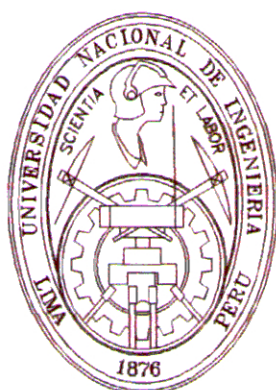


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

Sección de Posgrado y Segunda Especialización Profesional



TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS  
CON MENCIÓN EN QUÍMICA

**“ESTUDIO QUÍMICO DE LOS LÍQUENES *Xanthoparmelia*  
*tasmanica* y *Xanthomendoza mendozae*”**

PRESENTADO POR: ELENA ALICIA CÓNDROR CUYUBAMBA

ASESORA:

DRA. MARÍA DEL PILAR CARAMANTÍN SORIANO

Lima – Perú  
2012

**ESTUDIO QUÍMICO DE LOS LÍQUENES *Xanthoparmelia tasmanica* y  
*Xanthomendoza mendozae***

**INDICE DE CONTENIDO**

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	xii
<b>ABSTRAC</b>	xiii
<b>CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
1. LÍQUENES	2
2. PRODUCTOS NATURALES EN LÍQUENES	2
a) Procedimiento de Begg (1979)	4
b) Procedimiento de Yeap (1979)	5
c) Procedimiento de Elix (2000)	5
3. BIOSÍNTESIS	6
4. OBJETIVOS DE LA TESIS	8
<b>CAPITULO II: ESTUDIO QUÍMICO DEL LIQUEN <i>Xanthoparmelia Tasmanica</i></b>	<b>9</b>
A. INTRODUCCIÓN	10
B. PARTE EXPERIMENTAL	11
1. EQUIPOS Y MATERIALES	11
2. COLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	12
3. SECADO Y MOLIENDA DE LA MUESTRA	12
4. ANÁLISIS CUALITATIVO (Marcha Fitoquímica)	12
4.1 Muestra	12
4.2 Procedimiento	12
4.3 Resultados	12
5. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS Y AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS	13
5.1 Material vegetal	13
5.2 Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico (EBO)	13
5.3 Análisis preliminar por cromatografía en capa fina – CCF	13
5.4 Purificación por cromatografía	14
5.5 Cromatografía en columna-CC en Sephadex LH-20	14
5.6 Cromatografía en columna-CC en Sílica gel	15

5.7 Resultados y discusiones	16
5.7.1 Cristales X1, X2 y X3	16
5.7.2 Cromatografía en columna-CC en Sephadex LH-20	22
5.7.3 Cromatografía en columna-CC en Sílica gel	22
<b>CAPITULO III: ESTUDIO QUÍMICO DEL LIQUEN <i>Xanthomendoza mendozae</i></b>	<b>27</b>
A. INTRODUCCIÓN	29
B. PARTE EXPERIMENTAL	29
1. EQUIPOS Y MATERIALES	28
2. COLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	30
3. SECADO Y MOLIENDA DE LA MUESTRA	30
4. ANÁLISIS CUALITATIVO (MARCHA FITOQUÍMICA)	30
4.1 Muestra	30
4.2 Procedimiento	30
4.3 Resultados	30
5. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS Y AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS	31
5.1 Material vegetal	31
5.2 Extracción sólido – líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico (EBO)	31
5.3 Análisis preliminar por cromatografía en capa fina – CCF	31
5.4 Purificación por cromatografía	31
5.5 Cromatografía en columna-CC en Sephadex LH-20	31
5.6 Cromatografía en columna-CC en Sílica gel	33
5.7 Resultados y discusiones	35
5.7.1 Cromatografía en columna-CC en Sephadex LH-20	35
5.7.2 Cromatografía en columna-CC en Sílica gel	40
5.7.3 Elucidación estructural de la Parietina (fisciona)	42
5.7.4 Elucidación estructural de la Parietina acetilada	43
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>57</b>

## RESUMEN

Esta tesis describe el aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios de los extractos acetónicos de los líquenes *Xanthoparmelia tasmanica* (*X. tasmanica*) y *Xanthomendoza mendozae* (*X. mendozae*), colectados en el distrito de Muquiyauyo, provincia de Jauja (Departamento de Junín, 3 200 msnm). Las estructuras de estos compuestos fueron elucidados por una combinación de métodos espectroscópicos y químicos. Cabe mencionar que los resultados de esta tesis son las primeras informaciones que se relatan a cerca del estudio químico de *X. tasmanica* y *X. mendozae*.

