

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

ACERCA DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES Y LÍPIDOS EN
ESPECIES IBÉRICAS DEL GÉNERO *BARTRAMIA* HEDW.
(*BARTRAMIACEAE* SCHWAEGR., *BRYOPHYTA*)

López-Sáez, J.A., Pérez-Alonso, M.J., Velasco Noguera, A. y
Ron Alvarez, M.E.*

RESUMEN

Se lleva a cabo el estudio de la composición en aceites volátiles y lípidos en tres musgos ibéricos del género *Bartramia* Hedw.: *B. ithyphylla* Brid., *B. pomiformis* Hedw. y *B. stricta* Brid. Los resultados demuestran que dichas especies cuentan con mono-, sesqui y diterpenos. Su patrón lipídico es el esperado en briófitos.

Palabras clave: Compuestos Volátiles, Lípidos, *Bartramia*, *Musci*.

ABSTRACT

Three species of *Bartramia* Hedw. growing in Spain have been investigated: *B. ithyphylla* Brid., *B. pomiformis* Hedw. and *B. stricta* Brid., for the presence of volatils and lipids. The results demonstrate that these species contain monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. Its lipid pattern is typical of mosses.

Key Words: Volatil compounds, Lipids, *Bartramia*, *Musci*.

INTRODUCCIÓN

La problemática evolutiva de los briófitos supone un reto tanto para los investigadores en Sistemática Vegetal como para los paleobotánicos (1). En

* Trabajo realizado en base a una ayuda de la C.A.M.

este sentido, durante los últimos veinticinco años, los estudios fitoquímicos de este grupo botánico se han ampliado notablemente, sobre todo en cuanto a metabolitos secundarios se refiere. Flavonoides, lípidos y terpenoides han sido la base de numerosas investigaciones sobre la fitoquímica de briófitos, tanto desde un punto de vista taxonómico como filogenético (2,3).

Como una contribución más a la sistemática de musgos presentamos este trabajo, en él que únicamente hemos pretendido realizar un "screening" acerca de la composición lipídica y de compuestos volátiles en las especies ibéricas del género *Bartramia*, que nos permita conocer distintos aspectos sobre la fisiología de tales metabolitos en musgos (4,5,6,7).

MATERIAL Y MÉTODOS

De todas las muestras vegetales utilizadas en este trabajo se depositó un pliego testigo en el Herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid (MACB).

Los lípidos totales fueron extraídos del material biológico fresco (*B. pomiformis*: 2.25 g. de gametofito y 1.0 g. de esporófito; *B. stricta*: 2.25 g. de gametofito; *B. ithyphylla*: 1.0 g. de gametófito) sucesivamente mediante 50 ml de éter de petróleo en dos periodos de 8 horas y, 60 ml de cloroformo:metanol (2:1) durante 4 horas (8,9,10). Los filtrados obtenidos fueron cromatografiados en 1-D TLC en hexano:éter etílico: ácido acético (78:13:1) y 2-D TLC en cloroformo:metanol: 7 N hidróxido amónico (65:35:4) y cloroformo:metanol:acético: agua (170:25:25:4) en placas de Silicagel 60 F 254 de Merck (20 x 20 cm, 0.2 mm) (8,9), y reveladas con vapores de yodo (10). Las distintas clases individuales de lípidos fueron identificadas mediante comparación directa con la bibliografía (9,11,12,13,14,15).

La extracción de los compuestos volátiles se llevó a cabo por destilación en corriente de vapor con reciclación de agua (cohobación) en un aparato de Clevenger modificado durante 24h. (16) y, directamente con un disolvente orgánico (100 ml de éter etílico) seguido de 100 ml. de acetato de etilo, en ambos casos en tres periodos de 10 h., uniéndose finalmente ambas subfracciones (17). Los filtrados procedentes de ambos métodos de extracción fueron cromatografiados en C.G.L. en un cromatógrafo VARIAN 3300 (columna capilar de 30 m x 0.253 mm) con fase estacionaria apolar de aceite de silicona DB-1 y, en C.G.L. /M.S. en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5790 A (columna capilar de vidrio de 25 m x 0.32 mm) y fase estacionaria apolar de aceite de silicona OV-1, acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett Packard 5970 a 70eV. (Tabla 1).

