

ESTUDIOS QUÍMICOS DEL GÉNERO RAMALINA ACH. EN EL CENTRO DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

por

ROSARIO ARROYO CABEZA * & ESTEBAN MANRIQUE REOL **

Resumen

ARROYO CABEZA, R. & E. MANRIQUE REOL (1989). Estudios químicos del género *Ramalina* Ach. en el centro de la Península Ibérica. *Anales Jard. Bot. Madrid* 46(1): 307-315.

Se presentan los análisis químicos por TLC y HPLC de varias poblaciones de algunas especies del género *Ramalina* Ach. en las provincias de Guadalajara, Madrid y Segovia. Se ha detectado ácido sekikaico en *R. calicaris*, y los ácidos evérnico y obtusático en *R. fastigiata* y *R. pollinaria*. Asimismo, se han detectado ácido norestístico y ácido connorestístico en *R. polymorpha*, y los ácidos sekikaico y homosekikaico en ejemplares agrupados como *Ramalina* sp. El ácido usneico, característico de todo el género, muestra gran variabilidad en su concentración.

Palabras clave: Líquenes, *Ramalina*, quimiotaxonomía, España.

Abstract

ARROYO CABEZA, R. & E. MANRIQUE REOL (1989). Chemical studies of the genus *Ramalina* Ach. in Central Spain. *Anales Jard. Bot. Madrid* 46(1): 307-315 (in Spanish).

Several populations of various species of *Ramalina* Ach. from Guadalajara, Madrid and Segovia (Spain) have been analysed by TLC and HPLC. Sekikaic acid in *R. calicaris*, evernic and obtusatic acids in *R. fastigiata* and *R. pollinaria*, norstictic and connorstictic acids in *R. polymorpha*, and sekikaic and homosekikaic acids in a unknown *Ramalina* sp., have been detected. Usneic acid, which is characteristic of the whole genus, exhibits a highly variable concentration.

Key words: Lichens, *Ramalina*, chemotaxonomy, Spain.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Ramalina* Ach. se caracterizan por presentar una gran variabilidad morfológica, quizá debida a adaptaciones ambientales que en muchos casos hacen muy difícil su reconocimiento y determinación. A ésta se une además una alta variabilidad en la composición de sustancias líquénicas que provoca reacciones medulares intermedias o nuevas. Con el fin de entender mejor la posición sistemática y variabilidad química de algunas especies del género, se han realizado algunos estudios (CULBERSON, 1965, 1967; CULBERSON, 1966; HAWKS-

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

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

WORTH, 1968; SHEARD & JAMES, 1976; SHEARD, 1978; KROG & JAMES, 1977; KROG & ØSTHAGEN, 1980). Los más recientes y completos son los realizados por Krog & James y Krog & Østhagen en Fenoscandia e Islas Canarias, respectivamente. Estos autores tienen en cuenta no solo la morfología de las especies, sino también la anatomía y química del talo, estudiando incluso aquellas características del material tipo. De sus estudios se deduce la gran importancia que adquiere la composición química en las especies del género *Ramalina*, siendo en muchos casos el único carácter diferencial [*R. fraxinea* var. *calicariformis* Nyl. — *R. calicaris* (L.) Fr., *R. polymorpha* pp. —, *R. pollinaria* (Westr.) Ach.].

Análisis de este tipo en España, en *Ramalina*, solo se han realizado en *R. farinacea* (L.) Ach. en Madrid (ARROYO & MANRIQUE, 1988). El presente trabajo, que se viene realizando como proyecto de tesis doctoral por uno de nosotros (Arroyo), pretende ser un avance al estudio del género *Ramalina* en España, donde existe bastante confusión en la correcta determinación de algunas especies. Además, en algunos casos, los trabajos de Krog & James han introducido puntos de confusión para aquellos liquenólogos que no pueden realizar en su laboratorio los análisis químicos mencionados.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material analizado ha sido recogido por nosotros mismos procedente de doce localidades de la provincia de Madrid, dos en la de Segovia y dos en la de Guadalajara. Cada localidad se registró mediante sus coordenadas UTM y altitud sobre el nivel del mar (figs. 1, 2).

