

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN QUÍMICA**

TITULADA

**“Estudio Químico del líquen *Flavopunctelia
Flaventior (Stirt.) Hale*”**

PRESENTADA POR:

DIANA JUDITH MARTINO CRUZ

ASESORA:

MSc. ELENA ALICIA CÓNDOR CUYUBAMBA

LIMA – PERÚ

2015

*A mis amados padres Ego y Pilar
por todo su amor y apoyo incondicional*

A Katherine, Miguel y Kaiser por tantas alegrías

A José Luis con amor

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer sinceramente a mi asesora, MSc. Elena Córdor Cuyubamba, por el apoyo y los consejos brindados durante la realización del presente trabajo y durante mis años de estudios.

A los miembros del Grupo de Investigación de Química de Productos Naturales, por el constante apoyo que me brindaron durante las diferentes etapas de la realización de esta tesis; a la Dra. María del Pilar Caramantín Soriano y al Dr. Guillermo Schmeda por el apoyo y facilidades brindadas, durante mi permanencia en el Laboratorio del Instituto de Química de los Recursos Naturales para la realización de la purificación cromatográfica del extracto bruto orgánico del liquen, así como para la obtención de los espectros de Masas, y de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H), Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN¹³C), HMBC, IR y UV ; al Instituto General de Investigación de la UNI, por el apoyo económico que me brindaron, para la realización de este trabajo de investigación; finalmente, a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

RESUMEN

Las sustancias liquénicas han adquirido gran importancia en el mundo científico a lo largo de los años. Ha sido ampliamente reportado en la bibliografía que las sustancias liquénicas presentan una importante actividad biológica y tienen propiedades antibacterianas, antitumorales, antioxidantes, antifúngicas, entre otras. Por lo que el estudio químico del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale, tema de esta tesis, pretende presentar información relevante acerca de la presencia de estas sustancias liquénicas en esta especie. A partir del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale, que fue colectado en el distrito de Muquiyauyo, provincia de Jauja, departamento de Junín (3200 msnm), se logró aislar las sustancias liquénicas ácido úsnico, ácido lecanórico y β -orcinol carboxilato de metilo. Para ello se realizó la cromatografía en columna de 0.7622 g de extracto bruto orgánico, obtenido por extracción en acetona, del líquen en estudio. Se utilizó también técnicas de cromatografía en placa preparativa y cromatografía en capa fina. Tanto el ácido úsnico como el ácido lecanórico fueron identificados mediante sus Espectros de Masas (EM), RMN¹H, IR y UV. Mientras que el β -orcinol carboxilato de metilo fue identificado por sus espectros RMN¹H, RMN¹³C, HMBC y UV. Además, se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica). La cuantificación del ácido úsnico por espectrofotometría, tuvo como resultado que el ácido úsnico representa el 1.268% respecto al peso seco del líquen.

Palabras clave: sustancias liquénicas, ácido úsnico, ácido lecanórico, β -orcinol carboxilato de metilo, *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale

ESTUDIO QUÍMICO DEL LIQUEN
Flavopunctelia Flaventior (Stirt.) Hale

	Pág
1. ASPECTOS GENERALES	
A. PRESENTACIÓN	2
B. OBJETIVOS DE LA TESIS	5
2. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	
A. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS AL LIQUEN <i>FLAVOPUNCTELIA FLAVENTIOR (STIRT.) HALE</i>	8
A.1. Líquenes (Barreño,2003)	8
A.2. Sustancias líquénicas	12
A.3. Composición química del liquen <i>Flavopunctelia Flaventior (Stirt.) Hale</i>	14
a) Análisis cualitativo	14
b) Principales sustancias líquénicas presentes en el liquen <i>Flavopunctelia Flaventior (Stirt.) Hale</i>	14
c) Análisis cuantitativo de las sustancias líquénicas	18
A.4. Aislamiento de las sustancias líquénicas	20
a) Procedimiento Castro (2004)	21
b) Procedimiento Cóndor (2010)	22
A.5. Identificación clásica de las sustancias líquénicas	24
a) Comportamiento cromatográfico	24
b) Punto de fusión	25
A.6. Identificación espectroscópica de las sustancias líquénicas	26
a) Ácido úsnico	26
b) Ácido lecanórico	35
c) β -orcinol carboxilato de metilo	43
B. ESTUDIOS QUÍMICOS GENERALES	51
B.1. Análisis cualitativo – Marcha fitoquímica	51
B.2. Test para sustancias líquénicas	52
B.3. Determinación cuantitativa de sustancias líquénicas	52
a) Procedimiento de Castro (2004)	53

b) Procedimiento Nedeljko (2011)	54
c) Procedimiento realizado en la Tesis	55
B.4 Aislamiento de sustancias liquénicas	55
a) Procedimiento de Jayaprakasha et al (1998)	55
b) Procedimiento de Jaganmohan - Jayaprakasha (2000)	56
c) Procedimiento realizado en la Tesis	57
B.5 Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos (Reyna,1995)	60
a) Espectrometría de masas, (EM; ES/EM)	60
b) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno, RMN ¹ H	62
c) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono-13, RMN ¹³ C	64
d) Espectroscopía bidimensional HMBC	67
e) Espectroscopía de infrarrojo, IR	69
f) Espectroscopía de ultravioleta, UV	72
3. PARTE EXPERIMENTAL	75
PRESENTACIÓN	76
TRABAJO PRELIMINAR	78
A. RECOLECCIÓN DE LA PLANTA	78
B. USO DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS	78
C. DETERMINACIÓN (IDENTIFICACIÓN) BOTÁNICA	80
D. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	81
TRABAJO EXPERIMENTAL	83
A. SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA	83
B. ANÁLISIS CUALITATIVO	83
B.1. Marcha fitoquímica	83
B.2. Test para sustancias liquénicas	84
C. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL ÁCIDO ÚSNICO	85
i) Muestra	85
ii) Procedimiento	85

iii)	Determinación del contenido de ácido úsnico presente en el líquen <i>Flavopunctelia Flaventior</i> (Stirt.)Hale	86
D.	AISLAMIENTO DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS	90
D.1.	Muestra	90
D.2	Equipos utilizados	90
D.3	Procedimiento	91
a)	Extracción sólido-líquido	91
b)	Purificación por cromatografía	92
c)	Análisis preliminar por CCF	92
d)	Cromatografía en columna	93
d.1)	CC- Sephadex	94
d.2)	CC- Sílica Gel	97
d.3)	CC- Impregnada con ácido oxálico	102
d.4)	Cromatografía en placa preparativa-CPP	105
e)	Análisis de las fracciones mediante CCF y su espectro RMN	107
E.	IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS	109
E.1.	Compuesto FF7	110
a)	Espectro de masas	110
Espectro N°1:	Espectro de masas del compuesto FF7	112
b)	Espectro de RMN ¹ H	113
Espectro N°2:	Espectro de RMN ¹ H del compuesto FF7	115
c)	Espectro IR	116
Espectro N°3:	Espectro IR del compuesto FF7	118
d)	Espectro UV	119
Espectro N°4:	Espectro UV del compuesto FF7	120
E.2.	Compuesto FF8	121
a)	Espectro de masas	121
Espectro N°5:	Espectro de masas del compuesto FF8	123
b)	Espectro de RMN ¹ H	124
Espectro N°6:	Espectro de RMN ¹ H del compuesto FF8	125

c) Espectro IR	127
Espectro N°7: Espectro IR del compuesto FF8	129
d) Espectro UV	130
Espectro N°8: Espectro UV del compuesto FF8	131
E.3. Compuesto FF5	132
a) Espectro de RMN ¹ H	132
Espectro N°9: Espectro de RMN ¹ H del compuesto FF5	134
b) Espectro de RMN ¹³ C	135
Espectro N°10: Espectro RMN ¹³ C del compuesto FF5	137
c) Espectro HMBC	138
Espectro N°11: Espectro HMBC del compuesto FF5	141
d) Espectro UV	142
Espectro N°12: Espectro UV –Visible del compuesto FF5	143
4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	144
RESULTADOS	145
CONCLUSIONES	148
RECOMENDACIONES	149
5. BIBLIOGRAFÍA	150
6. ANEXOS	154
Anexo N°1. Identificación Botánica del líquen <i>Flavopunctelia Flaventior</i> (Stirt.) Hale	155
Anexo N°2. Marcha fitoquímica (Reyna, 1999-b)	156
Anexo N°3. Resultados de la marcha fitoquímica del líquen <i>Flavopunctelia Flaventior</i> (Stirt.) Hale	163
Anexo N°4. Test de sustancias líquénicas Barreño & Pérez (1996)	164
Anexo N°5: Cálculo estadístico de la incertidumbre asociada a la curva de calibración	167
Anexo N°6 Fotografía del líquen <i>Flavopunctelia Flaventior</i> (Stirt.) Hale	169

Anexo N°7. Fotografía de la columna cromatográfica del EBO	170
Anexo N°8: Certificado de análisis del ácido úsnico patrón	171
GLOSARIO	172

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig N°01 Formación de un liquen	9
Fig N°02 Formación del talo liquénico	10
Fig N°03 Clasificación de las sustancias liquénicas	14
Fig N°04 Partes de un liquen (Corte transversal)	17
Fig N°05 Estructuras de algunas sustancias liquénicas	18
Fig N°06 Espectro de masas del ácido úsnico O. Castro(2010)	29
Fig N°07 Estructura de ácido úsnico con identificación de los hidrógenos	31
Fig N°08 Espectro RMN ¹ H del ácido úsnico E. Córdor (2010)	33
Fig N°09 Espectro UV-Visible del ácido úsnico	34
Fig N°10 Espectro IR del ácido úsnico E. Córdor (2010)	36
Fig N°11 Espectro de masas del compuesto FF8 D.Martino (2013)	39
Fig N°12 Estructura del ácido lecanórico con la identificación de los hidrógeno	41
Fig N°13 Espectro UV-Visible del compuesto FF8	43
Fig N°14 Espectro infrarrojo del compuesto FF8	45
Fig N°15 Espectro RMN ¹ H β -orcinol carboxilato de metilo (CDCl ₃ , 100 MHz). S.Perico (2011).	47
Fig N°16 Estructura de β -orcinol carboxilato de metilo.	48
Fig N°17 Espectro RMN ¹³ C del β -orcinol carboxilato de metilo (CDCl ₃ , 100 MHz). S.Perico (2011).	50
Fig N°18 Espectro HMQC del β -orcinol carboxilato de metilo (CDCl ₃ ,100 MHz).	52
Fig N°19 Sistemas conjugados	75
Fig N°20 Tipos de electrones de valencia	76
Fig N°21 Liquen Flavopunctelia Flaventior (Stirt.) Hale (Foto: D. Martino).	79
Fig N°22 Liquen Flavopunctelia Flaventior (Stirt.) Hale (Foto: E. Córdor).	82
Fig N°23 Gráfica de la curva de calibración de ácido úsnico	90
Fig N°24 Cristales blancos formados a partir del grupo X7 (Foto: D. Martino).	99
Fig N°25 Columna Cromatográfica del EBO del liquen Flavopunctelia Flaventior (Stirt.) Hale (Foto: D. Martino).	104

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág
Tabla N°01	Contenido de Ácido Úsnico en 10 muestras líquénicas	20
Tabla N°02	Comparación de los datos RMN ¹ H (400Mz, CDCl ₃) del ácido úsnico	32
Tabla N°03	Comparación de las bandas de absorción del compuesto FF7 con valores reportados para ácido úsnico	35
Tabla N°04	Valores IR para el ácido úsnico E. Córdor (2010)	37
Tabla N°05	Comparación de datos RMN ¹ H (400Mz, CDCl ₃) del compuesto ácido lecanórico	42
Tabla N°06	Bandas de absorción del compuesto FF7 comparadas con valores reportados para el ácido lecanórico	44
Tabla N°07	Valores IR para el compuesto FF8	45
Tabla N°08	Datos RMN ¹ H (400Mz, CDCl ₃) del compuesto FF5	46
Tabla N°09	Comparación de los desplazamientos de los carbonos (ppm) del compuesto FF5	49
Tabla N°10	Comparación de Procedimientos para el aislamiento de sustancias líquénicas	61
Tabla N°11	Datos de las absorbancias obtenidas con UV ($\lambda = 284$ nm) para la curva de calibración	89
Tabla N°12	Concentraciones de obtenidas para muestra	90
Tabla N°13	Porcentaje presente de Ácido úsnico en las muestras de liquen	92
Tabla N°14	Agrupación de Fracciones en - C.C Sephadex	98
Tabla N°15	Grupos CC-Sílica Gel	102
Tabla N°16	Grupos CC-Acido Oxálico	107
Tabla N°17	Grupos Cromatografía Placa Preparativa	109
Tabla N°18	Compuesto puros obtenidos	111

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
°C	Grado centigrado
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en placa fina
CPP	Cromatografía en placa preparativa
<i>d</i>	duplete
δ	desplazamiento químico
EM	Espectro de Masas
EM/ES	Espectro de Masas tecnica electron spray
EtOH	Etanol
EBO	Extracto Bruto Orgánico
g	gramo
h	hora
HMBC	Correlación heteronuclear de enlace múltiple
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
IR	Infrarrojo
λ	longitud de onda
nm	nanometro
n	número de onda
RMN¹³C	Resonancia Magnetica Nuclear de Carbono
RMN¹H	Resonancia Magnetica Nuclear de Hidrogeno
s	singulete
UV	Ultra Violeta

Capítulo 1

ASPECTOS GENERALES

A. PRESENTACIÓN

La química de los productos naturales engloba el estudio y la investigación de los metabolitos secundarios provenientes de fuentes naturales, éstas pueden ser de origen animal, vegetal, fúngico y bacteriano. Siendo nuestro país una fuente inagotable de estos recursos, la química de los productos naturales cumple un papel importante en la investigación de todos estos recursos y los importantes metabolitos secundarios que de ellos derivan.

Hoy en día la química de los productos naturales ha dado muchos pasos adelante en el estudio de los componentes curativos de muchas plantas de uso ancestral, así como también en la industria cosmética se ha desarrollado el uso de diferentes fuentes naturales y el aislamiento de ciertos metabolitos para la fabricación de diversos productos de cuidado personal. La presente tesis, en la línea de Química Orgánica de Productos Naturales, comprende el estudio químico de las sustancias liquénicas presentes en el líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale y constituyó una revisión y aplicación de los conocimientos adquiridos a lo largo de los cursos de Química Orgánica I, II, III y IV; así como también del curso electivo Química de los Productos Naturales (CQ046). Es importante señalar que esta tesis se dio inicio con los cursos Proyecto de Tesis I: “*Marcha fitoquímica del líquen Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale” y Proyecto de Tesis II: “*Determinación cuantitativa del Ácido Úsnico en el líquen Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale”. Estos estudios constituyeron la base de esta tesis, en donde se tuvo una visión global de la

aplicación de los conocimientos de la Química Orgánica, conocimientos que se fueron ampliando junto con la investigación realizada.

El estudio de este líquen me permitió no sólo ampliar mi percepción de la Química Orgánica, sino, como científica, me proporcionó la capacidad de aprender a aplicar todo ese conocimiento adquirido en las aulas a la solución experimental de un problema específico, el estudio químico del líquen, permitiéndome conocer i. Los metabolitos secundarios con los que contaba el líquen, ii. La cantidad de sustancias liquénicas con las que contaba dicha especie y iii. El aislamiento, purificación e identificación de dichas sustancias presentes en el líquen *Flavopunctelia Flaventior (Stirt.) Hale*.

Este trabajo de tesis comprendió las siguientes actividades:

- i. Trabajo experimental en laboratorio químico, realizado en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3-175), ubicado en el Laboratorio N°12 (pabellón C) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, que comprendió el secado y molienda del líquen *Flavopunctelia Flaventior (Stirt.) Hale*, el análisis cualitativo (marcha fitoquímica), la determinación cuantitativa del ácido úsnico presente en el líquen y la obtención del extracto bruto orgánico de dicho líquen, así como también el extracto acetilado. Esta etapa se realizó entre abril del año 2012 y julio del año 2013.

- ii. Aislamiento, purificación e identificación espectroscópica de las sustancias líquénicas obtenidas. El aislamiento se realizó utilizando las técnicas de Cromatografía en capa fina, cromatografía en columna y cromatografía en placa preparativa, y la identificación se realizó utilizando técnicas espectroscópicas de Espectrometría de Masas (EM), RMN¹H, RMN¹³C, HMBC y espectros UV e IR. Esta etapa del trabajo se realizó durante una pasantía de investigación en la Universidad de Talca en Chile, en el Laboratorio de Química de los Productos Naturales del Instituto de Química de los Recursos Naturales, bajo la dirección del Dr. Guillermo Schmeda y la asesoría de la Dra. María del Pilar Caramantín Soriano, del 18 de Julio al 16 de Agosto del 2013.

- iii. El estudio y análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale y a las sustancias líquénicas: ácido úsnico, ácido lecanórico y β -orcinol carboxilato de metilo también se realizó en base a artículos científicos de la Universidad de Talca en Chile, durante la estadía de investigación en dicha casa de estudios.

B. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

- i. Aislar, purificar e identificar tres sustancias líquénicas a partir del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale.
- ii. Realizar el análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de los metabolitos secundarios presentes en el líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale
- iii. Realizar la determinación cuantitativa del ácido úsnico.

Nuestro principal objetivo, es el aislamiento, purificación e identificación de tres sustancias líquénicas, esto nos llevó al uso de diversos procedimientos de aislamiento.

El aislamiento comprende las etapas de extracción por solventes, separación y purificación. Así, se describirá la extracción de sustancias líquénicas, la elección del método adecuado, las pruebas cualitativas para la identificación de sustancias líquénicas, la utilización de la cromatografía en capa fina como método preliminar de identificación y la purificación mediante la cromatografía en columna y placa preparativa. Asimismo, se describirá la aplicación de la Espectrometría de masas (EM) y de Resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN¹H), Resonancia magnética nuclear de carbono (RMN¹³C) y

Espectroscopia bidimensional (HMBC) en la identificación de la estructura molecular.

De esta manera, el desarrollo de esta tesis me ha permitido conocer la rutina de trabajo químico en productos naturales, estudiando las diversas etapas del método de trabajo que se sigue para el estudio químico de sustancias liquénicas presentes en esta especie, el cual es análogo al que se sigue para el estudio de cualquier clase de compuestos orgánicos (metabolito secundario) contenido en un producto natural.

Capítulo 2

ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

A. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS AL LIQUEN *FLAVOPUNCTELIA FLAVENTIOR (STIRT.) HALE*

A.1. Líquenes (Barreño , 2003)

Los líquenes son por definición organismos simbióticos compuestos de una parte hongo denominada micobionte*, y una o más partes fotosintéticas, un alga, denominada protobionte* (Ver Figura N°1), la estructura base que forman la simbiosis de estas dos partes es llamada talo* liquénico. A pesar de que la naturaleza dual de los líquenes es conocida ampliamente, no es muy sabido que algunos líquenes son simbiosis entre tres o más organismos.

En la asociación liquénica el grado de participación de los dos organismos no es tan fundamental, lo importante es que ello conduce a la formación de organismos capaces de prosperar en medios muy diversos de la naturaleza, motivo por el cual su distribución geográfica es muy amplia y ocurre en una gran diversidad de ambientes, lo cual representa una gran ventaja con respecto a otros organismos.

La parte de la asociación fotosintética (protobionte o fotobionte), sintetiza los azúcares necesarios para el metabolismo del liquen, el cual libera oxígeno en el proceso. Esta parte, protobionte, puede estar constituida por cianobacterias* de color verde azulado, procariotas* y/o algas verdes unicelulares eucariotas*.

*Ver glosario

La parte micobionte más común son hongos ascomicetos*. Del estrecho contacto entre estas dos partes resultan los talos liquénicos (Ver Figura N°2) los cuales son estables con morfología, anatomía, fisiología, genética y ecología específicas, y son en realidad individuos complejos resultantes de la integración de los simbioses.



Figura N°1: Formación de un liquen. Superior izquierda: alga marina, Superior derecha: hongo, Inferior: Liquen producto de la simbiosis de un alga y un hongo.

Los talos liquénicos presentan frente a los simbioses gran originalidad morfológica, fisiológica, adaptativa de modos de vida y también en cuanto a su modo de reproducción, es decir, constituyen innovaciones simbioses específicas. Como bien señala Lynn Margulis (1993), los líquenes son un buen ejemplo de

* Ver glosario

cómo la integración cíclica de los simbioses que participan proporciona el potencial de nuevas y distintas relaciones entre organismos y puede ser un mecanismo de innovación evolutiva con efectos morfogenéticos, es decir, el origen de nuevas entidades con propiedades emergentes, las cuales no son el resultado de la suma lineal de las partes.

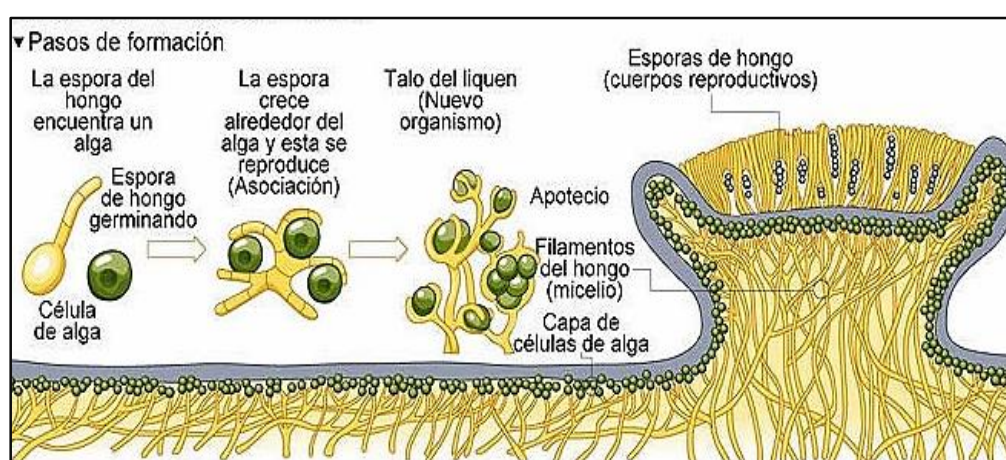


Figura N°2: Formación del talo liquénico (Simbiosis entre un alga y un hongo).

Las alrededor de 14000 especies conocidas de líquenes tienen una amplia distribución, desde los polos al ecuador, aunque sólo constituyen la vegetación dominante en el 8 % de la superficie terrestre. Son capaces de desarrollarse sobre todo tipo de sustratos* inertes u orgánicos (minerales, hojas, caparazones de animales, etc.). Especialmente son abundantes en los climas y geografías más extremas (desiertos fríos y cálidos o altas montañas) donde las plantas vasculares tienen dificultades para desarrollarse, la mayor diversidad la alcanzan en los trópicos, aunque no en las selvas.

* Ver glosario

El fino equilibrio funcional de los talos liquénicos, es lo que condiciona su reconocido uso como bioindicadores de las condiciones ambientales actuales, de los cambios paleohistóricos ocurridos en los distintos territorios biogeográficos y de las alteraciones de distinto tipo, consecuencia de la acción antrópica, que han sufrido o están sufriendo las distintas zonas terrestres.

En 1954, Asahina y Shibata, en Japón publicaron el libro “Chemistry of lichen substances” un clásico de liquenología. Esta obra es una compilación de sus trabajos y contiene estructuras elucidadas de numerosos compuestos, los métodos de aislamiento, síntesis, purificación y algunas propiedades físicas. En este trabajo se incluye también la identificación de sustancias liquénicas por microcristalización y describiría también la acción antibiótica de una gran cantidad de estos compuestos.

A.2. Sustancias liquénicas:

Asahina y Shibata (1954) dividen las sustancias liquénicas en alifáticas y aromáticas, teniendo en cuenta que, una sustancia liquénica, es toda aquella sustancia producida por un líquen. En la serie alifática se incluyen los ácidos grasos, alcoholes de azúcares y triterpenos, mientras que la serie aromática, contiene a los derivados de ácido pulvínico, depsidos, depsidonas, quinonas, dibenzofuranos y derivados de dicetopiperazina. El sistema de clasificación de Asahina y Shibata, está basado en las estructuras y vías biosintéticas que les dan origen. Un sistema de clasificación más reciente es el propuesto por Culberson & Elix (1989) en el que las sustancias son ordenadas de acuerdo a su probable origen biosintético. Debido a que ambas clasificaciones son muy amplias, se deriva una necesidad de una definición más específica para el término sustancias liquénicas.

Los avances realizados en los años noventa, muestran que las sustancias provenientes de líquenes se biosintetizan sólo por la parte micobionte (Huneck, 1996). Con este nuevo avance, aunque entre los metabolitos líquénicos se sintetizan aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, lactonas macrocíclicas, aromáticos monocíclicos, quinonas, cromonas, xantonas, terpenoides, esteroides y carotenoides que se acumulan en el talo; se define como un rasgo distintivo para incluirse como sustancias liquénicas, el que sean únicamente productos del metabolismo sintetizadas por el micobionte y excretadas a su superficie exterior.

Entonces, las sustancias liquénicas, se definen como aquellas sintetizadas única y exclusivamente por los líquenes y que corresponden a compuestos bien determinados (Huneck, 1996) los cuales se dividen en 3 grandes grupos: Dépsidos (meta y para dépsidos), Depsidonas y Dibenzofuranos (Ver Figura N°3). Esta clasificación es la más usada y aceptada hoy en día por la comunidad científica.

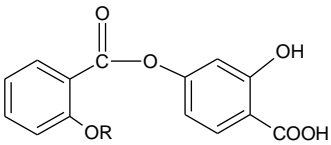
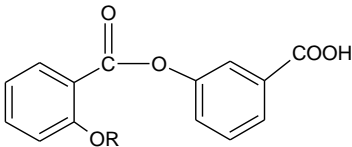
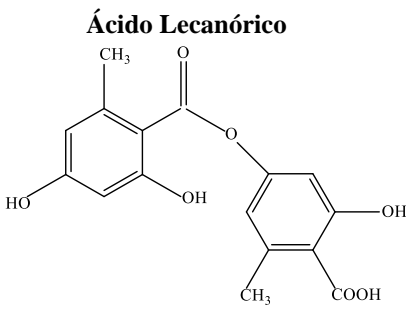
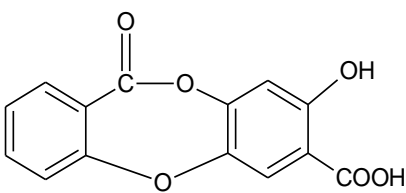
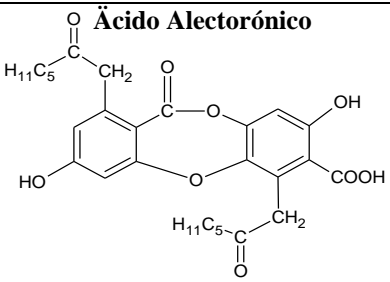
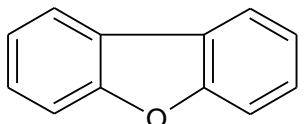
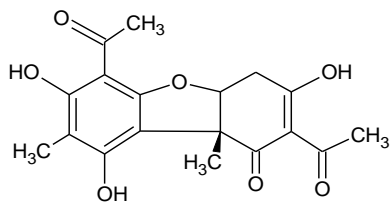
Sustancias liquénicas	Ejemplos
<p>Dépsidos</p> <p>Para-dépsido</p>  <p>Meta-dépsido</p> 	<p>Ácido Lecanórico</p> 
<p>Depsidonas</p> 	<p>Ácido Aleatorónico</p> 
<p>Dibenzofuranos</p> 	<p>Ácido úsnico</p> 

Figura N°3 Clasificación de las sustancias liquénicas.

A.3. Composición Química del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale.

a) Análisis cualitativo (marcha fitoquímica)

La marcha fitoquímica se refiere a la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios o productos naturales* presentes en una planta o cualquier organismo vivo. En la bibliografía revisada no hemos encontrado ningún trabajo referido al estudio fitoquímico realizado al líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale.

b) Principales sustancias líquénicas presentes en el líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale

Como se ha mencionado previamente no existe en la bibliografía ningún estudio químico realizado con esta especie líquénica. Sin embargo, existen estudios botánicos que indicarían que esta especie contiene ácido úsnico y ácido lecanórico (Sohrabi & Jamshidikia 2007: 5).

* Metabolitos secundarios o productos naturales.- Se refiere a los compuestos orgánicos de estructura variada, presentes en los organismos vivos, que tienen una distribución restringida y característica a determinada especie. Ejemplos: alcaloides, taninos, quinonas, triterpenos y esteroides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonoides, saponinas, etc.
Metabolitos primarios.- Productos del metabolismo general y de amplia distribución en plantas y animales. Ejemplos: carbohidratos, aminoácidos y proteínas, mucílagos, ceras, etc.

Sin embargo hemos revisado los estudios químicos realizados a otras especies liquénicas, con el objeto de extraer información que nos sirva como referencia para nuestra investigación.

Los líquenes presentan metabolitos secundarios que se pueden encontrar en la corteza o en la médula (ver Figura N°4), generalmente en una u otra y no es muy común encontrar estos compuestos en ambas partes de estos organismos. Los compuestos que tienen color, conforman en su mayoría antraquinonas, derivados del ácido pulvínico y el ácido úsnico. Por otro lado, aquellos compuestos incoloros son encontrados comúnmente en la corteza, por ejemplo, la antranorina y liquexantona. Los metabolitos secundarios también pueden ser encontrados en otras partes del liquen tales como el apotecio* o el talo. En general, en las especies liquénicas pueden encontrarse de una a tres sustancias liquénicas resultantes de los metabolitos secundarios. Esta, sin embargo, no es una regla. Existen líquenes como la *Pseudocyphellaria*, especie de Nueva Zelanda, en la que se han encontrado 41 diferentes dépsidos, depsidonas, derivados de ácido pulvínico y 17 triterpenos.

Actualmente, se han reportado aproximadamente 630 metabolitos secundarios aislados de los líquenes. Estos son ácidos alifáticos, meta- y para-depsidos, depsidonas, esterres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos y derivados del ácido pulvínico.

* Ver glosario

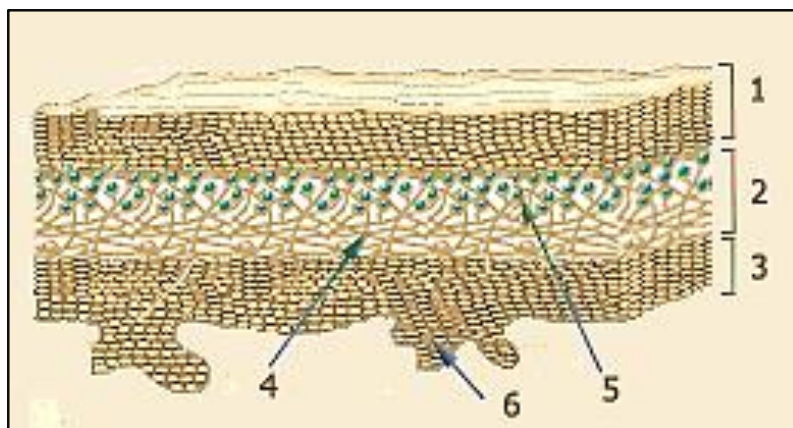


Figura N°4: Partes de un líquen (Corte transversal) 1) Corteza superior, 2) Médula, 3) Corteza inferior 4) Hifas, 5) Capa de algas, 6) Proyecciones de sujeción.