TABLA 1

Metodología empleada en la identificación de terpenoides: 1, según ref. (16); 2, según ref. (17); Q, cantidad en gramos

muestra	localidad	Q	extracción	identificación	simbología
<i>B. pomiformis</i>	HUESCA: Ordesa	16,0	1	CGL / MS	BP-Or2
<i>B. pomiformis</i>	AVILA: Candeleda	39,3	1	CGL	BP-Cd
<i>B. pomiformis</i>	AVILA: P.Bernardo	82,0	1	CGL	BP-Pb
<i>B. pomiformis</i>	CACERES: Guadalupe	145,5	1	CGL	BP-Gd
<i>B. stricta</i>	CACERES: Jaraicejo	59,9	1	CGL	BS-Ja
<i>B. ithyphylla</i>	MADRID: Pto. Canencia	2,0	2	CGL	BI-Ca

RESULTADOS

Rendimiento en lípidos totales: *B. pomiformis* (gametófito): 1.12%; *B. pomiformis* (esporófito): 1.26%; *B. stricta* (gametófito): 0.83%; *B. ithyphylla* (gametofito): 1.40%.

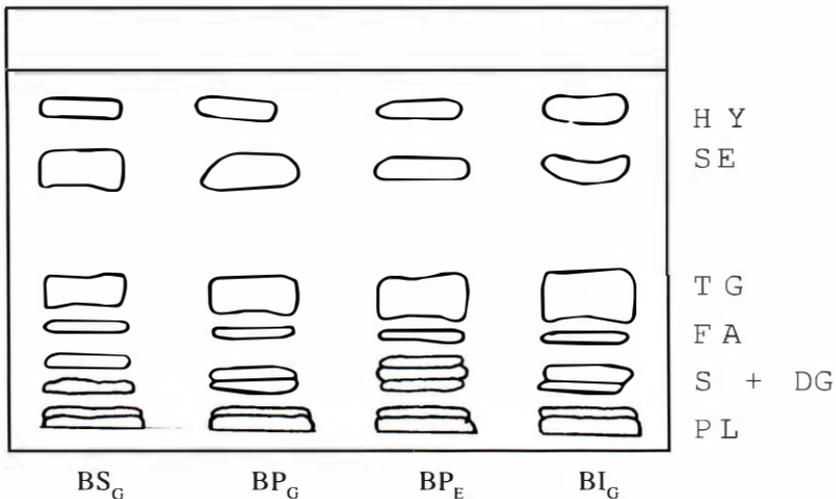


Figura 1: 1-D TLC para lípidos no polares. BP_G: *Bartramia pomiformis*, gametófito, Madrid: Pto. de Canencia; BP_E: *Bartramia pomiformis*, esporófito, Madrid: Pto. de Canencia; BS_G: *Bartramia stricta*, gametófito, Cáceres: Pque. Ncal. Montfragüe; I_G: *Bartramia ithyphylla*, gametófito, Lérida: P.N. Aigües Tortes; HY: hidrocarburos, SE: ésteres de esteroides, TG: triglicéridos, FA: ácidos grasos, S: esteroides, DG: diglicéridos, PL: lípidos polares.