Fue realizado un análisis cualitativo de los metabolitos secundarios para ambos líquenes. Este análisis infirió que el liquen *X. tasmanica* contiene aminogrupos primarios o secundarios (++) , grupos fenólicos libres (+), taninos (+), alcaloides (+), catequinas (+), triterpenos y esteroides (+), mientras que el liquen *X. mendozae* contiene aminogrupos primarios o secundarios (++) , grupos fenólicos libres (+), taninos (+), alcaloides (+), catequinas (+), triterpenos y esteroides (+).

Del liquen *X. tasmanica* se aisló el (+) ácido úsnico que fue elucidado por sus datos espectroscópicos (RMN <sup>1</sup>H, IR y EM) mientras que del liquen *X. mendozae* se aisló la antraquinona parietina (fisciona) que por derivatización de ésta en su forma acetilada se elucidó su estructura a través de sus espectros mono y bidimensional (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, HMBC, IR y EM).

De ambos líquenes se detectó por CG-EM y RMN <sup>1</sup>H mezcla de ácidos grasos y compuestos con estructuras base de antraquinonas. Actualmente sigue trabajándose en esta investigación, pero por factor de tiempo y cumplimiento de las normas de la dirección de la Postgraduación se tuvo que redactar la tesis con estos resultados.

## ABSTRAC

This thesis describes the isolation and structural elucidation of secondary metabolites and lichenic compounds of the acetone extracts from *Xanthoparmelia tasmanica* (*X. tasmanica*) and *Xanthomendoza mendozae* (*X. mendozae*) lichens and they were collected in Muquiyauyo District, Jauja province (Junin, 3 200 m). The structures of these compounds were characterized by combination of chemical and spectroscopic methods. These results are the first information that relate about to the chemical study of *X. tasmanica* and *X. mendozae*.

The qualitative analysis of the secondary metabolites for both lichens was carried out. This analysis concluded that the lichen *X. tasmanica* contains primary or secondary aminogrupos (++) , free phenolic groups (+), tannins (+), alkaloids (+), catechins (+), triterpenes and steroids (+), while that lichen *X. mendozae* contains primary or secondary aminogrupos (+), free phenolic groups (+), tannins (+), alkaloids (+), catechins (+), triterpenes and steroids (+).

(+) usnic acid was isolated from lichen *X. tasmanica* and the molecular structure was elucidated by spectroscopic data (RMN  $^1\text{H}$ , IR y EM). The anthraquinone parietin (physcion) was isolated from lichen *X. mendozae* and was possible to confirm its structure through acetylated parietin. The molecular structure was characterized by means of their respective spectral data (RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , IR y EM) including bidimensional experiment (HMBC).

GC-MS and NMR  $^1\text{H}$  analysis of both lichens revealed that they contained a mixture of fatty acids and anthraquinones based structures. Currently still working on this research, but by time factor and compliance of Postgraduate Depart rulers this work stopped and this thesis has been written with these results.

---

# CAPITULO I

---

## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

## 1. LÍQUENES

Los líquenes son seres complejos cuyos cuerpos vegetativos (talos) son el resultado de asociaciones simbióticas entre un hongo heterótrofo (micobionte) y una alga (fotobionte), que es el que sintetiza los azúcares necesarios para el metabolismo, liberando oxígeno en el proceso. De este estrecho contacto físico, interacción mutualista, se originan los talos liquénicos estables con morfología, anatomía, fisiología, genética y ecología específica.

En la asociación liquénica el grado de participación de los dos organismos no es tan fundamental, lo importante es que 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 mayor diversidad de ambientes, lo cual representa una gran ventaja con respecto a otros organismos [1,2].

## 2. PRODUCTOS NATURALES EN LÍQUENES

Dentro de los metabolitos secundarios\* comunes que se pueden encontrar en los líquenes tenemos a los compuestos cuya particularidad presentan anillos fenólicos en sus moléculas como son las cromonas, xantonas, ácido púlvico y las antraquinonas siendo la más común en los líquenes, la parietina (Figura 1).

