

## ESTUDIOS QUÍMICOS EN RAMALINA FARINACEA (L.) ACH. DEL CENTRO DE ESPAÑA

por

ROSARIO ARROYO CABEZA\* & ESTEBAN MANRIQUE REOL\*\*

### Resumen

ARROYO CABEZA, R. & E. MANRIQUE REOL (1988). Estudios químicos en *Ramalina farinacea* (L.) Ach. del centro de España. *Anales Jard. Bot. Madrid* 45(1): 53-59.

Mediante el análisis por técnicas de TLC y HPLC de diversas poblaciones de *Ramalina farinacea* (L.) Ach. de la provincia de Madrid y alrededores (España), se ha comprobado la presencia de tres quimiótipos de los descritos para esta especie en Europa. Quimiótipo I (1,6%), sin sustancias líquénicas; quimiótipo II (97,3%), con ácido protocetrárico, y quimiótipo III (1,07%), con ácido salacínico y ácido norestictico. También se han encontrado tres sustancias no identificadas que no han sido mencionadas anteriormente en esta especie.

Palabras clave: *Ramalina*, líquenes, quimiotaxonomía, Madrid, España.

### Abstract

ARROYO CABEZA, R. & E. MANRIQUE REOL (1988). Chemical studies on *Ramalina farinacea* (L.) Ach. from central Spain. *Anales Jard. Bot. Madrid* 45(1): 53-59 (in Spanish).

By means of TLC and HPLC analysis of several populations of *Ramalina farinacea* (L.) Ach. from the region of Madrid (Spain), three of the chemotypes previously described for this species in Europe have been evidenced: chemotype I (1,6%), without lichen substances; chemotype II (97,3%), with protocetraric acid, and chemotype III (1,07%), with salacinic acid and norstictic acid. Three unidentified substances not previously mentioned in this species have also been found.

Key words: *Ramalina*, lichens, chemotaxonomy, Madrid, Spain.

### INTRODUCCIÓN

El complejo *Ramalina farinacea-Ramalina subfarinacea* presenta una gran variabilidad morfológica, química y ecológica que ha provocado la realización de diversos estudios encaminados a su diferenciación (CULBERSON, 1966; HAWKSWORTH, 1968; KROG & JAMES, 1977). Estos autores, tras el estudio de poblaciones de ambos táxones, intentaron correlacionar la morfología con los caracteres químicos, y éstos, a su vez, con la ecología. C. F. Culberson recoge en su obra (CULBERSON, 1969, 1970; CULBERSON & al., 1977) los análisis químicos que sobre estos táxones se habían realizado. Para *Ramalina farinacea* (L.) Ach. cita ácido

\* Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Biología, Universidad Complutense. 28040 Madrid.

\*\* Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. 28040 Madrid.

protocetrárico, no habiéndose encontrado hasta entonces ningún ejemplar deficiente en ácidos; únicamente se encontraron individuos con ácido hipoprotocetrárico (CULBERSON, 1965), lo que llevó a W. L. Culberston a describir como especie nueva aquellos individuos que contenían este ácido, *Ramalina hypoprotocetrarica* Culb. (CULBERSON, 1966). De la misma forma encuentra ácido salacínico y ácido norestictico en los ejemplares de *R. farinacea* var. *reagens* B. de Lesd., a la que asigna el rango de especie *R. reagens* (B. de Lesd.) Culb. Posteriormente, HAWKSWORTH (1968) la incluyó con rango de variedad dentro de *R. subfarinacea* [*Ramalina subfarinacea* var. *reagens* (B. de Lesd.) D. Hawksw.]. KROG & JAMES (l.c.) reconocieron dos especies, *R. farinacea* (L.) Ach. y *R. subfarinacea* (Nyl. in Crombie) Nyl., la primera corticícola y la segunda preferentemente saxícola, con cuatro y cinco quimiótipos respectivamente. Estos mismos autores no encuentran correlación entre los caracteres químicos y la morfología, por lo que no admiten las especies químicas descritas por CULBERSON (l.c.).

Los diferentes quimiótipos de *R. farinacea* poseen áreas de distribución coincidentes, aunque con algunas diferencias en su abundancia relativa.

*R. subfarinacea* es una especie descrita como predominantemente costera, sobre rocas expuestas y muros (KROG & JAMES, l.c.; HARMAND, 1905). Por el contrario, *R. farinacea* tiene una amplia distribución en Europa, haciéndose rara hacia el N (Escandinavia y Finlandia).

En la Península Ibérica, *R. farinacea* ha sido ampliamente citada, mostrando una gran amplitud ecológica. No obstante, hasta el momento, se desconoce la variabilidad química de esta especie en España.