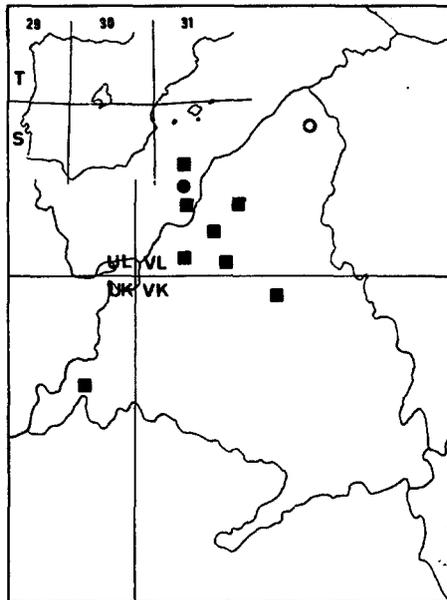


Fig. 1.—Mapa de distribución de *Ramalina calicaris* (L.) Fr., *Ramalina* sp. y *Ramalina polymorpha* s.l. ■ *R. polymorpha*; ● *R. calicaris*; ○ *R. polymorpha* y *Ramalina* s.p.

Se han analizado 391 especímenes recogidos sobre rocas (granitos, esquistos y gneises) o sobre cortezas de árboles o arbustos. Todos los pliegos analizados han quedado depositados en el herbario MAF Lich de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense (Madrid).

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 los disolventes A, B y C y placas de silicagel 60F254 (Merck 5554). Como controles se llevaron en todas las placas atranorina (Sigma Chem. Co.), ácido norestíctico [extraído de *Parmelia acetabulum* (Neck.) Duby y ácido protocetrárico (extraído de *Parmelia caperata* (L.) Ach.]. Algunos especímenes previamente seleccionados y cuya composición química era ya conocida por TLC, se analizaron por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Perkin-Elmer Series 10 LC, utilizando metanol-agua-ácido fosfórico (75:25:1 ó 82:18:1, según los casos) como fase móvil, a un flujo de 1 ml/min. La separación se realizó a partir de 6 µl de extracto, en dos columnas montadas en serie de 12,5 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno cada una (Nucleosil 5 C18), con la primera fase móvil, o una columna de 25 cm × 4,6 mm, 5 µm Spherisorb ODS-2, con la segunda fase móvil. Como sistema de detección se usó un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 1 Vis-UV, equipado con una microcélula de 8 µl de volumen y fijado a 270 nm.

En todos los casos se cromatografiaron sustancias patrón. Acido usneico y ácido evérnico (ambos adquiridos a Sigma Chem. Co.) y extractos acetónicos de

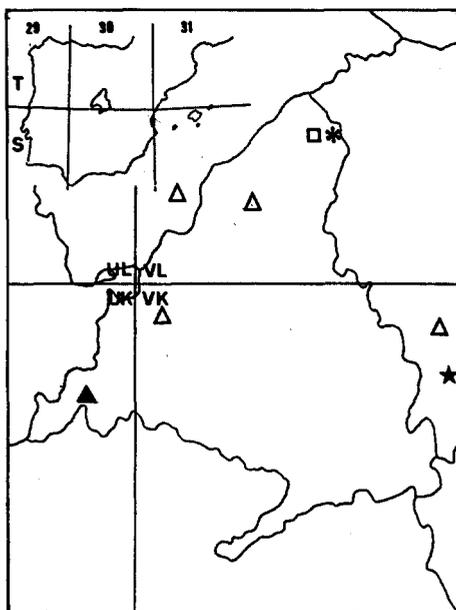


Fig. 2.—Mapa de distribución de *Ramalina fraxinea* (L.) Ach., *Ramalina fastigiata* (Pers.) Ach. y *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. △ *R. fraxinea*; ▲ *R. pollinaria*; ★ *R. fastigiata* y *R. fraxinea*; ★* *R. pollinaria* y *R. fraxinea*; □ *R. fraxinea*, *R. pollinaria* y *R. fastigiata*.

Parmelia acetabulum para los ácidos norestético y connorestético, de *Cladonia merochlorophaea* var. *novochlorophaea* Sipm. para los ácidos sekikaico y homosekikaico y de *Ramalina baltica* Lett. para ácido obtusático.

Las constantes de retención para cada sustancia detectada se han calculado de acuerdo con HOUVINEN & al. (1985), usando como patrones internos acetona y ácido usneico. Los índices de retención se hallaron según la ecuación:

$$iR = \frac{Rt \text{ del compuesto} - Rt \text{ acetona}}{Rt \text{ ácido usneico} - Rt \text{ acetona}}$$

siendo Rt el tiempo de retención en minutos e iR el índice de retención.