La concentración de los metabolitos secundarios, como por ejemplo el ácido úsnico, puede variar entre 0,1 a 10 % en relación al peso seco del líquen, sin embargo, en algunos casos la concentración puede ser más alta. El estudio sistemático de las sustancias químicas resultantes de los metabolitos secundarios de los líquenes tuvo su inicio con los trabajos de Bebert (1831) y Knopp (1844) quienes lograron aislar de algunas especies liquénicas, el ácido vulpínico y ácido úsnico, respectivamente (Ver Figura N°5).

El ácido lecanórico fue el primer dépsido de líquen sintetizado en un laboratorio por E. Fischer (1913).

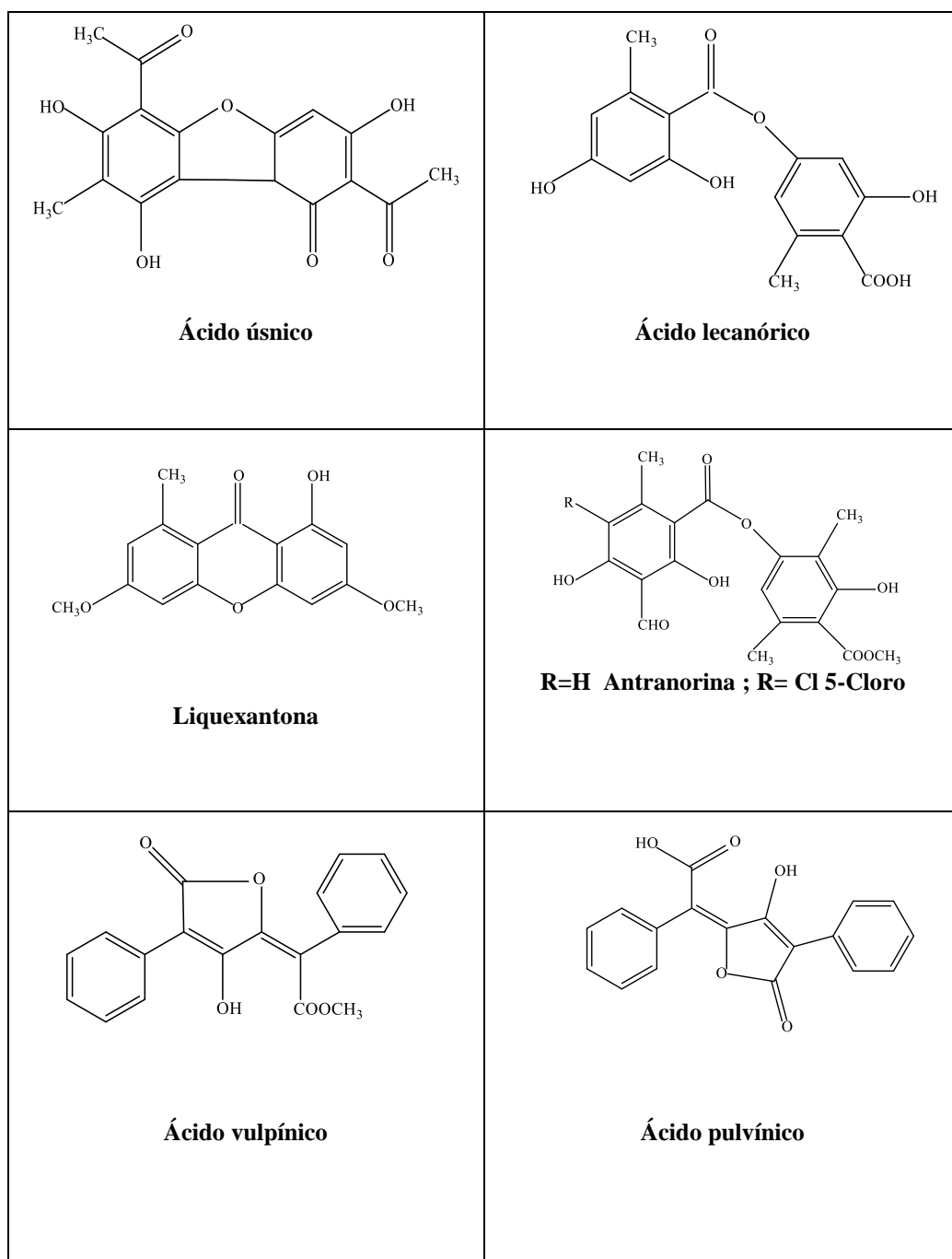


Figura N°5: Estructuras de algunas sustancias liquénicas.

c) Análisis cuantitativo de sustancias líquénicas

Castro (2010) realizó el análisis cuantitativo de ácido úsnico por espectrofotometría UV-Visible de 10 especies líquénicas (ver Tabla N°1). Castro preparó patrones de ácido úsnico entre 0-10 ppm, utilizando cloroformo como solvente; haciendo un barrido entre 200 y 500 nm, obtuvo como absorbancia máxima 284 nm. Se preparó la curva de calibración ploteando las concentraciones de las soluciones patrón preparadas vs absorbancia obtenida.

Castro, realizó dos extracciones en soxhlet, a 1 g de muestra seca y pulverizada, con 150 mL de cloroformo cada vez. Los extractos se juntaron y se concentraron a un volumen de 100 mL. A partir de este extracto, se prepararon diluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/500 y 1/1000 y se registraron sus absorbancias. Con estos valores se realizó el cálculo de la concentración de ácido úsnico utilizando la curva de calibración.

Tabla N° 1

Contenido de Ácido Úsnico en 10 muestras líquénicas

Muestra líquénica	Familia	% de ácido úsnico
<i>Flavoparmelia Caperata</i>	Parmeliaceae	0,35
<i>Flavoparmelia Cucullata</i>	Parmeliaceae	0,31
<i>Xanthoparmelia Consersa</i>	Parmeliaceae	0,32
<i>Alectoria Ochrolechia</i>	Parmeliaceae	0,29
<i>Hypotrachyna Parámense</i>	Parmeliaceae	0,25
<i>Psiloparmelia Denotata</i>	Parmeliaceae	0,34
<i>Psiloparmelia Distincta</i>	Parmeliaceae	0,32
<i>Thamnolia vermicularis subsp vermicularis</i>	Siphulaceae	0,06
<i>Thamnolia vermicularis subsp solida</i>	Siphulaceae	0,07
<i>Cladina Arbusculata</i>	Cladoniaceae	0,10
<i>Stereocaulon Versuviaum</i>	Stereocaulaceae	0,12

En la bibliografía se reporta la cuantificación de ácido lecanórico por HPLC, de diversas especies, sin embargo, no se ha encontrado un valor reportado para el líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale.

1. Miyawaki et al (1998) estudiaron la especie *Parmotrema Tinctorun* (Nyl.) Hale en muestras colectadas en diferentes lugares: Japón, Fiji, China, Vanuatu y Uruguay, encontrando que la cantidad de ácido lecanórico varía entre 0,155 ug a 15,398 ug dependiendo del lugar de procedencia de la muestra.
2. Thepnuan (2013) estudio el líquen *Parmotrema Tinctorun* que se recolectó en el Parque Nacional Khao Yai (Tailandia) en tres zonas diferenciadas: rocas, árboles y sobre las mallas de nylon obteniendo que el contenido de ácido lecanórico fue de 387,4 en rocas, 376,9 en árboles y 394,6 mg/g en mallas de nylon.

A.4. Aislamiento de sustancias líquénicas

No existen referencias en donde se haya realizado el aislamiento de sustancias líquénicas en la especie *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale. Sin embargo, en la bibliografía se reporta el aislamiento de sustancias líquénicas en diferentes especies de líquenes. Citaremos algunas que nos han servido de base para esta investigación.

- i. Estudio fitoquímico del líquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale. Castro (2004).
- ii. Estudio fitoquímico de los líquenes *Xanthoparmelia tasmanica* (*X. tasmanica*) y *Xanthomendoza mendozae* (*X. mendozae*). Cóndor (2010).
- iii. Purificación de sustancias líquénicas del líquen *Parmotrema Tinctorum* (Nyl.) Hale. Jayaprakasha (1998).
- iv. Aislamiento de ácido úsnico de *Flavoparmelia Caperata*. Castro (2010).
- v. Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon Strictum* (*Stereocaulaceae*) y *Lobariello Pallida* (*Lobariaceae*) y determinación de su potencial toxicidad: Perico (2011).
- vi. Constituyentes fenólicos del líquen *Parmotrema Stuppeum* (Nyl.) Hale: Jaganmohan y Jayaprakasha (2000).

De estas seis referencias se describirá el procedimiento de dos de ellos: Castro (2004) y Córdor (2010)

- a) **Procedimiento Castro (2004):** Liquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale.
- i. **Extracción sólido-líquido:** A 1 kg de muestra seca y molida se le realizaron dos extracciones sucesivas, con 2 L de acetona, durante tres días, obteniéndose un extracto acetónico que fue separado por filtración simple. El sólido remanente se extrajo nuevamente con 1,8 L de metanol, por dos veces a temperatura ambiente, obteniéndose 3 L de dicho extracto. Los extractos se llevaron a sequedad, en un rotaevaporador; se obtuvo 65,2 g del extracto acetónico y 11,2 g del extracto metanólico.
 - ii. **Separación y purificación cromatográfica:** El extracto acetónico y el extracto metanólico, se separaron por cromatografía en columna (CC) utilizando solventes de polaridad creciente como hexano, cloroformo, acetona, etanol. Se obtuvieron 7 fracciones del extracto acetónico y 3 fracciones del extracto metanólico. A partir de estas fracciones se aislaron 4 compuestos: 1) ácido 2-hidroxi, 3-formil, 4-etox, 6-metil benzoico, 2) ácido fumarprotocetrárico, 3) atranorina y 4) ácido úsnico.
 - iii. **Identificación:** Se determinaron las estructuras de los compuestos aislados, analizando sus espectros de IR, RMN¹H, RMN¹³C, DEPT y EM. Además, los ácidos grasos: ácido laurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido behémico,

ácido lignocérico, se identificaron por los tiempos de retención en la cromatografía de gases.

- iv. Análisis cuantitativo por HPLC:** Se cuantificaron las siguientes sustancias: ácido úsnico, atranorina, cloroatranorina, ácido salazínico, ácido guaésítico, ácido protocetrárico, ácido fumarprotocetrárico, ácido succinprotocetrárico, ácido fumárico.

b) Procedimiento Cóndor (2010)

b.1) Liquen *Xanthoparmelia tasmanica*

- i. Extracción sólido-líquido:** A 430 mg de muestra seca y molida se le realizaron tres extracciones sucesivas con 500 mL de acetona, obteniéndose el extracto por filtración simple. Dicho extracto se llevó a sequedad con un rotaevaporador, obteniéndose 6,1 g del extracto bruto orgánico (EBO). Sobre el EBO se realizó una extracción exhaustiva en cloroformo por tres veces consecutivas, de las cuales se obtuvo tres fracciones que contenían sólidos amarillos en forma de agujas, denominados X1, X2 y X3.
- ii. Separación cromatográfica:** Se realizó el análisis preliminar en CCF utilizando como revelador p-anisaldehído y calor. La separación de las fracciones se realizó mediante cromatografía en columna utilizando como soporte Sephadex LH-20 utilizando como eluyente diclorometano:metanol:éter (1:1:1). A partir de 0.52 g se obtuvieron 10 fracciones . Debido a la alta polaridad de los compuestos se

procedió a la derivatización preparando los compuestos acetilados los cuales se separaron mediante cromatografía en columna con sílica gel de 0,4863 g de EBO acetilado, utilizando como eluentes éter, acetato de etilo y metanol y se obtuvieron 10 fracciones.

- iii. **Purificación:** Se realizó la purificación de los cristales amarillos X1, X2 y X3 por repetidas recrystalizaciones en cloroformo.
- iv. **Elucidación:** La elucidación de los cristales amarillos provenientes de las fracciones X1, X2 y X3, se realizó utilizando Punto de Fusión, CG/EM, RMN¹H e IR, confirmándose que se trataba del ácido úsnico. De las fracciones de las columnas se obtuvieron mezclas de ácidos grasos identificadas por espectros RMN¹H.

b.2) *Liquen Xanthomendoza Mendozae*

- i. **Extracción sólido- líquido:** Se realiza la extracción de 50 g de muestra de liquen limpio y seco con 100 mL de acetona, por tres veces consecutivas, obteniéndose 300 mL de extracto acetónico el cual fue llevado a sequedad en un rotaevaporador. Se obtuvo 2,1 g de extracto bruto orgánico (EBO).
- ii. **Separación cromatográfica:** Se realizó el análisis preliminar en CCF, luego se realizó la CC-Sephadex LH-20 de 0,670 g utilizando como eluente diclorometano:metanol:éter (1:1:1) de esta columna se obtuvieron 6 fracciones.

Debido a la alta polaridad de los compuestos se procede a la derivatización del EBO. Se procede a realizar una columna con sílica gel de 0,5012 g de EBO acetilado utilizando como solventes éter-acetato de etilo y metanol de esta columna se obtuvieron 12 fracciones.

- iii. Purificación:** Se logró aislar un compuesto puro de las 12 fracciones provenientes de la columna en sílica gel del extracto derivatizado y este fue inyectado en un equipo CG-MS.
- iv. Elucidación:** El compuesto fue identificado con los espectros RMN¹H, RMN¹³C, HMBC, IR y EM, concluyendo que se trataba de la parietina.

A.5. Identificación clásica de las sustancias liquénicas:

a) Comportamiento cromatográfico:

i. Ácido úsnico:

Cromatografía en capa fina (CCF) O.Castro (2004)

Adsorbente: Kieselgel G, placas de 0,25mm de espesor.

Eluente: EtOH: Acetona (1:1)

Revelador: Solución de H₂SO₄ en MetOH (10 %)

R_f (Ac. úsnico): 0,63

ii. Ácido lecanórico:

Cromatografía en placa preparativa (CPP) Jayaprakasha (1998)

Adsorbente: Silica Gel, placa 20x20cm, 0.25 mm de espesor.

Eluente: CHCl₃: MetOH (9,8:0.2)

Revelador: Solución de H₂SO₄ en MetOH (10 %)

Rf (Ácido lecanórico): 0,23

b) Punto de fusión

i. Ácido úsnico: Cristales amarillos en forma de agujas

O. Castro (2004) 204-205 °C

E. Cóndor (2010) 204-205 °C

ii. Ácido lecanórico: Escamas blancas

Jayaprakasha (1998) 172- 174 °C

Huneck-Yoshimura (1996) 184°C

iii. β-orcinol carboxilato de metilo

Huneck-Yoshimura (1996) 140-141° C, 143-144 °C

A.6. Identificación espectroscópica de las sustancias liquénicas

En el Cap. 2 Sec.B.5. (Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos, Pág.60) se presentarán los fundamentos generales y la importancia en la determinación de la estructura molecular de las principales técnicas espectroscópicas, como son la Espectrometría de Masas, la Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H) y de Carbono (RMN¹³C), HMBC, así como la espectroscopia de Infrarrojo IR y de Ultravioleta UV.

a) **Ácido úsnico:**

El ácido úsnico es un compuesto ampliamente reportado en la literatura, razón por la cual el grupo de investigadores que nos asesoró en el desarrollo de este trabajo consideró, en su amplia experiencia, más que suficiente el Espectro de Masas (EM), RMN¹H, UV e IR para identificar esta sustancia.

a.1) **Espectro de masas de ácido úsnico:**

Castro (2010) nos proporciona el Espectro de Masas (EM) del ácido úsnico puro, obtenido en un equipo RMN INOVA – 500, 300 MHz en Brasil (Ver Figura N°6). Este espectro obtenido a partir del líquen *Flavoparmelia Caperata*, es similar al espectro obtenido por nosotros.

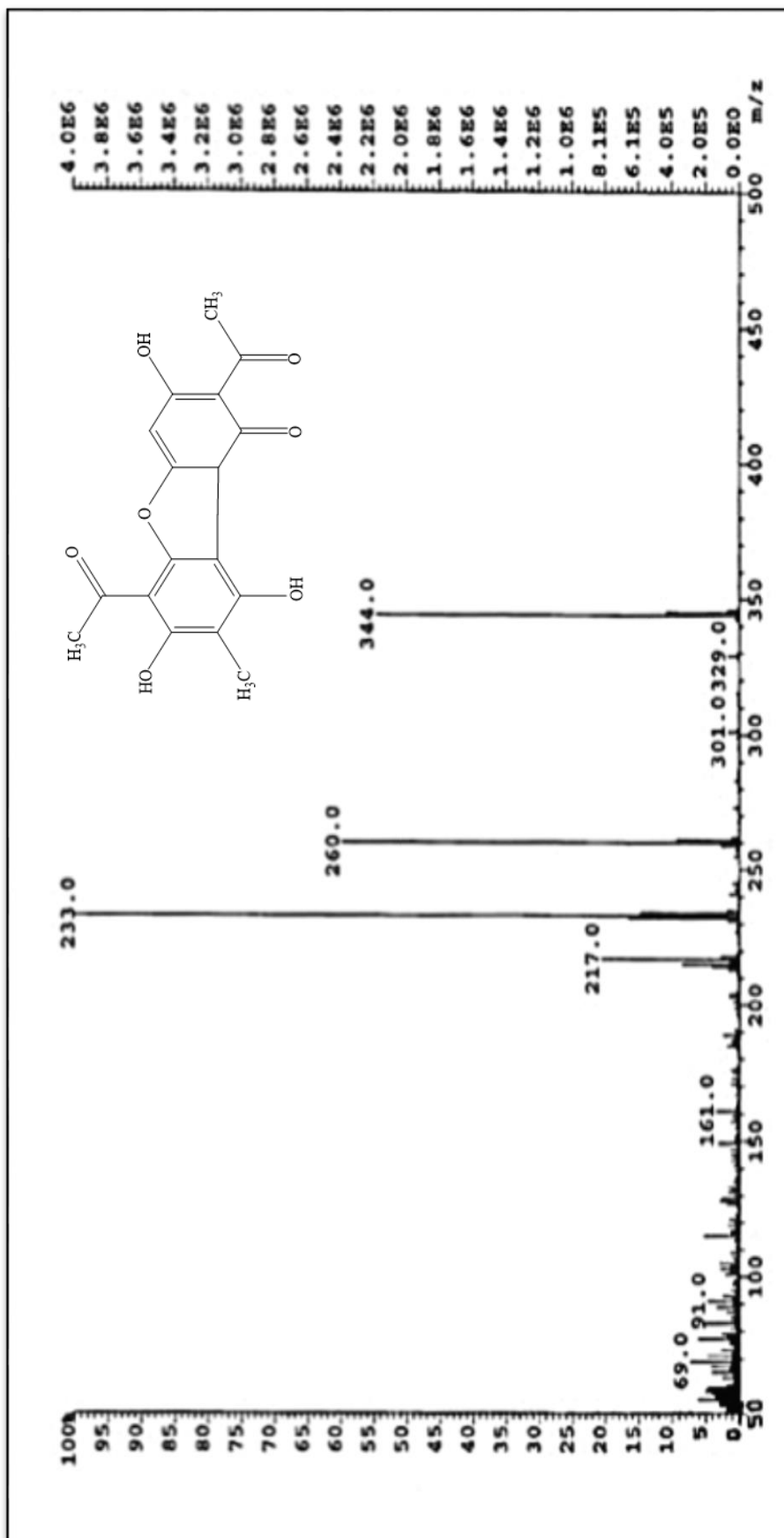
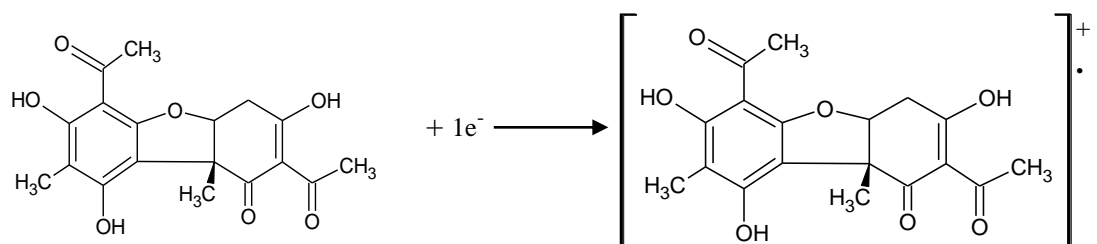


Figura N°6 : Espectro de masas ácido úsico (300 MHz, CDCl₃). Castro (2010)

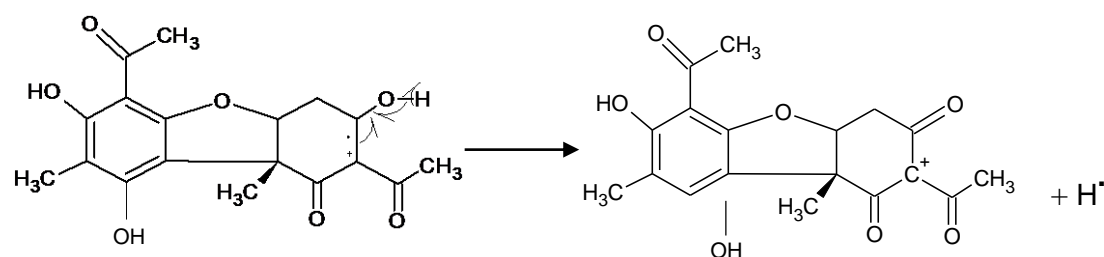
A continuación presentamos la propuesta de fragmentación de los principales picos

EM (m/z): 344 [M^+] 260 (45 %), 233 (100%), 217 (25%).

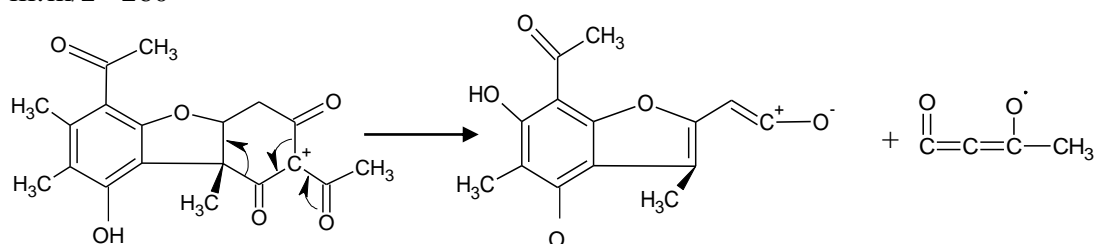
i. M = 344



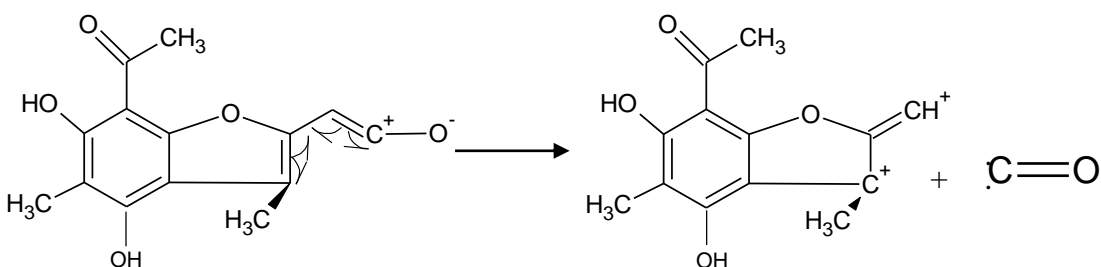
ii. m/z= 343



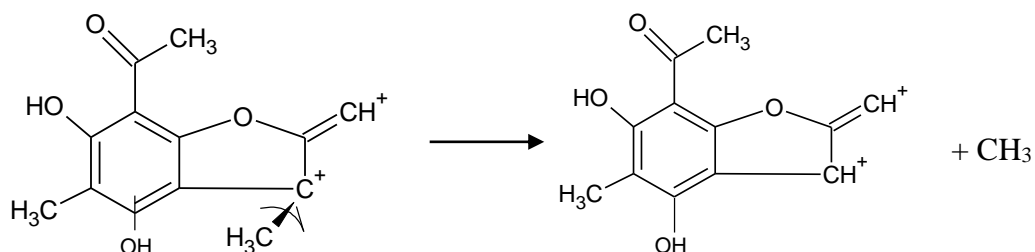
iii. m/z= 260



iv. m/z = 233



v. $m/z = 217$



a.2) Espectro de resonancia magnética nuclear RMN¹H

Cóndor (2010) nos proporciona el espectro de RMN¹H del ácido úsnico (ver Figura N°8), así como sus respectivos desplazamientos (ver tabla N°2). Castro (2004) nos proporciona también los desplazamientos para Ac. Úsnico. A continuación se indicará una comparación de los desplazamientos químicos del espectro de RMN¹H del compuesto aislado del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale (ver Cap.3. E.1. Pág. 113) y los proporcionados por la bibliografía.

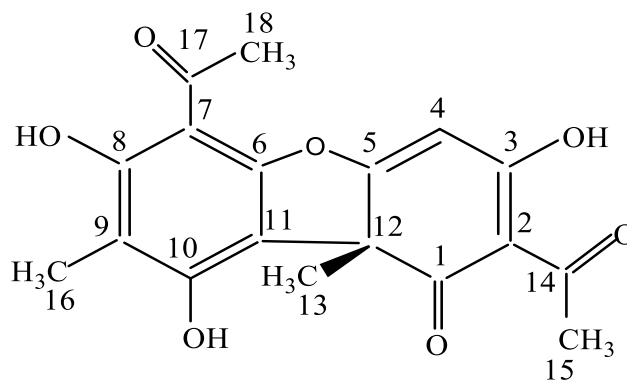


Figura N°7: Estructura del ácido úsnico con la identificación de los hidrógenos.

Tabla N° 2

Comparación de los datos RMN¹H (400Mz, CDCl₃) del ácido úsnico

	Castro (2004)	Cóndor (2010)	Tesis Martino (2013) FF7
Posición	Tipo de hidrógeno/ Integración, δ_H (ppm)	Tipo de hidrógeno/ Integración, δ_H (ppm)	Tipo de hidrógeno/ Integración, δ_H (ppm)
3 (-OH)	s, 1H, 18,84	-	s, 1H, 12,023
4 (Ar - H)	s, 1H, 5,97	s, 1H, 6,00	s, 1H, 5,98
8 (-OH)	s, 1H, 13,30	s, 1H, 13,34	s, 1H, 13,31
10 (-OH)	s, 1H, 11,02	s, 1H, 11,06	s, 1H, 11,05
13 (-CH ₃)	s, 3H, 1,76	s, 3H, 1,78	s, 3H, 1,76
15 (-CH ₃)	s, 3H, 2,67	s, 3H, 2,68	s, 3H, 2,45
16 (-CH ₃)	s, 3H, 2,09	s, 3H, 2,12	s, 3H, 2,11
18 (-CH ₃)	s, 3H, 2,67	s, 3H, 2,70	s, 3H, 2,68

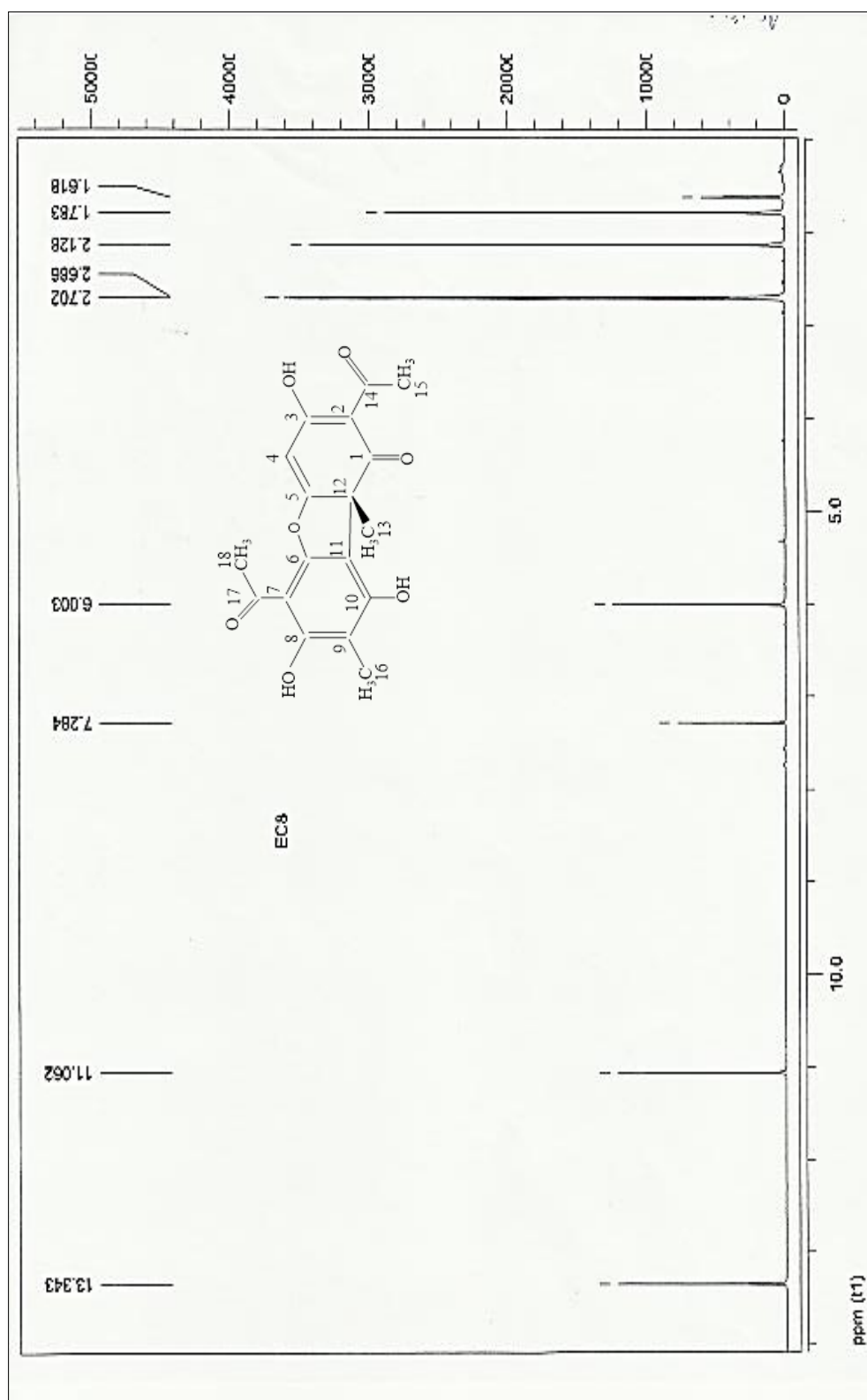


Figura N°8: Espectro RMN¹H del ácido úsnico (400 MHz, CDCl₃), (Córdor, 2010).

a.3) Espectrofotometría UV-Visible:

En la Tabla N°3 podemos observar que los picos de absorbancia máxima, del espectro UV-Visible son muy parecidos a los reportados por Castro (2010), Morales (1992) y Culberson (1968). En la Figura N°9 se muestra el espectro obtenido por Castro (2010).