El propósito de este trabajo ha sido estudiar químicamente algunas poblaciones de *R. farinacea* de los bosques del centro de España.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

El material analizado ha sido recogido por nosotros en 19 localidades de la provincia de Madrid, dos de la de Segovia y dos de la de Guadalajara.

Se han analizado 373 muestras, recogidas de rocas —granitos y esquistos— o de cortezas de árboles y arbustos —*Quercus rotundifolia* Lam., *Q. coccifera* L., *Q. pyrenaica* Willd., *Fagus sylvatica* L., *Fraxinus angustifolia* Vahl, *Pinus pinaster* Aiton, *Castanea sativa* Miller y *Cistus ladanifer* L.—. Testigos de las muestras analizadas quedan depositados en el herbario MAF Lich.

Los análisis se han realizado mediante la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) descrita por CULBERSON & KRISTINSSON (1970), CULBERSON (1972) y modificada por MANRIQUE & CRESPO (1983), usando el disolvente A (tolueno-dioxano-ácido acético; 180:60:8), y placas de silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck 5554). Como controles se utilizaron en todas las placas: atranorina (Sigma Chem. Co.), ácido norestictico (extraído de *Parmelia acatubulum*) y ácido protocetrárico (extraído de *Parmelia caperata*). Ejemplares previamente seleccionados se analizaron por HPLC en un cromatógrafo Perkin Elmer Series 10 LC, utilizando metanol-agua-ácido fosfórico (75:25:1) como eluyente, a un flujo de 1 ml/min (1.500 psi). La separación se realizó a partir de 6 µl de extracto, en dos columnas montadas en serie de 12,5 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno cada una (Nucleosil 5 C18).

El aparato de detección fue un espectrofotómetro Lambda 1 Vis-UV (Perkin Elmer), equipado con una microcélula de 8 µl y fijado a 270 nm.

Como sustancias patrón para HPLC se utilizaron ácido usneico (Sigma Chem. Co.), y extractos acetónicos de *Parmelia caperata*, para ácido protocetrárico (WHITE & JAMES, 1985); de *Parmelia acetabulum*, para ácido norestictico, y de *Parmelia saxatilis*, para ácido salacínico. Las constantes de retención para cada sustancia detectada se han calculado de acuerdo con la técnica de HUOVINEN & al. (1985), usando como patrones internos acetona y BHT (butilhidroxitolueno). Los índices de retención (Ir) se hallaron según la fórmula:

$$Ir = \frac{Rt \text{ del compuesto} - Rt \text{ acetona}}{Rt \text{ BHT} - Rt \text{ acetona}}$$

Rt = Tiempo de retención en minutos

Todas las muestras seleccionadas para ser analizadas mediante HPLC se extrajeron con BHT 2 mg/ml en acetona.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis por TLC han permitido la detección de siete sustancias liquénicas, cuyas características cromatográficas y reacciones de coloración quedan recogidas en la tabla 1.

En la tabla 2 se recoge la variabilidad química de las muestras de *Ramalina farinacea* estudiadas, así como el sustrato en el que se hallaron. En todos los casos se detectó la presencia de ácido usneico en concentración muy variable de unos talos a otros, a veces por debajo del límite de sensibilidad de la técnica utilizada (TLC). Por HPLC, el ácido usneico aparece como un pico de altura y área variable que cuando está en muy pequeña concentración se confunde con la cola del pico del estándar interno BHT (Rt = 24,53 y 23,14, respectivamente).

TABLA 1

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS Y REACCIONES DE COLORACIÓN DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS PRESENTES EN *RAMALINA FARINACEA* EN LA PROVINCIA DE MADRID Y ALREDEDORES

Sustancia	Rf/RfN, RfA × 100	Coloración
Ácido protocetrárico . . . . .	6/40,67	Gris oscuro *, PD+ naranja
Ácido salacínico . . . . .	15/38,65	Naranja *, PD+ naranja, K+ rojo
SDAM 1 . . . . .	21-22/40,67	Gris pálido *, Cl <sub>3</sub> Fe+ violeta
SDAM 3 . . . . .	28/40,67	Gris pálido amarillento *, Cl <sub>3</sub> Fe+ violeta
SDAM 2 . . . . .	38-39/40,66	Gris pálido amarillento *, Cl <sub>3</sub> Fe+ violeta
Ácido norestictico . . . . .	40/40,66	Amarillo *, PD+ amarillo, K+ rojo
Ácido usneico . . . . .	62/38,65	Gris verdoso

\* Coloración después de revelar con ácido sulfúrico al 10% en agua y calentando a 110 °C; PD+, coloración tras el revelado con una solución de para-fenilendiamina 2% en etanol 96%; K+, coloración tras el revelado con una solución de KOH 35% en agua, y Cl<sub>3</sub>Fe+, coloración tras el revelado con una solución de Cl<sub>3</sub>Fe 2% en etanol 96%.