La extracción de las sustancias líquénicas, tanto para hacer los análisis por TLC como por HPLC, se realizó con acetona, durante unos diez minutos, a temperatura ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis por TLC han permitido la detección de 11 sustancias líquénicas cuyas características cromatográficas y reacciones de coloración quedan recogidas en la tabla 1. En la tabla 2 se muestra la composición química encontrada para cada una de las especies analizadas, relacionándose también el sustrato en el que fueron halladas. *R. pollinaria*, muy similar a algunas formas de *R. polymorpha*, es una especie que se ha encontrado tanto sobre corteza de árbol como sobre roca. Como se puede observar en la tabla 2, todos los especímenes con morfología de

TABLA 1

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRAFICAS Y REACCIONES DE COLORACIÓN DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DETECTADAS EN LOS ESPECÍMENES ANALIZADOS DEL GÉNERO *RAMALINA* ACH.

Sustancia	A B C			A	B	C	Coloración
	Clase Rf			Rf × 100			
Ácido connorestético	2	3	2	6/44,67	24/38,72	5/27,65	Anaranjado *
SDAM 1	3	2	2	23/44,67	15/38,72	7/27,65	Gris amarillento *, Cl ₃ Fe + violeta
SDAM 2	3	3	2	43/44,67	42/38,72	17/27,65	Gris amarillento *, Cl ₃ Fe + violeta
Ácido evérmico	3	5	6	42/44,67	54/38,72	47/27,65	Anaranjado *
Ácido obtusático	3	6	6	40/44,67	58/38,72	48/27,65	Amarillo-anaranjado *
SDAM 4	3	5	3	32/44,67	45/38,72	22/27,65	Amarillo-anaranjado *
SDAM 5	3	5	5	43/44,67	48/38,72	32/27,65	Pardo-rosáceo *
Ácido norestético	4	4	4	—	—	—	Amarillo *. PD + amarillo, K + rojo
Ácido sekikaico	4	6	6	45/44,67	54/38,72	50/27,65	Pardo *
Ácido homosekikaico	5	6	6	52/44,67	60/38,72	55/27,65	Pardo-rosáceo *
Ácido usneico	6	6	6	65/44,67	65/38,72	55/27,65	Gris-verdoso *

* Coloración después de revelar con ácido sulfúrico al 10% en agua y posterior calentamiento 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; Cl₃Fe+, coloración tras el revelado con una solución de Cl₃Fe 2% en etanol 96%.

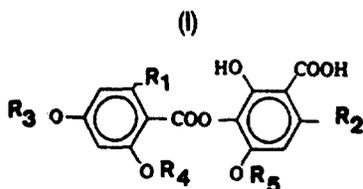
TABLA 2

COMPOSICIÓN EN SUSTANCIAS LIQUÉNICAS ENCONTRADAS EN LAS ESPECIES DEL GÉNERO *RAMALINA* ACH. ANALIZADAS

	Con.	SD1	SD2	Ev.	Obt.	SD4	SD5	Nor.	Sk.	Hsk.	Usn.	N.º de talos		
												sax.	cort.	
<i>R. calicaris</i>										+	+	+	1	
<i>Ramalina</i> sp.							+			+	+	+	3	
<i>R. fraxinea</i>												+	5	161
<i>R. fastigiata</i>					+	+	+					+		15
<i>R. pollinaria</i>					+	+						+	78	
<i>R. polymorpha</i>			+									+	23	
<i>R. polymorpha</i>				+								+	9	
<i>R. polymorpha</i>	+							+				+	13	
<i>R. polymorpha</i>												+	83	

Con.: ácido connorestético; SD1: SDAM 1; SD2: SDAM 2; Ev.: ácido evérnico; Obt.: ácido obtusático; SD4: SDAM 4; SD5: SDAM 5; Nor.: ácido noestético; Sk.: ácido sekikaico; Hsk.: ácido homosekikaico; Usn.: ácido usneico; sax.: saxícolas; cort.: cortícolas.