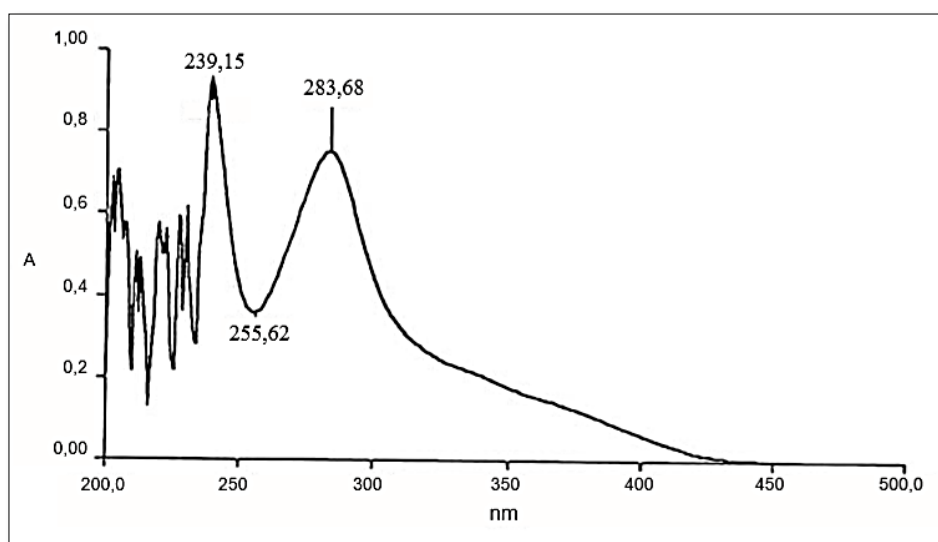


Figura N°9: Espectro UV-Visible del ácido úsnico.

Tabla N°3
Comparación de las bandas de absorción del compuesto FF7 con valores reportados para ácido úsnico

Bandas de Absorción	Banda 1	Banda 2
Morales (1992)	234,4	284,2
Culberson (1968)	233,3	283,2
Castro (2010)	239,6	283,1
Tesis Martino (2013) FF7	242,0	284,0

a.4) Espectroscopia Infraroja (IR)

Castro (2010) y Córdor (2010) reportan el espectro IR obtenido para el ácido úsnico el cual muestra los picos característicos debido a los grupos que se presentan en la estructura de este ácido. A continuación presentaremos el espectro IR obtenido para el ácido úsnico por Córdor (2010) (Ver Figura N°10) y presentaremos la relación entre las bandas y los enlaces presentes en el ácido úsnico.

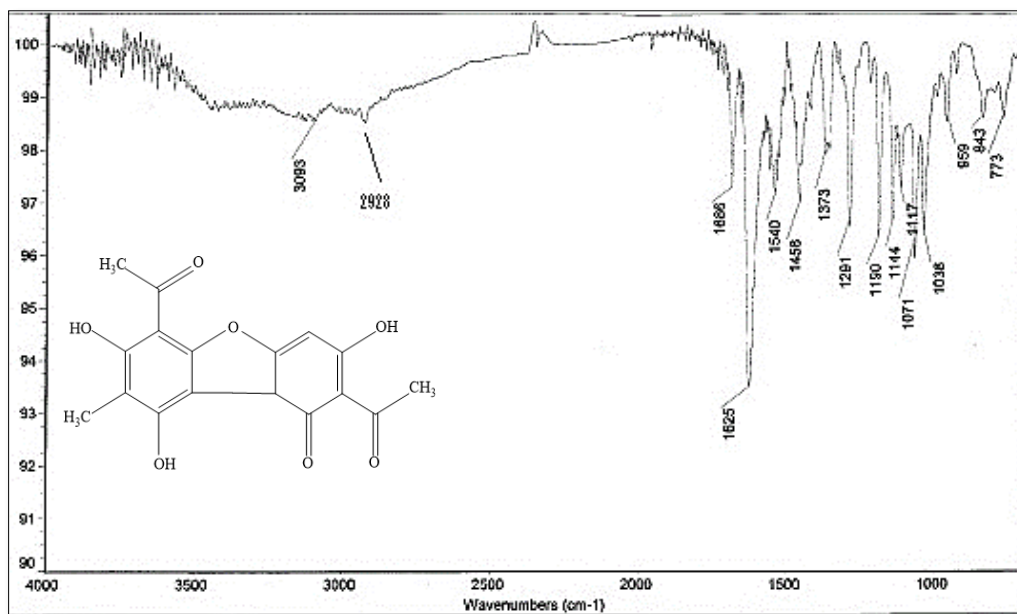


Figura N°10: Espectro IR del ácido úsnico E. Córdor (2010).

Del espectro IR en la Figura N°10 podemos observar los valores a 1625cm⁻¹ correspondientes al alargamiento del grupo carbonilo, a 3092 cm⁻¹ podemos ver el alargamiento debido al grupo OH. Presentamos a continuación los valores correspondientes a los grupos presentes en el ácido úsnico (ver Tabla N°4).

Tabla N°4

Valores IR para el ácido úsnico E. Córdor (2010)

ν (cm ⁻¹)	Asignación
3093	Alargamiento OH
2928	Flexión C-H Aromáticos
1625	Alargamiento C=O
1686	Alargamiento C – C Aromáticos
1373	Flexión O-H carbonílico

b) Ácido lecanórico:

El ácido lecanórico, así como el ácido úsnico, se encuentra ampliamente reportado en la literatura, razón por la cual el grupo de investigadores que nos asesoró en el desarrollo de este trabajo consideró más que suficiente el espectro de masas (EM), RMN¹H, UV e IR para identificar esta sustancia.

b.1) Espectro de masas

En 1996 Huneck y Yoshimura publican el libro *Identification of Lichen Substances* en el cual se brinda un recopilado de sustancias liquénicas y datos de sus espectros y características más importantes. El libro nos proporciona solamente las fragmentaciones más comunes para el espectro de masas del ácido lecanórico. Mostraremos a continuación la propuesta de fragmentación para el

compuesto FF8 por la técnica de Electron Spray Ionization. Esta técnica presenta normalmente alteraciones en las masas de las fragmentaciones, debido a la presencia de iones K^+ y Na^+ , por lo que es muy común representar las masas como $M+K$ o $M+Na$, e incluso múltiplos enteros de estos iones.

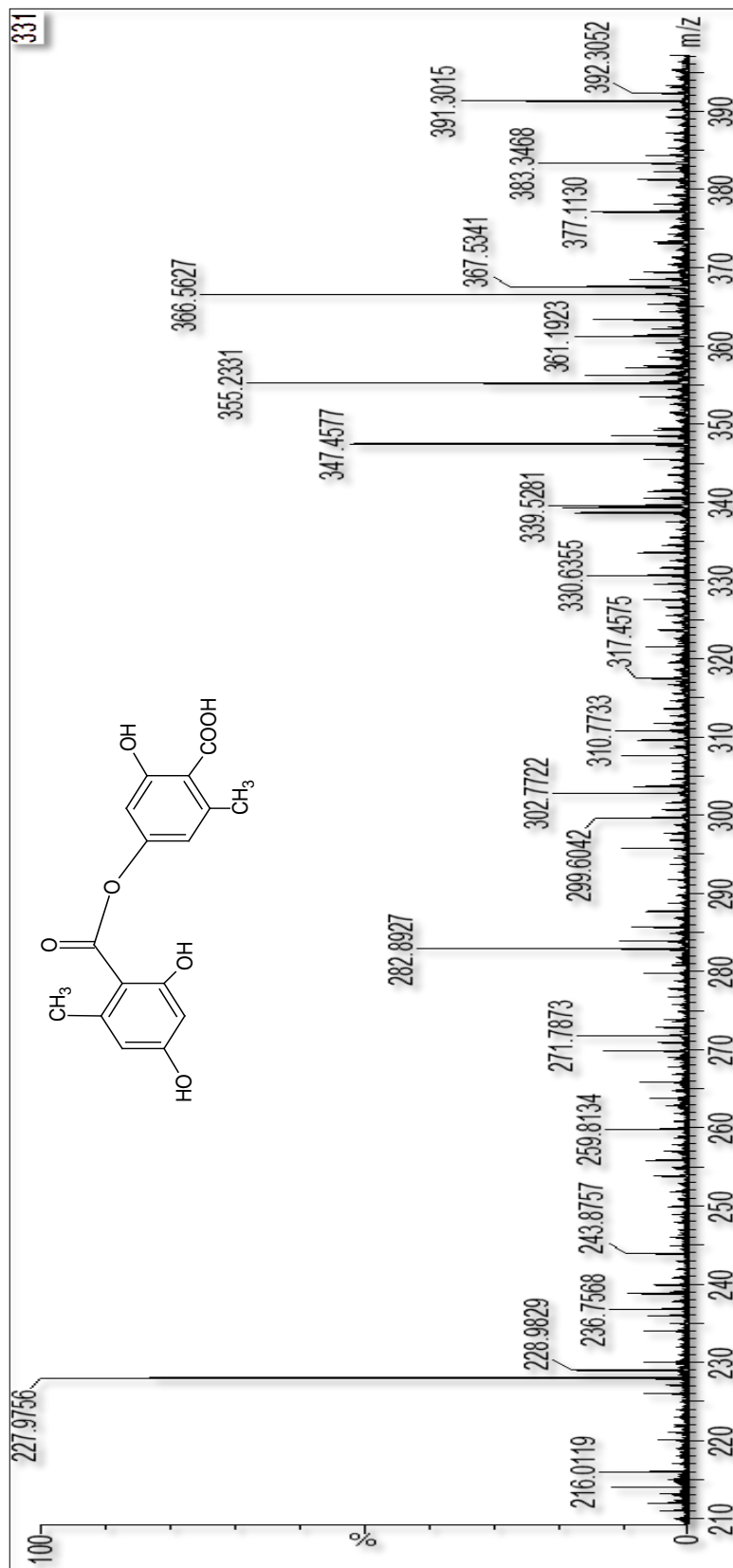
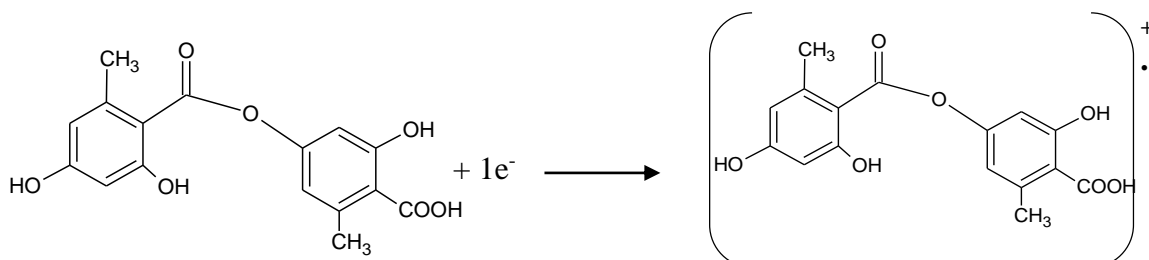


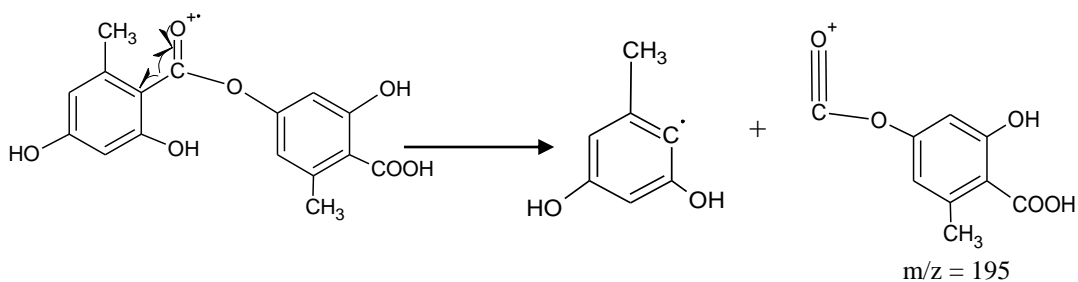
Figura N° 11 Espectro de masas del compuesto FF8 Martino (2013).

A continuación presentamos una propuesta de fragmentación para el compuesto FF8

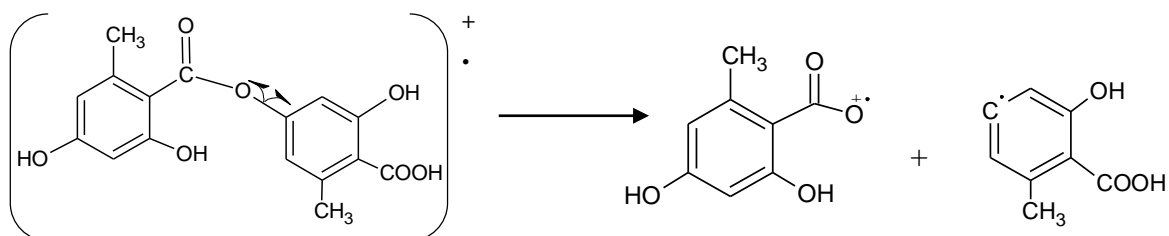
i. $[M]^+ = 318$ g



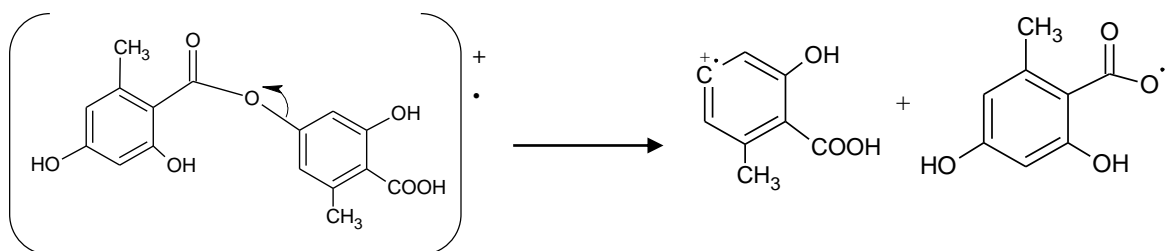
ii. $m/z = 195$



iii. $m/z = 151$



iv. $m/z = 167$



b.2) Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno RMN¹H

Huneck y Yoshimura (1996) también nos proporcionan los desplazamientos (δ ppm) correspondientes al ácido lecanórico sin mostrar el espectro. A continuación mostramos la comparación de los desplazamientos del espectro RMN¹H y de nuestro espectro (Ver Cap. 3 pág. 124) con los reportados por Huneck-Yoshimura (1996) (ver Tabla N°5)

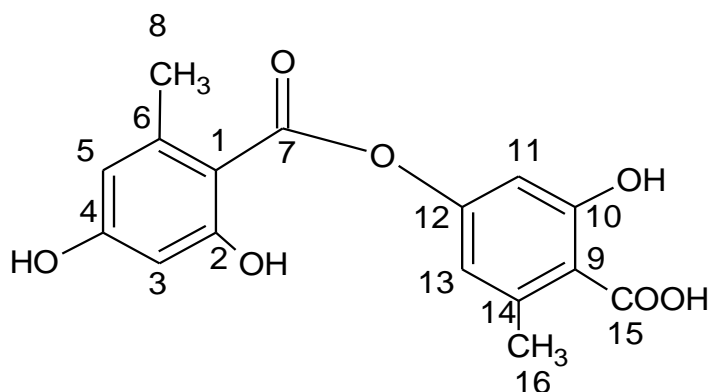


Figura N°12: Estructura del ácido lecanórico con la identificación de los hidrógenos.

Tabla N° 5

Comparación de datos RMN¹H (400Mz, CDCl₃) del compuesto ácido lecanórico

	Huneck-Yoshimura (1996)	Tesis D. Martino (2013) FF8
Posición	Tipo de hidrógeno/ Integración, δ_H (ppm)	Tipo de hidrógeno/ Integración, δ_H (ppm)
8(-CH ₃)	s, 3H, 2,51	s, 3H, 2,57
16(-CH ₃)	s, 3H, 2,65	s, 3H, 2,59
3 (Ar-H)	d, 1H, 6,31	d, 1H, 6,23
11 (Ar-H)	d, 1H, 6,40	s, 1H, 6,30
5(Ar-H)	d, 1H, 6,72	d, 1H, 6,64
13(Ar-H)	d, 1H, 6,76	d, 1H, 6,67
2;4(-OH)	----	s, 2H, 4,91
10(-OH)	----	s, 1H, 4,91

b.3) Espectrofotometría UV-Visible

Huneck y Yoshimura (1996) publican las bandas de absorción características del ácido lecanórico en metanol. En la Figura N° 13 se muestra el barrido del compuesto FF8 entre los 265 y 360 nm y en la Tabla N°6 la comparación de las bandas reportadas.

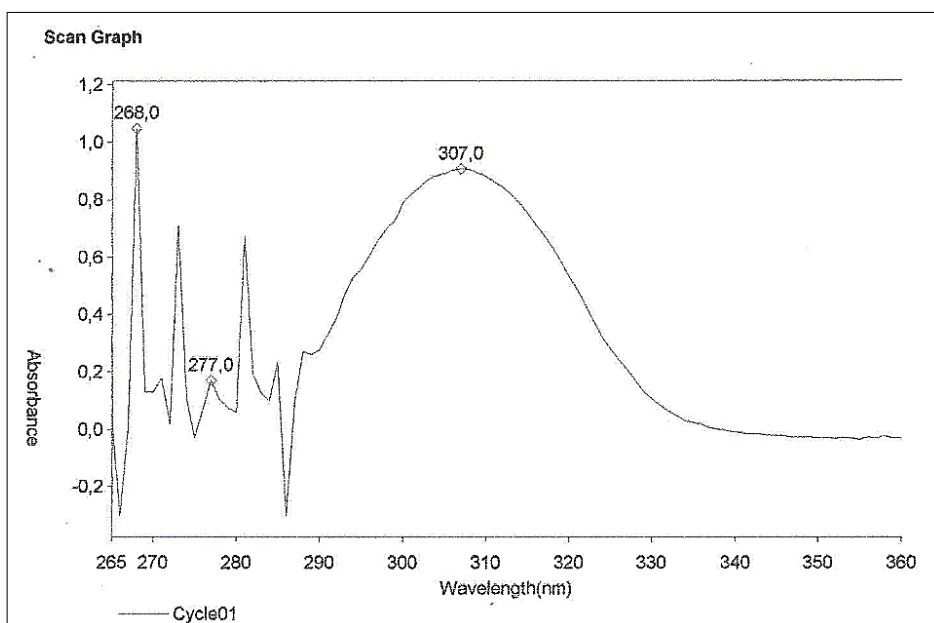


Figura N°13 Espectro UV-Visible del compuesto FF8.

Tabla N°6

Bandas de absorción del compuesto FF8 comparadas con valores reportados para el ácido lecanórico

Bandas de Absorción	Banda 1	Banda 2
Huneck-Yoshimura (1996)	270,5	305,5
Tesis D. Martino (2013) FF8	277,0	307,0

b.4) Espectroscopia infrarroja (IR)

Se realizó el espectro IR para el compuesto FF8 en KBr (Ver Figura N°14). En dicho espectro podemos observar las bandas correspondientes a la elongación del carbonilo, así como de las vibraciones de los enlaces C-H correspondientes al anillo aromático (Ver Tabla N°7).

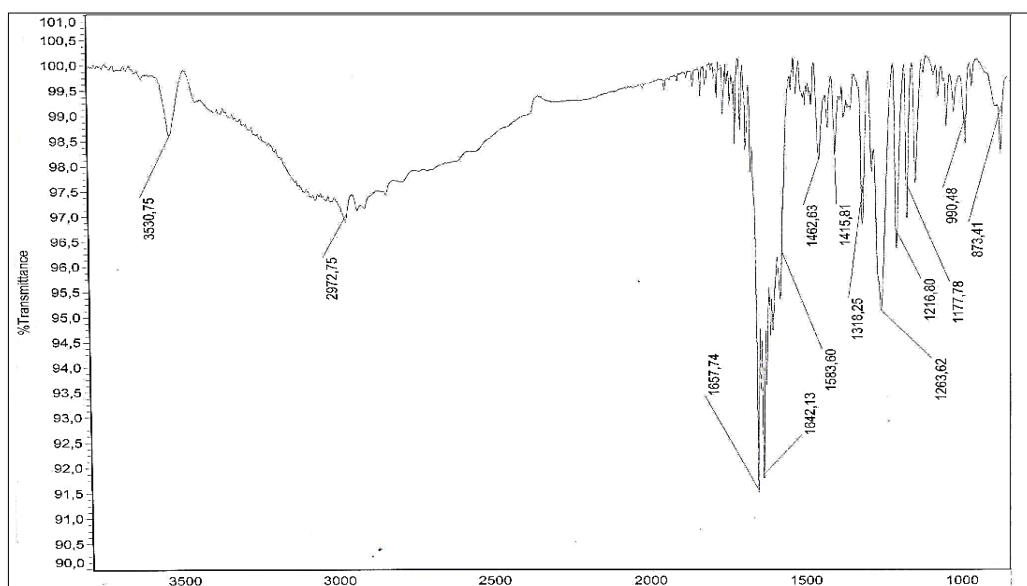


Figura N°14 Espectro infrarrojo del compuesto FF8.

Tabla N°7
Valores IR para el compuesto FF8

ν (cm⁻¹)	Asignación
3530	Alargamiento OH
2972	Flexión C-H Aromáticos
1657	Alargamiento C=O
1583	Alargamiento C – C Aromáticos
1263	Flexión O-H carbonílico

c) β -orcinol carboxilato de metilo

c.1) Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno RMN¹H

Huneck-Yoshimura (1996) proporcionan los desplazamientos del espectro RMN¹H del β -orcinol carboxilato de metilo. Perico (2011) publica el espectro RMN¹H con sus respectivos desplazamientos. En la Figura N°15 se muestra el espectro RMN¹H publicado por Perico y en la Tabla N°8 se indica la comparación de los desplazamientos (δ ppm) del compuesto.

Tabla N°8

Datos RMN¹H (400Mz, CDCl₃) del compuesto FF5

	Compuesto FF5 Tesis Martino (2013)	Huneck y Yoshimura(1996)	Perico (2011)
Posición	Tipo de hidrógeno/ Integración, δ_H (ppm)	Tipo de hidrógeno/ Integración, δ_H (ppm)	Tipo de hidrógeno/ Integración, δ_H (ppm)
Me-8	s, 3H, 2,10,	s, 3H, 2,10	s, 3H, 2,10
Me-9	s, 3H, 2,46	s, 3H, 2,45	s, 3H, 2,45
7 -COOMe	s, 3H, 3,92	s, 3H, 3,92	s, 3H, 3,90
OH-4	s, 1H, 5,06	s, 1H, 5,23	s, 1H,5,36
H-Ar-5	s, 1H, 6,21	s, 1H, 6,20	s, 1H, 6,20
OH-2	s, 1H, 12,03	s, 1H, 12,04	s, 1H, 12,03

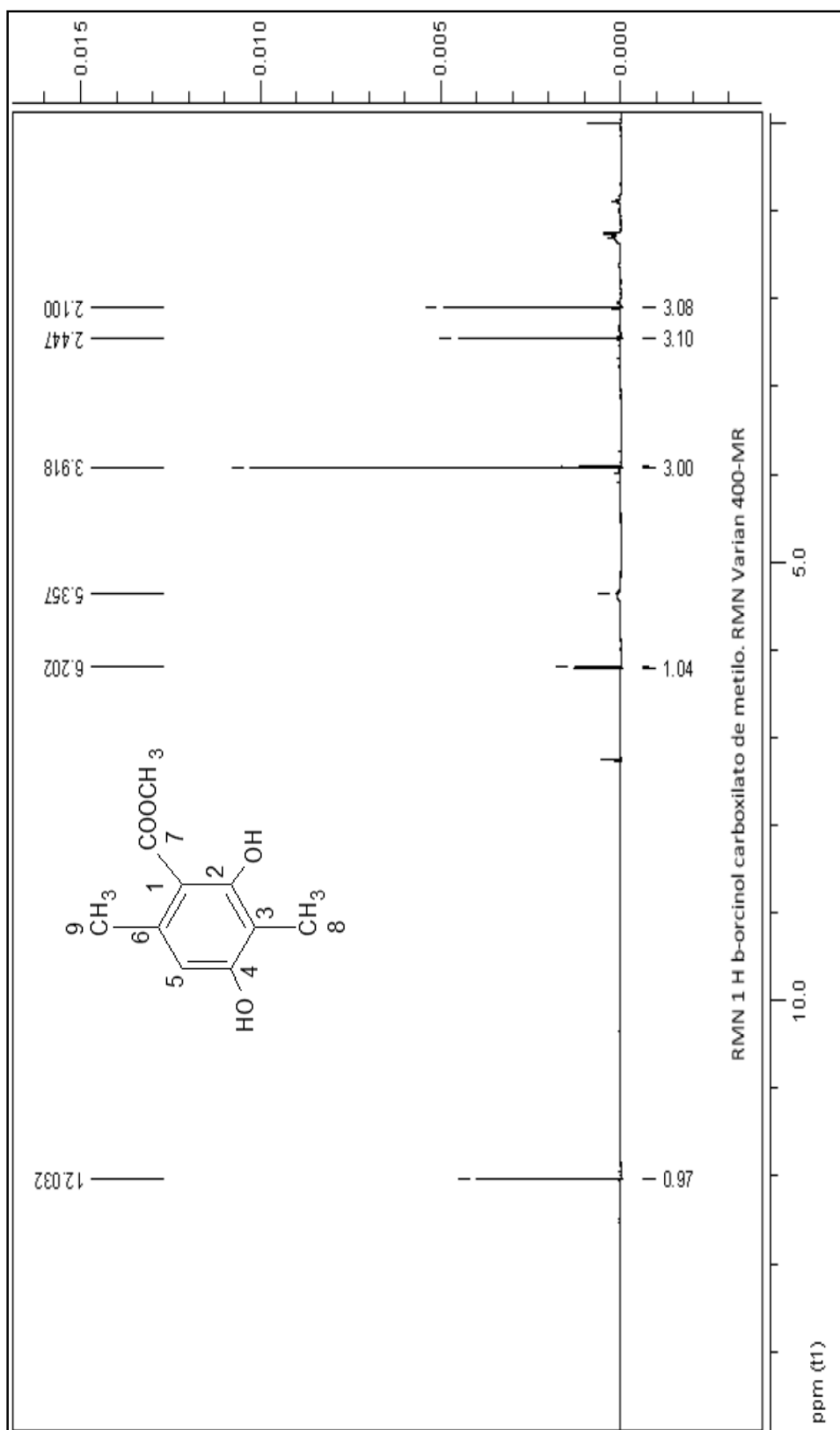


Figura N°15 Espectro RMN¹H β-orchinol carboxilato de metilo (CDCl₃, 100 MHz). Perico (2011).

c.2) Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono RMN¹³C

Huneck y Yoshimura (1996) nos proporcionan los desplazamientos de los carbonos para el β -orcinol carboxilato de metilo. Perico (2011) publica el espectro RMN¹³C para el β -orcinol carboxilato de metilo. En la Figura N°17 se muestra el espectro RMN¹³C publicado por Perico y en la Tabla N°9 se comparan los desplazamientos obtenidos de nuestro espectro (Ver Cap. 3 Pág. 140) con los proporcionados por la bibliografía.

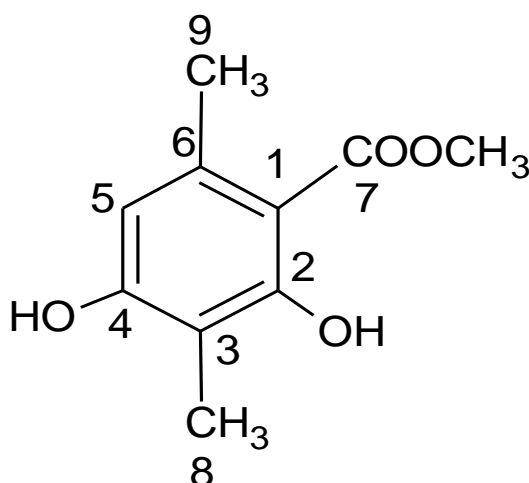


Figura N°16: Estructura de β -orcinol carboxilato de metilo.

Tabla N°9

Comparación de los desplazamientos de los carbonos (ppm) del compuesto FF5

	Tesis D.Martino (2013) FF5	Huneck– Yoshimura(1996)	S. Perico (2011)
Carbono	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)
C-8	8,02	7,6	7,6
C-9	24,46	24,1	24,1
-COOMe	52,18	51,8	51,8
C-1	105,69	105,2	105,2
C-3	108,87	108,5	108,6
C-5	110,91	110,5	110,6
C-6	140,55	140,2	140,1
C-2	158,38	158,0	158,1
C-4	163,58	163,1	163,1
C-7	172,97	172,6	172,6

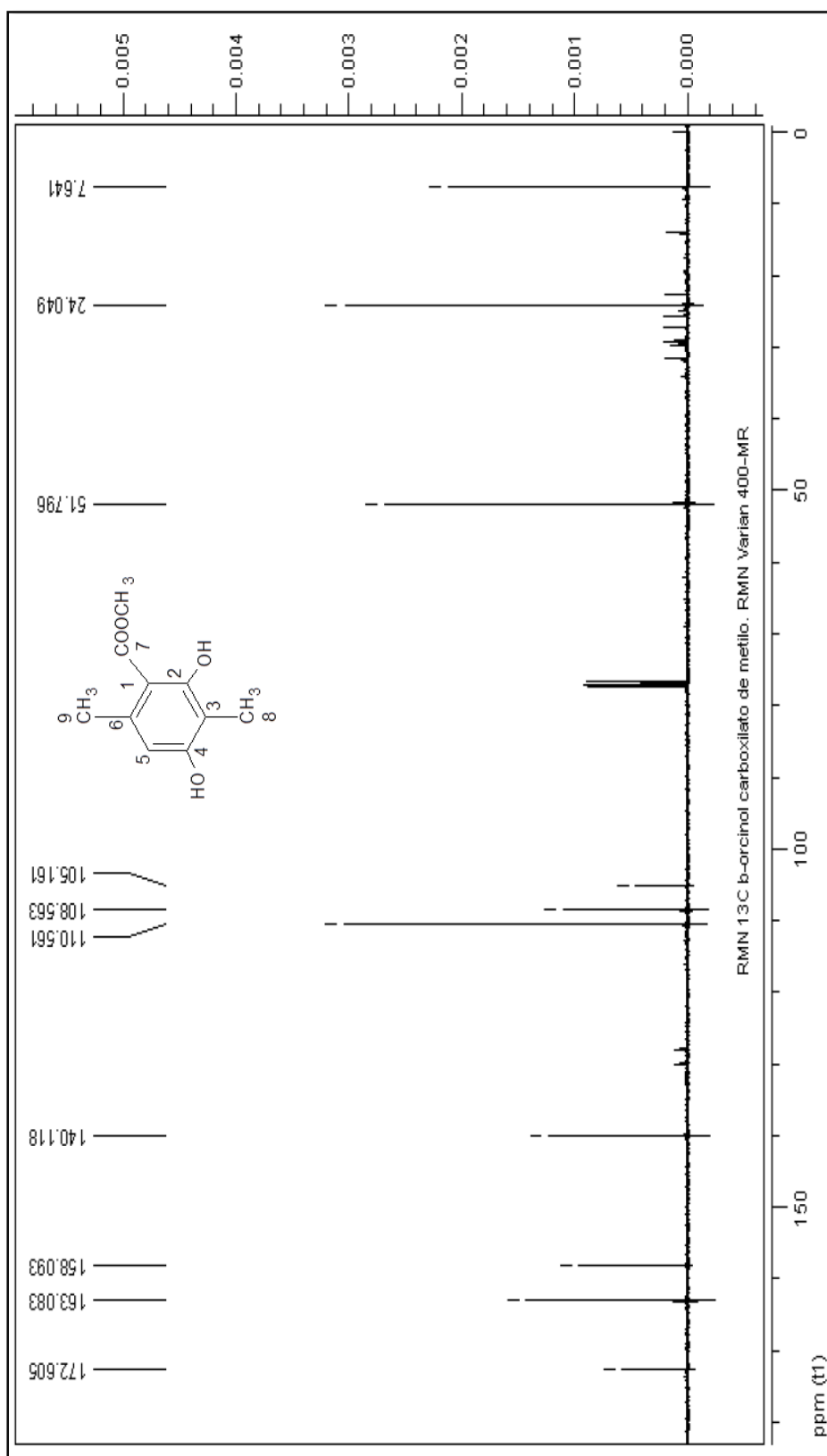


Figura N°17 Espectro RMN¹³C del β-orchinol carboxilato de metilo (100 MHz, CDCl₃) Perico (2011).

c.3) Espectroscopía bidimensional HMQC :

Perico (2011) nos muestra el espectro HMQC obtenido para el β -orcinol carboxilato de metilo aislado a partir del liquen *Stereocaulon Strictum* *Stereocaulaceae*. (Ver Figura N°18).