TABLA 2

COMBINACIONES DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS ENCONTRADAS  
EN *RAMALINA FARINACEA*

	Usn.	Sal.	Norst.	Prot.	SD1	SD2	SD3	N.º de talos	
								Sax.	Cort.
<i>Ramalina farinacea</i> 1	+	-	-	-	+	-	-	-	6
2	+	-	-	+	-	-	-	3	168
3	+	-	-	+	+	-	-	1	173
4	+	-	-	+	-	+	-		8
5	+	-	-	+	+	+	-		7
6	+	-	-	+	+	-	+		2
7	+	-	-	+	+	+	+		1
8	+	+	+	-	-	-	-		4

Usn.: ácido usneico; Sal.: ácido salacínico; Norst.: ácido norestético; Prot.: ácido protocetrárico; SD1: SDAM 1; SD2: SDAM 2; SD3: SDAM 3; Sax.: saxicolos, y Cort.: corticólicas.

En las cromatografías de numerosos individuos de *R. farinacea* (52,6%) se observan, además de las sustancias líquénicas previamente descritas en la literatura, tres manchas no identificadas, visibles a la luz ultravioleta de 254 nm, que toman coloración gris amarillenta cuando se revelan con ácido sulfúrico, y coloración violácea, cuando se revelan con  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  en etanol, por lo que parecen ser sustancias fenólicas (ASAHINA & SHIBATA, 1954). Estas manchas aparecen combinadas de distinto modo en las muestras que no tienen otra sustancia líquénica o en aquellas que llevan ácido protocetrárico, nunca en las que llevan ácidos salacínico y norestético. Cada una de ellas queda identificada en la tabla 1.

Los análisis por HPLC de las sustancias o extractos líquénicos utilizados como patrón, así como las características cromatográficas de las diferentes sustancias encontradas en *Ramalina farinacea*, quedan recogidos en las tablas 3a y 3b.

En los individuos en los que por TLC únicamente se detecta una mancha (1,6%), SDAM 1, en HPLC se observa un único pico con Ir de 0,034. Estos talos podrían pertenecer al quimiótipo 4, deficiente en ácidos, descrito por KROG & JAMES (*l.c.*). Según estos autores, el quimiótipo 4 carecería de ácido protocetrárico, pero no dicen nada de la sustancia anteriormente mencionada. El análisis por HPLC de aquellos individuos con ácido protocetrárico (97,3%) demostró la presencia de un pico con Ir idéntico al del ácido protocetrárico de *Parmelia caperata* (0,157). Este sería el quimiótipo 1 de KROG & JAMES (*l.c.*), sin considerar la presencia de las sustancias SDAM 1, SDAM 2 y SDAM 3; sería pues, con mucho, el quimiótipo de *R. farinacea* más abundante en la flora madrileña. La distinción entre éste y el primer quimiótipo aquí mencionado sería observable mediante la reacción con PD en la médula, PD+ amarillo-naranja y PD-, respectivamente.

De entre los especímenes analizados, un 1,07% reacciona K+ rojo y PD+ amarillo en la médula. El análisis de éstos por TLC revela la presencia de los ácidos salacínico y norestético, ambos depsidonas del  $\beta$ -orcinol con una función aldehído. Por HPLC se detectan en estos especímenes dos picos, uno con Ir de

TABLA 3a

TIEMPOS DE RETENCIÓN (Rt) E ÍNDICES DE RETENCIÓN (Ir) DE LAS SUSTANCIAS UTILIZADAS COMO PATRÓN PARA HPLC

Sustancia	Rt	Ir
Acetona . . . . .	2,54	0
Ácido salacínico . . . . .	3,86	0,045
Ácido norestíctico . . . . .	5,50	0,126
Ácido protocetrárico . . . . .	6,11	0,157
BHT . . . . .	23,14	1,0
Ácido usneico . . . . .	24,53	1,078

TABLA 3b

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DE LAS DIFERENTES SUSTANCIAS ENCONTRADAS EN *RAMALINA FARINACEA* MEDIANTE HPLC

Sustancia	Rt	Ir
SDAM 2 . . . . .	2,66	-0,017
SDAM 1 . . . . .	3,60	0,034
Ácido salacínico . . . . .	3,84	0,046
Ácido norestíctico . . . . .	5,44	0,126
Ácido protocetrárico . . . . .	6,27	0,156
Ácido usneico . . . . .	24,94	1,081

0,05 coincidente con el del ácido salacínico de *Parmelia saxatilis*, y otro, en menor concentración pero presente en todos los casos, con Ir de 0,13 igual al del ácido norestíctico de *Parmelia acetabulum*. Este quimiótipo sería el número 2 de KROG & JAMES (*l.c.*) que CULBERSON (1966) describió como *Ramalina reagens* Culb.

