

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUIMICA



Tesis para optar el Título de licenciado en Química

Titulada:

Estudio Fitoquímico del Líquen
Thamnozia vermicularis subsp. Vermicularis s. Str.

Presentado por

Olivio Nino CASTRO MANDUJANO

Lima – Perú
2002

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el aislamiento y estudio de sustancias líquénicas del líquen *Thamnotia vermicularis* (Sw.) Ach. Ex. Schaer. Subsp. *Vermicularis*, recolectado en la provincia de Huancayo (orillas del lago Huaytapallana), del departamento de Junín (Perú).

Se hicieron dos extracciones sucesivas por maceración con acetona a temperatura ambiente, sobre 210 gramos del material limpio y seco. Se procedió a separar diversos componentes del extracto acetónico, para ello se usaron solventes y mezclas de solventes de polaridad variable entre ellos hexano, cloroformo, acetona, acetato de etilo, metanol, etanol. Se aislaron y purificaron mediante técnicas cromatográficas y recristalizaciones.

Finalmente, se elucidaron y se determinaron las estructuras de los sólidos obtenidos, analizando sus espectros de IR, H^1 -NMR, C^{13} -NMR y EM; éstos son: compuesto H (ácido decarboxithamnólico), el compuesto S2 (Acido úsnico) y el compuesto D (Acido thamnólico). Además se hizo un análisis de los sólidos H, A, B, E y K por HPLC, lográndose identificar a 4 compuestos líquénicos de acuerdo a su tiempo de retención, estos son: Acido decarboxithamnólico, ácido thamnólico, ácido esquamático y ácido baeomicésico.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo es el resultado del esfuerzo propio, apoyo y colaboración de personas que de una y otra manera han hecho posible su culminación; por ello un especial y sincero agradecimiento a la Profesora M. Sc. Ana Pastor de Abram, por su permanente asesoría, apoyo, consejo y entusiasmo en la realización de esta investigación.

Al PD Dr H. Thorsten Lumbsch(Universidad de Essen-Alemania) y al Dr. Teuvo Ahti (Universidad de Helsinki- Finlandia), por la identificación de la planta líquénica.

A Dr John A. Elix (Universidad Nacional de Australia), por los espectros de H^1 -NMR, C^{13} -NMR, Espectrometría de Masa, por los cromatogramas y por la información proporcionada.

A la Dra. Neli Kika Honda (Universidade Federal de Mato Grosso do sul de Campo Grande, Brasil), por el espectro de C^{13} -NMR.

A los profesores y amigos por el apoyo en esta investigación mi aprecio y agradecimiento.

DEDICATORIA

Para mis padres
Nicolasa y Faustino,
por su amor
entrega y
sacrificio

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas...	
Índice de Figuras...	iii
Índice de Tablas...	v
Relación de Instrumentos utilizados...	vii
Protoco.	viii
I. OBJETIVO..	
II. PARTE TEORICA...	
1. Liqueues...	
2. Biosíntesis	
3. Compuestos Liquénicos...	4
4. Usos y Aplicaciones de los líquenes...	10
5. <i>Thamnia vermicularis</i> ...	10
5.1. Características botánicas de la <i>Thamnia vermicularis subps.</i> <i>vermicularis</i> ...	11
5.2. Taxonomía de la <i>Thamnia vermicularis subps.</i> <i>vermicularis</i> ..	11
5.3. Características Químicas de la <i>Thamnia vermicularis subps.</i> <i>Vermicularis</i> ...	12
III. PARTE EXPERIMENTAL...	15
1. Muestra...	15
2. Análisis Preliminar...	15
2.1. Marcha Fitoquímica...	15
2.2. Reacciones de coloración para compuestos líquénicos...	15
3. Aislamiento: Extracción, Separación y Purificación...	16
4. Análisis de las fracciones por HPLC	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES...	22
1. Resultados del Análisis Preliminar...	22
2. Resultados del extracto acetónico...	22

3. Elucidación Estructural del sólido H..	
4. Elucidación Estructural del sólido S2...	34
V. CONCLUSIONES..	50
VI. RECOMENDACIONES..	50
VII. BIBLIOGRAFÍA...	51
VIII. ANEXO....	53
Anexo 1 : Relaciones de Instituciones visitadas ..	53
Anexo 2 : Relación de revistas científicas que se revisaron ...	53
Anexo 3 : Identificación botánica del líquen ..	54
Anexo 4 : Elucidación estructural del compuesto D	55
Anexo 5 : Resultados del análisis por HPLC ..	60

ABREVIATURAS

Ac	ácido
Ac.Ac.	Acido acético
°C	Grados celsius
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CHCl ₃	Cloroformo
cm	centímetro
δ	Desplazamiento
DMSO	Dimetilsulfoxido
EM	Espectrometría de masa
E.P.	Eter de petróleo
EtOH	Etanol
Ext.	Extracto
FeCl ₃	Cloruro férrico
g	gramos
KOH	hidróxido de potasio
HCl	ácido clorhídrico
HClO ₄	ácido perclórico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IR	Espectroscopia Infrarroja
Me	Metilo, -CH ₃
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
msnm	Metros sobre nivel del mar
No.	número
pág	página
PUCP	Pontificia Universidad Católica del Perú
ppm	partes por millón

q	cuarteto
rec	recristalización
ref	referencia
¹³ C-NMR	Resonancia magnética nuclear del carbono – 13
¹ H- NMR	Resonancia magnética nuclear del hidrógeno –1
Rt	Tiempo de retención
s	singulete
seg	segundo
sol	solución
UV-vis	ultravioleta visible
V	volumen

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 : Tipos de líquenes ..	2
Figura No. 2 : Biosíntesis de derivados fenólicos ..	3
Figura No. 3 : Dépsidos ..	5
Figura No. 4 : Depsidona ..	6
Figura No. 5 : Depsona ..	7
Figura No. 6 : Acidos úsnicos ...	8
Figura No. 7 : Dibenzofurano ..	9
Figura No. 8 : <i>Thamnia vermicularis</i> subsp. <i>Solida</i> ..	13
Figura No. 9 : <i>Thamnia vermicularis</i> subsp. <i>Vermicularis</i> ..	14
Figura No.10:Marcha Fitoquímica ..	17
Figura No.11:Proceso Químico del aislamiento de compuestos liquénicos	20
Figura No.12:Espectro UV-vis del compuesto H ..	27
Figura No.13:Espectro de IR del Compuesto H ..	28
Figura No.14:Espectro de ^1H -NMR del Compuesto H ..	29
Figura No.15:Cromatograma de HPLC del compuesto H ..	30
Figura No.16:Espectro de ^{13}C -NMR del Compuesto H ..	31
Figura No.17:Espectro de Masa del Compuesto H ..	32
Figura No.18:Fragmentación del compuesto H ..	33
Figura No.19:Cromatograma de HPLC del compuesto S2 ..	40
Figura No.20:Espectro UV-vis del compuesto S2 ..	41
Figura No.21:Espectro IR del compuesto S2 ..	42
Figura No.22:Espectro de ^1H -NMR del compuesto S2 ...	43
Figura No.23:Espectro de ^{13}C -NMR del compuesto S2 ..	44
Figura No.24:Espectro de masa del compuesto S2	45

Figura No.25:Fragmentación del compuesto S2 ..	46
Figura No.26:Características del Acido úsnico ...	47
Figura No.27:Espectro de ¹ H-NMR del ácido úsnico	48
Figura No.28:Espectro de masa del ácido úsnico ..	49
Figura No.29:Cromatograma del sólidoo E .	58
Figura No.30:Espectro C13 – NMR del compuesto D ..	59
Figura No.31:Crmatograma de HPLC del compuesto B ..	61
Figura No.32:Cromatograma de HPLC del compuesto K ...	62
Figura No.33:Cromatograma de HPLC del compuesto A ..	63
Figura No.34:Compuestos Identificados por HPLC ..	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1: Fase móvil para la CC..	18
Tabla No. 2: Sólidos aislados de las fracciones...	18
Tabla No. 3: Resultados del Análisis Preliminar...	22
Tabla No. 4: Sólidos obtenidos del extracto acetónico	23
Tabla No. 5: Datos del Espectro ^1H -NMR del sólido H...	24
Tabla No. 6: Datos del Espectro ^{13}C -NMR del sólido H...	25
Tabla No. 7: Comparación de las absorbancias máximas del espectro UV-vis del sólido S2 y el ácido úsnico...	34
Tabla No. 8: Comparación de las absorciones del espectro IR del compuesto S2 y del ácido úsnico...	35
Tabla No. 9: Comparación de los desplazamiento del espectro ^1H -NMR del compuesto S2 y del ácido úsnico	36
Tabla No. 10: Comparación de los desplazamiento del espectro ^{13}C -NMR del compuesto S2 y del ácido úsnico...	37
Tabla No. 11: Comparación de los desplazamiento del espectro ^{13}C -NMR del compuesto D con el ácido thamnolico	57
Tabla No. 12: Compuestos identificados por HPLC ..	60

INSTRUMENTOS UTILIZADOS

1. Rotavapor Buchi R 110, PUCP - Perú
2. Lámpara UV 254 / 366 nm, PUCP - Perú
3. Punto de fusión: Melting Point, Fisher – Johns, PUCP – Perú.
4. Espectrómetro Infrarrojo, FT - IR, Serie 1600 , Perkin Elmer, PUCP - Perú
5. Espectrómetro Ultravioleta – Visible, Lambda 2, L A, Perkin Elmer, PUCP - Perú.
6. Polarímetro de círculo con lámpara espectral de sodio Carl Zeiss-Jena. Modelo 32-G-58 - oa -1, PUCP - Perú.
7. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear , Bruker de 250 MHz, Australia.
8. Cromatógrafo, Kontron , HPLC - System, Australia.

ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL LIQUEN

Thamnia vermicularis subsp. Vermicularis s. Str.

I. OBJETIVO

- Aislar (extracción, separación y purificación) y determinar su estructura química de los compuestos liquénicos que contiene el líquen.
- Identificar a los compuestos liquénicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

II. PARTE TEÓRICA

1. LÍQUENES

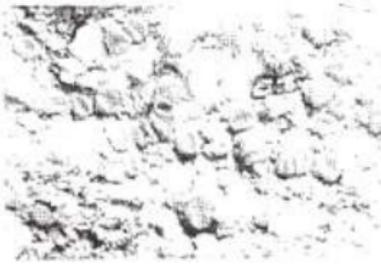
El líquen es un organismo simbiótico conformado por un hongo (Micobionte) y un alga (Ficobionte). Mientras el hongo se encarga del abastecimiento del agua y sales minerales, el alga provee los productos fotosintéticos como los glúcidos. Se calcula que existen aproximadamente 13500 especies dentro de 600 géneros.

Los líquenes son consorcios biológicos de amplia difusión que se encuentran en gran variedad de habitat, desde la región Ártica hasta la región Antártica. Son encontrados desde el nivel del mar hasta en las altas montañas; también se encuentran en los desiertos donde la temperatura es variable o en regiones polares donde las temperaturas son extremadamente bajas [1, 2]. Crecen sobre rocas, corteza, hojas de árboles, suelos, etc; Figura No. 1 .

2. BIOSÍNTESIS

La mayor parte de los metabolitos secundarios de los líquenes son oriundos vía acetil-polimalonil. Esta vía conduce a la formación de compuestos alifáticos como los ácidos grasos de cadena larga y a sustancias aromáticas del tipo fenólico. La biosíntesis de los ácidos fenólicos (dépsido, depsidona, etc.), se produce a través de la biosíntesis del ácido orselínico que es la unidad fundamental. El proceso biosintético se inicia por una condensación de 1 mol de acetilSCoA y 1 mol de malonilSCoA. La

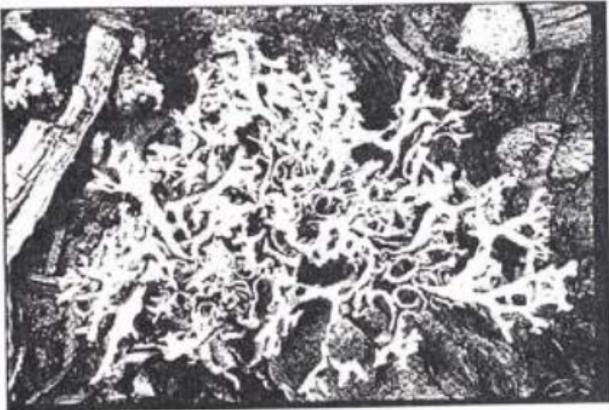
se inicia por una condensación de 1 mol de acetilSCoA y 1 mol de malonilSCoA. La acetoacetilSCoA, resultante de la condensación del acetilSCoA con malonilSCoA, puede condensar con otras moléculas de malonilSCoA en etapas sucesivas, formando un policetideo de 8 carbonos. Este último puede ciclarse a través de dos procesos distintos: uno es por la condensación aldólica produciendo el ácido orselínico y el otro por condensación tipo Claisen, produciendo floroacetofenona, Figura No.2 [2, 3].