R. pollinaria y con ácido evérnico y sus compuestos relacionados (ácido obtusático) en médula, se han encontrado creciendo sobre rocas ácidas (granitos y esquistos) y siempre ocupando posiciones muy protegidas, en paredes más o menos verticales, del piso supramediterráneo. *R. polymorpha* s.l., por el contrario, muestra una mayor dispersión, habiendo sido encontrada sobre rocas ácidas desde el piso mesomediterráneo hasta el oromediterráneo, en las comunidades ornitocóprifas, ocupando posiciones por lo general expuestas.



(I)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Ácido sekikaico	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	CH ₃	H	CH ₃
Ácido homosekikaico	C ₃ H ₇	C ₃ H ₁₁	CH ₃	H	CH ₃

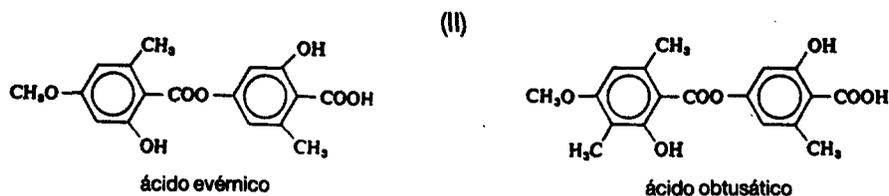


Fig. 3.—Estructura general de meta-dépsidos (I) y para-dépsidos (II) en este estudio.