En las poblaciones de *R. farinacea* del NW de Europa, la frecuencia de aparición de cada quimiótipo (ácido protocetrárico, 70%; ácido salacínico con o sin ácido norestíctico, 20%; ácido hipoprotocetrárico, menos del 10%; cf. KROG & JAMES, *l.c.*) es distinta de la indicada en este trabajo para el centro de España (ácido protocetrárico, 97,3%; ácido salacínico con ácido norestíctico, 1,07%; SDAM 1, 1,6%). En las poblaciones estudiadas por nosotros no se detecta el quimiótipo con ácido hipoprotocetrárico y todos ellos se encuentran creciendo mezclados, aunque los especímenes con ácido salacínico y ácido norestíctico viven únicamente en los bosques del piso supramediterráneo (RIVAS MARTÍNEZ, 1982) de la provincia de Madrid (fig. 1).

KROG & JAMES (*l.c.*) describen, además de los quimiótipos de *R. farinacea* ya considerados aquí, cinco quimiótipos de *R. subfarinacea*, especie predominantemente saxícola y de distribución costera. Cuatro talos del total de los analizados, que se recogieron sobre rocas graníticas y esquistosas presentan ácido protocetrárico y/o SDAM 1, como se deduce de los análisis por TLC y HPLC; a pesar de ello

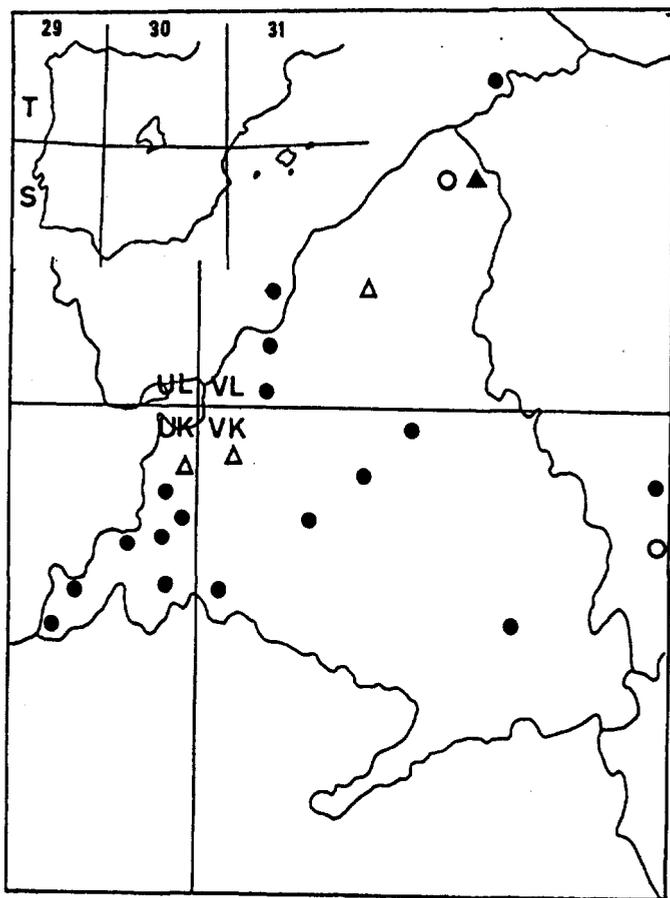


Fig. 1.—Distribución de *Ramalina farinacea* (L.) Ach. en la provincia de Madrid y alrededores. Quimiótipo I: sin ácido protocetrárico y con SDAM 1; PD- y K- en médula; quimiótipo II: con ácido protocetrárico y SDAM 1, SDAM 2, SDAM 3; PD+ amarillo y K- en médula; quimiótipo III: con ácido salicílico y ácido norestético; PD+ amarillo-naranja y K+ rojo en médula. ● (II), ○ (I y II), △ (II y III) y ▲ (I, II y III).