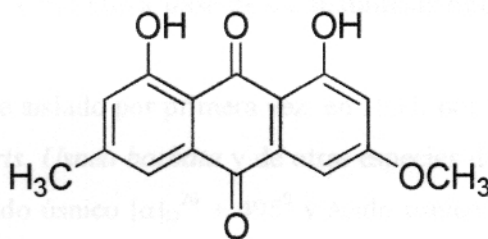
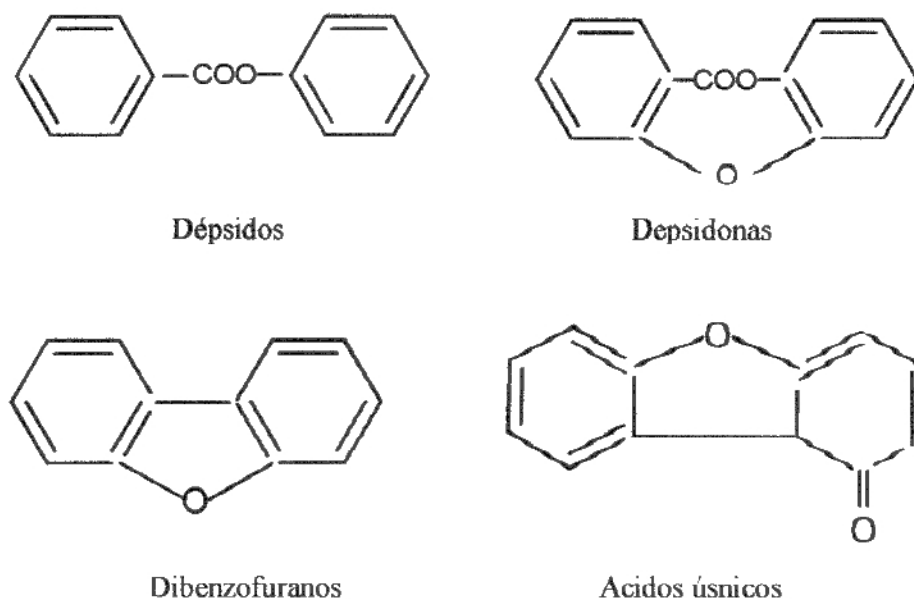


Figura 1.- Estructura de la parietina

\* 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, mucilagos, ceras, etc.

Otro segundo grupo de compuestos presentes en los líquenes, lo constituyen los llamado compuestos liquénicos, de derivados fenólicos, que provienen sólo de los líquenes. Todos ellos responden a cuatro estructuras, bien determinadas, que se conocen con los nombres de dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos (Figura 2), siendo el ampliamente distribuido en los líquenes el (+) ácido úsnico.



**Figura 2.- Estructura base de las sustancias liquénicas**

El ácido úsnico fue aislado por primera vez en 1934, por Rochleder *et al.* a partir de la *Ramalina calicaris*, *Usnea barbata* y de otras especies de líquenes. Presenta dos formas isoméricas: ácido úsnico  $[\alpha]_D^{20} + 495^0$  y ácido úsnico  $[\alpha]_D^{20} - 495^0$ . Existen muchos autores que clasifican a los ácidos úsnicos como un grupo de los dibenzofuranos, pero sustituidos (Figura 3) [3,4].

La característica principal de estas sustancias liquénicas es que presentan una variedad de acción biológica, en el caso del ácido úsnico presenta una actividad antimicrobial, antiinflamatoria y antiviral [4, 5, 6].

En la literatura revisada, no se ha encontrado ningún relato de análisis fitoquímico\* en los líquenes *Xanthoparmelia tasmanica* (*X. tasmanica*) y

\* Análisis fitoquímico o marcha fitoquímica se refiere a la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios o productos naturales presentes en una planta o cualquier organismo vivo.



