, de polaridad progresiva, que se diferenciaron por cromatografía en capa fina analítica.

Las fracciones anteriores se monitorizaron en lo que se refiere a su capacidad antioxidante encontrándose resultados positivos con dos de estas fracciones (denominadas 7 y 9). El malonaldehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenos (4-HDA) son productos finales del proceso de peroxidación lipídica que acontece mediante reacciones radicalarias en cadena y, por tanto, su cuantificación se puede usar para estimar el grado de oxidación lipídica. Así, homogeneizados de cerebro de rata se incubaron con H₂O₂ / FeSO₄ para provocar la peroxidación lipídica en ausencia –control– ó presencia de las diferentes fracciones cromatográficas. Las disoluciones obtenidas se sometieron a determinación analítica (MDA + 4-HDA) mediante un reactivo cromogénico (N-metil-2-fenilindol) que reacciona con MDA y 4-HDA produciendo un grupo cromóforo estable responsable de un máximo de absorbancia característico en el espectro visible. En la Tabla 1 y la Figura 3 se describen los resultados obtenidos para las dos fracciones activas (7 y 9) que, al inhibir la producción de MDA+4HDA, se muestran como antioxidantes. Obsérvese (Figura 3) que son más poderosas que la melatonina (MEL), un antioxidante conocido.

La actividad antioxidante de las fracciones cromatográficas 7 y 9 polarizó nuestra atención hacia la identificación de sus componentes químicos. Por TLC se presentan como una mezcla de cuatro sustancias mayoritarias dentro de 7 y dos dentro de 9, por lo que se procedió a su separación por cromatografía en columna a baja presión y TLC preparativa. Ello nos llevó a seis productos homogéneos por TLC procediéndose a su análisis espectroscópico por espectrometría de masas (MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (¹H-NMR). Estos seis productos fueron identificados respectivamente como atranorina (1), mezcla A-C –atranorina (1), 80% + cloroatranorina (2), 20%–, ácido ursólico (6), 2'-O-metilfisodona (3), ácido isofisódico (4) y ácido fisódico (5).

Elucidación estructural de la atranorina (1)

La Figura 1 muestra la estructura de este compuesto. Sus

constantes físicas y datos espectroscópicos están de acuerdo con los publicados previamente para él.¹⁰

Elucidación estructural de la cloroatranorina (2) dentro de la mezcla A-C

Sus espectros de ¹H-NMR y de masas informan que este producto se encuentra como constituyente de una mezcla de atranorina (1, 80%) y cloroatranorina (2, 20%). En el mencionado espectro de masas se observan los típicos pares de señales separadas por dos unidades de masa debidos a los dos isótopos (35/37) del cloro. Así, el ión molecular origina picos a m/z 374 (C₁₉H₁₈O₈, 6.13%, atranorina) y a 408 /410 (C₁₉H₁₇O₈Cl, 1.23%, cloroatranorina). El espectro de ¹H-NMR de esta mezcla presenta dos hombros en las señales correspondientes al protón aldehídico ($\Delta\delta = -0.0077$ ppm) y el metilo aromático sobre C-6 ($\Delta\delta = +0.0142$ ppm), lo que delata a la cloroatranorina (2) como la sustancia que, aunque minoritariamente, acompaña a atranorina. La composición de esta mezcla se confirmó por HPLC según los tiempos de retención previamente publicados⁶ para la atranorina (tr = 9.1 min) y cloroatranorina (tr=11.3 min) en las condiciones de fase reversa [μ -Bondapack-C₁₈, ácido acético/ agua/ metanol (0.4:19.6:80.0 v/v/v), 0.8 mL min⁻¹]. Los intentos de purificar la cloroatranorina por TLC preparativa sobre placas de gel de sílice, tanto en condiciones ácidas como básicas, fracasaron por la razón de que se hidrolizó siempre en dichas condiciones para dar los dos componentes aromáticos monocíclicos que la constituyen, el cloroatranol y el β -orselinato de metilo.⁶

Elucidación estructural del ácido ursólico (6)