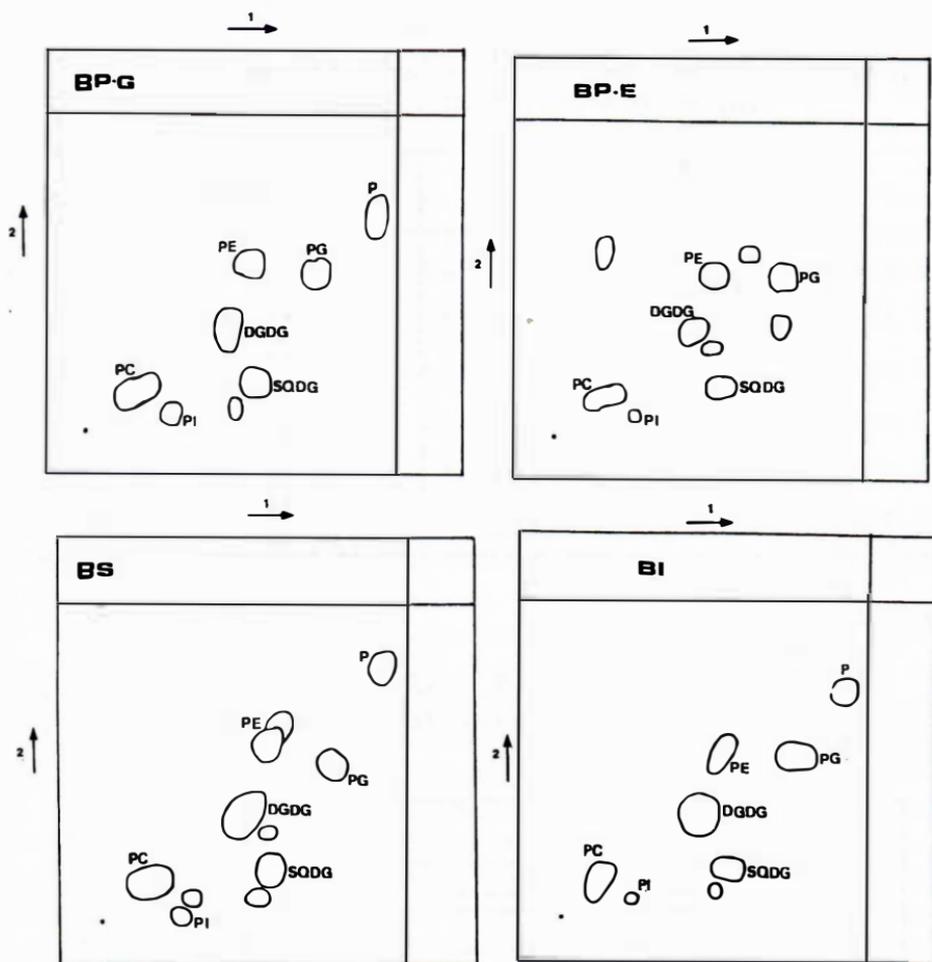


Figura 2. 2-D TLC para lípidos polares. P: pigmentos, PG: diacilglicerofosfato gliceroles, PE: diacilglicerofosfato etanolaminas, PI: diacilglicerofosfato inositoles, PC: diacilglicerofosfo colinas, DGDG: digalactosildiácil gliceroles, SQDG: sulfoquínosildiácil gliceroles

En las Fig. 1 y 2 se muestran respectivamente la 1-D TLC para lípidos no polares y 2-D TLC de lípidos polares de las cuatro muestras estudiadas.

En la Tabla 2 se recogen los tiempos de retención, índices de Kovats y porcentajes relativos de los distintos compuestos detectados por C.G.L. y/o C.G.L./MS.

TABLA 2

Compuestos Volátiles identificados en *Bartramia*. tR= tiempo de retención, Ik= índice de Kovats, t= % < 0.1 no integrado, ?= identificación tentativa. (simbología especies estudiadas según Tabla 1)

Nº	COMPUESTO	tR	Ik	BP-Or2	BP-Pb	BP-Cd	BP-Gd	BS-Ja	Bl-Ca
1		2.90	882.92	1.4	—	—	—	—	—
2	canfeno ?	3.51	935.33	5.4	t	—	—	t	t
3	1—octen—3—ol ?	3.72	951.12	0.7	—	—	—	t	—
4	3—octanol ?	3.96	969.17	1.1	—	—	0.2	t	2.3
5	c—pinano ?	4.11	980.45	0.5	.1	—	—	—	t
6		4.30	994.73	0.4	—	—	0.1	—	—
7	p—cimeno	4.86	1024.37	0.5	—	—	—	0.1	t
8	1,8—cineol ?	5.01	1031.84	—	—	—	0.3	0.2	—
9	Ó—tuyona ?	6.17	1089.55	2.5	1.8	—	—	t	—
10	β—tuyona ?	6.44	1102.31	t	t	—	0.2	—	4.8
11	mirtanol isómero ?	8.66	1188.03	—	2.6	t	0.7	0.3	—
12		9.23	1209.28	t	0.5	—	0.2	—	—
13		9.76	1227.85	—	—	—	0.2	0.1	—
14	mirtanol isómero ?	10.40	1251.07	0.1	—	—	0.3	—	—
15	p—ment—1 en—9—ol ?	10.57	1257.14	0.9	—	—	—	—	—
16		11.52	1291.07	—	4.4	t	1.3	0.7	—
17	piperonal ?	12.03	1308.55	t	0.6	0.2	3.0	—	4.2
18	longipineno ?	13.39	1353.28	—	0.5	0.4	0.4	t	—
19	muuroleno ?	14.48	1389.14	—	3.3	t	—	0.3	—
20		15.01	1406.66	0.7	0.8	—	0.1	—	—
21		15.49	1422.66	0.6	t	t	0.6	—	—
22	gimnomitreno	16.28	1449.00	23.9	t	0.8	2.4	t	—
23	aromadendreno ?	16.88	1469.00	t	0.6	0.8	0.7	0.2	—
24		17.30	1483.00	0.3	2.2	t	—	0.5	—
25		17.90	1502.98	0.9	t	t	0.2	0.4	—
26		18.20	1512.91	2.0	3.4	3.0	0.8	0.6	—
27		8.75	1531.12	1.5	1.1	0.9	0.4	0.4	1.8
28		19.95	1570.86	—	—	—	—	0.2	—
29		20.09	1575.49	—	t	t	—	0.6	—
30	espatulenol ?	20.73	1596.78	—	27.6	8.4	3.6	1.2	t