Caloplaca luteominea



Cladonia

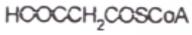


Xanthoparmelia chlorochroa

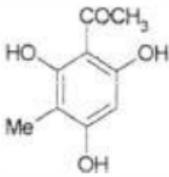
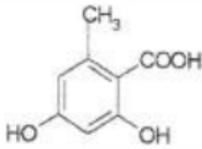
Figura No. 1: Tipos de líquenes



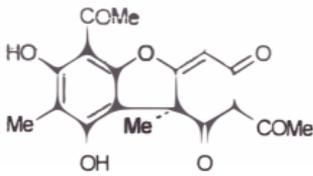
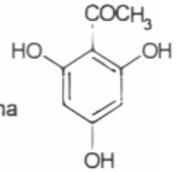
+



Acido orselinico



Floroacetofenona



Acido usnico

Figura No. 2 : Biosíntesis de derivados fenólicos.

3. COMPUESTOS LIQUÉNICOS

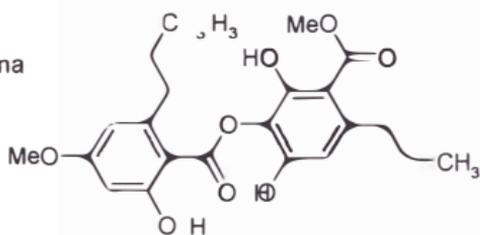
Se aplica el término de Compuestos Liquénicos a todos los compuestos sintetizados sólo por los líquenes [2, 3]. Los compuestos líquénicos (Figura No. 3-7) generalmente se agrupan de acuerdo al tipo de estructura en:

1. Dépsidos
2. Depsidonas
3. Depsona
4. Ácidos úsnicos
5. Dibenzofuranos

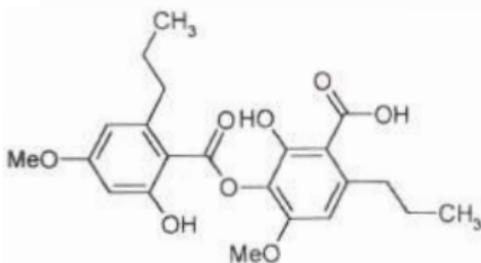
Según Reinhold [4], los tipos de compuestos encontrados en las plantas líquénicas son los siguientes:

Ácidos lactónicos y derivados	Ácidos grasos
Diterpenos	Triterpenos
Esteroides	Carotenoides
Alcoholes polihídricos	Carbohidratos
Orcinol y derivados	Dépsidos
Depsidonas	Depsona
Cromanona y derivados	Quinonas
Ácido púlvico y derivados	Dibenzofurano y derivado
Compuestos que contienen S y N	Aminoácidos
Vitaminas	Enzimas

Acido m-escrubiculina



Acido sequicaico



Acido thamnólico

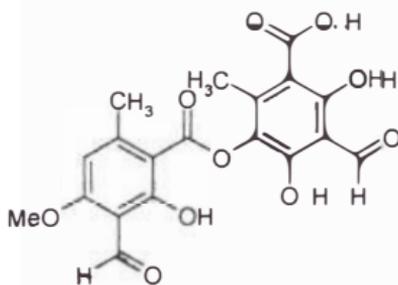


Figura No. 3: Dépsidos

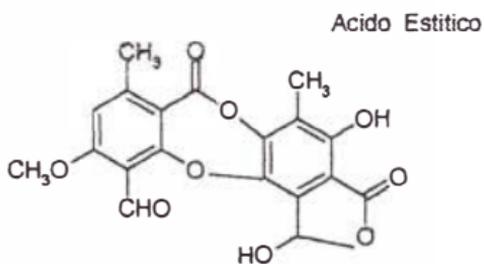
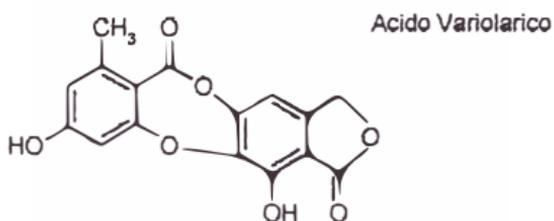
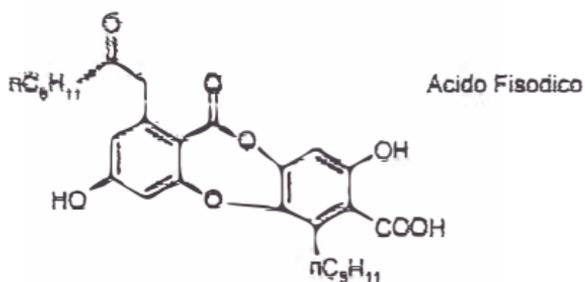


Figura No. 4: Depsidonas

Depsona: Acido picroliquénico
Pertusaria amara

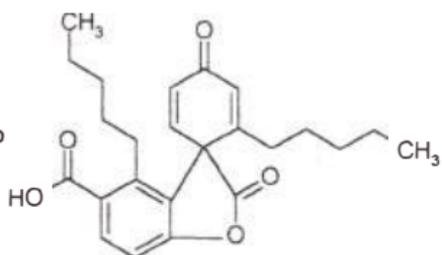
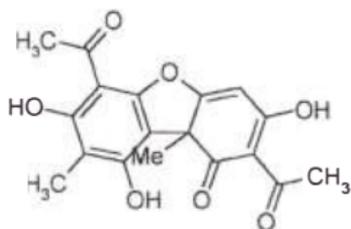
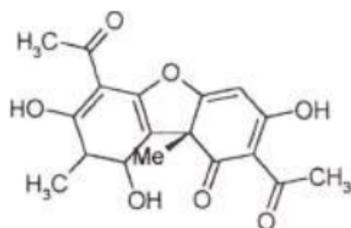


Figura No. 5: Depsona

(+)-(R)-Acido úsnico



(-)-(S)-Acido úsnico



(+)-(R)-Acido isoúsnico

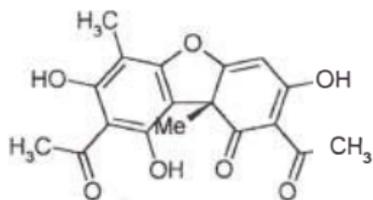
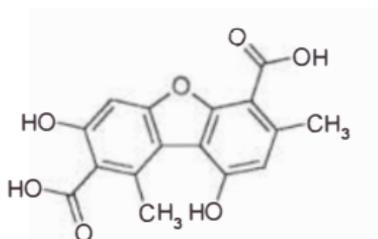
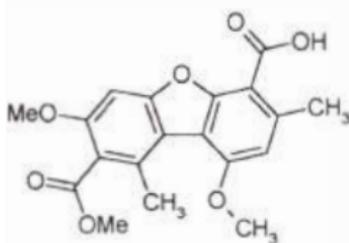


Figura No. 6: Acidos úsnicos

Acido panarico



Acido chizopéptico



Acido didímico

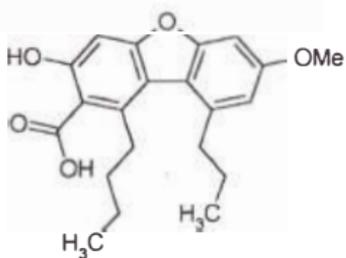


Figura No. 7: Dibenzofuranos

4. USOS Y APLICACIONES DE LOS LÍQUENES

En este mundo moderno, el papel más importante que desempeñan los líquenes en relación a los seres humanos, es el de indicadores biológicos de la contaminación del ambiente, además, se pueden utilizar en base a sus :

- Propiedades farmacológicas
- Capacidad quelante
- Por tener acción sobre reacciones fotoquímicas ligadas a cationes y
- Usado como pigmento,

El compuesto líquénico más estudiado es el ácido úsnico, los isómeros ópticos de este ácido muestran un amplio espectro de actividad fisiológica. Son activos frente a neumococos, estreptococos y estafilococos. Además presentan actividad antibiótica frente a los diferentes tipos de *Mycobacterium*. Asimismo, se ha conseguido ampliar considerablemente el espectro de antibiosis de estos ácidos por la obtención de derivados [3, 5].

Para la planta líquénica en estudio, según encuesta a los lugareños de la zona de recolección, la usan en enfermedades, como bronquitis.

5. *Thamnolia vermicularis*

Este género *thamnolia*, tiene un amplio rango de distribución, se encuentra principalmente en el ártico y montañas en el hemisferio norte, pero también en las montañas alpinas, de región de fría temperatura en el hemisferio sur; se caracteriza por tener un talo hueco [6], de reproducción asexual, químicamente variable, de color blanco. Entre las especies del género *thamnolia* tenemos: (Figuras No. 8 y 9)

1. *Thamnolia vermicularis* subsp. *vermicularis*
2. *Thamnolia vermicularis* subsp. *solida*

5.1. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS de la *Thamnotia vermicularis* subsp. *vermicularis*

El talo es recto o decumbente, muy variable pero siempre tiene un hueco, algunas veces forma un denso penacho por las ramas desde la parte basal o a lo largo de decumbente podocio hasta los 16 cm de talo, cilindrico a ligeramente irregular, ocurre también como ramas individuales sobre el suelo, las ramas irregulares terminan en una punta fina u otros en uniformemente mas delgada; tienen de 1-2 mm de diámetro de color blanco grisáceo, contienen el ácido thamnólico.

5.2. TAXONOMÍA DE LA *Thamnotia vermicularis* subsp. *Vermicularis* s. str

Reino	Vegetal
Tipo	Criptógamas
Phylum	Esthalophyta
División	Ascolichenes
Clase	Lecanorales
Familia	Siphulaceae
Género	Thamnotia
Especie	Thamnotia vermicularis
Sub especie	vermicularis
Nombre científico	Thamnotia vermicularis subsp. Vermicularis s. str.
Sinonimia	Thamnotia vermicularis var. Subuliformis, Thamnotia vermicularis var. subuliformis, Thamnotia subvermicularis.

2.5.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LA *Thamnia vermicularis* subsp. vermicularis

En la bibliografía se reportan estudios botánicos y quimiotaxonómicos de ésta especie, en los que se indica que contiene: Ácido thamnólico, y otros compuestos no identificados [6]. Se debe aclarar, que este compuesto fue identificado como resultado de un análisis por cromatografía en capa delgada y por HPLC, pero no hay estudios en cuanto al aislamiento y caracterización del compuesto en esta especie.

5.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LA *Thamnozia vermicularis* subsp. *vermicularis*

En la bibliografía se reportan estudios botánicos y quimiotaxonómicos de ésta especie, en los que se indica que contiene: Ácido thamnólico, y otros compuestos no identificados [6]. Se debe aclarar, que este compuesto fue identificado como resultado de un análisis por cromatografía en capa delgada y por HPLC, pero no hay estudios en cuanto al aislamiento y caracterización del compuesto en esta especie.



Figura No. 8: *Thamnolia vermicularis* subsp. *solida*

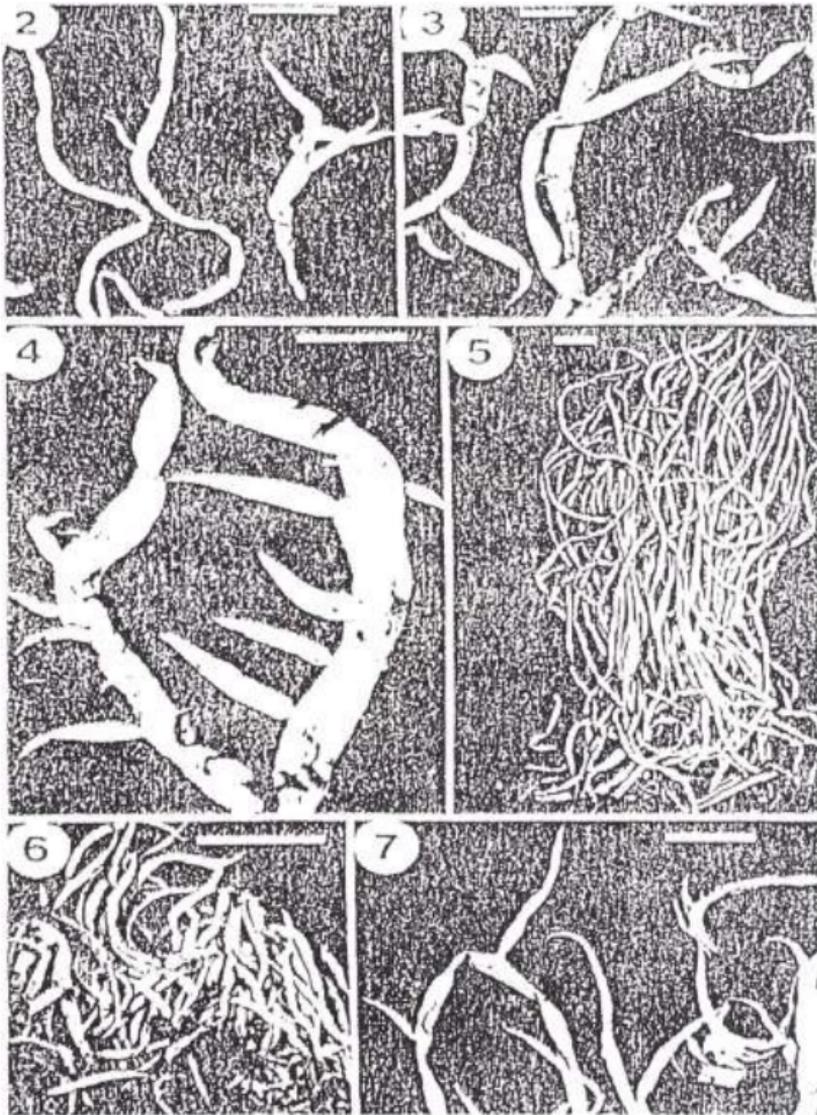


Figura No.9: *Thamnolia vermicularis* subsp. *vermicularis*

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. MUESTRA

La muestra constituye el líquen completo, el cual ha sido recolectado por el tesista, en el Departamento de Junín, Provincia de Huancayo, a orillas del Lago Huaytapallana que esta a una altitud de 4200 msnm., en mayo de 2000; su nombre científico es: *Thamnolia vermicularis* subsp. *vermicularis* s. str., la cual ha sido identificado por la Dr. Teuvo Ahti (University of Helsinki - Finlandia), y el PD Dr. H. Thorsten Lumbsch (Universität GH Essen – Germany), Anexo IV.