La Figura 2 muestra la estructura de este compuesto. Sus constantes físicas y datos espectroscópicos están de acuerdo con los publicados previamente.¹⁰

Elucidación estructural de la 2'-O-metilfisodona (3)

La Figura 1 muestra la estructura de este compuesto. Sus constantes físicas y datos espectroscópicos están de acuerdo con los publicados previamente para él.¹⁰

Elucidación estructural del ácido isofisódico (4)

La Figura 1 muestra la estructura de este compuesto. Sus constantes físicas están de acuerdo con los publicados previamente para él.¹⁸ El espectro de masas muestra picos a m/z (%) 428 (5), 427 (28), 426 (M-CO₂, 100), 370 (12), 257 (2), 249 (27), 248 (11), 231 (2), 229 (2), 219 (2), 192 (10), 179 (4), 178 (14), 163 (3), 150 (9), 123 (15), 99 (2), 91 (4), 69 (6), 55 (4). El espectro de ¹H-NMR muestra señales a δ 0.71 (3H, t, J=6.6 Hz, CH₃), 0.86 (3H, t, J=6.5 Hz, CH₃), 1.00-1.70 (12H, m, 6xCH₂), 1.47 (1H, br s, Ar-OH), 2.43 (2H, t, J=7.5 Hz, H-3''), 2.51 (1H, br s, Ar-OH), 3.00 (1H, br s, Ar-OH), 3.26 (2H, m, H-1'''), 6.00 (1H, d, J=1.3 Hz, H-3), 6.09 (1H, s, H-1''), 6.30 (1H, d, J=1.3 Hz, H-5) y 6.41 (1H, s, H-3').

Elucidación estructural del ácido fisódico (5)

La Figura 1 muestra la estructura de este compuesto. Sus constantes físicas y datos espectroscópicos están de acuerdo con los publicados previamente para él.¹⁰

Actividad inhibidora de radicales libres mediante el ensayo del DPPH•

Una vez que quedaron identificados estructuralmente los metabolitos se pudo abordar la capacidad antioxidante de los polifenoles (1-5) mediante el conocido ensayo de inhibición del radical estable 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (*The DPPH• test*). El ensayo del DPPH• para estimar la actividad antioxidante de compuestos químicos (AH)

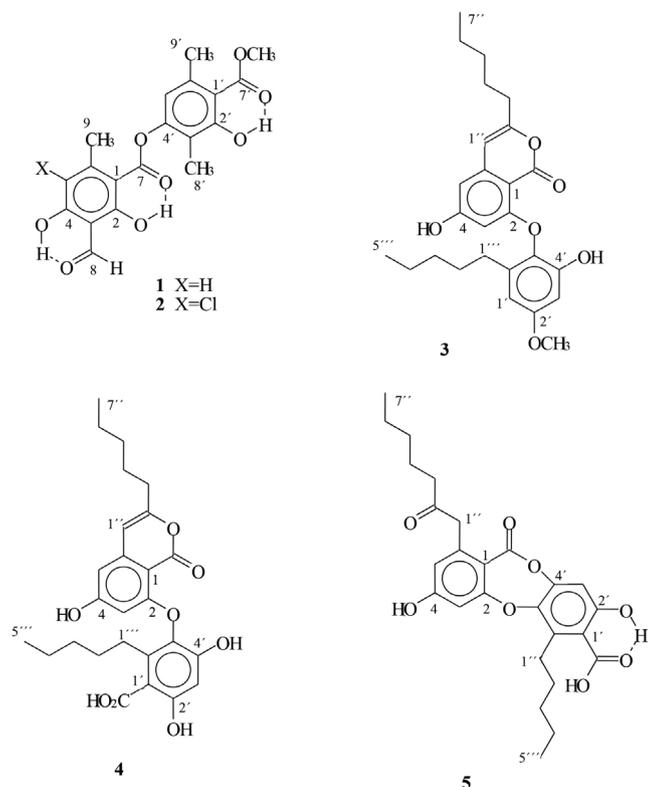


Figura 1. Polifenoles aislados a partir de *Hypogimmia tavaresii*. Atranorina (1), cloroatranorina (2), 2'-O-metilfisodona (3), ácido isofisódico (4) y ácido fisódico (5)