Nº	COMPUESTO	tR	Ik	BP-Or2	BP-Pb	BP-Cd	BP-Gd	BS-JaBI-Ca	
31		21.11	1610.00	t	t	1.2	0.1	0.6	4.2
32		21.27	1615.71	—	t	t	—	2.0	—
33		22.08	1644.64	—	—	—	0.5	1.0	—
34		22.93	1675.00	—	0.8	t	0.1	0.7	—
35		23.17	1683.58	—	1.7	0.8	—	0.9	—
36		23.37	1690.71	—	t	t	—	1.5	—
37		23.60	1698.92	—	—	—	0.2	0.2	—
38		23.81	1706.49	t	1.1	0.6	—	0.6	—
39		24.24	1722.02	—	2.1	1.7	0.5	5.9	—
40		24.75	1740.43	t	1.7	t	0.3	t	—
41		25.12	1753.79	—	1.2	t	—	1.6	—
42		26.09	1788.80	t	7.5	6.8	2.3	6.4	2.3
43		26.53	1804.69	—	—	—	—	0.6	—
44		27.08	1824.54	—	t	—	—	0.2	—
45		27.34	1833.93	—	0.8	9.5	1.9	0.6	—
46		27.94	1855.59	—	5.6	2.0	1.7	4.6	—
47		28.24	1866.42	—	1.5	t	—	0.6	—
48		28.66	1881.58	—	0.6	1.3	1.0	4.5	—
49		29.08	1896.75	—	t	t	—	0.5	—
50		29.99	1934.59	—	0.9	t	0.2	t	—
51		30.47	1955.55	—	t	0.8	1.8	0.5	—
52		30.99	1976.79	7.1	t	2.1	3.4	4.5	—
53		31.40	1994.09	—	19.1	54.4	58.1	49.6	79.5
54		33.05	2054.71	—	2.8	—	0.2	0.5	—
55		34.74	2120.27	—	—	0.5	0.2	t	—
56		34.85	2125.34	—	—	0.9	0.3	1.1	—
57		35.29	2145.62	14.4	—	2.9	8.2	3.8	—
58		35.80	2169.12	—	—	—	t	0.8	—
59		37.88	2233.33	24.2	—	—	0.5	—	—
60		39.31	2313.33	—	0.5	—	—	0.3	—
61		42.44	» 2300	—	0.5	—	—	0.2	—
62		43.81	» 2300	—	0.9	—	—	t	—

En la Fig. 3 se muestra el espectro de masas comparativo del compuesto 22 con el de un patrón de gimnomitreno.