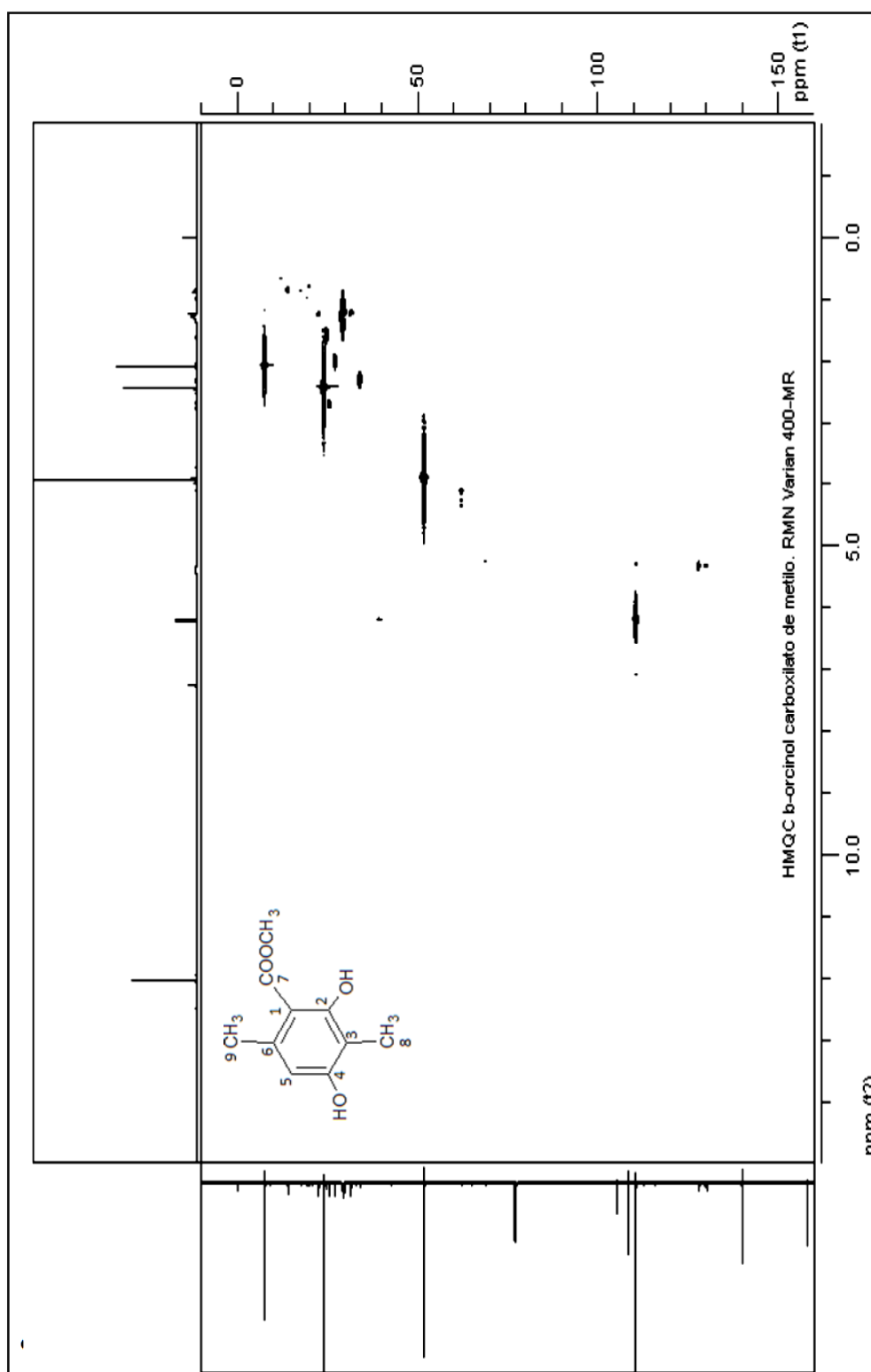


Figura N°18: Espectro HMQC del β -orchinol carboxilato de metilo (CDCl_3 , 100MHz) Perico (2011).

B. ESTUDIOS QUÍMICOS GENERALES

B.1. Análisis cualitativo – Marcha fitoquímica (Reyna 1999-b)

Se han revisado tres procedimientos citados en la bibliografía:

i Reyna (1999-b), de acuerdo a Rondina & Coussio-1969 (Anexo N°2).

ii Lock (1994)

iii Miranda (2002)

Lock (1994) proporciona esquemáticamente tres procesos sin ofrecer los detalles experimentales respectivos, siendo el más amplio de ellos similar al procedimiento de Rondina y Coussio (1969).

Miranda (2002) sigue un procedimiento totalmente diferente, para llegar a los mismos resultados. Este procedimiento tiene dos desventajas: a) el uso de éter etílico, que es un solvente excesivamente volátil y costoso, y debe usarse con mucha precaución por la posible presencia de peróxidos orgánicos, y b) la utilización de una mayor cantidad de muestra y de solventes, debido a que los extractos se obtienen por percolación*.

En esta tesis se ha seguido el procedimiento descrito por Reyna (1999-b) Anexo N°2.

* Percolación.- Procedimiento mediante el cual se hace pasar el solvente a través de la muestra empacada en un recipiente adecuado, por acción de la gravedad.

B.2. Test para sustancias liquénicas

Muchas sustancias liquénicas pueden ser detectadas macroscópicamente gracias a los colores que adquieren al ser puestos en contacto con diversos reactivos químicos o a la fluorescencia que producen bajo las radiaciones UV de longitud de onda λ 254 nm – 366 nm.

Brodo et al. (2001) y Orange et al. (2001) nos muestran una serie de reactivos que se utilizan para dicha identificación, estas soluciones son comúnmente denominadas por letras mayúsculas K, C, KC, PI, I, N la preparación de dichos reactivos y la correspondencia en los colores de las reacciones se describe en el Anexo N°3.

B.3. Determinación cuantitativa de sustancias liquénicas

Una de las técnicas más conocida y utilizada para la cuantificación del Ácido Úsnico es la espectrofotometría UV-Visible. Esta técnica consiste en una extracción con solventes del liquen y en la preparación de una curva de calibración, utilizando un patrón de ácido úsnico. A continuación, describiremos dos procedimientos de cuantificación de sustancias liquénicas.

a) Procedimiento Castro (2004)

i. Preparación de las soluciones estándares y curva de calibración, se siguieron las siguientes etapas:

- Se pesó 1,81 mg de ácido úsnico patrón.
- Se disolvió en cloroformo y se llevó a un volumen de 50 mL (36,2 ppm).
- Se preparó diluciones dentro del rango de linealidad.
- Se midió las absorbancias máximas de las soluciones.
- Se ploteó concentración vs absorbancia obteniendo la curva de calibración, y su ecuación respectiva.

ii. Preparación y evaluación de la muestra problema

- Se extrajo intensivamente un gramo de muestra problema con 150 mL de cloroformo en un soxhlet.
- Se repitió la extracción con 150 mL de cloroformo adicional.
- Se unieron los extractos, se concentraron y se llevaron a un volumen de 100 mL, dando la solución 1.
- A partir de la solución 1, se obtuvieron diluciones de 1/10, 1/20 ,1/50. Se midió las absorbancias máximas de las diluciones.
- Se realizó el cálculo del contenido del ácido úsnico del liquen por gramos de muestra, a partir de la curva de calibración, la ecuación de la curva y los valores de absorbancia de la solución 1 y sus diluciones.

b) Procedimiento Nedeljko et al (2011)

Nedeljko et al (2011) realizan la cuantificación de las sustancias liquénicas aisladas, por técnica HPLC. Esta técnica cuenta con un gran uso para la determinación cuantitativa de las sustancias liquénicas debido a la capacidad de detectar compuestos inclusive en trazas, que de otra manera no hubiesen podido ser detectados. Ello ha constituido un gran avance para los liquenólogos en las últimas décadas. Describiremos la metodología utilizada por estos científicos para la cuantificación de las sustancias liquénicas entre ellas el Ácido lecanórico.

i. Extracción sólido – líquido:

- El liquen fue secado a temperatura ambiente (26 °C) durante una semana.
- Una vez seco el liquen fue pulverizado y homogenizado.
- Se realizó la extracción sobre 500 g de muestra seca pulverizada con 2 L de cloroformo con agitación constante a temperatura ambiente durante 48 hrs.
- El extracto fue filtrado con filtro Whatman N°42 (125 mm)

ii. Análisis HPLC.

El extracto fue analizado en un equipo Agilent 1200 Series HPLC en una columna C18 (25cm x 4.6 mm, 10m) acoplado a un detector UV-Visible, se utilizó como solvente MetOH: H₂O:Ac.Fósforico (80:20:0.9 v/v/v). El metanol utilizado es de grado HPLC (Merck), el ácido fosfórico es de grado analítico y

el agua ultrapura. El flujo 1.0mL/min. Los estándares usados son los compuestos aislados y purificados del liquen.

c) Procedimiento realizado en la tesis

En esta Tesis se realizó la cuantificación del ácido úsnico realizando una curva de calibración mediante espectrofotometría UV-Visible, siguiendo el método Castro (2010), teniéndose un patrón de referencia, y preparando a partir de éste soluciones a diferentes concentraciones en cloroformo. Se realizó la lectura a 284 nm.

B.4. Aislamiento de sustancias liquénicas:

Presentaremos a continuación dos procedimientos para aislar sustancias liquénicas como ácido lecanórico, ácido orselínico, metil orselinato y atranorina.

a) Procedimiento Jayaprakasha et al (1998)

- **Muestra utilizada:** Liquen *Parmotrema Tinctorum* (Nyl.) Hale
- **Extracción sólido- líquido:** Se realizó la extracción de 40 g de muestra limpia y seca con acetona durante 36 h con agitación ocasional. El extracto se filtró y se evaporó en vacío. Se obtuvo 8,0 g de extracto seco en polvo.

- **Separación cromatográfica:** Se realizó TLC del extracto en diferentes solventes: Hexano-etilacetato (80:20), cloroformo-metanol (9,8:0,2), bencenoetilacetato (9,5:0,5). Se realizó cromatografía en columna utilizando sílica gel impregnada con ácido oxálico en una columna de 60cm x 18 mm cambiando la polaridad de los solventes utilizando: hexano, benceno y etilacetato.
- **Purificación y elucidación:** Se purificaron las fracciones por recristalización. Los compuestos aislados fueron: 1) atranorina (recristalizada en diclorometano), 2) metil orselinato (recristalizado en benceno), 3) ácido orselinico (recristalizado en éter) y 4) ácido lecanórico (recristalizado en acetona-agua 1:1). Se elucidaron los compuestos usando Punto de fusión, RMN^1H y RMN^{13}C .

b) **Procedimiento Jaganmohan y Jayaprashaka (2010)**

- **Muestra utilizada:** Liqueen *Parmotrema Stuppeum* (Nyl.) Hale
- **Extracción sólido-líquido:** Sobre 50 g de liquen limpio y seco, se realizó la extracción exhaustiva en soxhlet con benceno y seguidamente con acetona 8 h cada uno. Se obtuvieron dos EBO de 1,25 y 0,8 g, respectivamente.
- **Separación Cromatográfica:** Se realizó una TLC de ambos extractos teniéndose los mismos desplazamientos con diferentes concentraciones por

lo que decidieron unir los extractos. El nuevo EBO se pasó por una columna cromatográfica de sílica gel impregnada en ácido oxálico y se usaron como eluentes hexano, benceno, y etilacetato. Se obtuvieron 4 fracciones numeradas de 1 al 4.

- **Purificación y elucidación:** Se identificaron las fracciones determinando punto de fusión, RMN¹H y RMN¹³C. Se comprobó que las fracciones numeradas del 1-4 se trataban de 1) metil orselinato 2) ácido orselínico 3) atranorina y 4) ácido lecanórico.

c) Procedimiento realizado en la tesis:

Ambos procedimientos consisten en la obtención de un extracto bruto orgánico por extracción en solventes. La separación cromatográfica varía en los solventes utilizados ya que depende de la polaridad de las sustancias liquénicas presentes en las muestras. En este trabajo procedimos a la obtención del extracto bruto orgánico según Córdor (2010) (Cap.2, A.4, b Pág. 24) pero hubo variaciones al realizar la cromatografía en columna que se basaron en el procedimiento de Jayaprakasha (1998). En la Tabla N°10 presentamos la comparación del método utilizado en esta tesis con las referencias descritas. El procedimiento utilizado en esta tesis consistió en las siguientes etapas.

- Extracción sólido- líquido:
 - i. Secado y molienda de la muestra.
 - ii. Extracción con acetona
 - iii. Concentración de los extractos acetónicos.

- Separación cromatográfica:
 - i. Separación cromatográfica en sephadex.
 - ii. Separación cromatográfica en sílica gel.
 - iii. Separación cromatográfica en sílica gel impregnada con ácido oxálico.
 - iv. Separación cromatográfica en placa preparativa.

- Purificación e identificación:
 - i. Purificación de los cristales obtenidos por recristalización.
 - ii. Identificación de los sólidos por punto de fusión, solubilidad, EM, RMN¹H, RMN¹³C, HMBC, IR, UV.

Tabla N°10

Comparación de Procedimientos para el aislamiento de sustancias liquénicas

	Procedimiento Jayaprashaka et. al (1998)	Procedimiento Jagannmohan y Jayaprashaka (2000)	Procedimiento Tesis D.Martino (2013)
Extracción Sólido-Líquido	<ul style="list-style-type: none"> Muestra 40 g de líquen <i>Parmotrema Tinctorum</i> (Nyl.) Hale Extracción con acetona durante 36 h Obtención de 8,0 g de EBO 	<ul style="list-style-type: none"> Muestra 50 g líquen <i>Parmotrema Stuppeum</i> (Nyl.) Hale Extracción con Acetona y Benceno en soxhlet Obtención de 1,25 y 0,8 g EBO benceno y acetona respectivamente. 	<ul style="list-style-type: none"> Muestra: 3 recolectas (20,5 ; 17,0 y 26 g) Extracción con acetona x 48 h. Se realizó una TLC de los extractos y se reunieron los mismos. Se llevaron a sequedad. Obtención de 6,9 g de EBO.
Separación cromatográfica	<ul style="list-style-type: none"> Cromatografía en capa delgada Cromatografía en columna con sílica gel impregnada con Ac. Oxálico. 	<ul style="list-style-type: none"> Cromatografía en capa delgada Cromatografía en columna con sílica gel impregnada con Ac. Oxálico. 	<ul style="list-style-type: none"> Cromatografía en capa delgada Cromatografía en columna con Sephadex Cromatografía en sílica gel Cromatografía en Sílica gel impregnada con Ác. Oxálico Cromatografía el Placa Preparativa.
Purificación e Identificación	<ul style="list-style-type: none"> Se realizaron recristalizaciones con diferentes solventes sobre algunas fracciones. Se aislaron las sustancias liquénicas atranorina, metil orselinato, ácido orselinico, ácido lecanórico Se identificacon con espectros RMN¹H y RMN¹³C. 	<ul style="list-style-type: none"> Se aislaron las sustancias liquénicas atranorina, metil orselinato, ácido orselinico, ácido lecanórico Se identificacon con espectros RMN¹H y RMN¹³C. 	<ul style="list-style-type: none"> Se realizaron recristalizaciones con diferentes solventes sobre algunas fracciones. Se aislaron las sustancias liquénicas ácido úsnico, ácido lecanórico, β-orcinol carboxilato de metilo. Se identificacon con espectros EM ,RMN¹H, RMN¹³C, HMBC, IR y UV.

B.5. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos (Reyna, 1995)

Son cinco las técnicas espectroscópicas que constituyen las herramientas principales para la determinación de la estructura de un compuesto orgánico, a saber, la espectrometría de Masas, EM, la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H) y de carbono (RMN¹³C), Espectroscopia Bidimensional (HMBC), Espectroscopia de Infrarrojo, IR y Espectroscopia Ultravioleta, UV; debido a que estas técnicas permiten determinar un amplio rango de elementos estructurales.

La importancia relativa de cada método depende de la cantidad de información útil que pueda obtenerse a partir de él, la cual es función no solamente de la cantidad total de información, sino también de su interpretabilidad, y esto varía de molécula a molécula. En general, se acepta que la utilidad entre ellas sigue el orden:

$$\text{RMN} > \text{EM} \gg \text{IR} > \text{UV}$$

a) Espectrometría de masas (EM; ES/EM)

En un espectrómetro de masas, las moléculas que se encuentran en un estado gaseoso y a baja presión son bombardeadas con un haz de electrones de alta energía (70 eV ó 1 600 Kcal/mol), y uno de los efectos que este bombardeo produce es desprender uno de los electrones de la molécula y producir un ion de

carga positiva (con un número impar de electrones, un catión radical) al que se denomina “ion molecular” y se lo representa por M.

Además el haz de electrones imparte a los iones moleculares un excedente muy grande de energía, que es muy superior a lo que se requiere para romper los enlaces covalentes de las moléculas (50 a 100 Kcal /mol), y así poco después que se forman los iones moleculares la mayoría de ellos se “fragmentan” en diversas formas, que dependen de la naturaleza del ion molecular específico.

En seguida, el espectrómetro de masas separa la mezcla de iones resultante de acuerdo a su relación de masa /carga, m/z , y se registra la abundancia relativa de cada fragmento iónico. El espectrómetro presenta estos resultados en una gráfica donde aparece las intensidades de los fragmentos iónicos positivos respecto a m/z (esto es, respecto a su masa, puesto que la carga de los iones es unitaria); obteniéndose así el espectro de masas.

En la espectrometría de masas por electro-spray (ESI-MS) se usa una energía eléctrica para ayudar a la transferencia de iones de la solución a la fase gaseosa, antes de que dichos iones sean sujetos al análisis por espectrometría de masas. Las especies iónicas en solución pueden entonces ser analizadas utilizando ESI-MS con un gran incremento de la sensibilidad.

En estos espectros a la señal (o pico) más intensa en el espectro, denominada “pico base” se le asigna un valor de 100 %, y las intensidades de los otros picos, incluyendo el del ion molecular, son reportados como porcentaje del pico base.

La espectrometría de masas tiene dos aplicaciones importantes en el estudio de compuestos orgánicos:

- i. La determinación de la masa molecular del compuesto analizado, en la cual su precisión es superior a cualquier otro método; y
- ii. La deducción de la estructura del compuesto a partir del análisis cuidadoso de los diversos fragmentos que constituyen el espectro de masas.

b) Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de Hidrógeno, RMN¹H

Se conoce como resonancia magnética nuclear RMN al proceso de absorción de energía que experimenta el núcleo de un elemento, en este caso el hidrógeno, cuando se le coloca en un campo magnético fuerte y simultáneamente se lo irradia con energía electromagnética.

Esta absorción de energía, al igual que todos los procesos que se llevan a cabo a escala atómica y molecular, está cuantizada: La absorción de energía sólo se verifica cuando la fuerza de campo magnético y la frecuencia de radiación electromagnética (sobre un núcleo de hidrógeno particular) tienen valores específicos.

Los instrumentos conocidos como espectrómetros de RMN permiten medir la absorción de energía en los núcleos de hidrógeno (de un compuesto orgánico). Estos instrumentos están diseñados de manera que irradian al compuesto con energía electromagnética de frecuencia constante (60, 80, 200, 500 u 800 MHz)

mientras se varía la fuerza del campo magnético. Cuando este campo magnético alcanza la fuerza correcta, los núcleos de hidrógeno absorben energía (y se produce la “resonancia”): esta absorción es registrada por el instrumento como una señal (un pico o una serie de picos) sobre una hoja de papel calibrado.

El espectro de RMN constituye la gráfica de la frecuencia de los picos de absorción (expresado en unidades de δ , en partes por millón – ppm) en función de las intensidades de tales señales.

La interpretación de un espectro de RMN involucra el análisis de las tres principales características que presentan estos espectros:

- i. Los “desplazamientos químicos”, esto es la posición y número de señales diferentes que aparecen en el espectro: proporciona información sobre los diferentes tipos de hidrógeno en la molécula y el entorno químico de cada tipo de protón.
- ii. La intensidad de cada señal, registrada experimentalmente por el equipo de RMN como una “integración”: nos indica el número de hidrógenos que corresponde a cada señal;
- iii. El “acoplamiento spin – spin”, esto es la interacción entre hidrógenos vecinos, que se presenta en el espectro como divisiones de cada señal: nos indica el número de hidrógenos vecinos que tiene el protón que origina la señal.

Un espectro de RMN se considera plenamente identificado cuando a cada una de las señales que aparecen en el espectro se le puede asignar uno o un grupo de

hidrógenos de la molécula en estudio. Esto es, a cada hidrógeno, o grupo de hidrógenos equivalentes, de la molécula debe corresponder una señal en el espectro que satisfaga los requerimientos de desplazamiento químico, integración e interacción spin – spin correspondiente.

Sin embargo, el “modus operandi” del químico orgánico al interpretar un espectro de RMN es identificar sólo aquellas señales donde puedan deducirse fácilmente los acoplamientos spin – spin y, por lo general, no está interesado en encontrar soluciones precisas a sistemas complejos.

c) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono-13, RMN¹³C

La RMN¹³C tiene un valor particular en química orgánica. Mientras la RMN¹H nos permite “ver” los protones enlazados a la estructura carbonada de la molécula, la RMN¹³C nos permite ver los carbonos; por ello, la RMN¹³C es un complemento perfecto de la RMN¹H para elucidar la estructura de un compuesto.

Igual que en el isótopo de hidrógeno ¹H, el núcleo del isótopo de carbono – 13, ¹³C, tiene valores de spin de +1/2 y –1/2, que permite utilizarlo en espectroscopía de RMN, y por ello, los principios físicos de la RMN¹³C son los mismos que los de la RMN¹H. Sin embargo, se presenta una diferencia. En la RMN¹H se estudia al isótopo natural más común del hidrógeno, ¹H, cuya abundancia es del 99,98% del total de hidrógenos. Por el contrario, en la RMN¹³C se estudia al isótopo de carbono menos abundante, al ¹³C, que

constituye el 1,1% del total de carbonos. Esta deficiencia deviene en una ventaja, en razón de que no se observan desdoblamientos del tipo $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ en los espectros de RMN ^{13}C , a pesar que dichos núcleos vecinos pueden desdoblar sus señales entre sí, pero las probabilidades que se encuentren dos núcleos de ^{13}C resultan muy escasas.

Una desventaja de la baja abundancia isotópica del ^{13}C es que se hace necesario utilizar técnicas especiales que hacen que en el espectro las áreas de los picos no sean proporcionales al número real de carbonos en la molécula. Por ello, la integración de la señal no se practica en la RMN ^{13}C .

Otra desventaja es que debe utilizarse una cantidad de muestra mayor (aproximadamente 20 mg) que la requerida para obtener un espectro de RMN ^1H (4 mg o aún menos).

Al igual que la RMN ^1H , la RMN ^{13}C proporciona información del entorno electrónico en el que se encuentra cada átomo de carbono en la molécula. Los desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C son más o menos paralelos a los de la RMN ^1H . El compuesto de referencia, tetrametilsilano, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, TMS, absorbe a campo alto, mientras que los átomos de carbono aldehídico y carboxílico lo hacen a campos más bajos.

Los desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C son mucho mayores que los observados en la RMN ^1H , extendiéndose la zona de absorción en el rango de 0 a 250 ppm (δ) hacia campo bajo de la señal del TMS. Esto hace que los espectros

de RMN¹³C sean más sencillos que los de hidrógeno, ya que en un espectro de ¹³C es poco probable que se observen señales sobrepuestas.

Existen dos clases de espectros de RMN¹³C: en uno se observa los acoplamientos spin – spin ¹³C – ¹H, y en el otro no.

En el **espectro de RMN¹³C desacoplado a ¹H de banda ancha**, el núcleo de ¹³C no está acoplado con los del ¹H y, por lo tanto, no muestra acoplamiento spin – spin. El desacoplamiento se hace electrónicamente irradiando la muestra con una segunda radiofrecuencia. Dado que no hay desdoblamiento de picos, la señal de cada grupo de átomos de carbono magnéticamente aparece como un <singulete>. Este tipo de espectro permite determinar, de una manera sencilla, el número de átomos de carbono diferentes en la molécula, que corresponde al número de picos que aparecen en el espectro.

En los **espectros de RMN¹³C acoplado a ¹H** no se suprime el acoplamiento ¹³C – ¹H y, en este caso, la señal de cada carbono se desdobra por acción de los protones directamente enlazados a él, aplicándose también la regla n + 1 donde n es el número de átomos de hidrógeno enlazados al átomo de carbono que se analiza. Así, un carbono cuaternario (enlazado a cuatro grupos alquílicos y sin H enlazado a él) presenta una señal singulete; un carbono terciario (que sólo tiene 1 H enlazado) presenta un doblete; un carbono secundario (que tiene 2 H) presenta un triplete y un carbono primario (un grupo metilo, CH₃) presentará un cuadruplete.

Transferencia de polarización. Uno de los métodos con secuencias de pulsos de uso rutinario en la investigación de laboratorio es, por ejemplo, la RMN¹³C – DEPT (en inglés, “distorsionless enhanced by polarization transfer”, o sea, transferencia de polarización aumentada y no distorsionada).

Este tipo de espectro permite saber el tipo de carbono, CH₃, CH₂, CH o C_{cuaternario}, al que pertenece una determinada señal. En particular, es especialmente útil para superar la confusión de un espectro de RMN¹³C acoplado a ¹H en el que se superponen las señales multipletes próximas. El experimento DEPT consta de tres espectros: espectro registrado con un pulso (DEPT – 90) que sólo muestra las señales de los carbonos unidos a un solo hidrógeno (CH), un segundo espectro (DEPT – 135) en el que aparecen señales positivas para CH₃ y CH, absorciones negativas para CH₂ y en los que los carbonos cuaternarios carecen de señal, y por último, el espectro normal con desacoplamiento de ¹H de banda ancha.

d) **Espectroscopia bidimensional HMBC**

La posibilidad de excitar la muestra con uno o más pulsos de radiofrecuencia (RF), cada uno de ellos aplicado con una potencia, duración, frecuencia, forma y fase particulares, e introducirlos en momentos específicos de tiempo durante el experimento de RMN, generalmente antes de que el sistema haya regresado al equilibrio por relajación, permite diseñar toda una gama de secuencias de pulsos de las que se puede extraer información molecular muy variada.

Una secuencia de pulsos es una distribución en el tiempo de alguno o varios de los siguientes elementos: i) un cierto número de pulsos de RF que afecten a uno o más tipos de núcleos, ii) tiempos de espera en los que no se hace nada sino esperar a que el sistema evolucione de una determinada forma. Estos tiempos de espera pueden ser fijos o bien incrementables si su duración se va aumentando a medida que se repite el experimento. iii) gradientes de campo magnético y iv) una etapa final en la que se adquiere la FID.

En un experimento de RMN multidimensional la secuencia de pulsos debe constar de al menos dos pulsos y éstos deben separados por un periodo de espera incrementable. La secuencia de pulsos se repite un número de veces adquiriéndose una FID en cada ocasión. La fase de alguno de los pulsos puede alterarse en cada repetición así como incrementarse la duración de uno o más tiempos de espera variables. Si la secuencia de pulsos tiene un tiempo de espera incrementable el experimento tendrá dos dimensiones, si tiene dos será de tres dimensiones, si tiene tres el experimento será de cuatro dimensiones. Aunque en teoría no existe límite en el número de dimensiones de un experimento, experimentalmente hay limitaciones impuestas por la consiguiente pérdida de señal por relajación que conlleva la detección de las distintas dimensiones. Los tiempos de registro de los experimentos de RMN multidimensional se pueden acortar drásticamente con las técnicas rápidas de RMN desarrolladas en la presente década.

Los experimentos multidimensionales se pueden clasificar en dos tipos principales:

Experimentos de correlación homonuclear: Son aquellos en los que todas las dimensiones corresponden al mismo núcleo. Ejemplos: COSY (COrrrelation SpectroscopY), TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY), NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY).

Experimentos de correlación heteronuclear: En este experimentos se obtienen espectros cuyas dimensiones pertenecen a diferentes núcleos. Ejemplos: HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), HSQC (Heteronuclear Simple Quantum Correlation), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), HOESY (Heteronuclear Overhauser Effect SpectroscopY).

La espectroscopia HMBC es una versión modificada de la espectroscopía HMQC la cual determina enlaces H-C en un alto rango. Un espectro HMBC nos brinda información sobre la correlación entre los carbonos e hidrógenos que se encuentran separados por 2, 3 e inclusive en algunos casos 4 enlaces.

e) **Espectroscopia de infrarrojo, IR**

El espectro de infrarrojo de un compuesto es una representación gráfica de la longitud de onda (λ) ó del número de onda (ν) cm^{-1} , en el rango de radiación infrarroja (4000 a 666 cm^{-1}), en relación a la transmitancia (%T) o absorbancia (A) que presenta la muestra.

En el espectro IR del ácido úsnico y el ácido lecanórico obtenido en nuestra tesis se registra el número de onda $\nu \text{ cm}^{-1}$ con respecto a la transmitancia (%T).

En la bibliografía se encuentran espectros IR lineales en número de onda ν (cm^{-1}), y en longitud de onda λ (nm); y es importante tener presente – para propósitos de comparación entre espectros – que un espectro lineal en número de onda ν (cm^{-1}) tiene una apariencia muy diferente de aquel que es lineal en longitud de onda λ (nm).

Cuando una muestra no absorbe radiación a una longitud de onda particular, se registra como un 100% T (caso ideal). La porción del espectro donde %T es 100 o cerca de 100 se llama “línea base” y aparece registrada en la parte superior de un espectro de IR.

La absorción de radiación por la muestra a una longitud de onda determinada origina un descenso en el %T, lo que se pone de manifiesto en el espectro en forma de un “pico” o más propiamente de una “banda de absorción”.

La posición de las bandas de un espectro de IR se presentan como longitudes de onda λ (en micrones, nm) o como número de onda ν (en cm^{-1}).

Las intensidades de la absorción de las bandas se expresan ya sea como transmitancia (%T) o como absorbancia.

A diferencia de los espectros de masas y de RMN los espectros de IR aún de moléculas muy simples pueden ser extremadamente complejos. Sin embargo, el químico orgánico toma ventaja de esta complejidad cuando compara el espectro de un compuesto desconocido con aquel de una muestra de referencia: la correlación pico a pico de ambos espectros es una excelente evidencia de

identidad. No es posible que dos compuestos cualesquiera, excepto los enantiómeros ópticos, tengan el mismo espectro de IR.

A pesar de esta complejidad y del hecho que el espectro de IR es característico de toda la molécula, es una característica experimental que ciertos grupos de átomos (los grupos funcionales) originan bandas a, o cerca de, la misma frecuencia sin importar la estructura del resto de la molécula. Es la persistencia de estas bandas características lo que permite al químico obtener útil información estructural acerca de los grupos funcionales presentes en la molécula (por ejemplo: el grupo oxhidrilo OH, el grupo carbonilo C = O, etc.) mediante simple inspección del espectro y la referencia a las tablas de frecuencias de tales grupos.

Dado al hecho que no dependemos sólo del espectro de IR para la identificación de un compuesto orgánico, no se requerirá un análisis detallado del espectro de IR. Estos espectros se utilizan en conjunción con los otros datos espectrales (masas, RMN, UV) para la determinación de la estructura molecular.