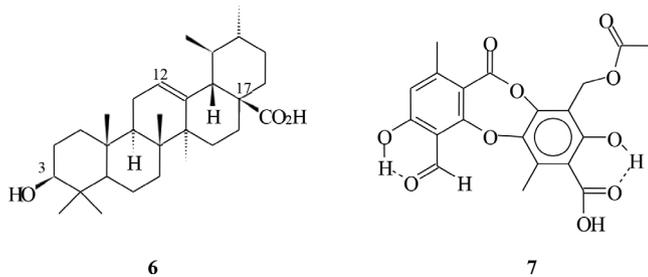


Figura 2. Estructura del ácido ursólico (6) y del ácido fisodálico (7)

Oxidación lipídica de un homogeneizado de cerebro de rata

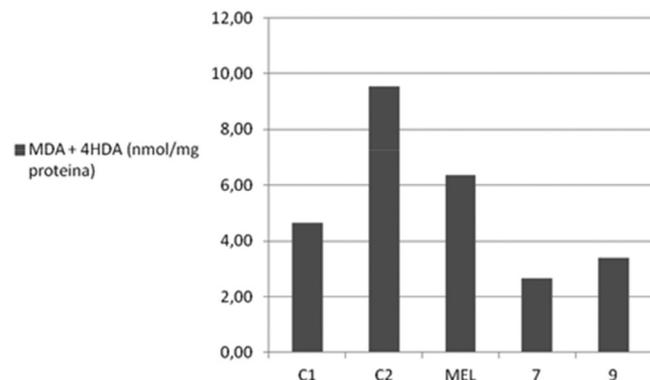


Figura 3. Homogeneizados de cerebro de rata se oxidaron a MDA+4HDA (H_2O_2 150 μM + Fe^{+2} 15 μM). Obsérvese cómo es inhibida dicha oxidación por la melatonina (MEL) y dos de las fracciones cromatográficas de *H. tavaresii* (fracciones 7 y 9)

fue propuesto por primera vez por Blois en 1958.¹⁹ Luego fue desarrollado por Brand-Williams y col. en 1995 en una forma que fue adoptada por la mayoría de los investigadores.²⁰ Los antioxidantes AH reaccionan con el radical DPPH• transformándolo en 2,2-difenil-1-picril-hidracina (DPPHH) debido a su habilidad donante de H. La magnitud de la decoloración indica el poder antiradical de los compuestos antioxidantes. En el experimento, diferentes concentraciones de AH se aplican para determinar la concentración de AH que destruye el 50% del radical DPPH• inicial en un específico, aunque arbitrario, intervalo de tiempo. Esta concentración se denomina EC₅₀ (concentración eficiente) ó IC₅₀ (concentración inhibitoria), la cual es la concentración, expresada en mmol L⁻¹ necesaria para que la absorbancia que el radical DPPH• produce a 515 nm decaiga en un 50%. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 de forma comparada con la actividad del α -(+)-tocoferol (vitamina E) y del trolox.²¹ Puede observarse cómo todos los polifenoles presentan actividad protectora de los radicales libres, aunque en una magnitud 180 – 800 veces inferior a la de la vitamina E. Sobresale la relativamente alta actividad de la mezcla A-C (atranorina, 80% + cloroatranorina, 20%), que informa del posible papel del átomo de cloro en la deslocalización –y consiguiente estabilización– del radical libre fenoxi (Ar-O•) de la cloroatranorina (2). Este resultado está de acuerdo con lo publicado previamente, donde se dice que la cloroatranorina tiene una actividad inhibitoria del radical libre DPPH• 150% superior que la atranorina.²²