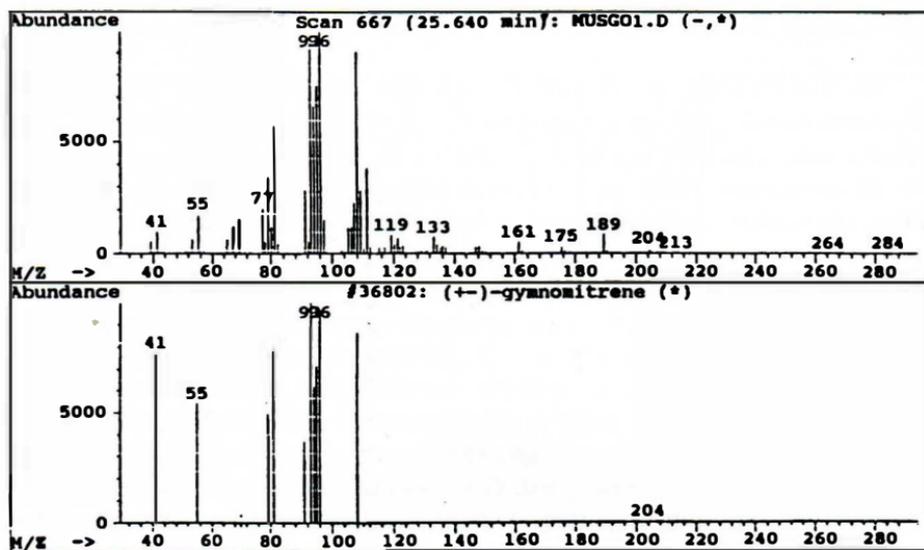


Figura 3. Espectros de masas del compuesto 22 y del gimnomitreño (patrón)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El mayor rendimiento en lípidos totales lo presenta el gametófito de *B. ithyphylla*. En *B. pomiformis* es el esporófito el que posee un mayor rendimiento en lípidos totales frente al gametófito, lo que posiblemente es debido a un mayor contenido en superficie de membrana, en concordancia con los resultados obtenidos para *Funaria hygrometrica* (9).

En cuanto al fraccionamiento en lípidos no polares se puede concluir la no existencia de diferencias cualitativas para ésteres de esteroides, hidrocarburos y triglicéridos, no ocurriendo lo mismo con el contenido en ácidos grasos, variable en las distintas muestras.

El gametófito de *B. pomiformis* parece poseer la misma composición en ácidos grasos que el de *B. stricta*, y diferente respecto del de su esporófito y del gametófito de *B. ithyphylla*.

En referencia a esteroides y diglicéridos, las diferencias en cambio son interespecíficas.

El patrón cromatográfico bidimensional es semejante en cuanto a los distintos tipos de lípidos polares identificados en las tres especies, aunque se advierten diferencias particulares en algunos de ellos, caso de los digalactosil-diacil glicerol y sulfoquinovosil-diacil glicerol; lo que viene a confirmar de nuevo que la composición lipídica de ambas generaciones en *B. pomiformis* es sensiblemente distinta.

Respecto a compuestos volátiles, no sólo hemos identificado diterpenos,

como cabría esperar (18,19,20), sino también monoterpenos y sesquiterpenos.

Es sorprendente, y por ello pretendemos confirmarlo en un futuro, la presencia por el momento tentativa en dichas especies, de sesquiterpenos, sólo citados hasta ahora en hepáticas y antocerotas, y nunca en musgos (20).

El rendimiento obtenido ha sido tan bajo que no nos ha permitido la identificación total de ciertos compuestos, hecho que queremos remediar con nuevas investigaciones a partir de mayor cantidad de material biológico de partida.

Debemos destacar entre todos los compuestos tentativamente identificados al gimnomitreno, hasta hace poco únicamente conocido en hepáticas (21), y recientemente en antocerotas (19,22). Su presencia en musgos, en base a nuestros resultados, abre una nueva posibilidad en cuanto a las posibles relaciones filogenéticas en briófitos, al menos desde un punto de vista quimiosistemático (2).