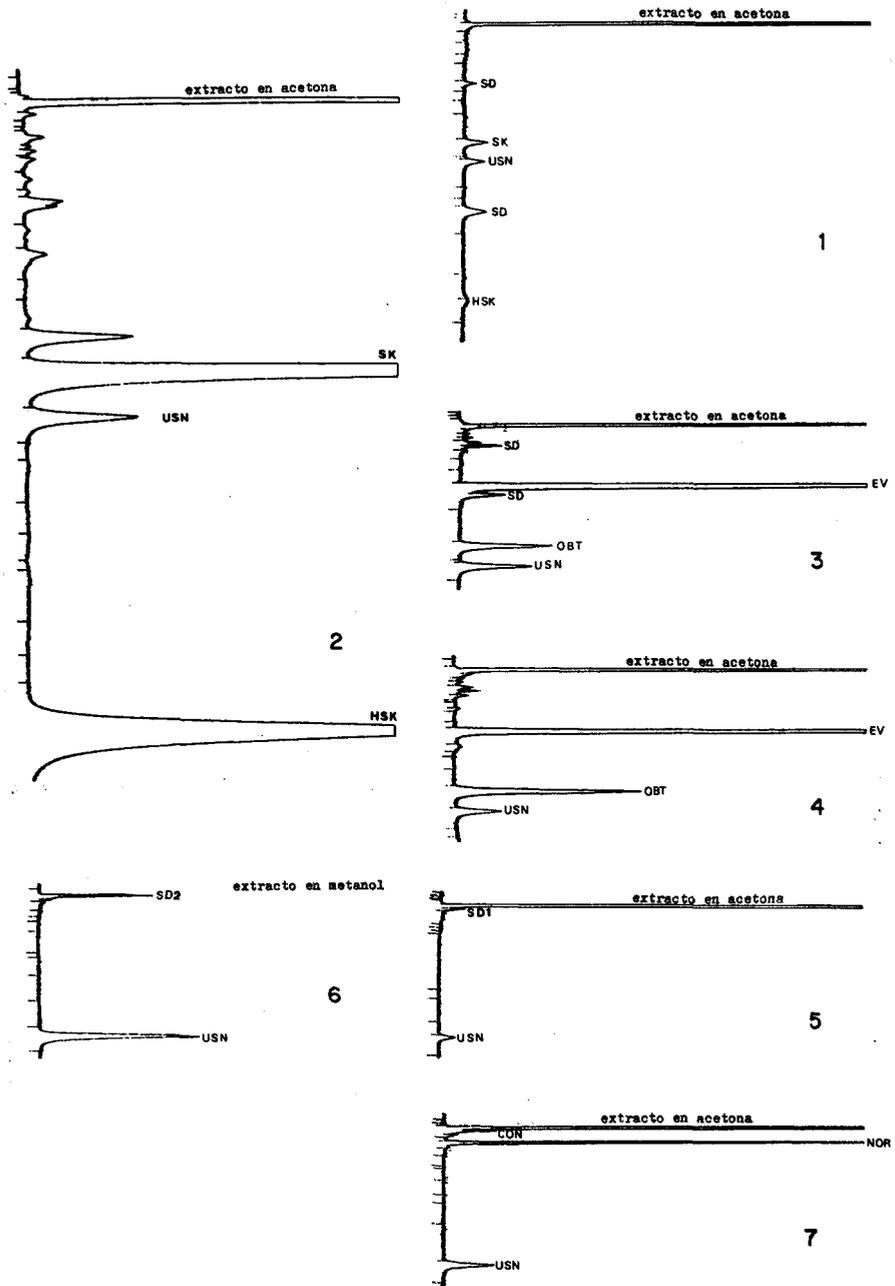


Fig. 4.—Representación de los análisis por HPLC de las especies del género *Ramalina* Ach. analizadas. 1, *R. calicaris*; 2, *Ramalina* sp.; 3, *R. fastigiata*; 4, *R. pollinaria*; 5, 6 y 7, *R. polymorpha* s.l.

Muchas de las sustancias medulares presentes en las especies del género *Ramalina* son fácilmente identificables por TLC, mientras que otras, como los ácidos evérnico y obtusático, por lo general juntas, han resultado problemáticas debido a que sus valores de R_f son demasiado próximos para una identificación satisfactoria por esta técnica. De forma continuada, los diferentes autores se han venido refiriendo a ellas como el agregado del ácido evérnico (fig. 3). El ácido sekikaico y compuestos relacionados presentan un problema similar, puesto de manifiesto recientemente por CULBERSON & *al.* (1985) en *Cladonia chlorophaea* grex. Tras los análisis de los especímenes de *Ramalina*, parece deducirse que los ácidos sekikaico y homosekikaico aparecen siempre juntos. En este caso no hemos detectado el ácido hiperhomosekikaico, que según CULBERSON & *al.* (*l.c.*) acompaña a los dos anteriores. El ácido obtusático se pone de manifiesto en el disolvente B, apareciendo como un capuchón de la mancha correspondiente al ácido evérnico, de coloración amarillo-anaranjada después del revelado con sulfúrico y cuya fluorescencia a UV 360 nm tras el revelado es anaranjada.

Los resultados de los análisis por HPLC (fig. 4) de las muestras analizadas se muestran en la tabla 3. Como se puede observar, las diferencias entre los tiempos de retención (R_t) de los patrones utilizados y de los picos correspondientes a los especímenes analizados, son realmente mínimas, de tal forma que los índices de retención (iR) resultan prácticamente idénticos.

Los especímenes que por TLC contenían ácido sekikaico con o sin ácido homosekikaico, tras someterlos a HPLC, siempre presentaron dos picos, de tiempos de retención coincidentes con los de los patrones utilizados (extracto de *Cladonia chlorophaea* var. *novochlorophaea*). En aquellos ejemplares con sólo ácido sekikaico por TLC, el pico mayoritario se identificó como ácido sekikaico, por coincidencia de R_t con el primero de los aparecidos en el patrón, y el minoritario

TABLA 3

CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS POR HPLC DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS ENCONTRADAS EN LAS ESPECIES DEL GÉNERO *RAMALINA* ACH. MENCIONADAS EN EL TEXTO

Sustancia	R_t	iR
Ácido connoestfctico	3,77 (-0,05)	0,027 (+0,001)
Ácido norestfctico	6,25 (-0,29)	0,112 (+0,001)
Ácido evérnico	9,59 (-0,03)	0,425 (+0,023)
Ácido obtusático	15,20 (-0,47)	0,782 (+0,071)
Ácido sekikaico	29,25 (+0,66)	0,864 (+0,060)
Ácido usneico	34,39 (-0,46)	1,0
Ácido homosekikaico	63,31 (+0,96)	1,984 (+0,122)

Entre paréntesis se aporta la diferencia entre el tiempo de retención y el índice de retención de la sustancia detectada en las muestras y la del patrón utilizado.

R_t : tiempo de retención.

iR : índice de retención.

lo asignamos a ácido homosekikaico, coincidiendo su Rt con el segundo de los del patrón. Aquellos ejemplares con ácido sekikaico y trazas de homosekikaico se asignaron a *R. calicaris*, mientras que, cuando se presentaban ambos ácidos en alta concentración y con una morfología que no pudo ser asignada a ninguna de las especies descritas en la bibliografía consultada, se agruparon como *Ramalina* sp. Estos dos táxones, junto con otros del mismo género que presentan también el agregado del ácido sekikaico, podrían pertenecer a un mismo quimiosíndrome (CULBERSON & CULBERSON, 1976; LEUCKERT, 1985). Punto éste que necesitará una mayor atención.