Polifenoles liquénicos y estrés oxidativo

Durante el proceso respiratorio en la célula, la molécula de O₂ se reduce a agua. Sin embargo, también es posible su reducción incompleta, lo que genera especies de oxígeno reactivo (ROS) altamente oxidantes como son el anión-radical superóxido (O₂•⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (HO•). Por otra parte, la radiación ultravioleta (UVA) transforma la molécula de oxígeno singlete (¹O₂) a un estado excitado, llamado oxígeno triplete (³O₂) que actúa como un diradical. Dichas especies, entre otras, atacan a las moléculas de DNA, proteínas y lípidos pudiendo generar necrosis ó incluso muerte celular.²³ Para prevenir la acumulación de ROS en la célula, sus sistemas antioxidantes actúan neutralizándolos, o sea, aboliendo su poder oxidativo. Dichos sistemas implican una cascada de moléculas redox entre las que se encuentran las vitaminas antioxidantes –vitamina C y E–.²⁴ Cuando el equilibrio redox se ve alterado aparece el estrés oxidativo. Este desequilibrio puede deberse tanto a

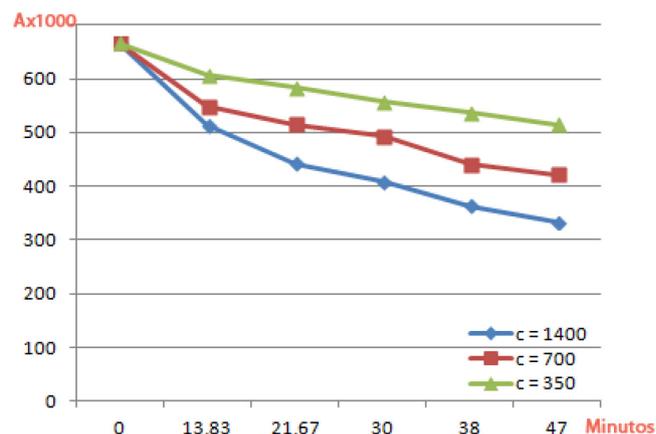


Figura 4. Destrucción del radical libre estable DPPH• por la mezcla A-C aislada de *H. tavaresii*. Obsérvese cómo a los 47 minutos se ha rebajado la absorbancia (515 nm) a la mitad para la concentración fenólica 1400 μmol L⁻¹ –el ID50 es, pues, 1400 mmol L⁻¹–. La mezcla A-C corresponde a atranorina (1,80%) + cloroatranorina (2,20%)

la sobreproducción de ROS como a una deficiencia en el sistema antioxidante.²⁵ Si la producción de ROS es excesiva, se producen daños irreversibles; sin embargo, los aumentos moderados ó transitorios de ROS no son letales, pudiendo ser detoxificados en unas pocas horas. Este fenómeno – el estrés oxidativo- es presumible que se presenta en los líquenes, especialmente en los que habitan regiones de mucha iluminación solar, como el archipiélago canario, y es para defenderse del mismo para lo que biosintetizan metabolitos de naturaleza polifenólica.⁶ Estos fenoles (Ar-OH) son ampliamente conocidos como inhibidores de ROS,^{4,26} a los que neutralizan transfiriéndoles el átomo de hidrógeno fenólico para dar como productos unos nuevos radicales Ar-O• estabilizados por deslocalización electrónica y, por tanto, menos dañinos.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se aporta el estudio de los metabolitos biosintetizados por el líquen *H. tavaresii*. Se identificaron por espectroscopía seis compuestos, atranorina (**1**), clorotranorina (**2**), 2'-O-metilfisodona (**3**), ácido isofisódico (**4**), ácido fisódico (**5**) y ácido ursólico (**6**), de los que tres (**3**, **4** y **6**) se citan aquí por primera vez para esta especie. La actividad antioxidante de los polifenoles anteriores, expresada mediante sus valores IC₅₀, se comparó con la de antioxidantes conocidos, demostrándose que dichos compuestos son activos, aunque 180-800 veces menos que la sustancia de referencia, el α -(+)-tocopherol. Estos resultados apoyan la tesis de que *H. tavaresii* fabrica y acumula altas concentraciones de dichos metabolitos para combatir el estrés oxidativo, protegiendo las membranas celulares y el citoplasma de la peroxidación al reducir la concentración de los radicales peroxídicos, previniendo así el daño celular.