La radiación IR ($4000 - 666 \text{ cm}^{-1}$) es absorbida y convertida por una molécula orgánica en energía de vibración molecular. Esta absorción está cuantizada; sin embargo, los espectros vibracionales (de IR) aparecen como bandas y no como líneas, debido a que un simple cambio de energía vibracional se encuentra acompañado por muchos cambios de energía rotacional.

f) Espectroscopía de ultravioleta, UV

El espectro de UV de un compuesto es una representación gráfica de la longitud de onda λ de absorción, en el rango de la radiación ultravioleta cercano (200 – 400 nm), en relación a la intensidad de absorción (expresada como absorbancia $A \times 100$; ó absorptividad molar $\text{Log } \epsilon$). El espectro UV consiste en una banda ancha de absorción extendida sobre un amplio rango de longitudes de onda, cuyas características principales son su posición y su intensidad.

La posición de la absorción UV se especifica como λ_{max} , es decir la longitud de onda del punto máximo de la curva de absorción, la cual corresponde a la longitud de onda de la radiación cuya energía es la requerida para que se produzca una transición electrónica.

La intensidad de la absorción UV (expresada como Absorbancia) cumple con la Ley de Lambert – Beer, la cual relaciona la absorbancia A , la transmitancia T y la absorptividad molar ϵ (coeficiente de extinción molar) según la ecuación:

$$A = \text{Log}_{10}(1/T) = \epsilon cb \quad \text{y} \quad \epsilon = A/cb$$

La absorbancia de un compuesto, a una longitud de onda en particular, aumenta al aumentar el número de moléculas que experimentan la absorción. En consecuencia la absorbancia, además de depender de la estructura electrónica del compuesto, depende de la concentración de la muestra c (en mol/L) y del espesor

de la celda empleada b (en cm). Por ello es frecuente expresar la intensidad de absorción en los espectros UV como absorptividad molar ϵ en lugar de absorbancia A , debido a que ϵ es un valor reproducible que tiene en cuenta tanto la concentración de la muestra c como la longitud de la celda b ; y si bien sus unidades son $M^{-1}cm^{-1}$ es frecuente escribirla como una cantidad adimensional.

Cuando los valores de ϵ son muy grandes es común utilizar $\log \epsilon$ en los gráficos de UV. Las absorciones con $\epsilon_{max} > 10^4$ son absorciones de alta intensidad, mientras que las absorciones de baja intensidad corresponden a valores de $\epsilon_{max} < 10^3$. Estas últimas se consideran “transiciones prohibidas”.

Los espectros de UV proporcionan mucho menor información acerca de la estructura de los compuestos, que aquella proporcionada por los espectros de masas y de RMN, y se aplica principalmente y prácticamente de manera exclusiva al estudio de sistemas conjugados, tales como:

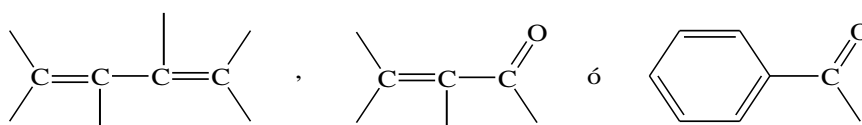


Figura N°19: Sistemas conjugados

La Espectrometría UV toma ventaja de esta selectividad en caracterizar sólo sistemas conjugados: La mayor parte de una molécula compleja resulta transparente (no absorbe) en el UV, y por tanto estos grupos conjugados característicos pueden ser puestos en evidencia dentro de la molécula.

Origen de las absorciones UV. El estado fundamental de una molécula orgánica contiene los electrones de valencia en tres tipos de orbitales moleculares: orbitales sigma σ , orbitales pi π y orbitales ocupados pero no enlazados n. Así para el grupo carbonilo se tiene:

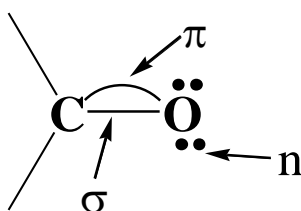


Figura N°20: Tipos de electrones de valencia

La energía absorbida por la molécula en la región UV (200- 400nm) produce transiciones electrónicas de los electrones de valencia de la molécula presentes en los orbitales σ , π ó n, a un orbital excitado de mayor energía.

Capítulo 3

PARTE EXPERIMENTAL

PRESENTACIÓN

La culminación de esta tesis de licenciatura ha pasado por las etapas propias del desarrollo del método científico. Para ello se eligió trabajar con el líquen *Flavopunctelia Flaventior (Stirt.)Hale* (Ver Figura N°21), material que fue recolectado en el distrito de Muquiyauyo, en la provincia de Jauja, por la asesora de esta tesis M.Sc. Elena Cóndor Cuyubamba.

El trabajo experimental del “Estudio Químico del líquen *Flavopunctelia Flaventior (Stirt.)Hale*” nombre con el cual fue registrada esta tesis (N°de registro 495, 22 de agosto de 2013), se comenzó en el mes de Julio del 2012, obteniéndose como resultado de esta investigación el aislamiento de las siguientes sustancias líquénicas: ácido úsnico, ácido lecanórico y β -orcinol carboxilato de metilo.

Consideramos importante indicar que las etapas experimentales de laboratorio químico, desde el secado de la planta hasta la obtención del extracto bruto orgánico, se realizaron en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3-175) del Laboratorio N° 12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, en el período comprendido entre abril del 2012 y julio del 2013, demandando un tiempo aproximado de 15 meses de trabajo efectivo (considerando el trabajo de 6 horas/día, durante 2 días/semana).

La purificación final de las sustancias líquénicas mencionadas mediante cromatografía en columna y cromatografía en placa preparativa, y su identificación mediante espectrometría de masas (EM), espectroscopia resonancia magnética nuclear de hidrógeno RMN¹H en CDCl₃, espectroscopia resonancia magnética nuclear de

carbono RMN¹³C en CDCl₃, espectroscopia bidimensional HMBC, espectrofotometría UV-Visible y espectroscopia IR, fue realizado por la autora de esta tesis, durante la breve estadía en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Química de Recursos Naturales de la Universidad de Talca, entre el 18 de julio y el 16 de agosto del 2013.

Consideramos pertinente reconocer que los procedimientos modernos de purificación e identificación de sustancias liquénicas involucran el uso de equipos acoplados de identificación espectroscópica, como la técnica de *Electron Spray Ionization* acoplado a un detector de masas (ESI-MS), y la técnica de Cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS), procedimiento que pudimos experimentar durante la etapa final de esta Tesis, que realizamos en los Laboratorios del Instituto de Química de Recursos Naturales de la Universidad de Talca (Talca-Chile).



Figura N°21: Liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale (Foto: D. Martino).

TRABAJO PRELIMINAR

A. RECOLECCIÓN DEL LIQUEN

El líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale fue recolectado en el distrito de Muquiyauyo, provincia de Jauja, departamento de Junín (3200msnm) el 27 y 28 de diciembre del 2011 (primera recolección para los estudios preliminares), el 27 y 28 de diciembre del 2012 (segunda recolección para el aislamiento de las sustancias líquénicas), 10 y 11 de mayo del 2013 (tercera recolección para el aislamiento de las sustancias líquénicas). De estas tres recolectas se tuvo una masa total de 77,5 g del líquen.

B. USO DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS

ÁCIDO ÚSNICO

El ácido úsnico fue aislado por primera vez en 1844 por Knop y quizás sea el metabolito secundario más estudiado y uno de los pocos que se ha comercializado. Aunque recibe su nombre por encontrarse en las especies del género *usnea*, también se encuentra en otros líquenes, y es abundante en los géneros *Alectoria*, *Cladonia*, *Evernia*, *Lecanora*, *Parmelia* y *Romalina* (Ingolfsdottir, 2002).

Como antibacteriano, el ácido úsnico es un efectivo inhibidor de las bacterias Gram +, y es activo frente *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, y algunas especies anaeróbicas (*Bacteroides* y *Clostridium*) incluyendo cepas resistentes a las beta-lactamasas, por ello su

mayor poder curativo reside en que combate las infecciones (Dharmananda, 2003). Sin embargo, las concentraciones mínimas inhibitorias son demasiado elevadas como para que puedan obtenerse en sangre después de una administración sistémica (vía oral o parenteral) aunque sí podrían alcanzarse después de una administración tópica. Asociado al sulfato de zinc, el ácido úsnico administrado intravaginalmente ha demostrado favorecer la re-epitelación después del tratamiento radioquirúrgico de las lesiones vaginales producidas por el papilomavirus humano y reducir el número de recaídas (C. Illana-Esteban, 2012).

El ácido úsnico, en forma de extracto de líquenes, se ha utilizado en una amplia gama de productos de herboristería como el té de Kombucha, cosméticos y productos de perfumería. Como sustancia pura, ha sido formulado en cremas medicinales, pasta de dientes, colutorios, desodorantes y protectores solares.

ÁCIDO LECANÓRICO Y β -ORCINOL CARBOXILATO DE METILO

Rankovic (2008) realizó un estudio sobre la actividad biológica de diversos compuestos fenólicos aislados de líquenes, entre ellos el ácido lecanórico. En dicho artículo se reporta la actividad biológica frente a diversas bacterias del ácido lecanórico como lo son diferentes especies del tipo *Bacillus*, *Escherichia* y *Staphylococcus*. A su vez presenta actividad antifúngica frente a las especies *Candida*, *Aspergillus*, *Botrytis* entre otras. Mientras que en Vinitha (2011) realizó un estudio en donde se muestra que si bien el β -orcinol carboxilato de

metilo no presenta actividad antibacteriana, si presenta alta y muy efectiva actividad antifúngica mucho mayor a la de algunos depsidos y depsidonas mostrados en este estudio.

C. DETERMINACIÓN (IDENTIFICACIÓN) BOTÁNICA

La muestra de *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale (Ver Figura N°22) fue identificada por el biólogo Ángel Ramírez (Museo de Historia Natural, Lima, Perú) (Ver Anexo N°1)



Figura N°22: Liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale

(Foto: E. Cóndor. Lugar: Miquiyauyo, Junín).

D. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

Las investigaciones precedentes que se realizaron sobre líquenes y en particular sobre nuestro liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale nos describen estudios botánicos y biológicos en los cuales se detalla sobre la presencia del ácido úsnico y ácido lecanórico como su principal componente (Sohrabi & Jamshidikia 2007: 5). Sin embargo, en nuestra investigación, tanto aquí en nuestro país como en las bibliotecas virtuales de artículos a nivel internacional a las cuales se tuvo acceso desde la Universidad de Talca (Chile), no se ha encontrado un estudio químico como el que se realizará en este trabajo sobre esta especie en particular. Por otro lado, los estudios precedentes sobre líquenes fueron una gran herramienta y una base de mucha ayuda para este estudio, describiéndonos técnicas de purificación e identificación de sustancias líquénicas las cuales fueron de vital importancia en el desarrollo de esta tesis.

Estas referencias se obtuvieron de la Biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería (Perú), así como de Bibliotecas de universidades extranjeras, gracias a la colaboración de la Dra. María del Pilar Caramantín Soriano, durante mi estadía de investigación en la Universidad de Talca (Chile) pudimos contar con más de 40 títulos como referencias bibliográficas para este trabajo, el barrido bibliográfico se realizó en una base de datos de dicha Universidad que data con artículos desde el año 1958 hasta 2015. Este estudio bibliográfico nos sirvió como base para este trabajo, de aquí pudimos aplicar la técnica de extracción del extracto bruto orgánico; así como

también, las técnicas empleadas en diferentes líquenes para el aislamiento de sustancias liquénicas.

TRABAJO EXPERIMENTAL

A. SECADO Y MOLIENDA DE LA PLANTA

El liquen se limpió cuidadosamente y se secó en una estufa “Labor” (Hungría) a 40 °C por 24 horas, se dispuso al inicio de nuestro trabajo (Julio 2012) de suficiente material seco.

Esta muestra se pulverizó a grano fino en un molino doméstico “Moulinex” (750W).

B. ANÁLISIS CUALITATIVO

B.1. Marcha Fitoquímica

i. Muestra: 12 g de muestra de liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale.

Se realizaron dos análisis, con resultados similares:

- Primer análisis: 23, 24 y 25 de Julio del 2012.
- Segundo análisis: 22, 23 y 24 de abril del 2013.

ii. Procedimiento Experimental: Reyna (1999-b), de acuerdo a Rondina & Coussio (1969) (ver Anexo N°2).

iii. Resultados Las dos muestras analizadas nos dieron idénticos resultados, los cuales se detallan en el Anexo N°3 y se resumen a continuación:

- a) **Contiene:** Aminogrupos primarios o secundarios (+++), grupos fenólicos libres (+), triterpenos y esteroides (+), quinonas, antranonas o antranoles (+) y leucoantocianidinas, catequinas (+).

Convención: Abundante (+++), regular (++), poco (+).

- b) **No contiene:** Flavonoides, alcaloides, saponinas, y taninos.

B.2. Test para sustancias liquénicas:

- i. **Muestra:** Extracto de acetona del liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.)
Hale.

- ii. **Procedimiento:** Brodo et al. (2001) y Orange et al. (2001) (Ver Anexo N°4)

iii. Resultados:

- a) **Contiene:** Acido úsnico (+), ácido lecanórico (+)

- b) **No contiene:** Parietina (-)

C. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ÁCIDO ÚSNICO

i. Muestra: 1 g de líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale

- Fecha de realización:
- 23, 24 y 25 de Julio de 2012
- 22, 23 y 24 de abril del 2013

El análisis se realizó por duplicado obteniéndose resultados similares.

ii. Procedimiento

a) Preparación de las soluciones estándares y curva de calibración: Se dispuso de ácido úsnico patrón marca SIGMA-ALDRICH Lote: MKBP1746B (Ver Anexo N°8)

- Se pesó 1,81 mg de ácido úsnico patrón.
- Se disolvió en cloroformo y se llevó a un volumen de 50 mL (36,2 ppm).
- Se prepararon diluciones dentro del rango de linealidad.
- Se midieron las absorbancias máximas de las soluciones en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 Series (Ver Tabla N°11)
- Se realizó la gráfica concentración vs absorbancia obteniendo la curva de calibración, encontrar su ecuación (Ver Figura N°23).

b) Preparación y evaluación de la muestra problema: Se dispuso de 1 g de muestra limpia y seca.

- Se realizó la extracción intensiva de un gramo de muestra problema con 150 mL de cloroformo en un soxhlet.
- Se repitió la extracción con 150 mL de cloroformo adicional.
- Se unieron los extractos, se concentró y se llevó a un volumen de 100 mL, obteniéndose la solución 1.
- A partir de la solución 1, se obtuvieron diluciones de 1/10, 1/20 ,1/50. Se midieron sus absorbancias máximas (Ver Tabla N°12)
- Se realizó el cálculo del contenido del ácido úsnico del líquen por gramos de muestra, a partir de la curva de calibración, la ecuación de la curva y los valores de absorbancia de la solución 1 y sus diluciones.
- La extracción de la muestra se realizó por duplicado. Diferenciaremos los dos extractos como A y B.

iii. Determinación del contenido de ácido úsnico presente en el líquen

Flavopunctelia Flaventior (Stirt.)Hale

a) Muestra:

Masa de líquen utilizada: 1,0018 g

b) Equipo utilizado:

Espectrofotómetro UV- Visible

Marca: Shimadzu

Modelo: UV-1800

Resolución: 1 nm

Tabla N° 11**Datos de las absorbancias obtenidas con UV ($\lambda = 284$ nm) para la curva de calibración**

Ac. úsnico (ppm)	Absorbancia
1	0,081
2	0,175
3	0,258
4	0,354
5	0,431
6	0,516
7	0,584
8	0,657
9	0,757

Tabla N°12

Concentraciones de obtenidas para muestra

Diluciones	Concentración (ppm)
1/10A	13,236
1/10B	13,103
1/20A	6,162
1/20B	6,053

b) **Curva de calibración estándar:**

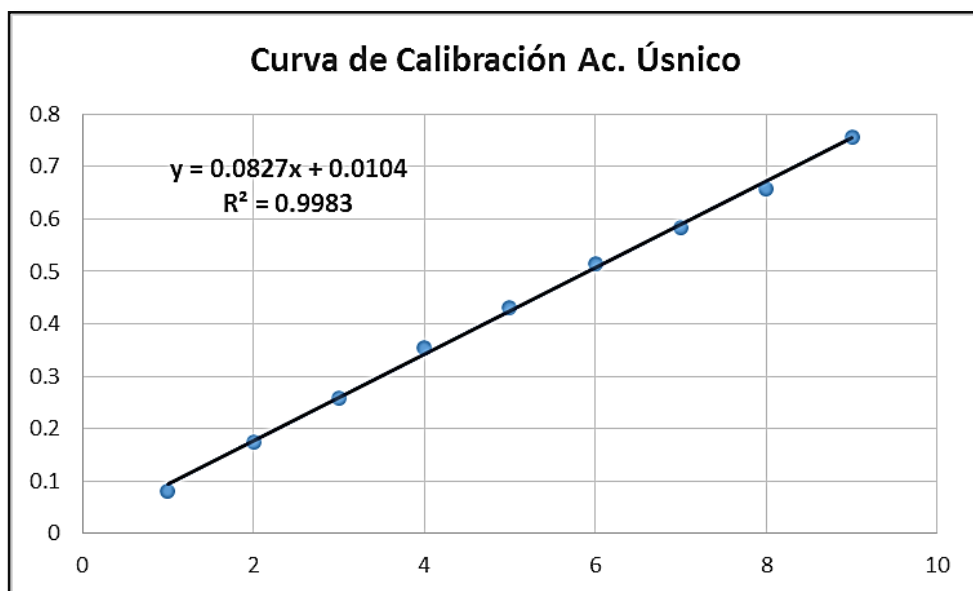


Figura N°23: Gráfica de la curva de calibración de ácido úsnico

c) Cálculos

De una fiola de 25 mL con extracto de líquen (solución 1) se prepararon diluciones de 1/10, 1/20 y 1/50 las cuales arrojaron las concentraciones de ácido úsnico en ppm mostradas en la tabla N°13. Así tenemos que el porcentaje de Ácido Úsnico presente en cada dilución estará dado por:

$$\% \text{ Ac úsnico} = \frac{[\text{concentración (ppm)}] \times (\text{volumen de dilución}) \times 100 \text{mL} \times 100\%}{1,0018}$$

d) Resultados

Tabla N°13

Porcentaje presente de Ácido úsnico en las muestras de liquen

Muestra	% Ac úsnico	% Ac. úsnico promedio
1/10 A	1,321	1,268 ± 0.048 *
1/20 A	1,230	
1/10 B	1,310	
1/20 B	1,211	

*El cálculo estadístico de la incertidumbre se encuentra en el Anexo N°5

D. AISLAMIENTO DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS:

D.1. Muestra: Se colectaron en total 77,5 g de líquenes en el distrito de Muquiyauyo, provincia Jauja, departamento de Junín (3200 msnm) de la siguiente manera

- i. Primera Colecta: 27 y 28 de diciembre de 2012, 27,5 g
- ii. Segunda Colecta: 27 y 28 de diciembre de 2013, 24 g
- iii. Tercera Colecta: 10 y 11 de mayo de 2013, 26 g

De los cuales se usaron 63.5 para el aislamiento de sustancias líquénicas

D.2. Equipos utilizados:

- **Centrifugadora:** Hettich, modelo EBA8, 10 velocidades.
- **Balanza Analítica:** Shimadzu- Libror AEU-210, capacidad 200.000 g
- **Lampará UV :** Spectroline, 254 y 365 nm
- **Medidor de punto de fusión:** Electrothermal Equilab IA900, rango 0,1 °C, capacidad 400 °C.
- **Rotaevaporador:** Heidolph – Laborota 4001

D.3. Procedimiento:

- a) **Extracción sólido-líquido: Obtención del extracto bruto orgánico** (15.Abr-15.Jul'13)
- i. Se dispuso de tres frascos de vidrios limpios y secos donde se colocaron las muestras de cada colecta por separado.
 - ii. Se rotuló cada frasco A, B y C correspondientes a la fecha de colecta que se mencionaron en la Sec. D.1. precedente. (masa A= 20,5 g; masa B=24 g; masa C= 26 g)
 - iii. Se dejaron macerando en Acetona (200 mL), cada muestra de líquen en su respectivo frasco, por un intervalo de 48 h. El proceso se repitió 4 veces cada vez con 200 mL.
 - iv. Se juntaron los volúmenes obtenidos para cada muestra, obteniéndose el extracto A, B y C respectivamente.
 - v. Se llevaron a sequedad en un rotaevaporador por separado
 - vi. Se hicieron ensayos de cromatografía en placa fina de los extractos A, B y C en diferentes eluentes: cloroformo, metanol y acetato de etilo.
 - vii. Al comprobar que se obtenían similares desplazamientos y separaciones, se decidió reunir y concentrar los extractos.
 - viii. Se obtuvo 6,9222 g de Extracto bruto orgánico (EBO) del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale.

b) Purificación por cromatografía (18. Jul – 16.Ago'13) Los procedimientos cromatográficos que se realizaron para la purificación de los compuestos liquénicos fueron los siguientes:

- i. Cromatografía de capa fina-CCF: Análisis preliminar
- ii. Cromatografía en columna-CC.
- iii. Cromatografía en placa preparativa-CPP.

Esta etapa del trabajo se realizó durante la estadía de investigación en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Química de los Recursos Naturales de la Universidad de Talca, Chile, bajo la asesoría de la Dra. Maria del Pilar Caramantin Soriano y el Dr. Guillermo Schmeda, del 18 de Julio al 16 de Agosto del 2013.

c) Análisis preliminar por cromatografía en capa fina – CCF: El objetivo de este procedimiento preliminar es seleccionar el eluyente más eficiente para realizar posteriormente la purificación del Extracto Bruto Orgánico por cromatografía en columna (CC) y/o cromatografía en placa preparativa (CPP).

- i. Muestra:** Extracto Bruto Orgánico (EBO), obtenida en la Sec D.3.a) precedente.
- ii. Referencia:** Se dispuso de patrón de Ácido Úsnico
- iii. Placa:** Placa de aluminio Kieselgel 60F-254, 0,2 mm

- iv. Eluyente:** Se desarrollaron placas con los siguientes eluentes: Acetato de Etilo:Cloroformo (1:1); Cloroformo: Metanol (1:1), Acetato de Etilo: Cloroformo (2:1).
- v. Procedimiento:** La aplicación de las muestras, el desarrollo del cromatograma y el revelado de las placas son procedimientos descritos en los textos y guías de prácticas de química orgánica.
- vi. Revelador:** Ácido sulfúrico y temperatura de 120 °C y lámpara UV a 254 nm.
- vii. Observaciones:** el resultado de la realización de este trabajo preliminar nos indica que aparentemente el liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale presenta un compuesto mayoritario que podría tratarse del ácido úsnico ya que el Rf de una de las manchas coincidió con el Rf del patrón.

d) Cromatografía en columna-CC

El objetivo de este procedimiento cromatográfico, es obtener fracciones enriquecidas, y si fuera posible puras, de una o más sustancias líquénicas mayoritarias.

En esta parte de la investigación se desarrollaron principalmente 3 columnas cromatográficas, denominadas CC-Sephadex, CC-Silica Gel, CC-Silica Gel-Ac. Oxálico. Pasaremos a describir cada una de ellas siendo de importancia los resultados obtenidos en el desarrollo de cada una de éstas.

d.1) Columna Cromatográfica- Sephadex:

- i. Muestra:** EBO (0,7622 g), obtenida en la Sec. D.3 a)
- ii. Características de la columna:** $\phi_i=30\text{mm}$, $h =80\text{cm}$; altura del Sephadex=21cm.
- iii. Adsorbente:** Sephadex LH-20
- iv. Procedimiento**
 - Se llenó la columna con Sephadex LH-20 hasta una altura de 21 cm, se agregó metanol hasta cubrir el empaque.
 - Se disolvió 0,7622 g del extracto de acetona del liquen en la mínima cantidad de metanol (12 mL) hasta formar una mezcla homogénea.
 - La mezcla anterior se colocó en la parte superior de la columna, y luego se cubrió con una pequeña capa de algodón para proteger la muestra.
 - Se siguió haciendo pasar metanol en volúmenes de 60 mL. Se utilizaron en total 420 mL.
- v. Resultados:** Se colectaron 148 fracciones, las que fueron reunidas en 10 grupos, por presentar similares manchas en el análisis de TLC en tolueno: acetato de etilo (170:30) y revelado con UV (254 y 365 nm) y solución de ácido sulfúrico 10 % en metanol en caliente.

Tabla N°14

Agrupación de Fracciones en - C.C Sephadex

Grupo (X)	Fracción (F)	Masa (mg)
X1	F1-10	13,8
X2	F11-29	18,8
X3	F30-51	106,3
X4	F52-58	77,9
X5	F59-73	89,1
X6	F74-86	87,1
X7	F87-98	317,9
X8	F99-108	83,3
X9	F109-127	15,6
X10	F128-148	7,0

En el grupo X7, después de 12 horas de reposo, se observó la formación de cristales blancos como copos de agujas (Ver Figura N°24). Dichos cristales fueron separados por filtración simple y se le practicó cromatografía en placa fina teniéndose un Rf similar al del ácido lecanórico (Jayaprashaka et al., 1998). Se procedió a realizar la recristalización en solución acetona: agua (5:5) en caliente, luego de varias recristalizaciones sucesivas se obtuvieron 68,9 mg de cristales blancos, los cuales se separaron para su posterior identificación por espectroscopia (Cap.3 Sec E.2 Pág. 123) Otros

grupos que presentaban una sola mancha en la TLC y que se separaron para su posterior estudio por espectroscopia fueron: X3 y X2. Los grupos X8 y X9 parecían presentar un compuesto mayoritario por lo que se unieron formando el sólido S.



Figura N°24: Cristales blancos formados a partir del grupo X7 (Foto: D. Martino).

Se realizó la cromatografía en capa fina de todos los grupos obtenidos de la columna y se observó que el grupo X5 tenía gran cantidad de compuestos debido a las numerosas manchas que se observaban, por lo que se decidió realizar una cromatografía en columna de este grupo, la cual se describirá a continuación.

d.2) Columna Cromatográfica- Sílica Gel:

- i. Muestra:** Grupo X5 (0,0891 g), obtenido de la CC – Sephadex
- ii. Características de la columna:** $\phi_i=25$ mm, $h=37$ cm; altura de la sílica = 11,5 cm.
- iii. Adsorbente:** Sílica Gel 70-120 μm
- iv. Procedimiento**
 - La muestra se disolvió en la mínima cantidad de acetona, luego se le agregó un poco de sílica gel formando una papilla la cual fue homogenizada hasta que se encontró seca.
 - Se agregó la sílica gel a la columna y se utilizó como eluyente inicial éter de petróleo hasta cubrir el empaque. Se colocó la muestra de manera homogénea en la parte superior de la columna y se cubrió con una capa de algodón para protegerla.
 - Se le agregó a la columna eluentes en orden de polaridad creciente de la siguiente manera: éter de petróleo 100 %, éter de petróleo: acetato de etilo (9:1; 8:2; 7:3; 6:4), acetato de etilo 100 %, Acetato de etilo: metanol (9:1; 8:2; 7:3; 6:4) metanol: agua (5:5) y agua 100 %. (Ver Figura N°25)
 -

v. Resultados:

Se colectaron 196 fracciones, las mismas que fueron reunidas en 13 grupos por presentar similares compuestos en la cromatografía en capa fina.

- 100 mL de Éter de petróleo: Acetato de etilo (8:2) F15-63
- 50 mL de Éter de petróleo: Acetato de etilo (7:3) F64-91
- 50 mL de Éter de petróleo: Acetato de etilo (6:4) F92-114
- 50 mL de Éter de petróleo: Acetato de etilo (5:5) F115-130
- 50 mL de Éter de petróleo: Acetato de etilo (4:6) F131-137
- 50 mL de Éter de petróleo: Acetato de etilo (3:7) F138-144
- 50 mL de Éter de petróleo: Acetato de etilo (2:8) F145-150
- 50 mL de Éter de petróleo: Acetato de etilo (1:9) F151-160
- 50 mL de Acetato de etilo 100% F161-164
- 25 mL de Acetato de etilo: metanol (9:1) F165-169
- 25 mL de Acetato de etilo: metanol (6:4) F170-173
- 25 mL de Acetato de etilo: metanol (4:6) F174-177
- 25 mL de Acetato de etilo: metanol (2:8) F178-183
- 75 mL de metanol (9:1) F184-194
- 50 mL Metanol: agua (5:5) F195
- 50 mL Agua 100 % F196

Tabla N°15
Grupos CC-Silica Gel

Grupo (G)	Fracción (F)	Masa (mg)
G1	F1-33	2,5
G2	F34-48	4,2
G3	F49-69	4,1
G4	F70-74	0,5
G5	F75-81	1,4
G6	F82-88	2,4
G7	F89-99	2,5
G8	F100-107	1,5
G9	F108-128	15,6
G10	F129-145	12,5
G11	F146-172	1,8
G12	F173-182	6,4
G13	F183-196	13

Cuando se realizó la cromatografía en placa fina de los diferentes grupos se observó una sustancia mayoritaria en los grupos G2 y G3 por lo que se decide juntar ambos grupos, y se denominó este grupo P, se decide realizar una cromatografía en placa preparativa de este grupo

En los grupos del G9 al G12 se observó un compuesto mayoritario y al correr la cromatografía junto con un patrón de ácido úsnico se observó un compuesto que tenía un R_f similar a este, por lo que se decidió juntar dichos grupos y se denominó Q. Se decidió proceder a la separación por cromatografía en placa preparativa.



Figura N° 25: Columna Cromatográfica del EBO del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.)

Hale (Foto: D. Martino).

d.3) Cromatografía en columna- impregnada con ácido oxálico

- i. Muestra:** EBO (0,6240 gr), obtenida en la Sec. D.3 a)
- ii. Características de la columna:** $\phi_i=20$ mm, $h =48$ cm; altura de la sílica =26 cm.
- iii. Adsorbente:** Silica Gel 70-120 μm impregnada con ácido oxálico
- iv. Procedimiento**

Se pesó 0,5 g de ácido oxálico y luego se disolvió en 100 mL de metanol. A dicha mezcla se le adicionó 41,7 g de sílica-gel (70-120 μm). Se agitó hasta homogenizar y luego se secó en la estufa (100 ° C) por 1h y 30 minutos. Se dejó enfriar antes de usar.

La columna se empaquetó con la sílica-gel impregnada con ácido oxálico hasta una altura de 26 cm. Se colocó el EBO en la parte superior de la columna, el cual previamente fue mezclado con la misma sílica impregnada con ácido oxálico hasta formar una papilla y se secó en vacío. Se utilizaron como eluentes éter de petróleo 100 %, éter de petróleo: tolueno (3:1, 3:3, 1:3), Tolueno 100 %, Tolueno: Acetato de etilo (98:2, 95:5, 90:10, 70:30, 60:40, 80:20), Acetato de Etilo 100 %, Acetato de Etilo: Metanol (95:5, 80:20, 50:50), Metanol 100 %.

v. Resultados:

Se colectaron 114 fracciones que fueron reunidas en 8 grupos por análisis de Cromatografía en placa fina; revelada con UV (254 y 365 nm) y solución de ácido sulfúrico con aire caliente.