2. ANÁLISIS PRELIMINAR

2.1. MARCHA FITOQUÍMICA

Se han desarrollado diferentes métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos en la planta, basados en la extracción de éstos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración [8 - 10].

Se realizó una marcha fitoquímica según el proceso que se expone en la Figura No. 11.

3.2.2. REACCIONES DE COLORACIÓN PARA COMPUESTOS LIQUENICOS

- Para reconocer los ácidos fenólicos se emplea el cloruro férrico en disolución acuosa al 1%, o en disolución etanólica.
- Las sustancias liquénicas que posean en uno de sus anillos, dos grupos hidroxilos en posición meta (2-4 ó 4-6), se pueden reconocer empleando una disolución acuosa saturada de Hipoclorito de calcio.

- La presencia de depsidonas, es detectable empleando una disolución acuosa de KOH al 5%. Su acción se basa en la ruptura del éster mediante hidrólisis alcalina, conduciendo a la formación de un compuesto difenólico con un enlace éster.
- Se puede emplear sucesivamente KOH y $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ juntos. Observándose color rojo con depsidonas [2, 5].

3. AISLAMIENTO: EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN

Se extrae 210 gramos de líquen con acetona por maceración por 7 días a temperatura ambiente, se filtra, se repite la extracción por otros 7 días, finalmente se tiene un extracto total de 1,5 L de acetona, el cual se concentra al vacío con el rotavapor, hasta 100mL. Este extracto concentrado, se guarda en reposo a 0°C, durante un día, se observa que se precipita un sólido, el que se filtra y se lava con cloroformo frío, obteniéndose un sólido I (Figura No. 11). El líquido filtrado se concentra hasta 10 mL, luego se realiza con él una cromatografía en columna (CC), bajo las siguientes condiciones:

Fase estacionaria	Silica Gel para CC de malla 110-230 35 cm de la columna cromatográfica
Columna	50 x 2,2 cm
Fase móvil	Tabla No. 1
Flujo	1 gota / seg

Se colecta en tubos de ensayo en volúmenes aproximados de 5 mL hasta un total de 60 tubos.

- La presencia de depsidonas, es detectable empleando una disolución acuosa de KOH al 5%. Su acción se basa en la ruptura del éster mediante hidrólisis alcalina, conduciendo a la formación de un compuesto difenólico con un enlace éster.

Se puede emplear sucesivamente KOH y $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ juntos. Observándose color rojo con depsidonas [2, 5].

3.3. AISLAMIENTO: EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN

Se extrae 210 gramos de líquen con acetona por maceración por 7 días a temperatura ambiente, se filtra, se repite la extracción por otros 7 días, finalmente se tiene un extracto total de 1,5 L de acetona, el cual se concentra al vacío con el rotavapor, hasta 100mL. Este extracto concentrado, se guarda en reposo a 0°C, durante un día, se observa que se precipita un sólido, el que se filtra y se lava con cloroformo frío, obteniéndose un sólido I (Figura No. 11). El líquido filtrado se concentra hasta 10 mL, luego se realiza con él una cromatografía en columna (CC), bajo las siguientes condiciones:

Fase estacionaria	Silica Gel para CC de malla 110-230 35 cm de la columna cromatográfica
Columna	50 x 2,2 cm
Fase móvil	Tabla No. 1
Flujo	1 gota / seg

Se colecta en tubos de ensayo en volúmenes aproximados de 5 mL hasta un total de 60 tubos.

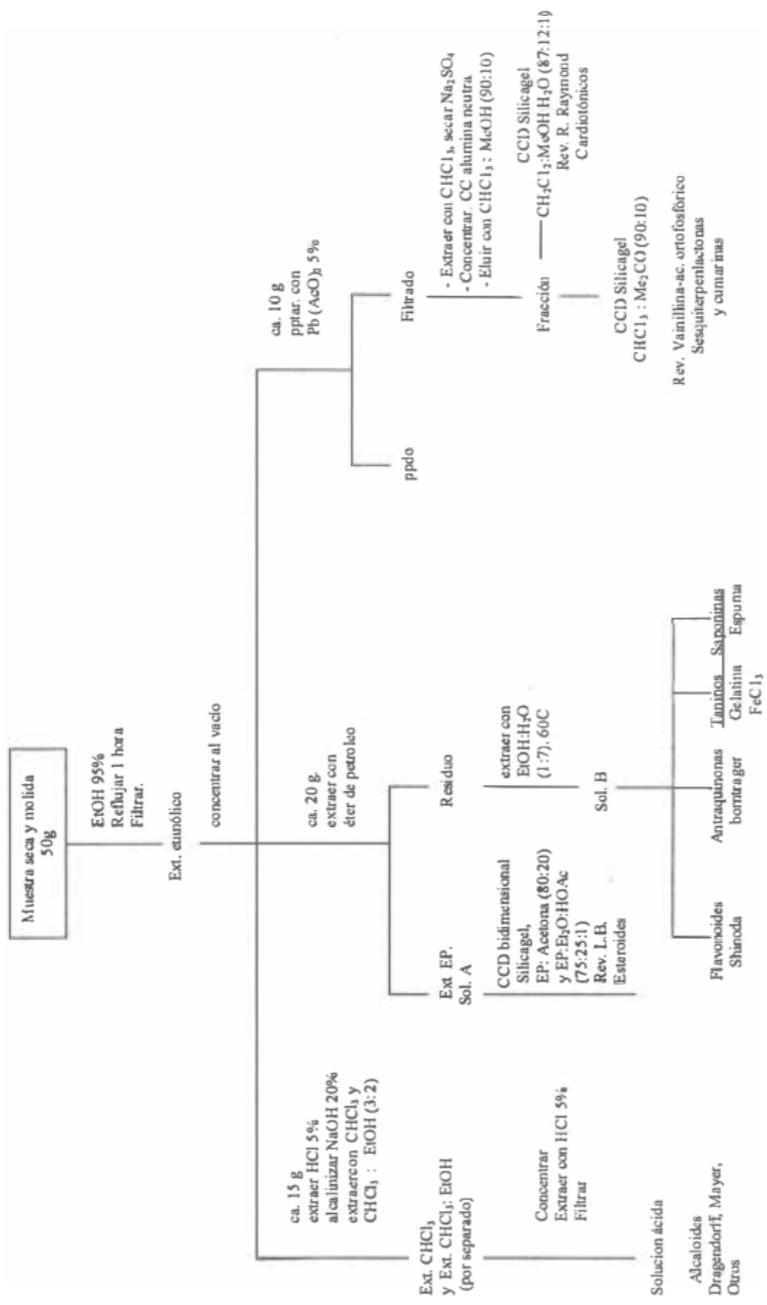


Figura No. 10 . Marcha Fitoquímica

Tabla No. 1: Fase Móvil para la CC

Sistema de Disolvente	Proporción V / V	Volumen en mL
CHCl ₃ – MeOH	5 : 0	50
	4 : 1	50
	3 : 2	50
	2 : 3	50
	1 : 4	50
	0 : 5	50

Se obtiene en total 60 fracciones a las cuales se somete a cromatografía de capa delgada (CCD), eluyendo con el sistema CHCl₃ – EtOH (1:1), se revelan los capas delgadas con vapores de yodo, se juntan aquellas fracciones que tiene las mismas composiciones, Tabla No. 2.

Tabla No. 2 : Sólidos aislados de las fracciones del extracto acetónico

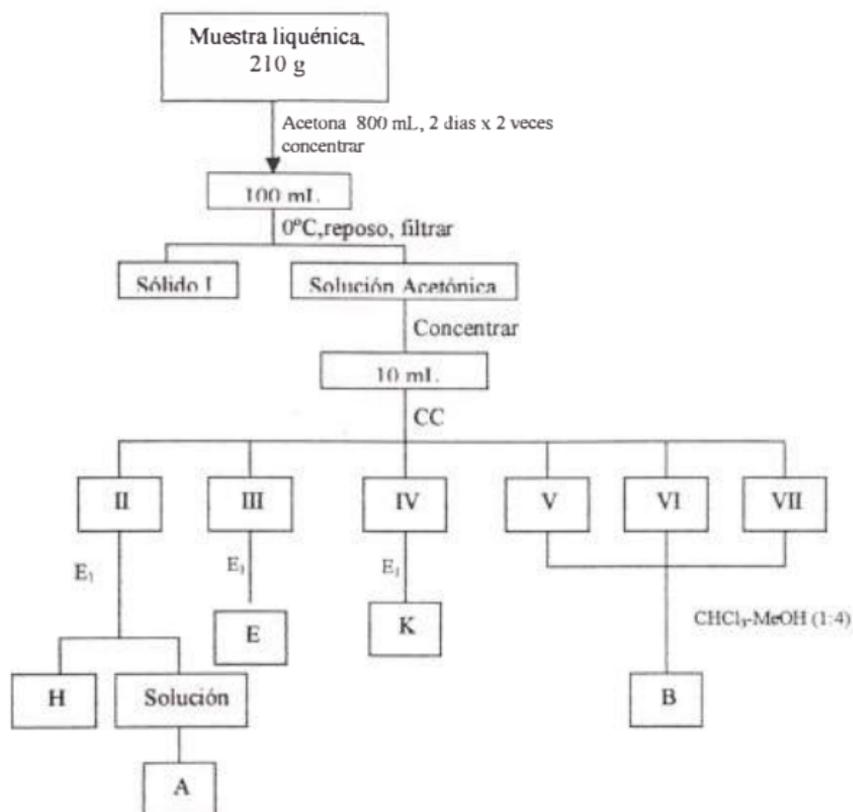
No.	Fracción	Sólido	R _f
1	3 – 6	II	0,52
2	9 – 15	III	0,45
3	20 – 28	IV	0,34
4	32 – 44	V	0,60
5	47 – 51	VI	0,58
6	52 – 56	VII	0,57

La fracción II, se disuelve en el sistema $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (1:1), se deja en reposo a 0°C , luego se filtra así se obtiene un sólido H (80 mg, color blanco); el filtrado se concentra y se trata con acetona quedándonos un sólido A (120 mg, color crema - blanco) de la fracción II. La fracción III se purifica disolviéndola con $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (1:1), se guarda a 0°C por dos horas y luego se filtra así se obtiene un sólido E (120 mg, color crema) después de lavar con el mismo sistema, el filtrado se desecha. A partir de la fracción IV se disuelve con el sistema $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (1:1), se enfría a 0°C , por dos horas, luego se filtra y se obtiene el sólido K (140 mg, color crema).

Se hicieron CCD de cada sólido sobre cromatofolios de Sílica Gel bajo el sistema Tolueno - $\text{AcOEt} - \text{Ac.Ac. glacial}$ (6:4:1), revelando con una solución de H_2SO_4 (10%) en MeOH , el resultado confirma para H y A tienen una mancha, mientras que para E dos manchas y para K 3 manchas.

Al sólido I, se le agrega 15 mL de acetona y se calienta hasta ebullición, así en caliente se filtra, esto se repite dos veces más. El extracto acetónico se concentra hasta 5 mL, se deja en reposo a 0°C por un día, obteniendo unos cristales amarillos (S2), el cual se filtra en frío y se lava con acetona helada; se mide su punto de fusión el cual nos da $203-204^\circ\text{C}$, además al reaccionar con KOH da una coloración amarillo.