*Xanthomendoza mendozae* (*X. mendozae*). Asimismo, no se ha encontrado estudio acerca de la composición química de los líquenes en estudio, sin embargo, se reporta el aislamiento de metabolitos secundarios en líquenes de otras especies del género *Xanthoparmelia*, por ejemplo *X. scabrosa* (Tayl.) Hale (Begg et al.-1978) [7], *X. xanthosorediata* (Begg et al.-1979) [8], la *X. competitiva* (Elix et al. -2000a) [9]; *X. verrucigera* (Elix et al.-2000b) [10].

Para el género *Xanthoparmelia*, se han publicado una serie variada de procedimientos para la extracción y purificación de los compuestos liquénicos. A continuación se detallarán tres procedimientos de estos que comprende la obtención del ácido úsnico relatados por Elix (2000), Yeap (1979) y Begg (1979).

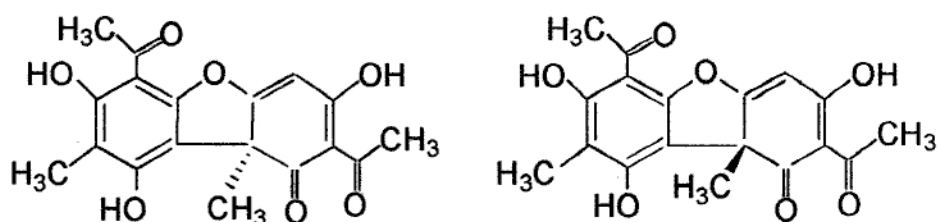


Figura 3.- Estructuras de (-) ácido úsnico y (+) ácido úsnico

**a) Procedimiento de Begg (1979)**

- Muestra utilizada: muestra seca de *X. xanthosorediata*
- Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
  - i Extracción en Soxhlet por 48 horas con acetona anhidra. El extracto orgánico se concentra al vacío hasta sequedad, obteniéndose el EBO, de color marrón.
- Separación cromatográfica
  - ii El extracto bruto orgánico fue examinada mediante una cromatografía en placa preparativa de sílica Gel 60 F254.
  - iii El eluyente utilizado fue: 15% de ácido acético en tolueno, obteniéndose 3 bandas, dentro de los cuales estaba presente el ácido úsnico en la primera banda.
- Purificación e Identificación
  - iv Purificación: el ácido úsnico fue purificado por recristalización con benceno.
  - v Identificación: el ácido úsnico fue identificado por su punto de fusión y espectroscopía RMN  $^1\text{H}$ .
- Resultados: aislamiento e identificación del ácido úsnico, entre otros compuestos.

**b) Procedimiento de Yeap (1979)**

- Muestra utilizada: muestra seca de *X. scabrosa*
- Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
  - i Se realizaron dos extracciones por separado, primero en benceno y luego en acetona, ambos en caliente.
  - ii Todos los extractos orgánicos se concentraron.
- Separación cromatográfica
  - iii El extracto bruto orgánico de benceno y acetona se examinaron mediante la cromatografía de placa preparativa, por separado, de sílica Gel G.
  - iv El eluente utilizado fue: benceno:dioxano:ácido acético (36:9:1). Del extracto de benceno por placas cromatográficas se obtuvo ácido úsnico.
- Purificación e Identificación
  - v Purificación: ácido úsnico fue purificado por recristalización con etanol.
  - vi Identificación: el ácido úsnico fue identificado por su punto de fusión. Resultados: aislamiento e identificación del ácido úsnico, entre otros compuestos.

**c) Procedimiento de Elix (2000a)**

- Muestra utilizada: muestra seca de *X. competitiva Hale*
- Extracción sólido-líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)
  - i Extracción en Soxhlet por 3 días con éter etílico anhidro. El extracto orgánico se concentra al vacío hasta sequedad.
- Separación cromatográfica
  - ii El extracto bruto orgánico se examinó mediante la cromatografía de placa preparativa, de sílica Gel.
  - iii El eluente utilizado fue: tolueno:ácido acético (85:15).
  - iv De las placas cromatográficas del extracto se obtuvo ácido úsnico.
- Purificación e Identificación
  - v Purificación: ácido úsnico se obtuvo puro de la cromatografía en capa preparativa.
  - vi Identificación: el ácido úsnico fue identificado por cromatografía en capa fina.
- Resultados: aislamiento e identificación del ácido úsnico.