- 60 mL de Éter de petróleo 100% F1-7
- 80 mL de Éter de petróleo: Tolueno (3:1) F8-23
- 60 mL de Éter de petróleo: Tolueno (3:3) F24-31
- 40 mL de Éter de petróleo: Tolueno (1:3) F32-35
- 40 mL de Tolueno 100% F36-41
- 50 mL de Tolueno: Acetato de etilo (98:2) F42-49
- 50 mL de Tolueno: Acetato de etilo (95:5) F50-58
- 50 mL de Tolueno: Acetato de etilo (90:10) F59-65
- 50 mL de Tolueno: Acetato de etilo (70:30) F66-73
- 50 mL de Tolueno: Acetato de etilo (60:40) F74-82
- 50 mL de Tolueno: Acetato de etilo (20:80) F83-88
- 50 mL de Acetato de etilo 100% F89-93
- 50 mL de Acetato de etilo: Metanol (95:5) F94-100
- 50 mL de Acetato de etilo: Metanol (80:20) F101-108
- 50 mL de Acetato de etilo: Metanol (50:50) F109-112
- 50 mL de Metanol 100% F113-114

Tabla N°16: Grupos CC-Acido Oxálico

Grupo (A)	Fracción (F)	Masa (mg)
A1	F1-4	18,2
A2	F5-17	44
A3	F18-30	59,9
A4	F31-53	52,7
A5	F54-70	43,8
A6	F71-83	154,39
A7	F84-93	184,3
A8	F94-114	37,3

Se observó la formación de cristales en forma de aguja de color amarillo en los grupos A1, A2 y A4. En el grupo A4 se tiene una cantidad más abundante de estos cristales impuros, pues se tenían algunas manchas blancas en esta fracción. Con la finalidad de separar los cristales amarillos se realizó una extracción en cloroformo y los cristales blancos se extrajeron con metanol. A los cristales amarillos se les denominó A4a y a los cristales blancos se les denominó A4b.

Se realizaron pruebas de punto de fusión de los cristales amarillo sin purificar, se obtuvieron valores de entre 203,7 -204,3 °C

Se procedió a la purificación de los cristales amarillos nuevamente mediante una extracción en cloroformo, se obtuvieron 0.0384 g de estos cristales los cuales fueron separados para su análisis por espectroscopia (Cap.3, Sec.E.1 Pág. 113)

d.4) Cromatografía en placa preparativa-CPP

- i. Muestra:** P (8,3 mg) y Q (36,3 mg), provenientes de la Columna en Sílica Gel en la sección D.3. d.2)
- ii. Adsorbente:** Placas de Sílica Gel Kieselgel 60F-254*, 1 mm de espesor de capa (20x20 cm²) (permiten trabajar con 20 mg de muestra).
- iii. Eluyente:** Cloroformo: Metanol (98:2)
- iv. Revelador:** Lámpara UV (254-365 nm)
- v. Procedimiento :** La aplicación de las muestras, la triple elusión** cromatográfica, la identificación de la porción de la placa que contiene el compuesto de interés y la recuperación a partir de las placas son

* Las placas fueron preparadas dispersando una suspensión de sílica en agua destilada sobre placa de vidrio de 20x20 cm².

** Elusión consiste en el ascenso del solvente por la propiedad de capilaridad.

procedimientos descritos en los textos y guías de prácticas de química orgánica.

- Se sembraron las muestras P y Q en dos placas diferentes. Del grupo P se obtuvieron 4 fracciones y del grupo Q se obtuvieron 5 fracciones.
- Se separaron las fracciones por raspado con una espátula fina y se trasvasó en frascos de vidrio pequeños, limpios y secos previamente tarados.
- Se realizó la TLC de todas las fracciones y se encontró que las fracciones P2, Q1 y Q2 presentaban una sola mancha, por lo que se presumía que se trataban de compuestos puros.
- Se separaron estas fracciones para su análisis por espectroscopia.

Tabla N°17: Grupos Cromatografía Placa Preparativa

Fracción	Masa (mg)
P ₂	5,1
Q ₁	2,8
Q ₂	7,7

e) Análisis de las fracciones mediante CCF y su espectro de RMN:

- Por cromatografía en capa fina se observó que los grupos X7 (Sephadex), P2 (placa preparativa), y A4a (CC-Sílica Gel Acido Oxálico) contenían sustancias puras. A los grupos X7 y A4a se les realizó pruebas de punto de fusión y se les midió el R_f , respectivamente, obteniéndose que el X7 tenía punto de fusión y R_f similar al que la bibliografía reportaba para Acido lecanórico (Jayaprashaka, 1998); y A4a tenía punto de fusión que correspondía al Ácido Úsnico (Castro 2010).
- Se decide homogenizar los códigos de todos los grupos obtenidos de la separación cromatográfica que se presumía tenían sustancias puras. Dicha codificación se muestra en el siguiente cuadro (Ver Tabla N°17)

Tabla N°18: Compuesto puros obtenidos

Compuesto	Código
Q1	FF1
S	FF2
A4b	FF3
X3	FF4
P2	FF5
Q2	FF6
A4a	FF7
X7	FF8

- Por espectroscopia de RMN¹H y Espectro de masas, se verificó la presencia de ácido lecanórico en el compuesto codificado como FF8, del ácido úsnico en el compuesto FF7, también se observó la presencia de un tercer compuesto puro proveniente de la cromatografía en placa preparativa denominado FF5, por lo que se decide realizar un espectro RMN¹³C y HMBC a dicho compuesto, de la comparación con la literatura de dichos espectros podemos decir que el compuesto FF5 se trataría de la sustancia líquénica β -orcinol carboxilato de metilo.
- Conclusión: A partir de 63,5 g de muestra del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale se lograron aislar las principales sustancias

liquénicas ácido úsnico (38,4 mg), ácido lecanórico (68,9mg) y β -orcinol carboxilato de metilo (5,1 mg).

E. IDENTIFICACION ESPECTROSCÓPICA DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS:

La determinación estructural de los compuesto liquénicos aislados a partir del liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale, se realizó mediante el análisis de sus espectros* de masas, EM, de RMN¹H, RMN¹³C, HMBC, IR y UV.

Las muestras analizadas fueron las sustancias puras codificadas como FF8, FF7 y FF5. Respecto a los demás grupos que se analizaron por RMN, se concluyó, por sus respectivos espectros, que no se trataban de sustancias puras, por lo que queda pendiente para una posterior investigación su separación, purificación e identificación.

* Los espectros fueron obtenidos durante la estadía que realizó la autora de esta Tesis, en el Instituto de Química de los Recursos Naturales de la Universidad de Talca (Chile)

E.1. Compuesto FF7

El compuesto FF7 físicamente son cristales en forma de aguja amarillos, solubles en cloroformo, cuyo punto de fusión es 203,7 -204,3 °C.

a) Espectro de masas (Espectro N°1)

a.1) Condiciones de trabajo

- i. Equipo:** Cromatógrafo de Gas acoplado a Masas (CG-MS) Cromatógrafo de Gas: Perkin Elmer Turbo Mass. Autosystem XL. Las muestras fueron disueltas en diclorometano e inyectadas directamente al equipo.
- ii. Laboratorio:** Instituto de Química de los Recursos Naturales, Universidad de Talca, Chile
- iii. Operador:** Dr. María del Pilar Caramantín Soriano.
- iv. Fecha:** 12 de Agosto del 2013

a.2) Características del espectro

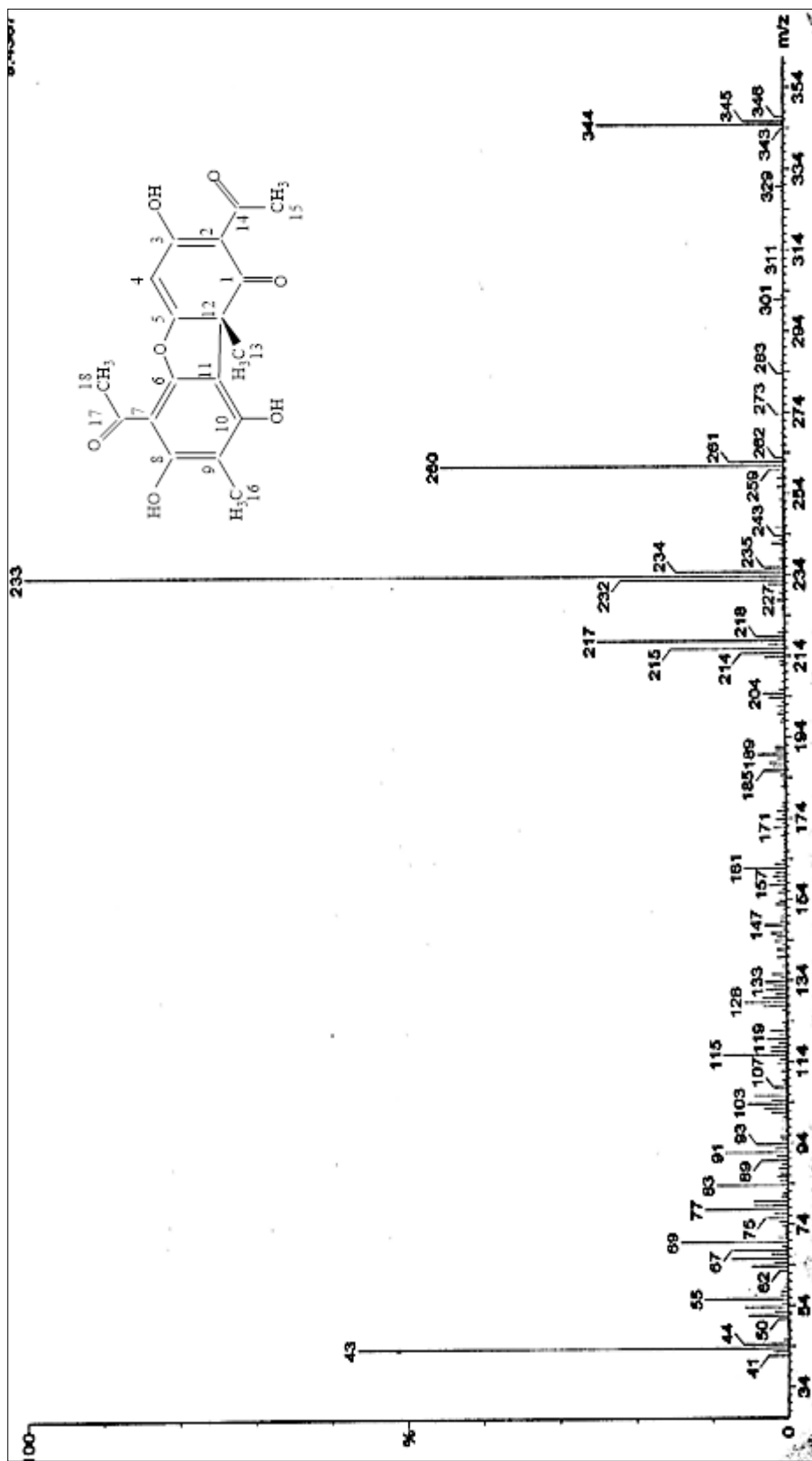
Ion Molecular EM (m/z): $[M^{\ddagger}]$, 344 260 (45 %), 233 pico base (100%), 217 (25%).

a.3) Análisis del espectro

La identificación de los cuatro fragmentos iónicos correspondientes a los picos m/z 344, 260, 233 y 217 y las ecuaciones de fragmentación respectivas, se han descrito precedentemente (Cap.2.A.6 Pág.28).

El espectro de masas del compuesto FF7 obtenido a partir del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale es similar al espectro registrado por Castro (2010), (ver Sec. 2. A.6. pag. 27)

a.4) Conclusión: Existe correspondencia entre el espectro de masas obtenido para nuestro compuesto FF7 y aquel publicado en la bibliografía para el ácido úsnico.



Espectro N°1 Espectro de Masas Compuesto FF7.

b) Espectro de RMN¹H (Espectro N°2)

b.1) Condiciones de trabajo

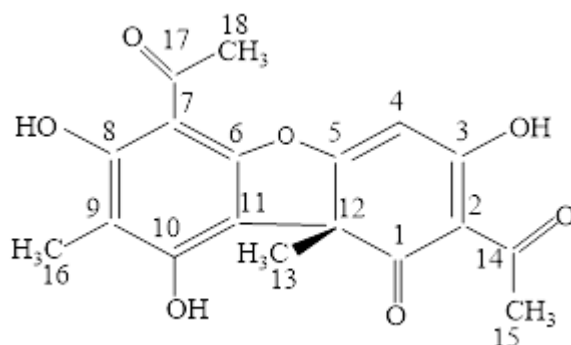
- i. Equipo:** Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance 400 (Bruker, Rheinstetten, Germany).
- ii. Laboratorio:** Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- iii. Operador:** Dra. Maria del Pilar Caramantin Soriano
- iv. Fecha:** 12 de Agosto del 2013
- v. Solvente:** CDCl₃

b.2) Características del espectro

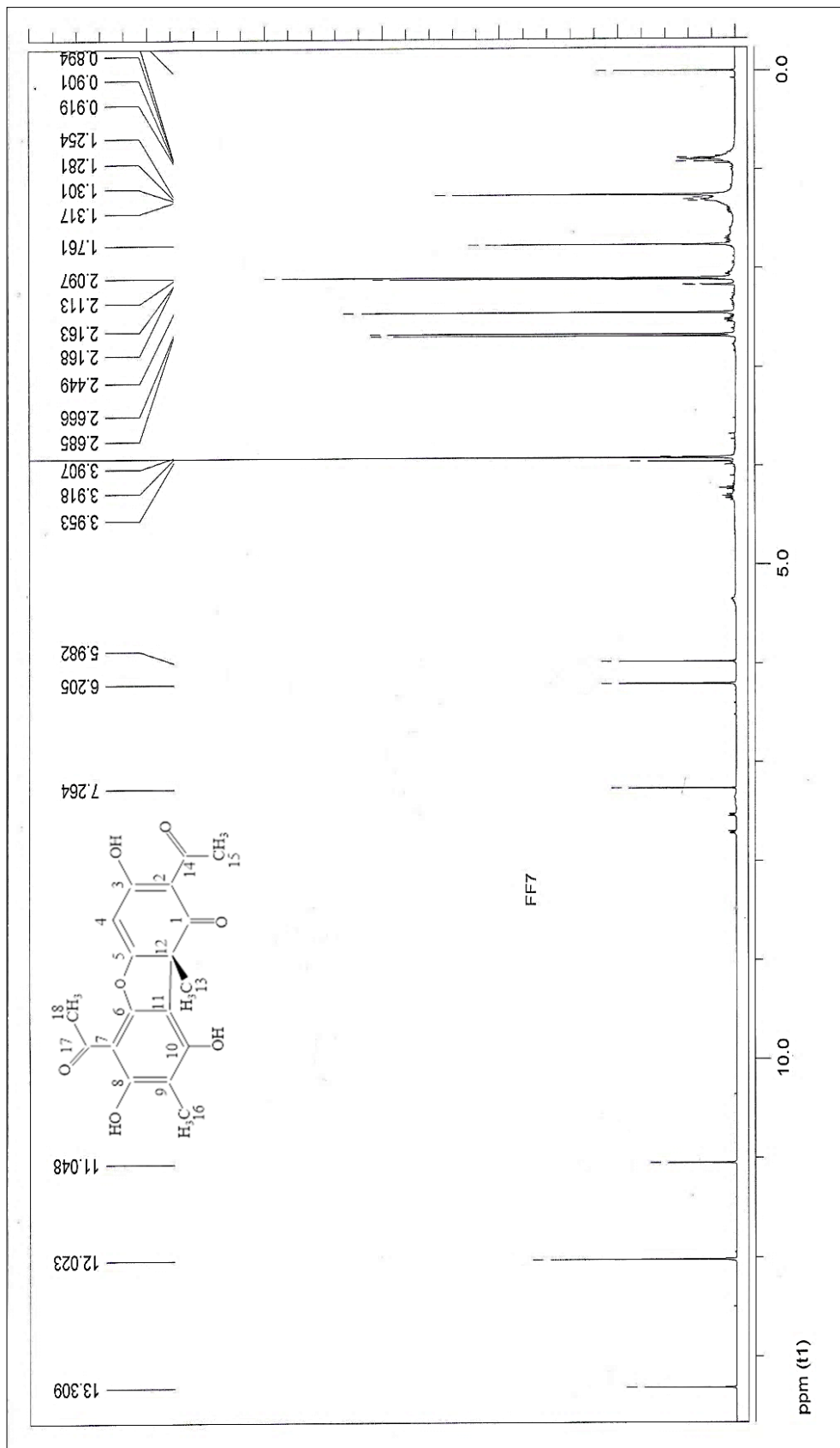
2,68 ppm (s, 3H metilo), 2,11 ppm (s, 3H ciclo metilo), 2,45 ppm (s, 3H, metilo), 1,76ppm (s, 3H, metilo), 11,05 (s, 1H OH), 13,31 ppm (s, 1H OH), 5,98 ppm (s, 1H Ar), 12,023 ppm (s, 1H OH).

b.3) Análisis del espectro (Desplazamientos químicos)

La identificación de los diferentes tipos de hidrógenos correspondientes se ha descrito precedentemente (Cap.2 A.6.a Pág.02).



δ (ppm)	Tipo de Señal	Integración	Tipo de Hidrógeno
12,023	singulete	1H	OH (posición 3)
5,98	singulete	1H	H-Ar (posición 4)
13,31	singulete	1H	OH(posición 8)
11,05	singulete	1H	OH(posición 10)
1,76	singulete	3H	CH ₃ (posición 13)
2,45	singulete	3H	CH ₃ (posición 15)
2,11	singulete	3H	CH ₃ (posición 16)
2,68	singulete	3H	CH ₃ (posición 18)



Espectro N°2 Espectro RMN¹H del Compuesto FF7 (CDCl₃, 400 MHz).

b.4) Conclusión.- El espectro RMN¹H obtenido corresponde a lo esperado para la estructura del ácido úsnico.

c) Espectro IR (Espectro N°3)

c.1) Condiciones de trabajo

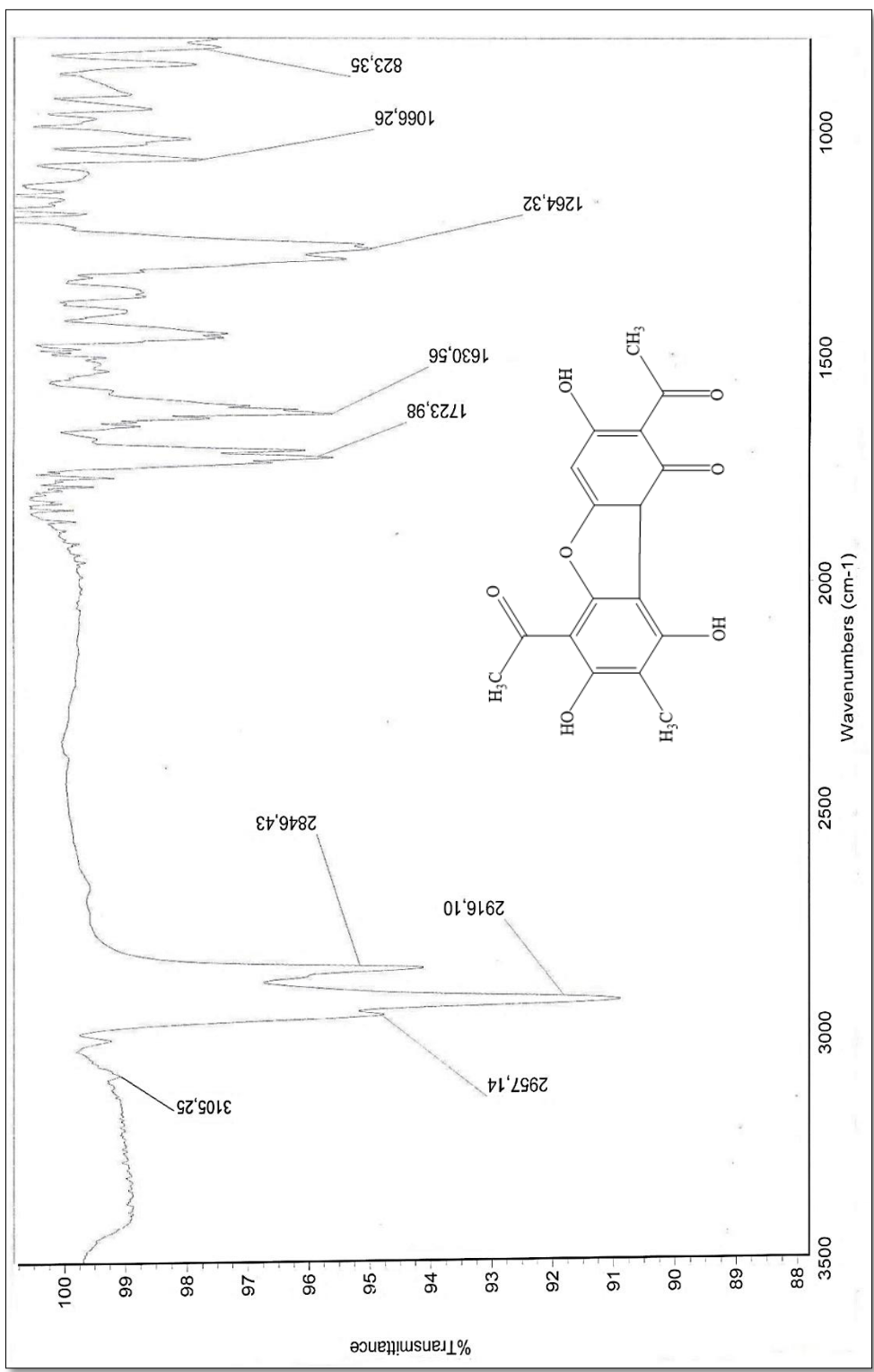
- i. Equipo:** Espectrofotómetro infrarrojo: Thermo Nexus 470 FT-IR
- ii. Laboratorio:** Instituto de Química de los Recursos Naturales, Universidad de Talca, Talca, Chile.
- iii. Operador:** Diana Martino Cruz.
- iv. Fecha:** 12 Agosto 2013
- v. Solvente:** KBr

c.2) Características del espectro

ν (cm⁻¹): 3105, 2916, 1722, 1630, 1266

c.3) Análisis del espectro (ver Espectro N°3)

Banda	ν (cm ⁻¹)	Descripción
A	3105	Alargamiento OH
B	2916	Flexión C-H Aromáticos
C	1722	Alargamiento C=O
D	1630	Alargamiento C – C Aromáticos
E	1266	Flexión O-H carbonílico



Espectro N° 3: Espectro IR para el compuesto FF7.

c.4) Conclusión.- El espectro IR obtenido corresponde a lo esperado para la estructura del ácido úsnico.

d) Espectro UV (Espectro N°4)

d.1) Condiciones de trabajo

- i. Equipo:** Espectrofotómetro UV-Visible: Thermo Spectronic-Vision 32 Software V1.24
- ii. Laboratorio:** Instituto de Química de los Recursos Naturales, Universidad de Talca, Talca, Chile
- iii. Operador:** Diana Martino Cruz
- iv. Fecha:** 12 de Agosto del 2013
- v. Solvente:** Cloroformo

d.2) Características del espectro

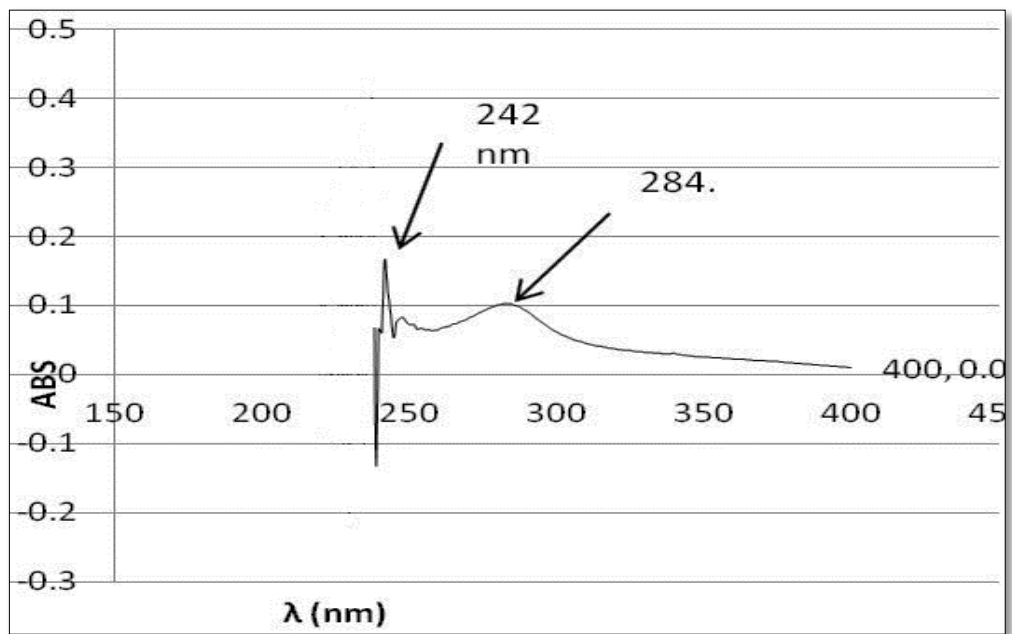
λ (nm): 242, 284

d.3) Análisis del espectro (ver Espectro N°4)

Las bandas máximas de absorción coinciden con las bandas de absorción reportadas para el ácido úsnico.

d.4) Conclusión.- El espectro UV obtenido corresponde con el esperado para el ácido úsnico.

Espectro N°4: Espectro UV para el compuesto FF7



E.2. Compuesto FF8

El compuesto FF8 físicamente es un sólido blanco en forma de escamas bastante ligero, soluble en metanol. El punto fusión del compuesto FF8 está en el rango de 181-183 °C.

a) Espectro de masas (Espectro N°5)

a.1) Condiciones de trabajo

- i. **Equipo:** Autoflex Speed MALDI–TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics Flex Control) equipado con un láser de nitrógeno $\lambda = 337$ nm).
- ii. **Laboratorio:** Instituto de Química de los Recursos Naturales, Universidad de Talca, Chile
- iii. **Operador:** Dr. María Caramantín Soriano.
- iv. **Fecha:** 15 de Julio 2014

a.2) Características del espectro

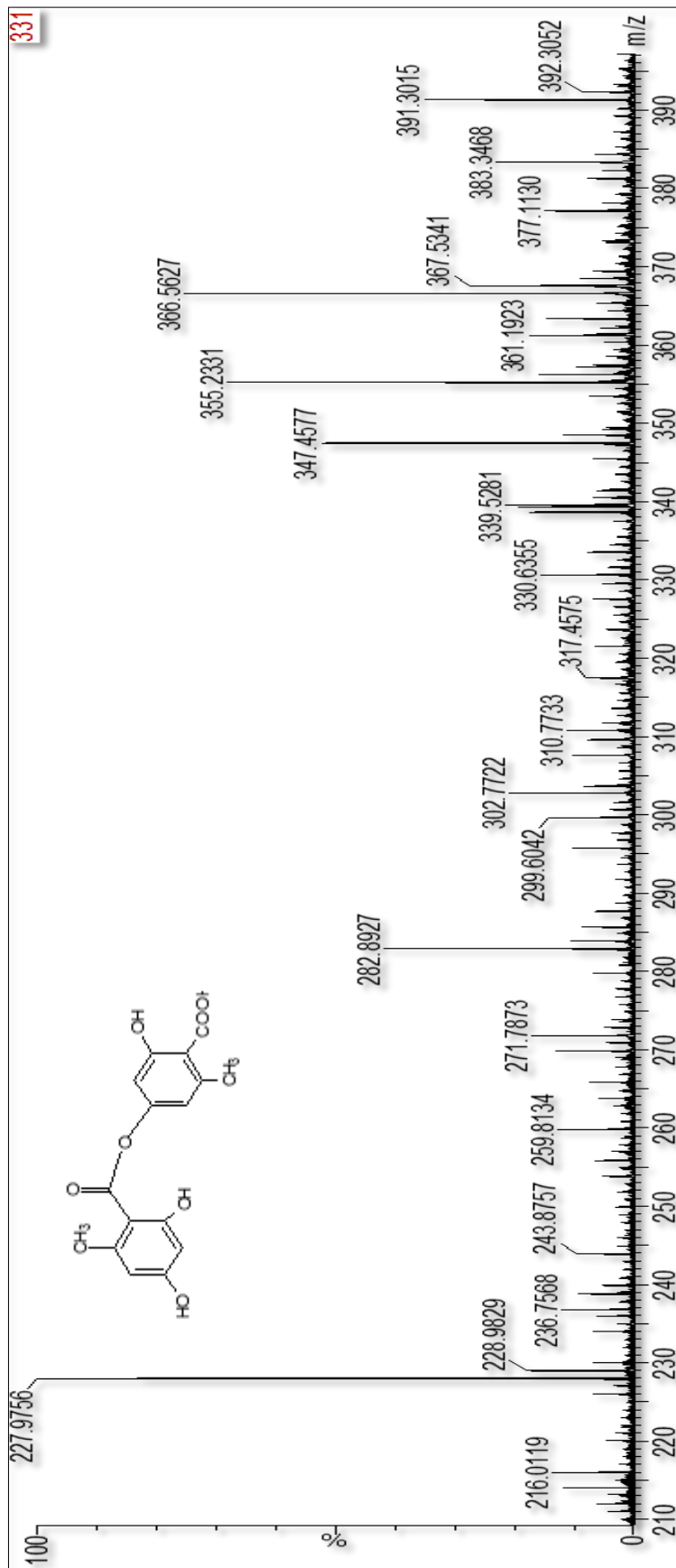
El espectro de masas fue realizado por la técnica del ion electro spray (ESI-MS), estos espectros nos muestran fragmentos del tipo $[M+K]$ o $[M+Na]$ o múltiplos enteros de estos iones, debido a que son los iones presentes en los detergentes que se usan para la limpieza de los materiales en esta técnica por lo que en este espectro se observarán los fragmentos identificados de esta manera.