Por otro lado, las fracciones V, VI y VII, se purifican cada uno disolviendo con $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (1:4), luego se deja en reposo a 0°C por 4 horas, se filtra el sólido formado el cual se lava con el mismo sistema pero frío; así se obtienen un sólido de cada fracción, luego se realizan un cromatografía de CCD a los tres sólidos obtenidos, bajo el sistema: Tolueno- $\text{AcOEt} - \text{Ac.Ac. Glacial}$ (6:4:1), revelado con una solución de H_2SO_4 en MeOH (10%), analizando los cromatogramas se observa dos manchas con R_f muy parecido, entonces se asume que son iguales y se unen todos estos sólidos marrones-claros (Sólido B) resultando 165 mg.



$E_1 = \text{CHCl}_3 : \text{MeOH} (1:1)$

Figura No. 11: Proceso químico del aislamiento de compuestos líquénicos

Para caracterizar los sólidos aislados (S2, H, A, B, E y K) se envían las muestras al extranjero para el análisis espectroscópico de $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ y Espectrometría de Masa. Los análisis de UV-Vis e IR se realizan en los Laboratorios de Instrumentación de la PUCP.

4. ANALISIS DE LAS FRACCIONES POR HPLC

Los sólidos del extracto acetónico (H, A, B, E y K), se envía al extranjero, para su análisis por HPLC. La muestra se trata de la siguiente manera: 20 mg de muestra sólida se extraen con acetona fría, por 5 minutos en un Ultrasonic (Equipo que desgasifica), se decanta y se toma una alícuota para inyectar al cromatógrafo [11]. Las condiciones cromatográficas son :

Cromatógrafo	Kontron HPLC, Systems-Data Systems
Detector	UV - 430
Columna	Spherisorb %ODS-2, Kontron, 250 x 4,6 mm
Estándares Internos	20 mg de ácido benzoico y 20 mg de ácido solorínico por 1000 mL acetona
Fase móvil	A: Agua bidestilada con 1% de ácido ortofosfórico. B: Metanol Baker. A y B se desgasifica con el Ultrasonic.
Flujo	0,7 mL / min
Volumen de inyección	5 μL
Longitud de onda	245 nm
Laboratorio	Cromatografía - Departamento de Química (Univ. Nac. Australia)
Operador	Dr. J. Elix.
Fecha	31 -03 -2001

Se compararon los tiempos de retención obtenidos de la muestra con la base de datos que tiene el laboratorio a partir de muestras puras extraídas de otras plantas, bajo la mismas condiciones.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PRELIMINAR

Los resultados de los análisis cualitativos: Marcha fitoquímica y reacciones de coloración para compuestos liquénicos, se encuentran en la Tabla No. 3

Tabla No. 3 : Resultados del Análisis preliminar

REACTIVOS	COMPUESTO	RESULTADO (*)
FeCl ₃	Fenoles y taninos	+
Ninhidrina	Aminoácidos	+
Shinoda	Flavonoides	-
Borntrager	Antraquinonas	-
Dragendorff	Alcaloides	-
Mayer	Alcaloides	-
L.B.	Esteroides y triterpenos	+
FeCl ₃	Acidos fenólicos	++
KOH	Depsidonas	++
Ca (ClO) ₂	Dépsidos	+++
KOH + Ca (ClO) ₂	Acido úsnico	+

(*) Convención: +++ abundante, ++ regular, + trazas, - negativo

2. RESULTADOS DEL EXTRACTO ACETONICO

Los resultados de la extracción, separación y purificación del extracto acetónico se resumen en la Tabla No. 4.

Tabla No. 4: Sólidos obtenidos del extracto acetónico

Fracción	Nombre	Cantidad	Observaciones
I	S2	110 mg	Agujas amarillas cristalinas
II	H	80 mg	Sólido blanco
	A	120 mg	Sólido crema-blanco
III	E	120 mg	Sólido crema
IV	K	140 mg	Sólido crema
V, VI, VII	B	165 mg	Sólido marrón – claro

3. ELUCIDACION ESTRUCTURAL DEL SOLIDO H

La reacción de coloración con KOH nos dió amarillo, H tiene punto de fusión 215°C con descomposición, el espectro UV-vis, tiene longitud de onda máxima en 267, 313 y 365 nm (Figura No. 12) que indica la presencia de un grupo cromóforo fuertemente conjugado.

Del espectro IR (Figura No. 13), se determina por ejemplo presencia del grupo OH fenólico a 3411,6 cm^{-1} , C=O cetónico a 1745, C=O ácido a 1651 cm^{-1} ; C=C a 1526,6 cm^{-1}

Analizando el espectro ^1H -NMR, en acetona- d_6 , se observan los desplazamientos (δ), del solvente es a 2,86 y 206 ppm (Figura No. 14) y se identifican los desplazamientos de cada protón: Los metilos por lo general aparecen alrededor de 1,0 ppm, pero cuando están acoplados a grupos como a anillos aromáticos, OH, éstos metilos son desplazados sus señales a campos bajos 2,28 y 2,55 ppm.

Además del espectro se observa también señales de 2 protones aromáticos a 6,41 y 6,79 ppm, los cuales estarán en dos anillos diferentes y estos a su vez estarán bien sustituidos ya que las señales son singuletes y de diferentes alturas de los picos.

Por otro lado, se observa que a 10,3 ppm hay una señal lo cual indica que es un aldehído aromático; finalmente, del pico de 11,2 ppm aproximadamente se podría decir que se trata de un grupo COOH, ya que estos grupos frecuentemente presentan señales entre 11 -12 ppm; toda la información espectroscópica se encuentra en la Tabla No. 5.

Tabla No. 5: Datos del Espectro de ^1H -RMN del sólido H

DESPLAZAMIENTO En ppm	INTEGRACION	ASIGNACION
2,28	3H, s	-CH ₃
2,55	3H, s	-CH ₃
4,16	3H, s	metoxi
6,41	1H, s	protón aromático
6,79	1H, s	protón aromático
10,30	1H, s	-CHO
11,2	1H, s	-COOH

Reuniendo los datos de UV-Vis, IR, ^1H -NMR y observando su cromatograma de HPLC (Figura No. 15), nos indica que el compuesto H se trataría del compuesto Acido decarboxihámónico, entonces se analiza el espectro de C^{13} -NMR (Figura No. 16) del compuesto H, para sustentar esta hipótesis. Los desplazamientos de cada carbono del compuesto se resume en la Tabla No. 6.

Los datos del espectro de masa (Figura No. 17), nos indica que su fórmula global es: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_9$, su peso molecular es de 376,0; con fragmentos a 332 (al perder un CO_2 de 376), 265, 226 (cuando pierde un grupo CHO del fragmento 265), 191 (pico padre), otros fragmentos son 165, 150, 121, 105, 93 y 65 (Figura No. 18).

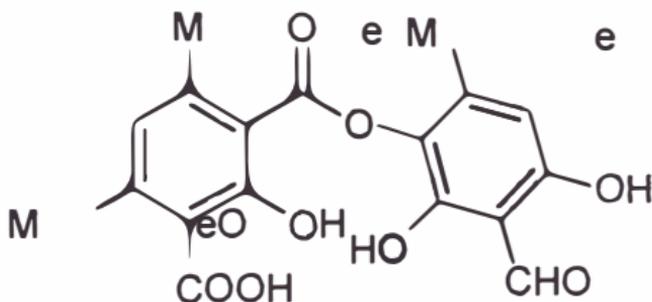
Tabla No. 6: Datos espectro C¹³ – NMR del compuesto H

No. de Carbono	Desplazamiento δ en ppm	No. de carbono	Desplazamiento δ en ppm
C-1	99,2358	C-1'	108,348
C-2	165,934	C-2'	156,5
C-3	105,610	C-3'	143,893
C-4	161,332	C-4'	137
C-5	105,610	C-5'	109,893
C-6	147,072	C-6'	159,846
C-7	164	C-7'	194,550 (CHO)
C-8	171,5 (COMe)	C-8'	17,5091(CH ₃)
C-9	21,0333 (CH ₃)		
C-4-Ome	57,7334		

Entonces, el compuesto H aislado se propone que se trataría del ácido decarboxi-thamnólico, el cual en resumen tiene las siguientes características :

- Las reacciones de coloración con KOH nos amarillo.
- Punto de fusión 215°C con descomposición.
- UV-vis, tiene su Longitud de onda máxima en 267, 313 y 365 nm .
- IR (cm⁻¹) : 3599,9; 3411,6; 3181,1; 1745,6; 1651,4; 1526,6; 1430,1; 1293,4; 1277,9; 1238,0; 1200,4; 1187,5; 1113; 1099,1; 833,1; 812,1; 775,2; 724,1; 656; 643,6; 589; 516,4; 460,7; 415,3; 404,1.
- H¹-NMR (δ , ppm): 2,28 (3H, s,metil), 2,55(3H,s, metil); 4,16(3H, s, Ome); 6,41(1H, s, aromático); 6,79(1H, s, aromático); 10,30(1H, s, CHO); 11,2(1H, s, COOH).

- C^{13} -NMR (δ , ppm): 99,2358(C-1), 165,934(C-2), 105,610(C-3), 161,332(C-4), 105,610(C-5), 147,072(C-6), 164(C-7), 171,5(C-8, COMe), 21,0333(C-9, Me), 57,7334(C-4, OMe), 108,348(C-1'), 156,5(C-2'), 143,893(C-3'), 137(C-4'), 109,893(C-5'), 159,846(C-6'), 194,550(C-7', CHO), 17,5091(C-8', Me).
- EM (m/z) $C_{18}H_{16}O_9$, PM: 376,0 ; 332, 265, 226, 191(100%), 165, 150, 121, 105, 93, 65.
- La estructura del ácido decarboxithamnónico es la siguiente.



Equipo	UV-visible
Lugar	Univ. Nacional Australia
Fecha	Marzo de 2001
Operario	Dr. John Elix

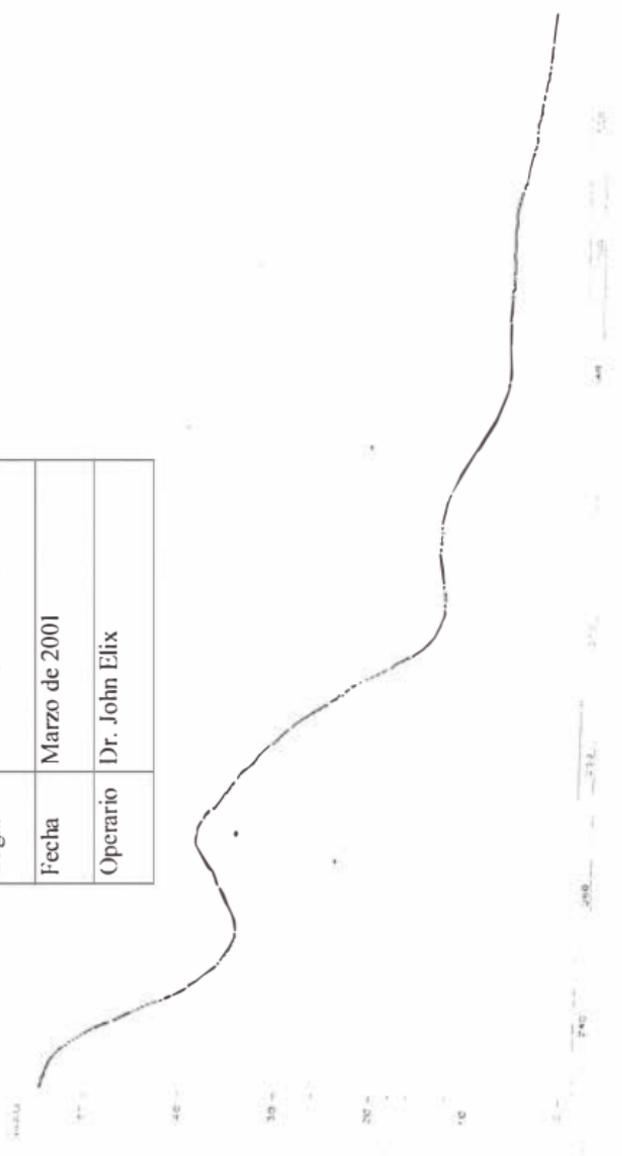


Figura No. 12: Espectro UV-vis del compuesto H

Equipo	FT-IR, serie 1600, Perkin Elmer
Lugar	Pontificia Univ. Católica del Perú
Fecha	Enero 2001
Operario	Nino Castro