Por añadidura, se concluye que *H. tavaresii* es una buena materia prima para obtener extractos moderadamente antioxidantes. Es de esperar que esta información químio-específica ayude en las futuras aplicaciones biotecnológicas de dicha especie.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Los espectros de ¹H-NMR y de MS de los compuestos **1**, **3**, **4**, **5** y **6** pueden consultarse libremente en <http://quimicanova.sbq.org.br>, en formato PDF. Para otros datos contactar a los autores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero dado por el Gobierno Canario al proyecto SI-697 (ULPAPD-08/01-5) a través de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI) así como por el Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC).

REFERENCIAS

- Halliwell, B.; *Nutr. Rev.* **1997**, *55*, S44.
- Pandey, K. B.; Rizvi, S. I.; *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2009**, *2*, 270.
- Meo, F.D.; Lemaury, V.; Cornil, J.; Lazzaroni, R.; Duroux, L.; Olivier, Y.; Trouillas, P.; *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 2082.
- Iglesias, J.; Medina, I.; Pazos, M. En *Polyphenols in Human Health and Disease, Vol. 1*; Watson, R. R.; Preedy, V. R.; Zibadi, S., eds.; Academic Press, Elsevier Inc: USA, 2004, cap. 25.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841.
- Toledo Marante, F. J.; García Castellano, A.; Estevez Rosas, F.; Quintana Aguiar, J.; Bermejo Barrera, J.; *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 2049.
- Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansman, C.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 632; Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Saura-Calixto, F.; *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *76*, 270; Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Saura-Calixto, F.; *Food Res. Int.* **1999**, *32*, 407.
- Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; Minter, D. W.; Stalpers, J. A.; *Ainswrth & Bisby's Dictionary of the fungi*, 10th ed., CABI Europe: Reino Unido, 2008, p. 784.
- Feurerer, T.; Hawksworth, D. I.; *Biodivers. Conserv.* **2007**, *16*, 85
- Culberson, C. F.; *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*, The University of North Carolina Press: Chapel Hill, North Carolina, 1969; Huneck, S.; Yoshimura, I.; *Identification of Lichen Substances*, Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, 1996. Molnár, K.; Farkas, E.; *Z. Naturforsch. C* **2010**, 157.
- Lendemmer, J. C.; *Castanea* **2012**, *77*, 89.
- Stojanovic, G.; Stojanovic, I.; Smelcerovic, A.; *Org. Chem.* **2012**, *9*, 178.
- Boustie, J.; Grube, M.; *Plant Genet. Resour.* **2005**, *3*, 273.
- Hawksworth, D. L.; *The Lichenologist* **1973**, *5*, 452.
- Elix, J. A.; Stocker-Wörgötter, E. En *Lichen Biology*; Nash, T. H., ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2008, p. 104.
- Latkowska, E.; Bober, B.; Chrapusta, E.; Adamski, M.; *Phytochemistry* **2015**, *118*, 116.
- Benabadji, S. H.; Wen, R.; Zheng, J.-B.; Dong, X.-C.; Yuan, S.-G.; *Acta Pharmacol. Sin.* **2004**, *25*, 666.
- Asahina, Y.; Nogami, H.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1934**, *67B*, 805.
- Blois, M. S.; *Nature* **1958**, *181*, 1199.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; *LWT-Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25.
- Manojlovic, N. T.; Vasiljevic, P. J.; Gritsanapau, W.; Supabphol, R.; Manojlovic, I.; *Biol. Res.* **2010**, *43*, 169.
- Valencia-Islands, N.; Zambrano, A.; Rojas, J. L.; *J. Chem. Ecol.* **2007**, *33*, 1619.
- Vaughan, M.; *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18513.
- Sies, H.; Stahl, W.; Sundquist, A. R.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1992**, *669*, 7.
- Michiels, C.; Remacle, J.; *Eur. J. Biochem.* **1988**, *177*, 435
- Rice-Evans, C. En *Antioxidant Food Supplements in Human Health*; Packer, L.; Hiramatsu, M.; Yoshikawa, T., eds.; Academic Press, Elsevier Inc: USA, 1999, cap. 16.