Ion Molecular: 318 [M^+]

M (m/z)	Fragmento en el espectro	
318	[M -2H + K]	355,23
	[M-4H + 2K]	392,3
195	[M -2H +2K]	271,78
151	[M-2H +2K]	227,97
167	[M -2H + 3K]	282,89
	[M -2H + 2K]	243,87

a.3) Análisis del espectro

La identificación de los cuatro fragmentos iónicos correspondientes a los picos m/z 318, 195, 151 y 167 y las ecuaciones de fragmentación respectivas, se han descrito precedentemente (Cap. 2 Sec.A.6. b Pág. 38)



Espectro N° 5 Espectro de masas del compuesto FF8.

a.4) Conclusión: Existe correspondencia entre el espectro de masas obtenido para nuestro compuesto FF8 y las fragmentaciones publicadas por Huneck-Yoshimura (1996).

b) Espectro RMN¹H (Espectro N°6)

b.1) Condiciones de trabajo

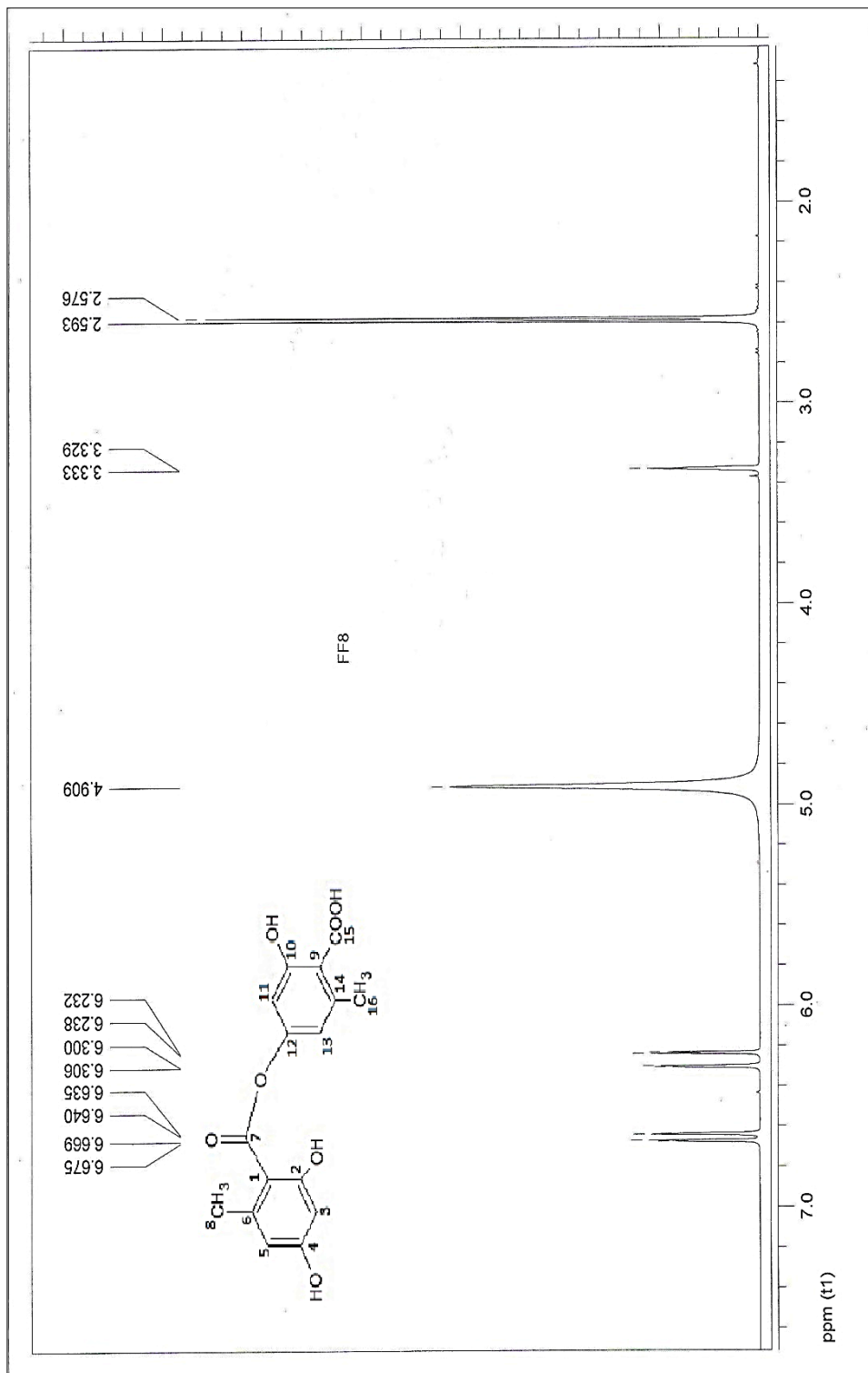
- i. Equipo:** Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance 400 (Bruker, Rheinstetten, Germany).
- ii. Laboratorio:** Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- iii. Operador:** Dr. María Caramantín Soriano
- iv. Fecha:** 12 de Agosto del 2013
- v. Solvente:** CDCl₃

b.2) Características del espectro

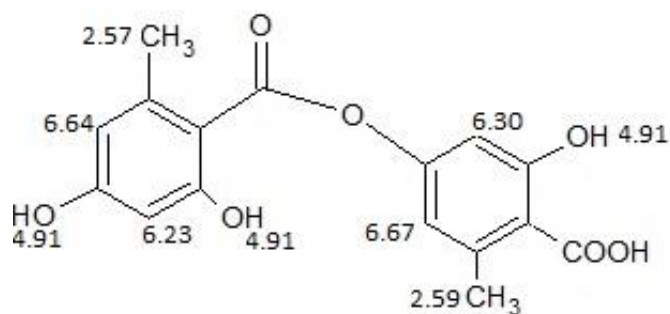
2,57 ppm (s, 3H metilo); 2,59 ppm (s, 3H metilo); 6,23 ppm (d, 1H Ar); 6,30ppm (s, 1H Ar); 6,64 (d, 1H Ar); 6,67 ppm (d, 1H Ar); 4,91 ppm (s, 2H OH); 4,91 ppm (d, 1H OH).

b.3) Análisis del espectro (Desplazamientos químicos)

La identificación de los diferentes tipos de hidrógenos correspondientes se ha descrito precedentemente (Cap. 2. Sec.A.6. b Pág. 40).



Espectro N°6 Espectro de RMN¹H del compuesto FF8 (CDCl₃, 400 MHz).



δ (ppm)	Tipo de Señal	Integración	Tipo de Hidrógeno
2,57	singulete	3H	CH ₃ (posición 8)
2,59	singulete	3H	CH ₃ (posición 16)
6,23	duplete	1H	Ar-H (posición 3)
6,3	singulete	1H	Ar-H (posición 11)
6,64	duplete	1H	Ar-H (posición 5)
6,67	duplete	1H	Ar-H (posición 13)
4,91	singulete	2H	OH (posición 2;4)
4,91	singulete	1H	OH (posición 10)

b.4) Conclusión: El espectro RMN¹H obtenido para el compuesto FF8 es el esperado para el ácido lecanórico.

c) Espectro IR (Espectro N°7)**c.1) Condiciones de trabajo**

- i. Equipo:** Espectrofotómetro infrarrojo: Thermo Nexus 470 FT-IR
- ii. Laboratorio:** Instituto de Química de los Recursos Naturales, Universidad de Talca, Talca, Chile.
- iii. Operador:** Diana Martino Cruz.
- iv. Fecha:** 12 de Agosto del 2013
- v. Solvente:** KBr

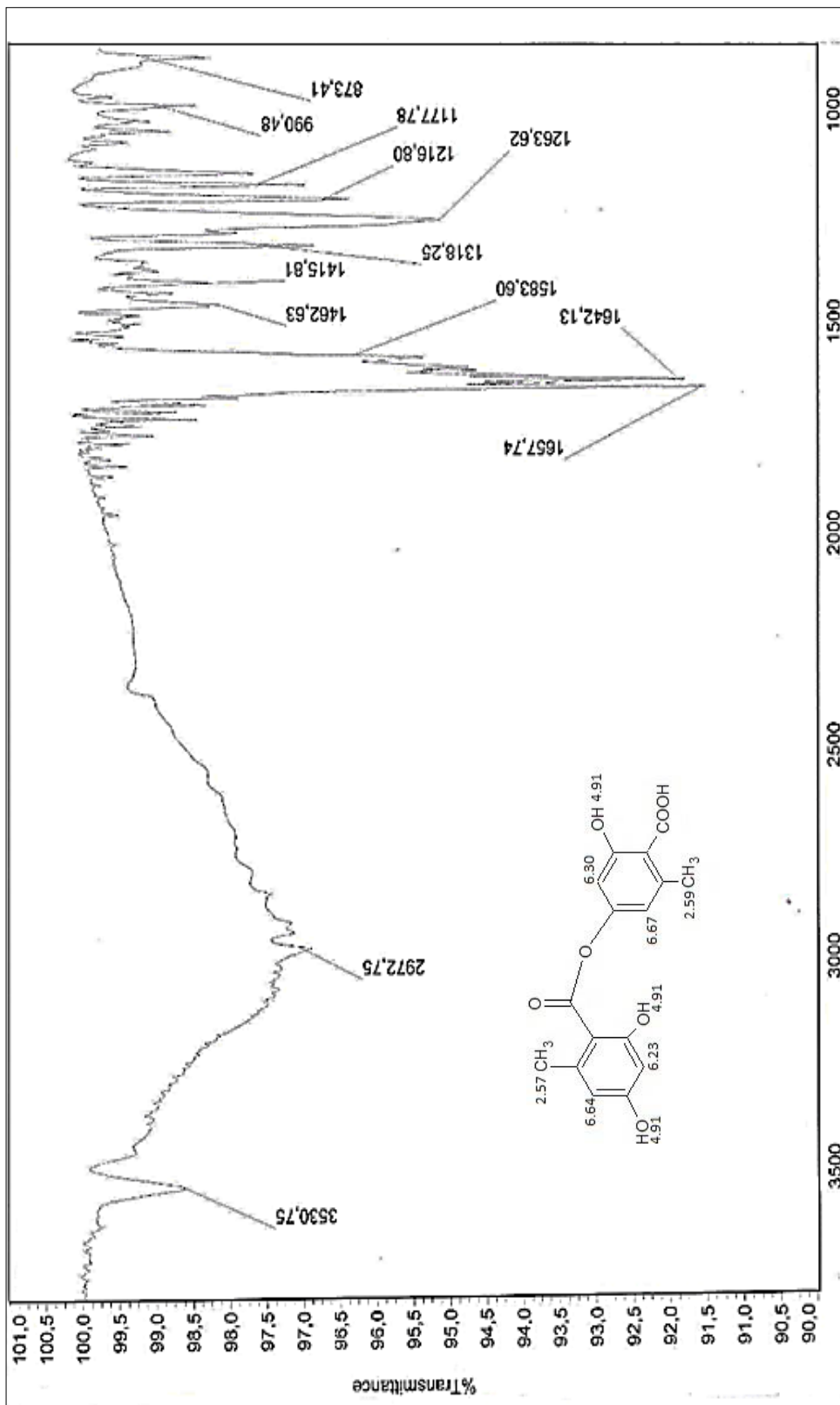
c.2) Características del espectro

ν^{-1} (cm⁻¹): 3530, 2972, 1657, 1583, 1263.

c.3) Análisis del espectro (ver Espectro N°7)

Banda	ν (μm^{-1})	Asignación
A	3530	Alargamiento OH
B	2972	Flexión C-H Aromáticos
C	1657	Alargamiento C=O
D	1583	Alargamiento C – C Aromáticos
E	1263	Flexión O-H carbonílico

c.4) Conclusión: Las bandas del espectro IR del compuesto FF8 son las esperadas para el ácido lecanórico.



Espectro N°7 Espectro IR del compuesto FF8.

d) Espectro UV (Espectro N°8)

d.1) Condiciones de trabajo

- i. Equipo:** Espectrofotómetro UV-Visible: Thermo Spectronic-Vision 32
Software V1.24
- ii. Laboratorio:** Instituto de Química de los Recursos Naturales, Universidad de Talca, Talca, Chile
- iii. Operador:** Dra. María del Pilar Caramantín Soriano.
- iv. Fecha:** 12 de Agosto del 2013
- v. Solvente:** Metanol

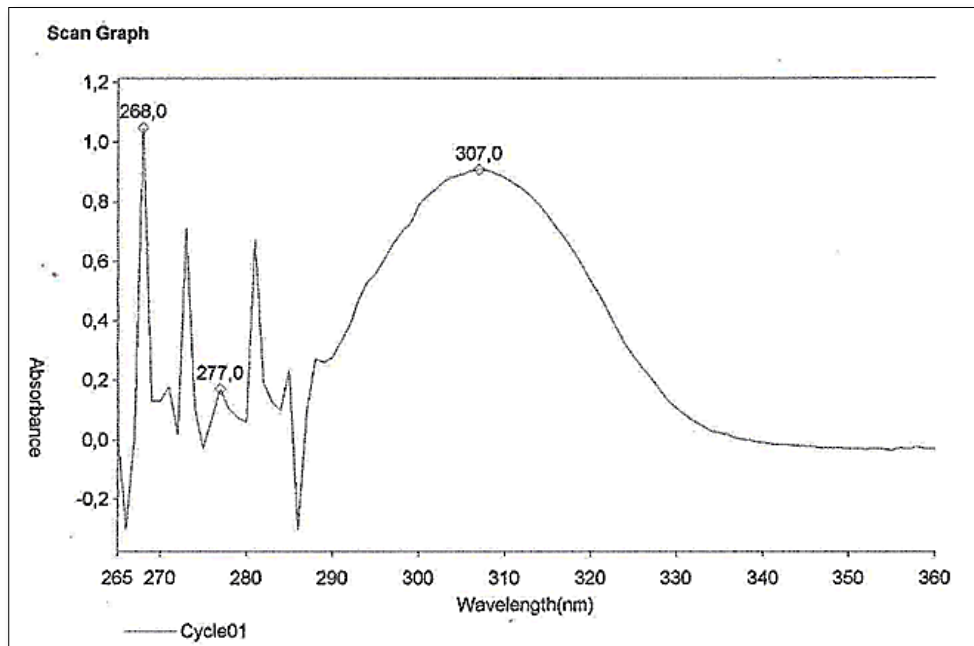
d.2) Características del espectro

λ (nm): 277 , 307.

d.3) Análisis del espectro (ver Espectro N°8)

Las bandas máximas de absorción coinciden con las bandas de absorción reportadas para el ácido lecanórico.

d.4) Conclusión.- El espectro UV obtenido corresponde con el esperado para el ácido lecanórico.



Espectro N°8: Espectro UV para el compuesto FF8.

E.3. Compuesto FF5

El compuesto FF5 fue aislado partiendo de la cromatografía en columna en sephadex, posteriormente en columna de sílica gel, y por último en cromatografía en placa preparativa, debido a la pequeña cantidad aislada ($m=5,1$ mg) se le realizaron solo los análisis por UV, RMN¹H, RMN¹³C y HMBC.

a) Espectro RMN¹H (Espectro N°9)

a.1) Condiciones de trabajo

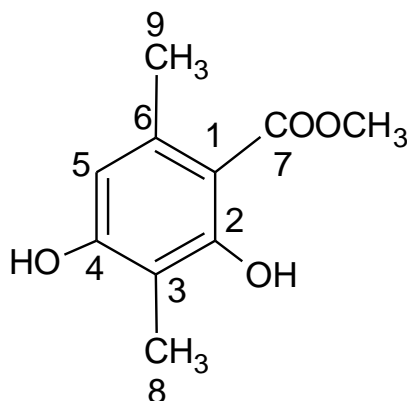
- i. **Equipo:** Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance 400 (Bruker, Rheinstetten, Germany).
- ii. **Laboratorio:** Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- iii **Operador:** Dr. María Caramantín Soriano
- iv. **Fecha:** 12 de Agosto del 2013
- v. **Solvente:** CDCl₃

a.2) Características del espectro

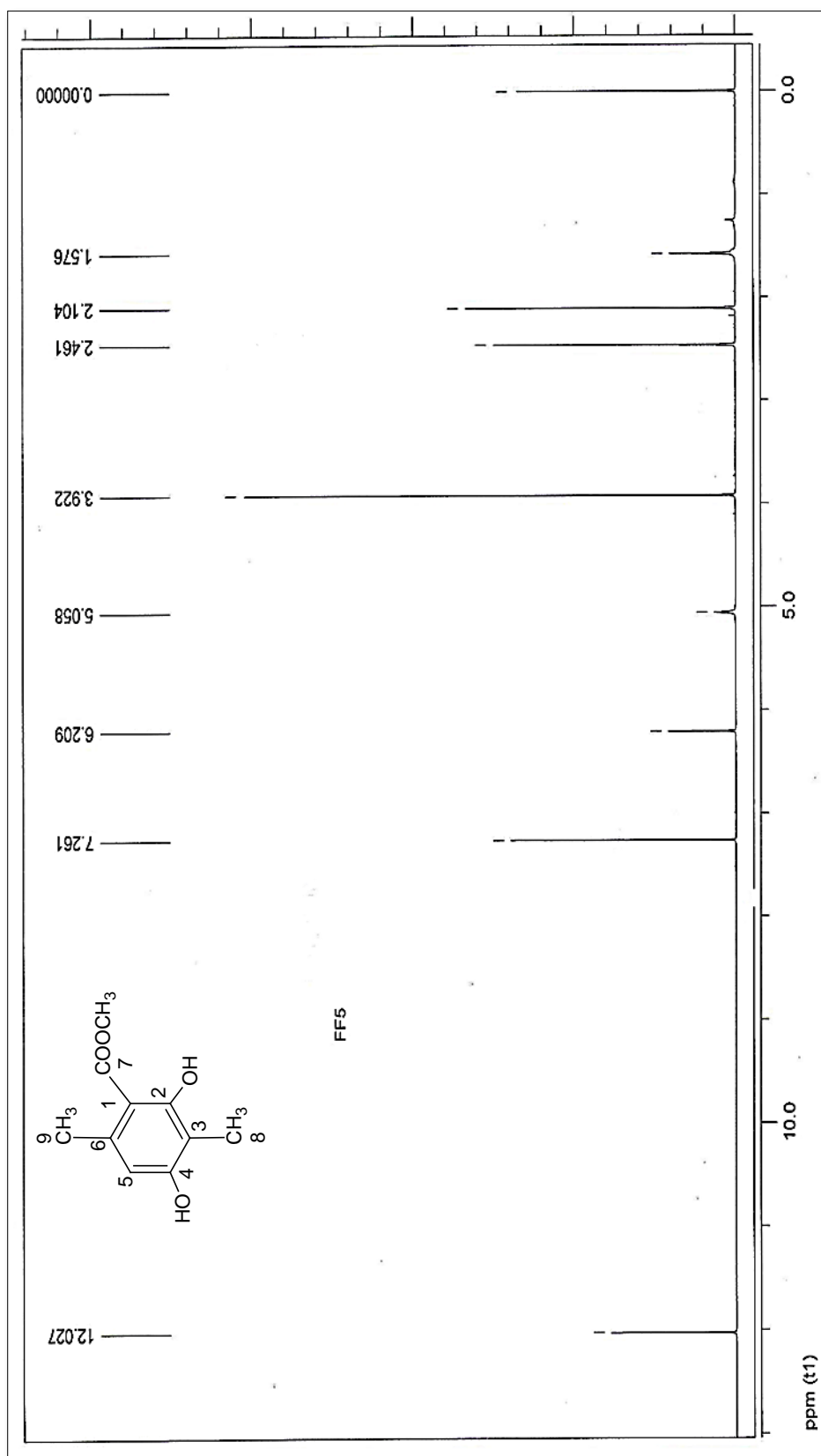
2,10 ppm (s, 3H metilo); 2,46 ppm (s, 3H metilo); 3,92 ppm (s, 3H -COOMe); 5,06 ppm (s, 1H OH); 6,21 (s, 1H Ar); 12,03 (s, 1H OH).

a.3) Análisis del espectro (Desplazamientos químicos)

La identificación de los diferentes tipos de hidrógenos correspondientes se ha descrito precedentemente (Cap. 2 A.6. c Pág.44).



δ (ppm)	Tipo de Señal	Integración	Tipo de Hidrógeno
2,1	singlete	3H	CH ₃ (posición 8)
2,46	singlete	3H	CH ₃ (posición 9)
3,92	singlete	1H	COOMe (posición 7)
5,06	singlete	1H	OH (posición 4)
6,21	singlete	1H	Ar-H (posición 5)
1,03	singlete	1H	OH (posición 2)



Espectro N°9 Espectro RMN¹H del compuesto FF5 (CDCl₃, 400 MHz).

a.4) Conclusión: Las bandas del espectro RMN¹H del compuesto FF5 son las esperadas para el β-orcinol carboxilato de metilo.

b) Espectro RMN¹³C

b.1) Condiciones de trabajo

- i. Equipo:** Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance 400 (Bruker, Rheinstetten, Germany).
- ii. Laboratorio:** Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- iii Operador:** Dr. María Caramantín Soriano
- iv. Fecha:** 12 de Agosto del 2013
- v. Solvente:** CDCl₃

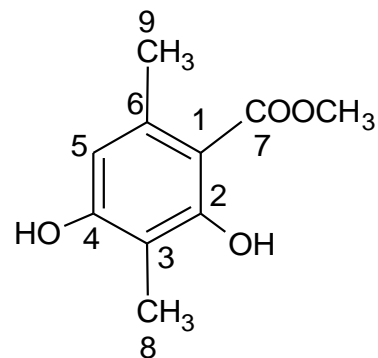
b.2) Características del espectro

105,69 ppm (C-1); 158,38 (C-2); 108,87 (C-3); 163,58 (C-4); 110,91 (C-5);
140,55 (C-6); 172,97 (C-8); 24,46 (C-9); 52,18 (-COOMe).

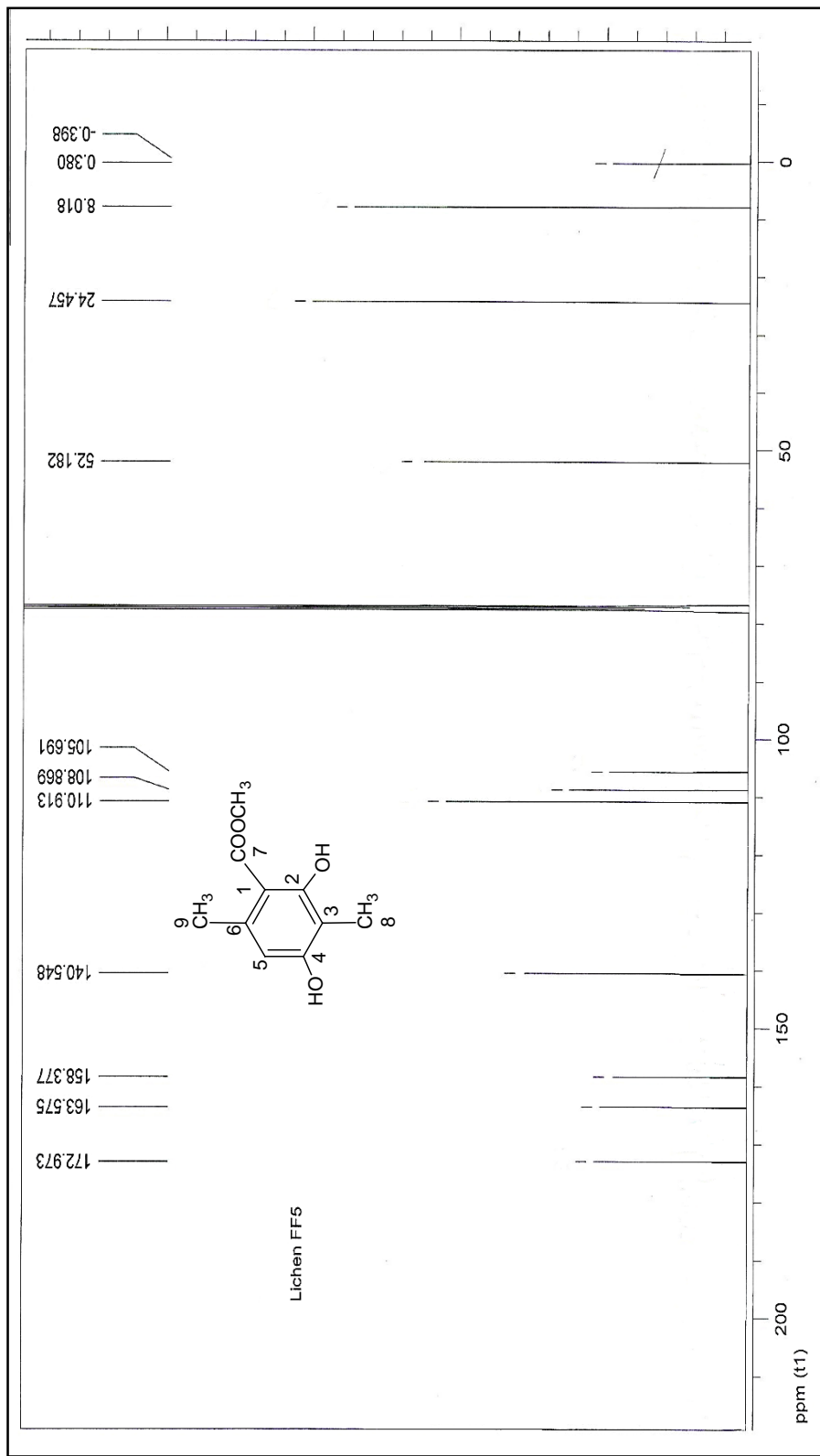
b.3) Análisis del espectro (Desplazamientos químicos)

La identificación de los diferentes tipos de carbonos correspondientes se ha descrito precedentemente (Cap. 2 A.6. c Pág.47).

δ (ppm)	Tipo de Carbono
8,02	C-8
24,46	C-9
52,18	-COOMe
105,69	C-1
108,87	C-3
110,91	C-5
140,55	C-6
158,38	C-2
163,58	C-4
172,97	C-7



b.4) Conclusiones: Los desplazamientos encontrados para los carbonos son los esperados para el β -orcinol carboxilato de metilo.



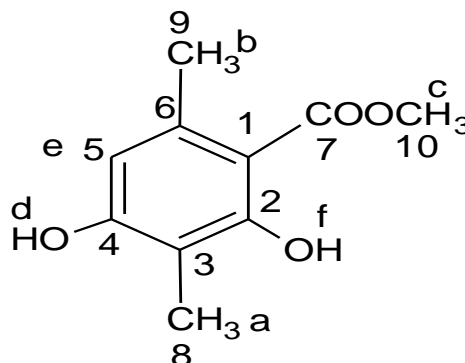
Espectro N° 10 Espectro RMN¹³C del compuesto FF5 (CDCl₃, 400 MHz).

c) Espectro HMBC (Espectro N°10)

c.1) Condiciones de trabajo

- i. Equipo:** Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance 400 (Bruker, Rheinstetten, Germany).
- ii. Laboratorio:** Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- iii Operador:** Dr. María Caramantín Soriano
- iv. Fecha:** 12 de Agosto del 2013
- v. Solvente:** CDCl_3

c.2) Análisis del espectro (correlaciones):

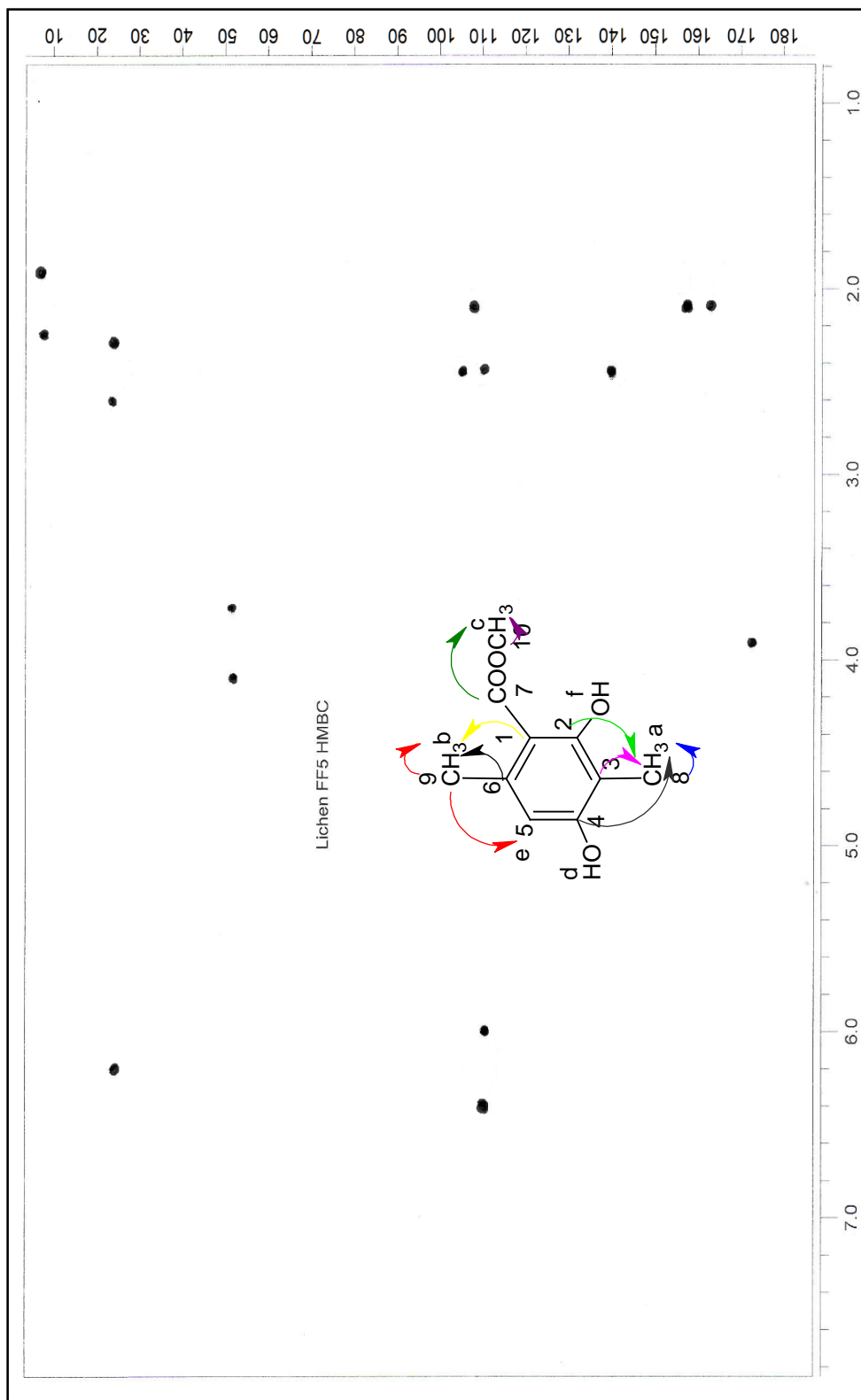


Carbono	δ_c (ppm)	H-C directo	δ_H (ppm)	H	δ_H (ppm)	C _e
C8	8,018	a	2,104	-	-	-
C9	24,457	b	2,461	e	6,209	2
C10	52,182	c	3,922	-	-	-
C5	110,91	e	6,209	b	2,461	2
C7	172,97	-	-	c	3,922	1
C4	163,58	-	-	a	2,104	2
C2	158,38	-	-	a	2,104	2
C3	108,87	-	-	a	2,104	1
C1	105,69	-	-	b	2,461	2
C6	140,55	-	-	b	2,461	1

El cuadro debe interpretarse de la siguiente manera:

- El C-8 (8,018 ppm) está enlazado directamente al H_a (2,104 ppm).
- El C-9 (24,457 ppm) está enlazado directamente al H_b (2,461 ppm) y a dos enlaces de Carbono del H_e

c.3) Conclusiones: Los desplazamientos encontrados corresponden a las correlaciones carbono-hidrógeno esperados para el β -orcinol carboxilato de metilo.