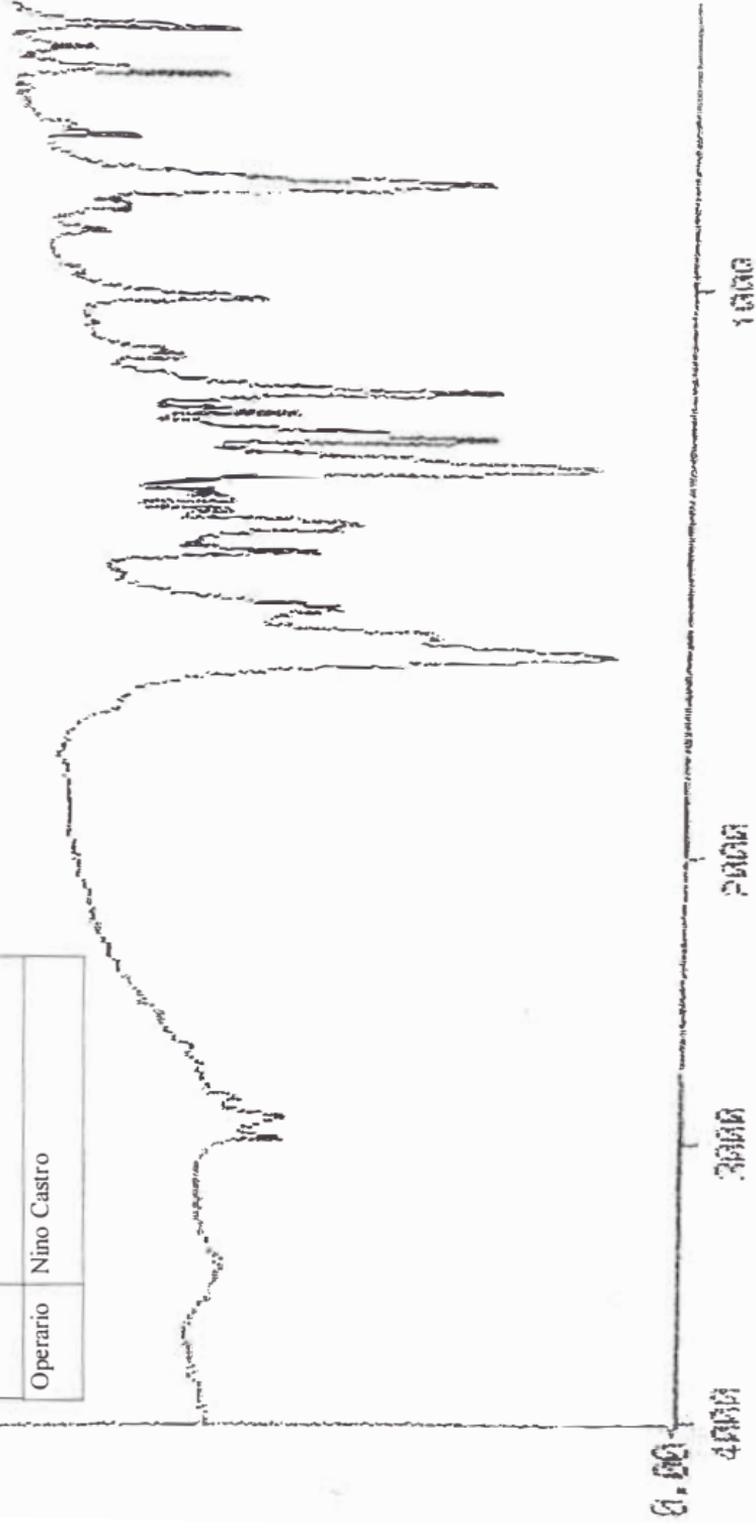
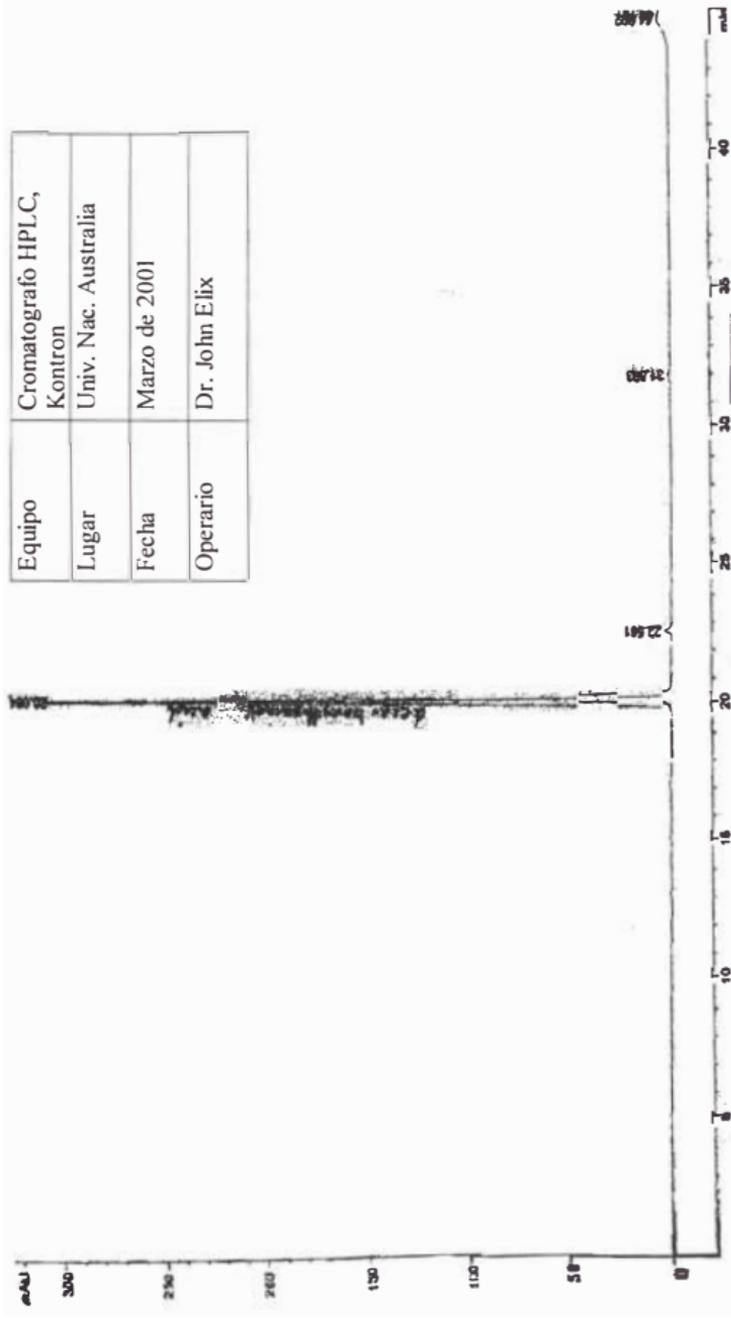


Figura No.13: Espectro de IR del compuesto H



Equipo	Cromatografo HPLC, Kontron
Lugar	Univ. Nac. Australia
Fecha	Marzo de 2001
Operario	Dr. John Elix

Figura No. 15: Cromatograma de HPLC del compuesto H

Equipo	RMN Spectronic Bruker 250 MHz
Lugar	Univ. Nac. Australia
Fecha	Marzo de 2001
Operario	Dr. John Elix

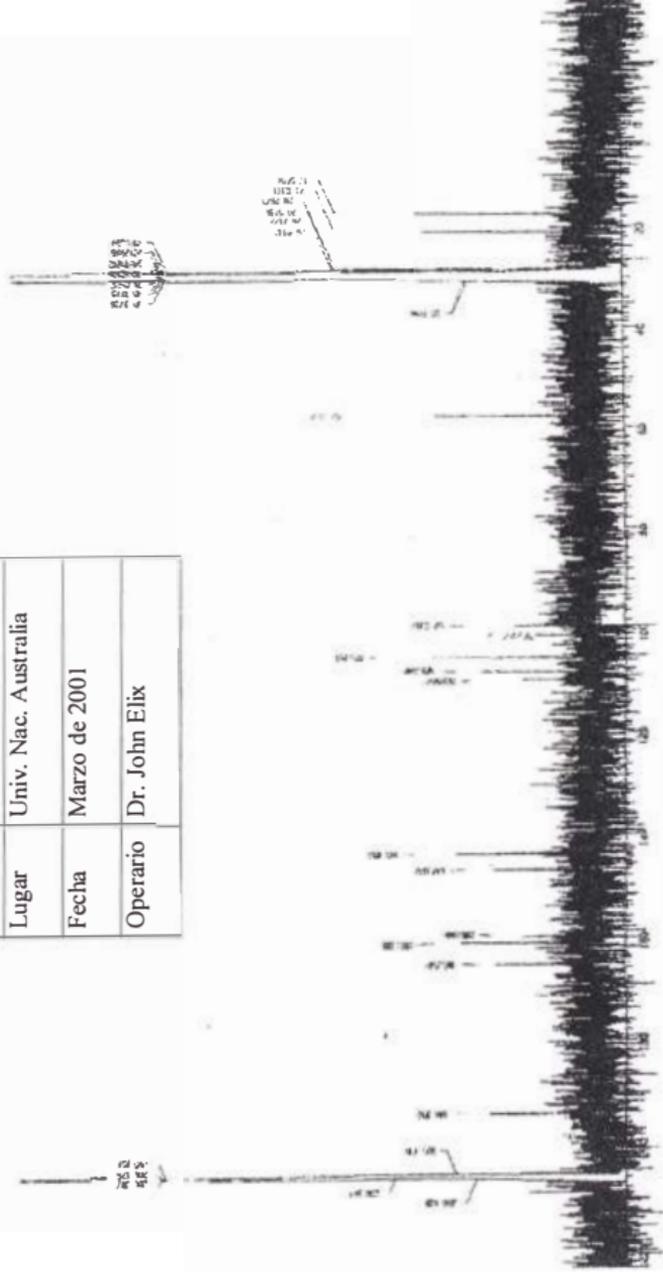


Figura No. 16: Espectro C^{13} -NMR del compuesto H

Equipo	Espectrometro de masa, Kratos MS-25
Lugar	Univ. Nac. Australia
Fecha	Mayo de 2001
Operario	Dr. John Elix