preferimos pensar que se trata de *R. farinacea* viviendo sobre roca y no de *R. subfarinacea* quimiótipo 4, aunque morfológicamente son difíciles de diferenciar solo por el tamaño de los soredios, que es mayor en esta última (farinosos y subgranulares, respectivamente). Esto apoyaría la idea de los autores mencionados de que *R. subfarinacea* estaría ausente de aquellas áreas de climas fuertemente continentales, como lo es el del centro de la Península Ibérica. Además, todos los ejemplares analizados, a pesar de la variabilidad química encontrada, son morfológicamente idénticos y caen dentro de la variación que admiten KROG & JAMES (*l.c.*) para *R. farinacea* (soredios farinosos y lacinias subpendulares de hasta 10 cm de longitud).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el marco del Proyecto de Investigación subvencionado por CAICYT, número 2954/83 CO2-02.

## RELACIÓN DE LOCALIDADES

MADRID: Aldea del Fresno, 500 m, 30TUK9666; Arganda, 650 m, 30TVK6459; Boadilla del Monte, 600 m, 30TVK2974; Cenicientos, Minga Morena, 800 m, 30TUK6753; Cerceda, 900 m, 30TVL2015; Colmenar del Arroyo, 700 m, 30TUK9678; Collado Mediano, cerro del Castillo, 1000 m, 30TVL1504; Chapinería, 650 m, 30TUK9772; El Escorial, 1000 m, 30TVK0291; El Pardo, lomas del Corcho, 650 m, 30TVK3787; hayedo de Montejo, 1300 m, 30TVL5850; La Almenara, 1257 m, 30TUK9378; La Hiruela, 1200 m, 30TVL6349; puerto de Canencia, arroyo de Canencia, 1500 m, 30TVL3426; río Cofio, 700 m, 30TUK8878; Robledo de Chavela, 700 m, 30TUK9586; Rozas de Puerto Real, 900 m, 30TUK7162; Soto de Viñuelas, 740 m, 30TVL6714; Villanueva de Perales, 600 m, 30TVK0967.

GUADALAJARA: Armuña de Tajuña, 700 m, 30TVK9576; Hueva, 940 m, 30TWK0579.

SEGOVIA: Riaza, 1200 m, 30TVL6371; Valsaín, 1200 m, 30TVL1025.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASAHINA, Y. & SHIBATA, S. (1954). *Chemistry of lichen substances*. Japan Society for the Promotion of Science, Tokio.
- CULBERSON, C. F. (1965). Some constituents of the Lichen *Ramalina siliquosa*. *Phytochemistry* 4: 951-961.
- CULBERSON, C. F. (1969). *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*. Chapel Hill, N. C.
- CULBERSON, C. F. (1970). Supplement to "Chemical and Botanical Guide to Lichen Products". *Bryologist* 73: 177-377.
- CULBERSON, C. F. (1972). Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *J. Chromatogr.* 72: 113-125.
- CULBERSON, C. F., CULBERSON, W. L. & JOHNSON, A. (1977). *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*, supl. 2. St. Louis: Missouri Botanical Garden.
- CULBERSON, C. F. & KRISTINSSON, H. (1970). A standardized method for the identification of lichen products. *J. Chromatogr.* 46: 85-93.
- CULBERSON, W. L. (1966). Chemie et taxonomie des lichens du groupe *Ramalina farinacea* en Europe. *Rev. Bryol. Lichénol.* 34: 841-851.
- HARMAND, J. (1905). *Lichenes de France*. Epinal.
- HAWKSWORTH, D. L. (1968). A note on the chemical strains of the lichen *Ramalina subfarinacea*. *Bot. Not.* 121: 317-320.
- HUOVINEN, K., HILTUNEN, R. & SCHANTZ, M. VON (1985). A high performance liquid chromatographic method for the analysis of lichen compounds from the genera *Cladonia* and *Cladonia*. *Acta Pharm. Fenn.* 94: 99-112.
- KROG, H. & JAMES, P. W. (1977). The genus *Ramalina* in Fennoscandia and the British Isles. *Norweg. J. Bot.* 24: 15-43.
- MANRIQUE, E. & CRESPO, A. (1983). Sobre *Melanelia acetabulum* (Neck.) Essl. en la Península Ibérica: caracterización química y distribución. *Lazaroa* 5: 269-275.
- RIVAS MARTÍNEZ, S. (1982). *Mapa de las series de vegetación de Madrid*. Diputación de Madrid, Madrid.
- WHITE, F. J. & JAMES, P. W. (1985). A new guide to microchemical techniques for the identification of lichen substances. *Brit. Lichen Soc. Bull.* 57 Suppl.: 1-41.