Espectro N°11 Espectro HMBC del compuesto FF5 (CDCl₃, 400 MHz).

d) Espectro UV (Espectro N°8)

d.1) Condiciones de trabajo

- i. Equipo:** Espectrofotómetro UV-Visible: Thermo Spectronic-Vision 32
Software V1.24
- ii. Laboratorio:** Instituto de Química de los Recursos Naturales, Universidad de Talca, Talca, Chile
- iii. Operador:** Dra. María del Pilar Caramantín Soriano.
- iv. Fecha:** 12 de Agosto del 2013
- v. Solvente:** Acetona

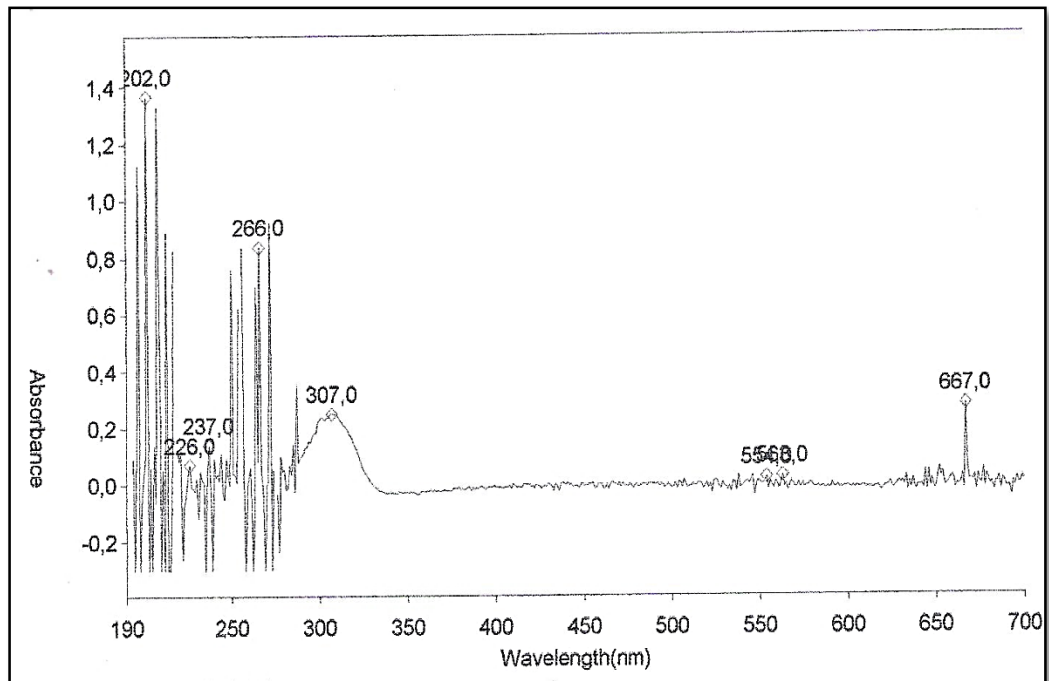
d.2) Características del espectro

λ (nm): 307.

d.3) Análisis del espectro (ver Espectro N°8)

Las bandas máximas de absorción coinciden con las bandas de absorción reportadas para el β -orcinol carboxilato de metilo.

d.4) Conclusión.- El espectro UV obtenido corresponde con el esperado para el β -orcinol carboxilato de metilo.



Espectro N°12: Espectro UV del compuesto FF5 (solvente: Acetona).

Capítulo 4

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

RESULTADOS

1. Obtención de sustancias liquénicas del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.)

Hale.

- a. A partir de 63 g del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) *Hale*, seco y molido, se obtuvo mediante extracción por solventes y separación sólido – líquido el Extracto Bruto Orgánico, el cual se purificó mediante cromatografía en columna, seguido de cromatografía en placa preparativa proporcionando:
- 21,5 mg de ácido úsnico, como cristales amarillos en forma de agujas
 - 10,3 mg de ácido lecanórico como cristales blancos en forma de aglomeraciones de agujas.
 - 5,1 mg de β -orcinol carboxilato de metilo

La caracterización del ácido úsnico y ácido lecanórico se realizó mediante sus espectros de Masas, RMN¹H, IR y UV; para el caso del β -orcinol carboxilato de metilo se realizaron los espectros RMN¹H, RMN¹³C, HMBC y UV correspondiendo todos ellos a los valores y características referidas en la bibliografía para dichas sustancias liquénicas.

- b. El análisis del espectro de masas para el ácido úsnico y para el ácido lecanórico corresponden a lo reportado en la literatura.
- c. Los espectros de RMN¹H son consistentes con aquellos reportados en la literatura para las tres sustancias liquénicas.
- d. Los espectros IR presentan las bandas de absorción características de los grupos funcionales para el ácido úsnico y ácido lecanórico.
- e. Los espectros RMN¹³C y HMBC corresponden a lo reportado en la literatura para el β-orcinol carboxilato de metilo.

2. El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (Marcha Fitoquímica)

presentes en el liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale, siguiendo el procedimiento de Reyna (1999) (de acuerdo al procedimiento de Rondina y Coussio–1969), nos indica que contiene: Aminogrupos primarios o secundarios (+++), grupos fenólicos libres (+), triterpenos y esteroides (+), quinonas, antranas o antranoles (+) y leucoantocianidinas, catequinas (+).

En la aplicación del test de sustancias liquénicas E.Barreño & Pérez (2003) se encontró: Acido úsnico (+), ácido lecanórico (+)

3. La determinación cuantitativa del ácido úsnico, siguiendo el método de Castro (2004) dio como resultado 1,268 %. Este valor es mayor con respecto a lo publicado en la bibliografía para líquenes Castro (2010)

4. Se realizó el análisis de la información bibliográfica relativa a los estudios químicos del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale. En las bases de datos de Scifinder, la cual está conformada por más de 16 millones de registros de actualización diaria, esta base nos proporciona referencias bibliográficas y abstracts de artículos de publicaciones periódicas, informes técnicos, tesis doctorales, ponencias de congresos, patentes, etc. Se compone de las BBDD del Chemical Abstracts Service, entre ellas el Chemical Abstracts desde 1967, y la base MEDLINE de la National Library of Medicine (desde 1958). - Materias: Química, ingeniería química, ciencia de los materiales y aspectos relacionados con sustancias de otras áreas de conocimiento como farmacia, medicina, biología, geología, física y ciencias del medio ambiente. En la búsqueda que realizamos en estas bases, no encontramos estudios químicos precedentes del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale.

CONCLUSIONES

1. A partir del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale se ha aislado las sustancias líquénicas ácido úsnico y ácido lecanórico las cuales se identificaron por sus respectivos espectros EM, RMN¹H, IR y UV. Se aisló la sustancia líquénica β -orcínol carboxilato de metilo y se identificó por sus espectros RMN¹H, RMN¹³C, HMBC y UV.
2. Se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (Marcha Fitoquímica) presente en el líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969), habiéndose verificado la presencia de: Aminogrupos primarios o secundarios (+++), grupos fenólicos libres (+), triterpenos y esteroides (+), quinonas, antranonas o antranoles (+) y leucoantocianidinas, catequinas (+).
3. Se realizó la determinación cuantitativa del ácido úsnico, según el procedimiento de O. Castro (2004), habiéndose obtenido 1,268% en relación al peso seco del líquen.

RECOMENDACIONES

1. Luego de haber realizado el análisis cuantitativo para el ácido úsnico por técnica espectrofotométrica y en vista de que el compuesto mayoritario para este liquen es el ácido lecanórico, se recomienda realizar la cuantificación del ácido lecanórico por técnica HPLC.
2. Se recomienda analizar la actividad antioxidante del ácido lecanórico y el β -orcinol carboxilato de metilo.
3. En vista de que en las cromatografías en placa fina se observaban mezclas de diversas sustancias se recomienda seguir purificando las fracciones, con la finalidad de aislar más sustancias líquénicas que no hayan sido detectadas en este estudio.

Capítulo 5

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Asahina, Y.; Shibata, S.; Chemistry of Lichen Substances; Japan Society from the Promotion of Science; Tokyo, 1954.
2. Barreno, E., Perez-Ortega, S., Biología de los líquenes, Ed. KRK, Asturias-España, 2003, pág. 65-66; 77-79.
3. Castro M., Estudio fitoquímico del liquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale, Tesis para optar el Grado de Magister en Ciencias- mención Química, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima-Perú, 2004. pág. 32-38; 40-51; 104-112.
4. Castro O., *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76, 4, 389-399 (2010), “Aislamiento del ácido úsnico *Flavoparmelia caperata* su Determinación Cuantitativa Por Espectroscopía UV, en diez líquenes”
5. Chávez, J., Programa conjunto INBio-SINAC, 2005, págs. 2-4.
6. Córdor E., Tesis de Maestría, “Estudio Químico de los líquenes *Xanthoparmelia tasmanica* y *Xanthomendoza mendozae*”, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Ingeniería, Lima -Perú, 2010, Págs. 2-8
7. Córdova V., Fisiología de las sustancias liquénicas, Ed. Alhambra, España, 1975, págs. 4-7; 70-73.
8. Culberson, C.F., *Pytochemistry* ,2,335-340(1963).
9. Huneck, S., and Yoshimura, Isao, “Identification of the lichen substances”, ed. Springer, Berlin, 1996.

10. Jayaprakasha G.;Jayanmohan R; Singh Y; Sakarian K.; *Journal of Chromatographic Sciencie* Vol 36 (1998) 8-10; Improve Chromatographic Method for the Purification of Phenolic Constituents of the Lichen *Parmotrema Tinctorum* (Nyl.) Hale, Mysore, India.
11. Jayaprakasha G.;Jayanmohan R; Z Naturforsch C. Vol 55 (2000) 11-12 Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity, Mysore, India.
12. Nash,Thomas M., *Lichen Biology*, Cambridge, University Press. (1996) ,Págs. 1-7.
13. Nedeljko, Perica, Dragan, Gordana, Zoran, Stevo, *Hem. Ind. Journal* 65 (5) 591-598 (2011), “The isolation, analytical characterization by *HPLC–UV and NMR* spectroscopy, cytotoxic and antioxidant activities of baecomysesic acid from *Thamnomlia vermicularis* var. *Subuliformis*”, Serbia.
14. Morales Bueno, P. Tesis de licenciatura, Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima,Perú,PUCP,1992.
15. Perico S. ;Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon Strictum* (*Stereocaulaceae*) y *Lobariello Pallida* (*Lobariaceae*) y determinación de su potencial toxicidad; Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, Colombia, (2011)
16. Rankovic B.; Misic M. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(4) 1013-1016 (2008), “The Antimicrobial Activity of the Lichen Substances of the Lichens *Cladonia Furcata*, *Ochrolechia Androgyna*, *Parmelia Caperata* and *Parmelia Conspresa*”, Serbia.

17. Ramis Ramos G., *Quimiometría*, 1° Ed., SINTESIS S.A., Madrid, España, Páginas 35-40.
18. Reyna P., Víctor, *Marcha Fitoquímica, Práctica de Laboratorio (Separata)*, Curso de Química de Productos Naturales-CQ046, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 2005, 5 pág.
19. Rondina, R. Coussio, J., *Revista de Investigaciones Agropecuarias-INTA (Argentina)*, 6, 33, 351-366 (1969), “Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales”.
20. Silverstein, R.M., (2005), *Spectrometric identification of organic compounds*, 7TH. Edition, Ed. John Wiley, pág 127-258.
21. Skoog, Holler Nieman, *Principios del Análisis Instrumental* (2001), Madrid, 5° Ed. McGRAW-HILL/ INTERAMERICANA DE ESPAÑA S. A. U., Pág. 1028.

Capítulo 6

ANEXOS

ANEXO N°1



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

MUSEO DE HISTORIA NATURAL



CONSTANCIA N° 211-USM-2007

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (líquen) recibida de la **Srta. ELENA ALICIA CONDOR CUYUBAMBA** ha sido estudiada y clasificada como: ***Flavopunctelia flaventior*** (Stirt.) Hale y tiene la siguiente posición taxonómica, según O.E. Erikson.

REINO : Fungi

DIVISION: Ascomycota

CLASE: Lecanoromycetes

ORDEN: Lecanorales

FAMILIA: Parmeliaceae

GENERO: ***Flavopunctelia***

ESPECIE: ***Flavopunctelia flaventior*** (Stirt.) Hale

Nombre vulgar: desconocido

Determinada por: **Blgo. Angel Ramírez**

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 28 de octubre de 2011



Hayde Montoya Ferreros
Dra. **Hayde Montoya Ferreros**
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS
(USM)

DDB

ANEXO N°2

MARCHA FITOQUÍMICA

Victor Reyna (1999), de acuerdo a Rondina & Coussio (1969)

La Marcha Fitoquímica propuesta por Rondina & Coussio se basa en el fraccionamiento de un extracto metanólico de la muestra vegetal estudiada en diferentes solventes y la identificación de los tipos de principios activos presentes en cada uno de ellos mediante reacciones de coloración y/o precipitación.

Obtención de las fracciones

a. Fracción (a)

- i. Se tomaron 5,0 g de muestra seca y pulverizada y se mezclaron en un balón de 100 mL con 50 mL de metanol. Se dejó macerar durante 20 horas a temperatura ambiente.
- ii. La mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas. Se filtró en caliente lavando el residuo con metanol hasta completar 50mL. Esto constiyó la *fracción (a)*.

b. Fracción (b)

- i. Se separó 5mL de la *fracción (a)* y el resto se llevó a sequedad en un rotavapor.
- ii. El residuo se extrajo con 10 mL de ácido clorhídrico al 1%, calentando ligeramente a (50 °C) y se filtró utilizando papel de filtro lento. La operación se repitió con 5 mL de ácido clorhídrico al 1%. Las soluciones ácidas se reunieron en un erlenmeyer de 50 mL y se guardaron para ser utilizados posteriormente (Sec. c.i).
- iii. El residuo sólido se disolvió en 5mL de cloroformo con ayuda de calor (50 °C) y agitación vigorosa, luego se filtró a través de un embudo pequeño utilizando

papel de filtro pequeño completando a través del filtro a 5 mL con cloroformo. Esto constituyó la *fracción (b)*. El residuo sólido se descartó.

c. Fracción (c)

- i. La solución ácida obtenida en la sección b.i se basificó con $\text{NH}_3(\text{ac})$ 7.5N hasta pH 9-10
- ii. Se extrajo dos veces con 25 mL de cloroformo en una pera de decantación. La fase acuosa se guardó para su posterior utilización (Sec. d.i)
- iii. La fase clorofórmica se lavó con 10 mL de agua destilada. El agua de lavado se reunió con la fase acuosa obtenida anterior (ii).
- iv. La fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró completando a 50 mL con cloroformo. El filtrado constituyó la *fracción (c)*.

d. Fracción (d)

- i. Las fases acuosas básicas obtenidas en la sección c.ii y c.iii se semisaturaron con sulfato de sodio agregando 0,1 g de sal por mL de solución, y se filtro con papel de filtro rápido. Luego se extrajo dos veces con 25 mL de una mezcla de cloroformo – etanol (3:2) en un embudo de separación de 125 mL. Se guardaron las fases acuosas para su posterior uso (Sec. d.).
- ii. La fase orgánica se lavó con solución semisaturada de sulfato de sodio, 0.1 g en 10 mL de agua destilada. Se juntó el lavado acuoso con la obtenida en la etapa anterior.
- iii. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se filtró obteniendo la fracción (d).

e. Fracción (e)

- i. Las fases acuosas obtenidas en la sección d.i y d.ii constituyeron la fracción (e).

f. Fracción (f)

- i. En un tubo de ensayo de 18 x 160 mm se adicionó 1g de muestra seca y pulverizada, y se adicionaron 10 mL de agua destilada. Se calentó la mezcla durante 15 minutos en “baño maría”.
- ii. La solución obtenida se filtró en caliente utilizando papel de filtro lento, completando el filtrado a 10 mL con agua destilada, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Esta solución constituyó la fracción (f).

4. Pruebas de identificación de principios activos.**a. Aminogrupos primarios o secundario (Prueba de la ninhidrina)**

Se realizó sobre las fracciones (a) y (f).

- i. Se tomó cuidado de no tocar la parte central con los dedos, se preparó tres trozos de papel de filtro lento de 2x3 cm, se colocó cada uno sobre una luna de reloj, luego con la ayuda de una pipeta Pasteur se colocó, en el centro de cada uno, se agregó 1 gota de las siguientes muestras: fracción (a), fracción (f) y agua destilada. Los papeles se dejaron secar a temperatura de ambiente.
- ii. Luego se agregó 1 gota de solución de ninhidrina al 0,2 % en etanol sobre la parte central de cada uno de los tres papeles anteriores.
- iii. Finalmente, los papeles se colocaron en una estufa a 120°C durante 30 minutos.
Observación: un color azul o violáceo nos indica prueba positiva.

b. Grupos fenólicos libres y/o taninos (Prueba con el reactivo férrico)

Se realizó sobre la fracción (a)

- i. El resto de la fracción (a) se llevó a sequedad en el rotavapor.
- ii. El residuo se disolvió en 0,5 mL de agua destilada y se filtró a través de un papel de filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo ensayo (13 x 100 mm), siendo esta la solución (a).
- iii. Se colocaron 2 gotas de solución (a) sobre una placa de toque y se agregó 1 gota de solución acuosa de cloruro férrico al 1 % y se mezclaron con una bagueta.

Observación: un precipitado de color rojo-vino o verde nos indica prueba positiva.

c. Taninos (Prueba de gelatina)

Se realizó sobre la fracción (a).

- i. Se colocaron 4 gotas de solución (a) sobre una luna de reloj de 7,5 cm de diámetro se adicionaron dos gotas de solución de gelatina al 0,5% esta operación se realizó con 2 gotas de agua destilada como referencia.

Observación: un precipitado blanco o turbidez nos indica prueba positiva.

d. Flavonoides (Reacción de Shinoda) (exceptuando chalconas, dihidrochalconas, auronas, catequinas e isoflavonas).

Se realiza sobre la fracción (d) y (e).

- i. Se colocaron la fracción (d) en un balón de 100 mL y se llevó a sequedad en un rotavapor.

- ii. Sobre el residuo se agregó 2,5 mL de etanol, dentro de un “baño maría” a 50°C. Luego se filtró a través de un papel de filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo (13x100). Constituyendo esta la solución (d).
- iii. En un tubo de ensayo se colocaron 3 gotas de la solución (d) con 2 mL de agua destilada, y en otro tubo 2 mL de la fracción (e). Luego se adicionó 1 mL de HCl 12N y unas limaduras de magnesio, a cada tubo. Se agitaron ambos tubos y luego se dejaron en reposo durante 5 minutos.
- iv. Se adicionó 10 gotas de alcohol amílico a cada tubo, agitando estos. Luego se dejaron en reposo para la separación de las 2 fases.

Observación: Una coloración amarilla naranja, rojo de la fase amílica nos indica positiva.

d. Triterpenos y esteroides (Reacción de Liberman – Burchard)

Se realiza sobre las fracciones (b), (c) y la solución d

- i. Se separaron 4 mL de la fracción (c) en un tubo de 13x100 mm y se llevó a sequedad. Luego se disolvió el residuo con 0,2 mL de cloroformo. Constituyendo esta la “solución (c)”
- ii. Se colocaron 5 gotas de la “solución (d)” en un tubo de 13x100 mm y se llevó a sequedad en un rotavapor, disolviendo el residuo con 2 gotas de cloroformo.
- iii. En tres tubos de 6x50 mm por separado, se colocaron 2 gotas de la fracción (b), la solución (c) y la solución (d), respectivamente. Luego se agregó 2 gotas de anhídrido acético sobre ellas y se mezcló bien.
- iv. Finalmente, se agregó, a través de las paredes del tubo, sobre cada una de ellas 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Observación: un color rojo, rosado, púrpura, naranja, azul o verde del anillo nos indica prueba positiva.

e. Quinonas, antrononas o antranoles (Reacción de Borntrager).

Se realizó sobre la fracción (b).

- i. El resto de la fracción (b) se colocó en un tubo de ensayo de 16 x 180mm, y se agregó 5 mL de hidróxido de sodio al 5%. Luego se agitó.

Observación: Fase acuosa rosada o roja nos indica prueba positiva.

f. Alcaloides (Test de Dragendorff, Mayer y Wagner)

Se realizó sobre la fracción (c) y la “solución d”

- i. El resto de la fracción (c) se llevó a sequedad y el residuo se disolvió con 2,5 mL de HCl al 1%, luego se filtró a través de un papel filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo de 13x100 mm.
- ii. Se dispuso de 5 gotas de la solución (d) en un tubo de ensayo de 13x100 mm y se llevó a sequedad, se disolvió con 10 gotas de HCl al 2%, luego se filtró a través de un papel de filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo de 6x50 mm.
- iii. A tres tubos de ensayo de 6x50 mm, se adicionaron 5 gotas de la solución final obtenida en la sec. (f.i), por separado. Asimismo, a otros 3 tubos de ensayo de 6x50 mm, se adicionaron 5 gotas de la solución final obtenido en la sec. (f.ii), por separado. Luego se adicionaron a cada tubo 2 gotas de los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, respectivamente.

Observación: La formación de precipitado rojo, crema y pardo respectivamente nos indica prueba positiva.

g. Leucoantocianidinas y catequinas (Reacción de Rosembein)

Se realizó sobre la fracción (e) y la solución (d).

- i. En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se colocaron 3 gotas de la solución (d) junto con 2 mL de agua destilada, y en otro tubo de ensayo de 13x100mm 2 mL de la fracción (e).
- ii. Luego a ambos tubos se le agregaron 1 mL de HCl 12N, se agitó y se colocaron en baño maría durante 10 minutos.
- iii. Se dejaron enfriar las mezclas, luego se agregaron 10 gotas de alcohol amílico, a cada una, se agitaron, y se dejaron reposar por 5 minutos.

Observación: Una coloración roja en la fase amílica indica la presencia de leucoantocianidinas, un color marrón indica la presencia de catequinas.

h. Saponinas (Prueba de la espuma).

Se realizó sobre la fracción (f)

- i. Se colocó 1 mL de la fracción (f) en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm y se agitó durante 15 segundos. Luego se dejó en reposo durante 15 minutos, al cabo de lo cual se midió la altura de la espuma.

Observación: Si la espuma tiende una altura mayor a 5 mm y persiste por más de 5 minutos prueba positiva.

ANEXO N°3

1. RESULTADOS DE LAS MARCHAS FITOQUÍMICAS DEL LIQUEN

Flavopunctelia Flaventior

Principio Activo	Pruebas de coloración	Fracción	Reacción		Observaciones (coloración de soluciones)
			Marcha Fitoquímica		
			1	2	
Aminogrupos primarios o secundarios	Ninhidrina	a	+++	+++	Mancha de color violeta
		f	+++	+++	Mancha de color violeta
Grupos fenólicos libres	Cloruro férrico	a	++	++	Color morado
Taninos	Gelatina	a	-	-	Ausencia de precipitado
Triterpenos y esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	b	++	+	Verde Intenso
		c	+	+	Anillo naranja
		d	-	-	Trazas
Quinonas, antronas o antranoles	Reacción de Borntrager	b	++	++	Fase superior color rojo
Alcaloides	Reacción de Dragendorff	c	-	-	Turbidez
		d	-	-	Turbidez
	Reactivo de Mayer	c	-	-	Turbidez
		d	-	-	Ausencia de precipitado
	Reactivo de Wagner	c	-	-	Ausencia de precipitado
		d	-	-	Ausencia de precipitado
Leucoantocianidinas (rojo), catequinas (marrón)	Reacción de Rosembeim	d	-	-	Fase amilica transparente incolora
		e	+	++	Fase amilica pardo
Flavonoides excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas	Reacción de Shinoda	d	-	-	Fase amilica transparente incolora
		e	-	-	Fase amilica transparente
Saponinas	Prueba de la espuma	f	-	-	Si aparece espuma

ANEXO N°4

TEST DE SUSTANCIAS LÍQUENICAS

Brodo et al. (2001) ; Orange et al. (2001)

Muchos de estos compuestos liquénicos pueden ser detectadas macroscópicamente gracias a los colores que adquieren al ser puestas en contacto con diversos reactivos químicos o la fluorescencia que producen bajo las radiaciones UV de longitud de onda (λ) 254 a 336 nm.

En general, para la detección de los compuestos liquénicos, se realiza un test de coloración, orientada exclusivamente a detectar macroscópicamente la presencia de grupos de compuestos químicos, que se presentan dentro de un grupo taxonómico dado, evidenciado por cambios de color. Para ello la muestra liquénica es extraída mediante algún solvente (acetona).

Para el caso de reconocer los ácidos fenólicos se emplea FeCl_3 en disolución acuosa al 1 % o en disolución etanólica o acetónica entre 1 – 3 %. Para este reactivo se evidencia cuatro tipos de coloraciones, a un grupo de los compuestos liquénicos se tendrá un azul, mientras que a otro se tendrá una coloración fugaz de rojiza a parda, tal es el caso para el ácido úsnico. Asimismo se observará una coloración violeta y violeta – azul.

Si se cuenta con una disolución acuosa saturada de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ se puede reconocer la presencia de compuestos liquénicos que posean en uno de sus anillos, dos grupos hidroxilo en posición meta (2-4 ó 2-6), para ello el color característico que se evidenciará será el rojo sangre, este es para el caso del ácido lecanórico.

En el caso de las depsidonas, estas son detectables empleando una disolución acuosa de KOH entre 5 – 10 %. Su acción se basa en la ruptura del enlace éster mediante hidrólisis alcalina, conduciendo a la formación de un compuesto difenólico con un enlace éter. Esta reacción no se puede considerar específica de las depsidonas, porque el enlace éster de los dépsidos también puede hidrolizarse

por álcalis. Entre las coloraciones que se observarán son el amarillo característico para el ácido úsnico, rojo vino y rojo.

En la tabla A , se muestran algunas de las reacciones de coloración de acuerdo al reactivo empleado y su posible interpretación asociado al compuesto liquénico.

TABLA A : Reacciones de Color para las sustancias líquueñas

Reactivo	Color	Compuesto Líqueneo
FeCl₃	Rojo – Pardo	Pseudocifelarina A Eriodermina Compuestos "J" y "G" Ácido Úsnico
	Azul	Estrepeilina Escrobiculina
	Azul – violeta	Ác. 4 – O- metilfisódico Pseudocifelarina B
	Violeta	Ác. Picrolíqueno
Ca(OCl)₂	Rojo Sangre	Escrobiculina Ác. Lecanórico
NaOCl	Rojo	Ác. Lecanórico Ác. Olivetónico
	Púrpura	Ác. Meclorofaeico Ác. Criptoclorofaeico
	Verde	Ác. Porfirílico Escrepilina
KOH	Amarillo	Pseudocifelarina A Ác. estético Atranorina Escrobiculina Compuesto "J" Ác. Úsnico
	Rojo Vino	Ác. Meclorofaeico Ác. Criptoclorofaeico
	Rojo	Ác. Norístico
KOH + NaOCl	Amarillo	Ác. Úsnico
	Rojo	Ác. fisódico Ác. Lobárico
	Azul	Estrepcilina

ANEXO N°5

CÁLCULOS ESTADÍSTICOS APLICADOS A LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Es posible obtener los límites de confianza para la pendiente y la ordenada al origen de nuestra recta de ajuste:

$$y = a + bx$$

$$b \pm tS_b$$

$$a \pm tS_a$$

Donde:

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y})^2}{n - 2} \right\}^{\frac{1}{2}} = 0.007051571$$

$$s_a = s_{y/x} \left\{ \frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{\frac{1}{2}} = 0.011030827$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right\}^{\frac{1}{2}}} = 0.000883173$$

A un nivel de de significancia del 95%:

Los límites de confianza de la pendiente (b) y de la ordenada (a) para un nivel de confianza al 95% ($\alpha=0.05$, de dos lados) $t= 12.71$ (valor tomado de tablas student) con $n=3$ ($n-2=1$) vienen dados por las siguientes ecuaciones:

$$b \pm tS_b = 0.084724 \pm 0.002271$$

$$a \pm tS_a = 0.004232 \pm 0.028360$$

Cálculo de la concentración de las muestras problemas diluidos

Ecuación de la recta: $Abs_{(Ac.Úsnico)} = 0.084724[Ac. Úsnico] + 0.004232$

Remplazando las Abs de las muestras problemas de la tabla N°3 en la ecuación de la recta.

Los límites de confianza para los valores de concentración calculados a un nivel de confianza de 95%, donde $t=12.71$ (valor tomado de tablas student) con $n=4$, con grados de libertad: $n - 2 = 4$ son:

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \left\{ 1 + \frac{1}{n} + \frac{(Y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$$

En esta ecuación Y_0 es el valor experimental de y (absorbancias obtenidas por el equipo) a partir del cual se determina el valor de la concentración X_0 (concentración ppm), S_{x_0} es la desviación estándar estimada de X_0 y los otros símbolos tienen el significado habitual b : pendiente de la curva de calibración y el parámetro $S_{y/x}$ calculado anteriormente, n es el número de datos que estamos analizando, para nosotros n toma el valor de 6 (dos muestras, tres diluciones por cada muestra). Luego los valores X_0 que se obtengan podrán ser expresados como:

$$X_0 \pm t(S_{x_0})$$

Donde t : es el estadístico para el t-student obtenido de tablas para $n-2$ grados de libertad.

ANEXO N°6



Fotografía N°1: Liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.)Hale (Foto: E. Cóndor).

ANEXO N°7



Fotografía N°2: Columna Cromatográfica del EBO del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.)Hale (Foto: D. Martino).

ANEXO N°8

CERTIFICADO DE ANALISIS DE ÁCIDO ÚSNICO PATRÓN

SIGMA-ALDRICH

sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

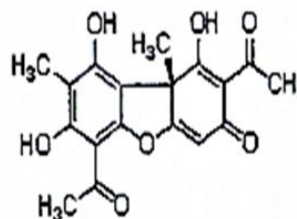
Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of AnalysisProduct Name:
(+)-Usnic acid - 98%

Product Number: 329967
 Batch Number: MKBP1746V
 Brand: ALDRICH
 CAS Number: 7552-61-0
 MDL Number: MFCD00016878
 Formula: C₁₈H₁₆O₇
 Formula Weight: 344.32 g/mol
 Quality Release Date: 16 APR 2013



Test	Specification	Result
Appearance (Color) Yellow to Yellow-Green or Gold	Conforms to Requirements	Light Yellow
Appearance (Form)	Powder	Powder
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Optical Rotation c = 0.7%; Chloroform	478.0 - 498.0 deg	478.2 deg
Purity (HPLC)	≥ 97.5 %	99.8 %

Jamie Gleason, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, Wisconsin US

GLOSARIO

- 1. Apotecio:** estructura de reproducción sexual (ascocarpos) del hongo en forma de disco o de copa. El himenio tiene hifas fértiles -ascas- que producen esporas e hifas estériles -paráfisis- y cuando está maduro, queda expuesto al exterior. Siempre rodeado por un borde (excípulo, margen) de distintos tipos (propio y/o talino) que le permite sostenerse.
- 2. Ascomicetos:** Es una división dentro del reino fungi. Esta división comprende más del 50% de especies del reino Fungi.
- 3. Cianobacterias:** División a la que pertenecen los organismos procariotas unicelulares fotosintéticos que carecen de núcleo definido u otras estructuras celulares especializadas.
- 4. Eucariotas:** Se llama célula eucariota o eucarionte —del griego eu, ‘bien’ o ‘normal’, y karyon, ‘nuez’ o ‘núcleo’—1 a todas las células con un núcleo celular delimitado dentro de una doble capa lipídica: la envoltura nuclear, la cual es porosa y contiene su material hereditario, fundamentalmente su información genética. Las células eucariotas son las que tienen núcleo definido (poseen núcleo verdadero) gracias a una membrana nuclear, al contrario de las procariotas que carecen de dicha membrana nuclear, por lo que el material genético se encuentra disperso en ellas (en su citoplasma), por lo cual es perceptible solo al microscopio electrónico. A los organismos formados por células eucariotas se les denomina eucariontes.
- 5. Fotobionte (o Protobionte):** el simbiote que fotosintetiza en los talos liquénicos. Puede ser un alga verde unicelular o una cianobacteria. Capa de fotobiontes es el estrato de los talos en donde se dan los contactos físicos entre los hongos y los fotobiontes; suele estar por debajo del córtex y su morfología y grosor son variables (en ocasiones es un carácter).

- 6. Procariotas:** Organismo unicelular desprovisto de membrana nuclear, por lo que el genoma se encuentra libremente en el citoplasma, aunque suele agruparse en una determinada región citoplasmática. Sistemáticamente forman el reino mónera, que comprende todas las bacterias.
- 7. Sustrato:** superficie en la que una planta o un animal vive.
- 8. Talos:** cuerpo vegetativo de los líquenes que se forma mediante la asociación estable hongo-fotobionte (alga verde o cianobacteria) y da como resultado la formación de un talo de estructura compleja que difiere de cualquiera de los simbioses en estado de vida libre. Los dos extremos de complejidad son los de estructura homómera y los de heterómera (dorsiventral). En ocasiones puede tener dos fotobiontes, en ese caso el primario es un alga verde y el secundario una cianobacteria (v. cefalodio).