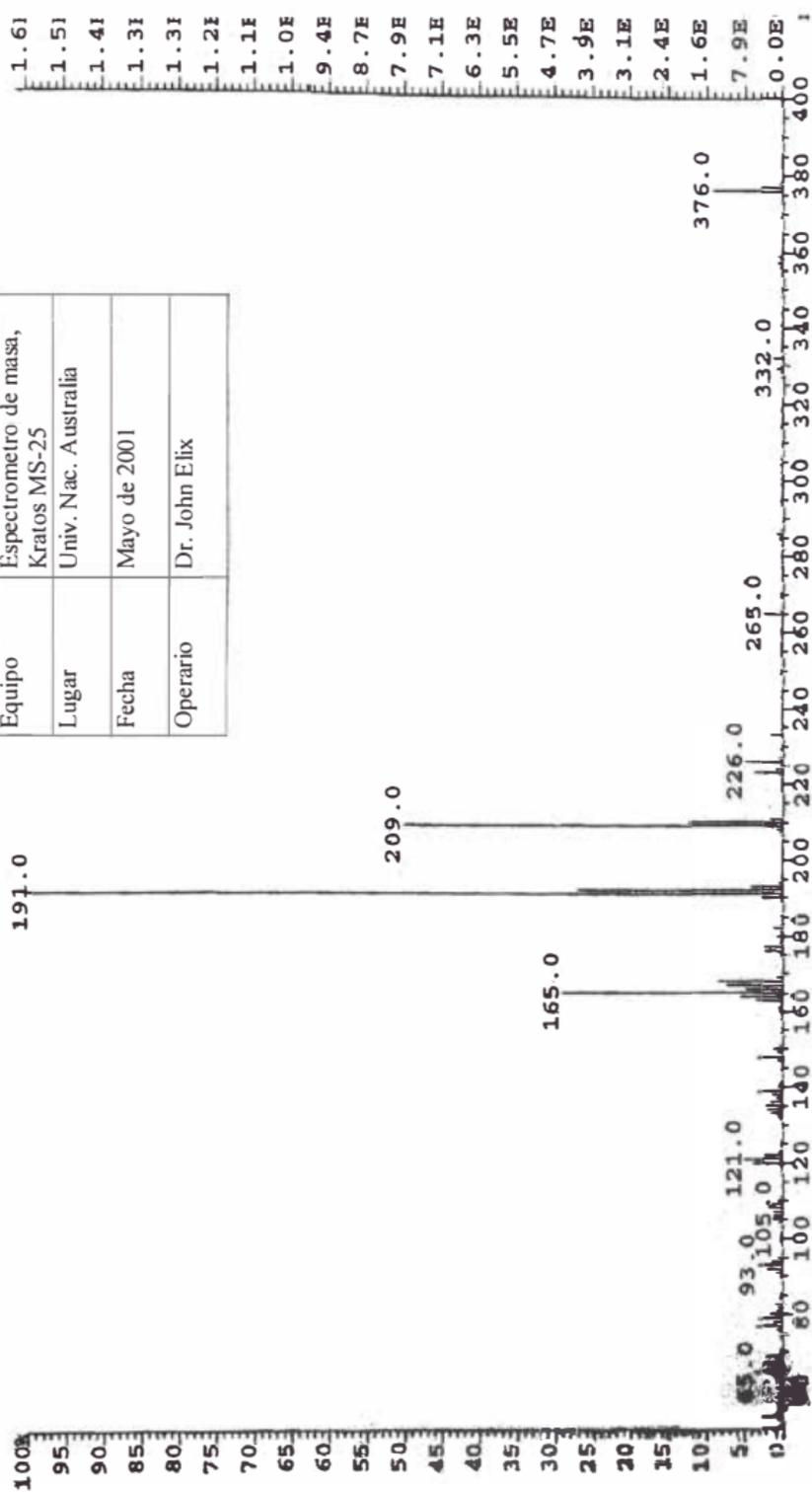


Figura No 17 : Espectro de Masa del compuesto H

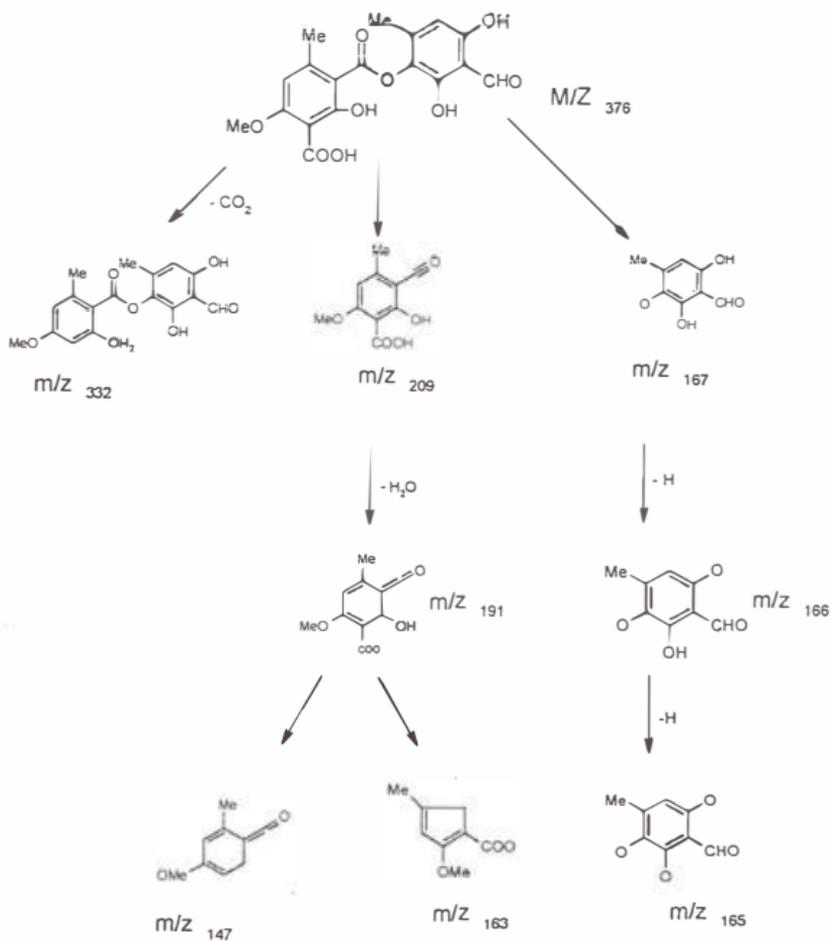


Figura No. 18: Fragmentación del compuesto H

4. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPUESTO S2

El S2 es un sólido cristalino en forma de agujas de color amarillo, soluble en CHCl_3 , poco soluble en MeOH, Acetona, reacciona con KOH dando un color amarillo, y con FeCl_3 da un color rojo; con punto de fusión de: $203^\circ\text{-}204^\circ\text{C}$; al medir su rotación óptica con el polarímetro nos da $[\alpha]^{25} = +492$; estas características indica que S2 podría ser el (+) R ácido úsnico (R por su configuración y determinando su giro dextrógiro), por otro lado, el cromatograma de HPLC de S2, (Figura No. 19), confirma que se trata del ácido úsnico que tiene un tiempo de retención de 26,103min. Bajo las condiciones de ensayo.

En el espectro UV-vis, (Figura No. 20), se aprecia los valores de absorbancia máxima los cuales son bastante cercanos comparados con los reportados por Culberson y Morales, ambos han sido medidos en etanol, los valores de longitud de onda máxima se muestra en la Tabla No. 7.

Tabla No. 7: Comparación de las absorbancias máximas del espectro UV-vis del compuesto S2 y el ácido úsnico

Banda de absorción reportados por	Banda 1	Banda 2
Patricia Morales (*1)	234,4 nm	284,2 nm
Culberson(*2)	233,3 nm	283,2 nm
Compuesto S2	239,6 nm	283,1 nm

Del espectro IR, (Figuras No. 21), se observan valores para el 1691 cm^{-1} que nos indica un alargamiento del $\text{C}=\text{O}$; a 1290 cm^{-1} alargamiento del $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ en el anillo; 1632 cm^{-1} para el grupo $\text{C}=\text{C}$ conjugado, a 3008 cm^{-1} alargamiento del C-H aromático, a 3438 cm^{-1} presencia del los OH; en general las zonas de huella dactilar son bastante parecidas. Los otros valores de absorción se muestran en la Tabla No. 8.

(*1) Morales, P. Tesis de licenciatura, 1992, PUCP, Lima, Perú.

(*2) Culberson, C.F., *Phytochemistry*, 2, 333-340(1963)

Tabla No. 8: Comparación de las absorciones en IR del compuesto S2 y el ácido úsnico

FRECUENCIA en cm^{-1} (*)			
Referencia	Compuesto S2	Referencia	Compuesto S2
704	700,8	1220	1221,5
810	803,2	1290	1290,8
825	819,5	1320	1317,5
848	840,5	1338	1334,5
938	930,7	1360	1358,1
965	959,1	1380	1375,6
998	992,0	1425	1421,2
1030	1024,4	1460	1456,1
1042	1040,1	1550	1542,0
1070	1070,4	1630	1632,2
1118	1118,5	1686	1691,4
1142	1144,0	3000	3008,3
1190	1190,7	3550	3438,1

(*) Valores de frecuencias de la bibliografía No. 14

Analizando el espectro H^1 -NMR (CDCl_3 , δ) del compuesto S2 (Figura No. 22), se determina que el hay un 2 metilos singuletes a 1,76 ppm y a 2,1 ppm aproximadamente este ultimo esta desplazado debido a que debe estar unido a un anillo aromático, además hay otros 2 grupos metoxilo singuletes que sus señales están muy cerca (2,66 ppm y 2,68 ppm), debido a que tiene casi el mismo ambiente que los rodea en la estructura ; por otro lado hay también un protón aromático.

Se observa además que sólo hay 2 oxidrilos, el tercero no se distingue por que su señal esta alrededor de 18 ppm y el espectro no indica este rango. En la tabla No. 9 se muestra una comparación de los valores de desplazamiento con los que indica la referencia [14].

Tabla No. 9: Comparación de los valores de desplazamiento del espectro de ^1H -RMN de S2 y ácido úsnico

DESPLAZAMIENTOS	
δ en ppm	
REFERENCIA (14)	Compuesto S2
1,75 (3H, s, Me-13)	1,7647 (3H, s, Me)
2,10 (3H, s, Me-16)	2,1133 (3H, s, Me)
2,66 (3H, s, Me-15)	2,6653 (3H, s, -COMe)
2,67 (3H, s, Me-18)	2,6855 (3H, s, -COMe)
5,92 (1H, s, H-4)	5,9859 (1H, s, aromático)
11,02 (1H, s, C ₁₀ -OH)	11,0485 (1H, s, OH)
13,31 (1H, s, C ₈ -OH)	13,3309 (1H,s, OH)
18,84 (1H, s, C ₃ -OH)	

En el espectro de ^{13}C - RMN (Figura No. 23) del compuesto S2 (medido en CDCl_3), se observa que los carbonos de los carbonilos de los grupos del -COMe estan bien desplazados a 200,29 (C-14) y 201,73 (C-17) ppm; para los metilos aromáticos los valores son 27,88 (C-13) y 7,50 (C-16) ppm; para el desplazamiento 98,27 ppm se analizando bien el espectro se concluye que hay una sólo señal para dos tipos de carbonos con desplazamientos muy cercanos (C-4 y C-6); en general se observa que hay valores de desplazamiento muy parecidos entre el compuesto S2 y ácido úsnico, Tabla No. 10.

Tabla No.10: Comparación de los desplazamientos del espectro ^{13}C -RMNde S2 y el ácido úsnico

No. Carbono	Desplazamiento del ácido úsnico (δ)	Desplazamiento del compuesto S2
C-1	198,2	197,966
C-2	179,4	179,273
C-3	155,1	155,127
C-4	98,3	98,2731
C-5	101,7	101,433
C-6	99,8	98,2731
C-7	109,5	109,208
C-8	157,6	157,405
C-9	104,2	103,892
C-10	164,1	163,775
C-11	105,4	105,151
C-12	59,2	59,0032
C-13	27,4	27,8844
C-14	200,1	200,290
C-15	32,0	32,0949
C-16	7,7	7,5084
C-17	201,3	201,730
C-18	30,9	31,2602

Analizando el espectro de masa (Figura No. 24) nos indica que se trata del compuesto $C_{18}H_{16}O_7$, cuyo peso molecular es 344,0 sus fragmentos son : 260, 233(100), 217, 161. Coincide exactamente con los datos de referencia. La fragmentación de este compuesto S2 lo tenemos en la Figura No. 25.

Para confirmar la estructura elucidada, se buscó en algunas base de datos por internet, para este compuesto S2, lográndose encontrar en la dirección electrónica <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>, confirmando la estructura que se propone. Figuras No. 26, 27 y 28.

Finalmente, se propone que el compuesto S2 es muy probable que sea el (+)R ácido úsnico y que tiene las siguientes características:

Sólido cristalino en forma de agujas y color amarillo.

- Soluble en $CHCl_3$, poco soluble en MeOH, Acetona.
- Reacciona con KOH dando un color amarillo, y reacciona con $FeCl_3$ dando un color rojo.

Punto de fusión : 203°-204° C.

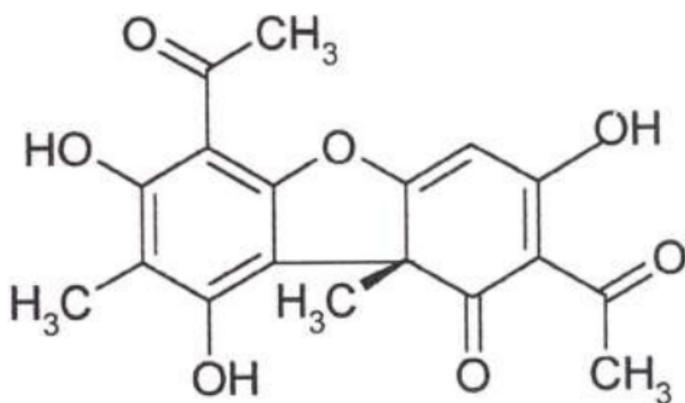
Rotación ópticaes, $[\alpha]^{25} + 492$, ($CHCl_3$, c 1,00)

- UV-vis : longitud de onda máxima 239,6 y 283,1 nm.
- IR (cm^{-1}) 700,8 ; 803,2; 819,5; 840,5; 930,7; 959,1; 992; 1024,4; 1040,1; 1070,4; 1118,5; 1144; 1190,7; 1221,5; 1290,8; 1317,5; 1334,5; 1358,1; 1375,6; 1421,2; 1456,1; 1542; 1632,2; 1691,4; 3008,3; 3438,1.
- H^1 -NMR (δ , ppm) : 1,7647 (3H, s, Me), 2,1133 (3H, s, Me), 2,6653 (3H, s, COMe), 2,6855 (3H, s, -COMe), 5,9859 (1H, s, aromático), 11,0485 (1H, s, OH) 13,3309 (1H,s, OH).

C^{13} -NMR(δ , ppm): 197,966(C-1), 179,273(C-2), 155,127(C-3), 98,2731(C-4), 101,433(C-5), 98,2731(C-6), 109,208(C-7), 157,405(C-8), 103,892(C-9), 163,892(C-10), 105,151(C-11), 59,0032(C-12), 27,8844(C-13), 200,290(C-14), 32,0949(C-15), 7,5084(C-16), 201,730(C-17), 31,2602(C-18).

▪ EM (m/z) . $C_{18}H_{16}O_7$; PM: 344; 260, 233(100%), 217, 161.