Queremos concluir, diciendo que somos conscientes de que este trabajo, es únicamente el inicio de futuros estudios sobre la quimiosistemática de *Bartramiaceae*, pero dada la importancia de los resultados hasta ahora obtenidos, hemos considerado oportuno darlos a conocer, para abrir de esta manera nuevas vías de conocimiento en la filogenia de *Bryophyta*.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HEROUT, V. (1990) Diterpenes and higher terpenes from bryophytes. In Zinsmeister, H.D. & Mues, R. (Eds.): *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* (vol. 29). Clarendon Press. Oxford.
- (2) LOPEZ—SAEZ, J.A. (1992). Contribución al estudio de trazadores quimiosistemáticos en especies ibéricas del género *Bartramia* Hedw. (*Bartramiaceae* *Schwaegr.*, *Bryophyta*). *Memoria de Licenciatura (inédit.)*. Universidad Complutense. Madrid.
- (3) MÜES, R. (1990). The significance of flavonoids for the classification of bryophyte taxa at different taxonomic rank. In Zinsmeister, H.D. & Mues, R. (Eds.): *Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* (vol. 29). Clarendon Press. Oxford.
- (4) VANDEKERKHOVE, O., EULER, R., KOHN, G. & HARTMANN, E. (1984). *J. Hattori Bot. Lab.*, 56: 187—193.
- (5) BEUTELMANN, P., KOHN, G., EULER, R. & HARTMANN, E. (1992). *Crypt. Bot.*, 3. 77—81.
- (6) KOHN, G., DEMMERLE, S., VANDEKERKHOVE, O., BEUTELMANN, P. & HARTMANN, E. (1987). *Phytochemistry*, 26: 2271—2275.
- (7) ASAKAWA, Y. (1990). Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes. In Zinsmeister, H.D. & Mues, R. (Eds.): *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* (vol. 29). Clarendon Press. Oxford.
- (8) PEREZ—ALONSO, M.J. (1974). Efecto de la administración de insulina y gestación sobre niveles de lípidos plasmáticos y composición en ácidos grasos de hígado de conejo. *Memoria de Licenciatura (inédit.)*. Facultad de Ciencias. Universidad de Madrid. Madrid.

- (9) AL—HASAN, R.H., EL—SAADAWI, W.E., ALI, M. & RADWAN, S.S. (1990). *The Bryologist*, 93(1): 44—49.
- (10) BEUTELMANN, P., EULER, R., KOHN, G. & HARTMANN, E. (1988). Analysis of bryophyte lipids. In Glime, J.M. (Ed.): *Methods in Bryology. Proc. Bryol. Meth. Workshop, Mainz. Hattori Bot. Lab. Nichinan.*
- (11) DITTMER, J.C. & LESTER, L. (1964). *Journal of Lipid Research*, 5: 126—127.
- (12) HUNECK, S. (1983). Chemistry and Biochemistry of Bryophytes. In: Schuster, R.M. (Eds.): *New manual of Bryology. The Hattori Botanical Garden. Nichinan—Miyazaki.*
- (13) PFAFFMANN, H. & HARTMANN, E. (1988). Analysis of phospholipids and assay for phospholipases from moss tissue. In Glime, J.M. (Ed.): *Methods in Bryology. Proc. Bryol. Meth. Workshop, Mainz. Hattori Bot. Lab. Nichinan.*
- (14) SIAKOTOS, A.N. & ROUSER, G. (1965). *J.Am.Oil.Chem.Soc.*, 42: 913—919.
- (15) VIOQUE, E. (1984). Spray reagents for thin layer chromatography (TLC) and paper chromatography (PC). In Zweig, G., Sherma, J. & Mangold, H.K. (Eds.): *Handbook of Chromatography. Lipids. (vol. II). Boca Raton.*
- (16) *FARMACOPEA EUROPEA. (1990). 2^a Ed. Parte 1. Vol. 1. Apto. V.4.5.8. Consejo de Europa. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.*
- (17) ASAKAWA, Y. (1988). Separation and isolation of terpenoids from liverworts and their analysis by thin layer and gas chromatography. In Glime, J.M. (Ed.): *Methods in Bryology. Proc. Bryol. Meth. Workshop, Mainz. Hattori Bot. Lab. Nichinan.*
- (18) ASAKAWA, Y., TOKUNAGA, N., TOYOTA, M., TAKEMOTO, T. & SUIRE, C. (1979a). *J. Hattori Bot. Lab.*, 45: 395—407.
- (19) ASAKAWA, Y., TOKUNAGA, N., TOYOTA, M., TAKEMOTO, T., HATTORI, S., MIZUTANI, M. & SUIRE, C. (1979b). *J. Hattori Bot. Lab.*, 46: 67—76.
- (20) ZINSMEISTER, H.D., BECKER, H. & EICHER, T. (1991). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 30: 130—147.
- (21) ASAKAWA, Y. (1982). Chemical constituents of the Hepaticae. In Herz, W., Grisebach, H. & Kirby, G.W. (Eds.): *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (vol. 42).* Springer—Verlag. Vienna.
- (22) SUIRE, C. & ASAKAWA, Y. (1982). *Beih. Nova Hedwigia*, 71: 39—58.