R. polymorpha s.l. presenta a veces una cierta cantidad de ácido norestíctico, que se detecta también aplicando K sobre los soralios o la médula (tabla 2). No se han encontrado diferencias químicas significativas entre las distintas morfologías que esta especie presenta. Este mismo hecho lo pusieron de manifiesto KROG & JAMES (1977), quienes asignaron todo el grupo a una sola especie, *R. polymorpha* (Ach.) Ach.

RELACIÓN DE LOCALIDADES

MADRID: Puerto de Canencia, arroyo de Canencia, 1500 m, 30TVL3426; ibídem, arroyo del Sestil del Maíllo, 1500 m, 30TVL3426; Peña de Cenicientos, 1254 m, 30TUK7460; Collado Mediano, cerro del Castillo, 1000 m, 30TVL1504; El Escorial, 1000 m, 30TVK0291; hayedo de Montejo de la Sierra, 1300 m, 30TVL5850; Dos Hermanas, Sierra de Guadarrama, 2000 m, 30TVL1922; La Hiruela, 1200 m, 30TVL6349; La Morcuera, 1600 m, 30TVL3119; La Pedriza, 1100 m, 30TVL2611; Soto de Viñuelas, 740 m, 30TVL6714; La Pedriza, Cabeza de Hierro, 2100 m, 30TVL2514.

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

SEGOVIA: La Granja, 1300 m, 30TVL1528; Valsaín, 1200 m, 30TVL1025.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el marco del Proyecto de Investigación subvencionado por la CAICYT, número 2954/83 C02-02.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARROYO R. & E. MANRIQUE (1988). Estudios químicos en *Ramalina farinacea* (L.) Ach. del centro de España. *Anales Jard. Bot. Madrid* 45(1): 53-59.
- CULBERSON, C. F. (1965). Some constituents of the lichen *Ramalina siliquosa*. *Phytochemistry* 4: 951-961.
- CULBERSON, C. F. (1967). The Chemical constituents of *Ramalina paludosa*. *Bryologist* 70(4): 397-405.
- 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. & W. L. CULBERSON (1976). Chemosyndromic Variation in Lichens. *Syst. Bot.* 1(4): 325-339.
- CULBERSON, C. F. & H. KRISTINSSON (1970). A standardized method for the identification of lichen products. *J. Chromatogr.* 46: 85-93.
- CULBERSON, C. F., W. L. CULBERSON & A. JOHNSON (1985). Orcinol type Depsides and Depsidones in the lichens of the *Cladonia chlorophaea* Group (Ascomycotina, Cladoniaceae). *Briologist* 88(4): 380-387.

- CULBERSON, W. L. (1966). Chemie et taxonomie des lichens du groupe *Ramalina farinacea* en Europe. *Rev. Bryol. Lichénol.* 34: 841-851.
- HAWKSWORTH, D. L. (1968). A note on the chemical strains of the lichen *Ramalina subfarinacea*. *Bot. Not.* 121: 317-320.
- HUOVINEN, K., R. HILTUNEN & M. VON SCHANTZ (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. & P. W. JAMES (1977). The genus *Ramalina* in Fenoscandia and the British Isles. *Norw. J. Bot.* 24: 15-43.
- KROG, H. & H. ØSTHAGEN (1980). The genus *Ramalina* in the Canary Islands. *Norw. J. Bot.* 27: 255-296.
- LEUCKERT, CH. (1985). Probleme der Flechten-Chemotaxonomie-Stoffkombinationem und ihre taxonomische Wertung. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 98: 401-408.
- MANRIQUE, E. & A. CRESPO (1983). Sobre *Melanelia acetabulum* (Neck.) Essl. en la Península Ibérica: caracterización química y distribución. *Lazaroa* 5: 269-275.
- SHEARD, J. W. (1978). The taxonomy of the *Ramalina siliquosa* species aggregate (lichenized Ascomycetes). *Canad. J. Bot.* 56: 916-938.
- SHEARD, J. W. & P. W. JAMES (1976). Typification of the taxa belonging to the *Ramalina siliquosa* species aggregate. *Lichenologist* 8: 35-46.

Aceptado para publicación: 17-VI-1988