▪ La estructura del compuesto S2 es la siguiente:



Equipo	Cromatografo HPLC, Kontron
Lugar	Univ. Nac. Australia
Fecha	Setiembre de 2000
Operario	Dr. John Elix

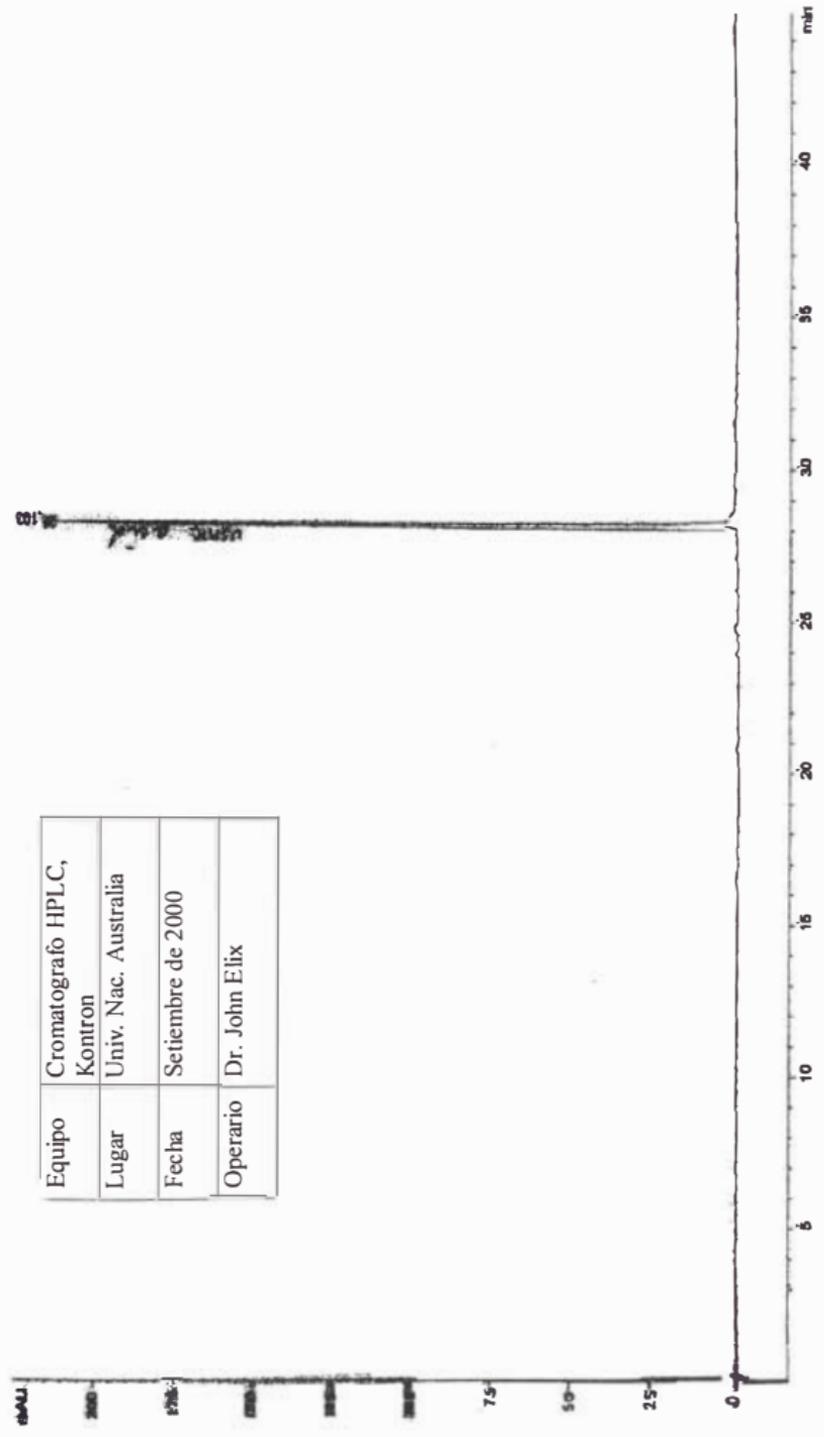
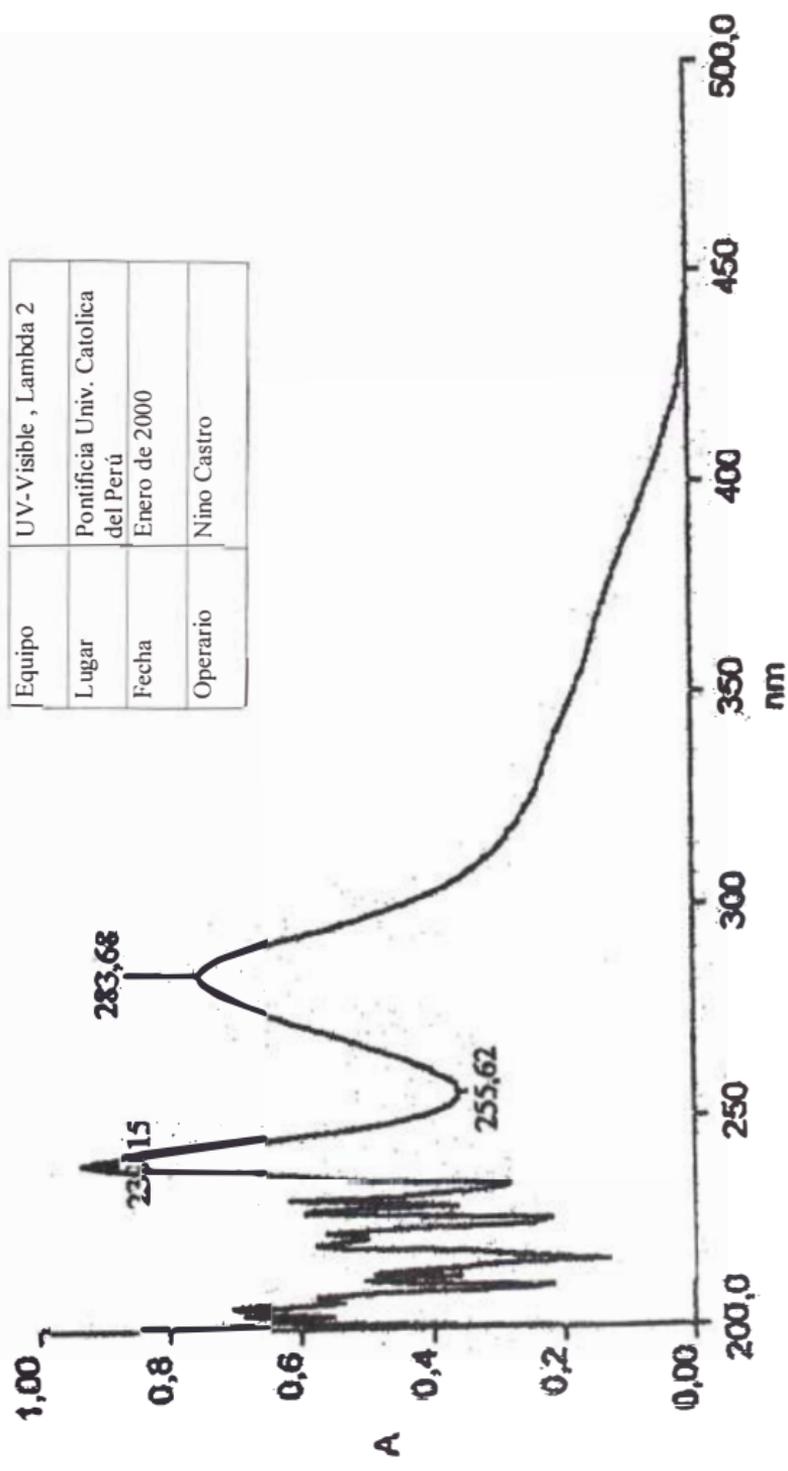


Figura No 19 : Cromatograma de HPLC del compuesto S2



Equipo	UV-Visible , Lambda 2
Lugar	Pontificia Univ. Catolica del Perú
Fecha	Enero de 2000
Operario	Nino Castro

Figura No 20 : Espectro UV-VIS del compuesto S2

Equipo	FT-IR, serie 1600
Lugar	Pontificia Univ. Catolica del Perú
Fecha	Febrero de 2000
Operario	Nino Castro

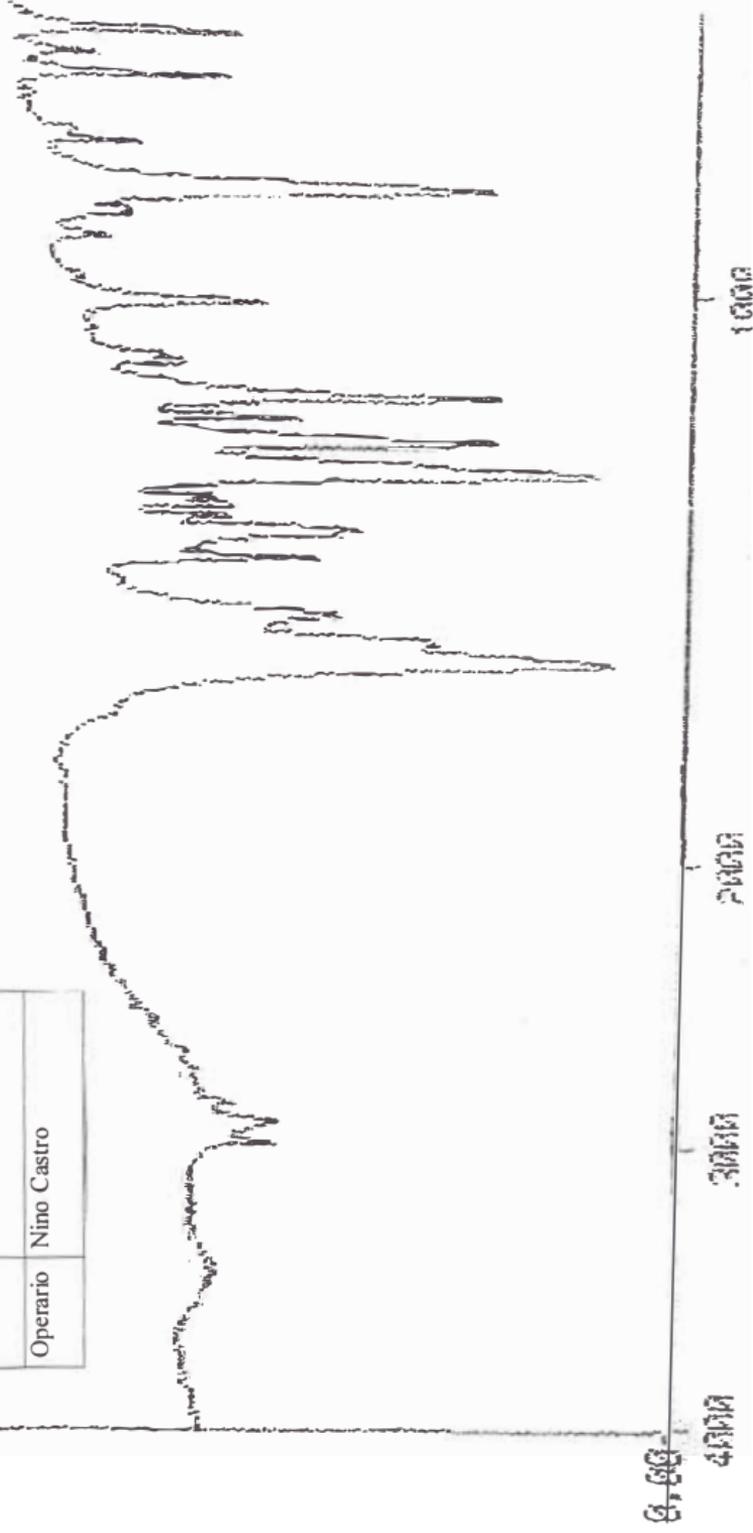


Figura No.21 : Espectro de IR del compuesto S2

Equipo	RMN Spectronic Bruker 250 MHz
Lugar	Univ. Nac. Australia
Fecha	Setiembre de 2000
Operario	Dr. John Elix

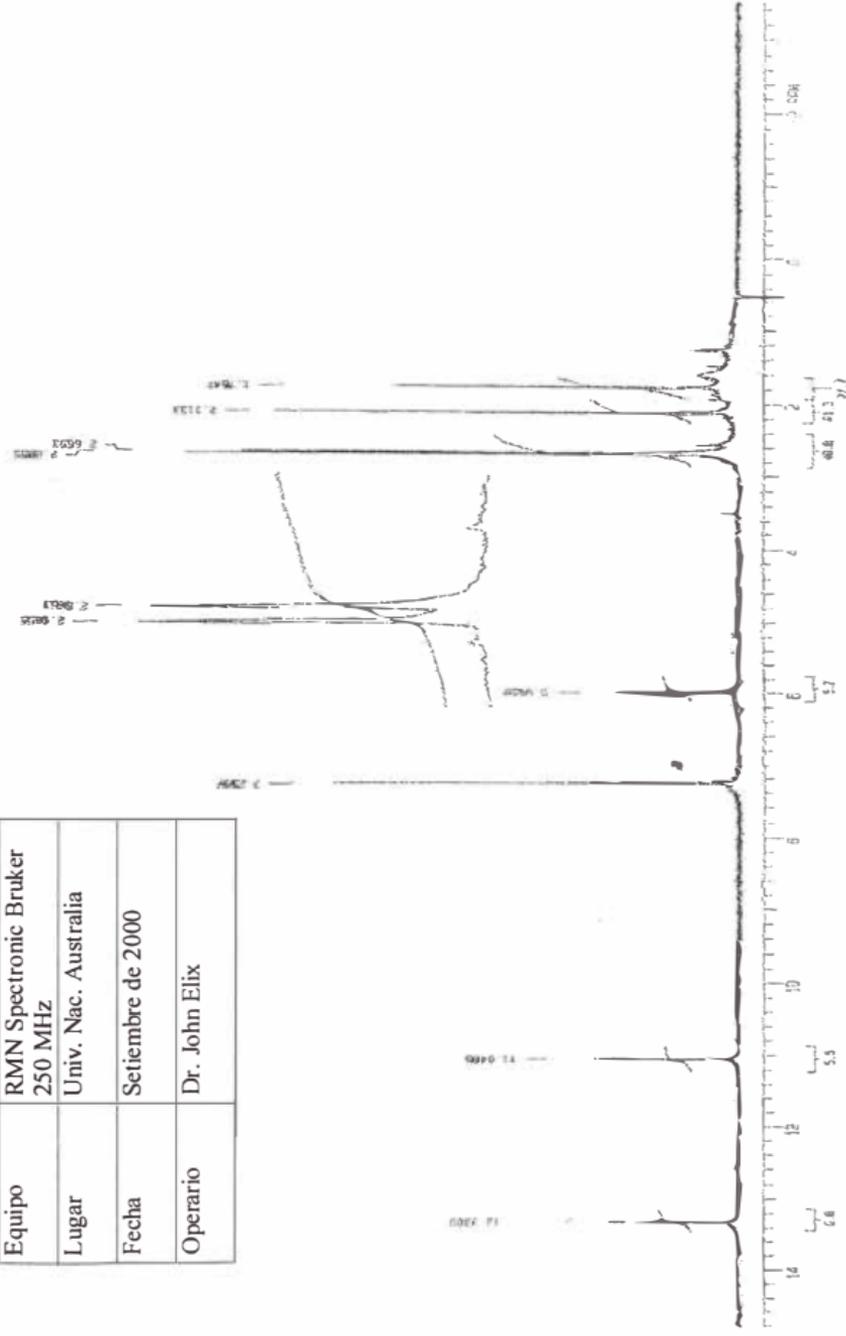


Figura No 22 : Espectro de ¹H-NMR del compuesto S2

Equipo	Espectrometro de masa, Kratos MS-25
Lugar	Univ. Nac. Australia
Fecha	Setiembre de 2000
Operario	Dr. John Elix

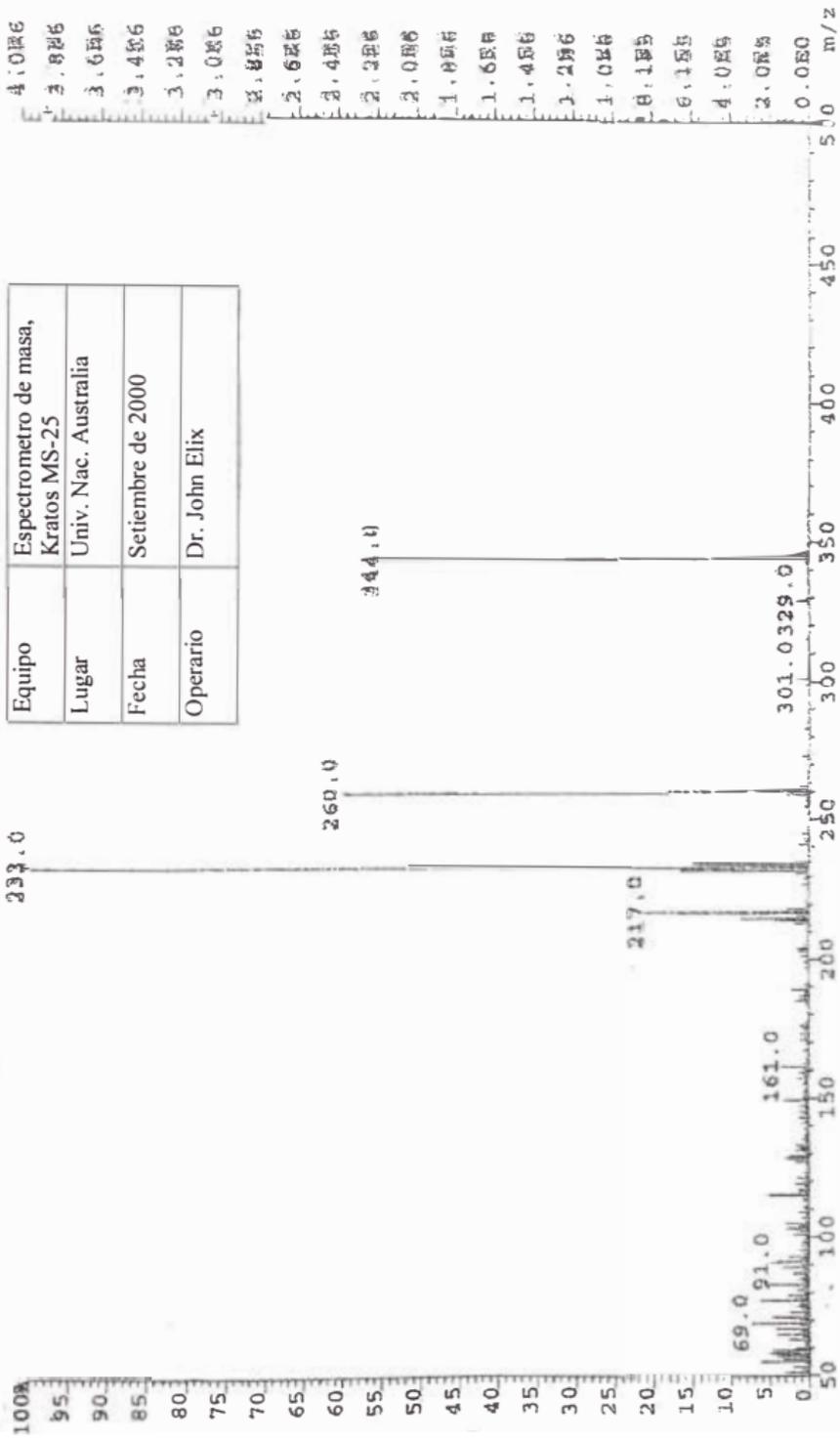


Figura No.24 : Espectro de masa del compuesto S2

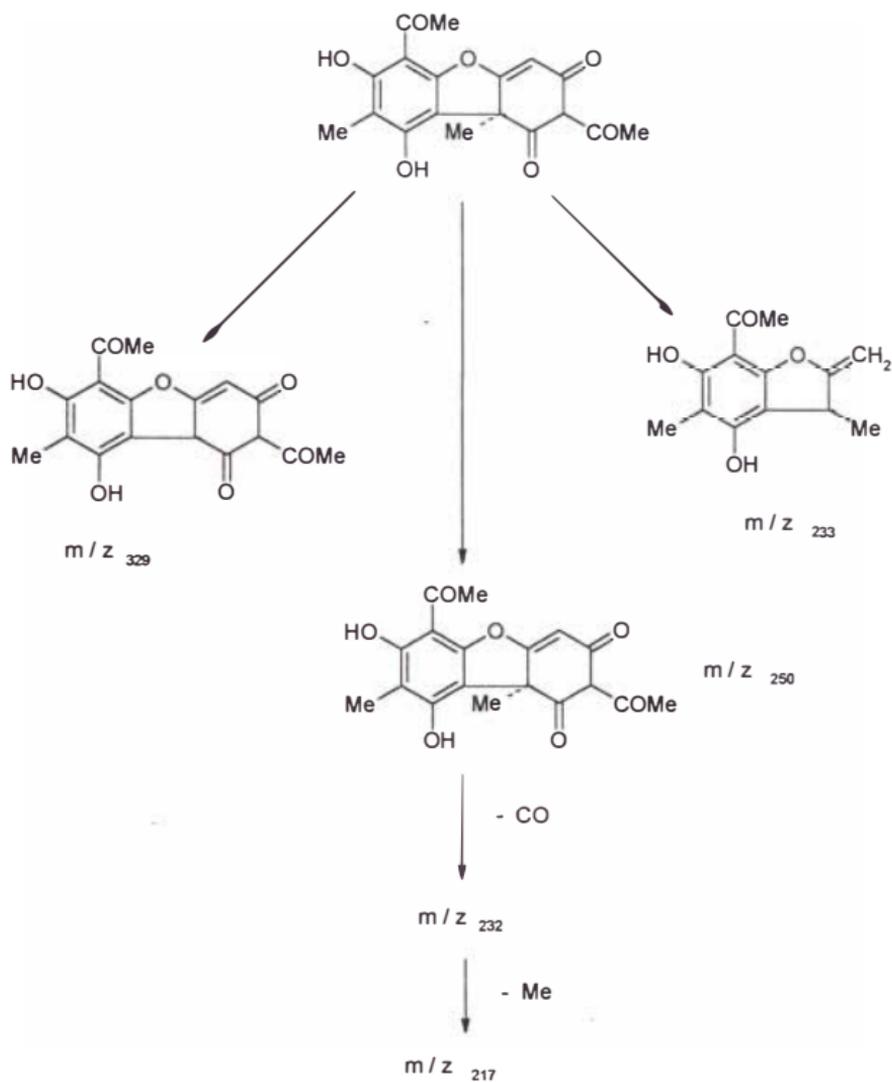


Figura No.25: Fragmentación del compuesto S2

SDBS Compound Information

Compound Name:

usnic acid
usinic acid
usnein
2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyldibenzofuran-1,3(2H,9bh)-dione

Molecular Formula: $C_{18}H_{16}O_7$

Molecular Weight: 344.3

Spectral Code:

Mass :

^1H NMR : 90 MHz in CDCl_3

IR : KBr disc

IR : nujol mull

CAS Registry No: 125-46-2

Chemical Structure

SDBS No: 7871

[Back to Query Page](#)

[Back to SDBS Home Page](#)

V. CONCLUSIONES

Se aisló y se determinó su estructura a 2 compuestos liquénicos, éstos son: Compuesto H (ácido decarboxithamnólico) y compuesto S2 (ácido úsnico).

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda seguir investigando a esta planta liquénica *Thamnolia vermicularis subsp. vermicularis*, y otros líquenes, para ir descubriendo nuevos compuestos y caracterizarlos determinando su estructura química, también se recomienda seguir investigando las otras fracciones.
2. Se recomienda realizar estudios teóricos y prácticos, cualitativo y cuantitativo para determinar los compuestos liquénicos, por medio de un Análisis por HPLC de las plantas liquénicas, ya que estos tipos de investigaciones no hay aquí en el Perú.
3. Se recomienda hacer un análisis por cromatografía de gases de los ácidos grasos que contiene.
4. También podría efectuarse bio-ensayos para determinar y comprobar propiedades farmacológicas de los compuestos liquénicos aislados.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. FINK, B., The lichen of the united states, editorial University of Michigan press, USA, 1960.
2. VICENTE, C., Fisiología de las sustancias liquénicas, Ed. Alhambra, Madrid, 1975.
3. KIKI H. , N, Vilegas, W., Química Nova – Brasil, 21, 110 – 124 (1998), “A química dos líquenes”.
4. REINHOLD L. D. et al, Progress in *Phytochemistry*, 1968, pag 225.
5. ROBLES C., et al., Revista química – PUCP, 6, 65-76 (1992), “Líquenes y sustancias liquénicas”.
6. KARNEFELT, E.I., THELL, A., *Bibl. Lichenol.*, 58, 213-234(1995), “Genotypical variation and reproduction in natural populations of *thamnia*”
7. “Directorio de Tesis Universitarias Peruanas 1950-1986”, Vol. 1, Recurso flora, Lima, 1990.
8. LOCK DE UGAZ, O., Investigación fitoquímica, Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, 1994.
9. DURST, H. D., Química orgánica experimental, Ed. Reverte, Barcelona, 1985.
10. RANDEATH, K., Cromatografía de capa fina, Ed. Urmo, Bilbao, España, 1965.
11. FEIGE, G. B., et al., *J. Chromatography*, 646, 417-427 (1993), “Identificación of lichen substances by a standardized High-performance liquid chromatographic method”.
12. WILLARD, H.H., et al., Métodos instrumentales de análisis, Ed. Iberoamericana, México, 1991.
13. ROBLES, C., et al., Revista Química – PUCP, 6, 192-200 (1992), “Líquenes y sustancias liquénicas – Segunda parte”.

14. HUNECK, S., AND YOSHIMURA, I., Identification of the lichen substances, ed. Springer, Berlin, 1996.
15. SILVERSTEIN, R.M., Spectrometric identification of organic compounds, 5TH. Edition, Ed. John Wiley, 1991.
16. PRETSCH, et al., Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos, Ed. Springer –Verlag Ibérica, Barcelona, 1998.