En lo que respecta al líquen *X. mendozae*, no hay ningún reporte acerca del estudio químico.

### 3. BIOSÍNTESIS

Las sustancias liquénicas (compuestos liquénicos) son metabolitos secundarios que en su mayoría se producen vía acetil-polimalonil. Esta vía conduce a la formación de compuestos alifáticos como los ácidos grasos de cadena larga y sustancias aromáticas del tipo fenólico, éstos últimos se producen a través de la biosíntesis del ácido orselínico que es la unidad fundamental. El proceso biosintético se inicia por una condensación de 1 mol de acetilSCoA y 1 mol de malonilSCoA. La acetoacetilSCoA, resultante puede condensar con otras moléculas de malonilSCoA en etapas sucesivas, formando un policetido de 8 carbonos. Este último puede ciclarse a través de dos procesos distintos: por condensación aldólica produciendo el ácido orselínico y por condensación tipo Claisen, produciendo floroacetofena (Figura 4)[2,4].

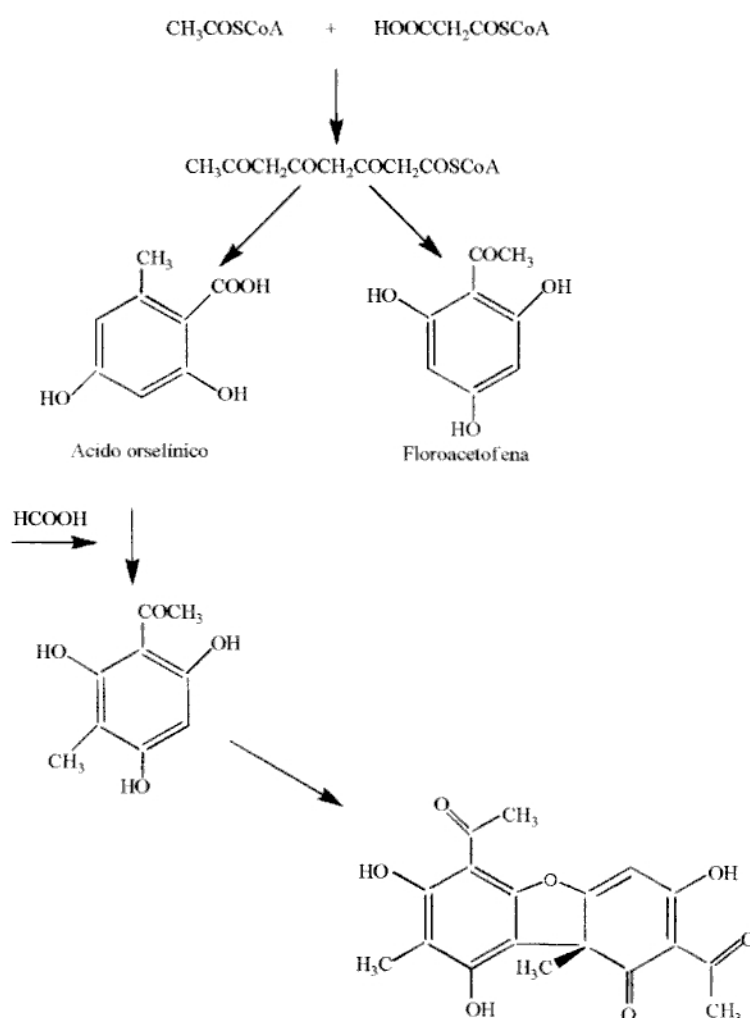


Figura 4.- Biosíntesis de compuestos liquénicos

Las antraquinonas son biosintetizadas por la ruta de la malonil Coenzima. En este proceso, una molécula de AcetilCoA se condensa sucesivamente con 7 moléculas de MalonilCoA para producir una cadena policetídica de 16 carbonos u octacétido. Luego, el octacétido se pliega de la manera que se observa en la figura 5, y se cicliza por condensaciones entre los grupos metilenos y sus vecinos carbonilos para dar el triciclo cetónico. Este intermedio enoliza para generar el núcleo de las antronas. El núcleo de las antronas puede dimerizarse enzimáticamente para producir diantronas, o puede oxidarse para dar antranoles y/o antraquinonas [12].

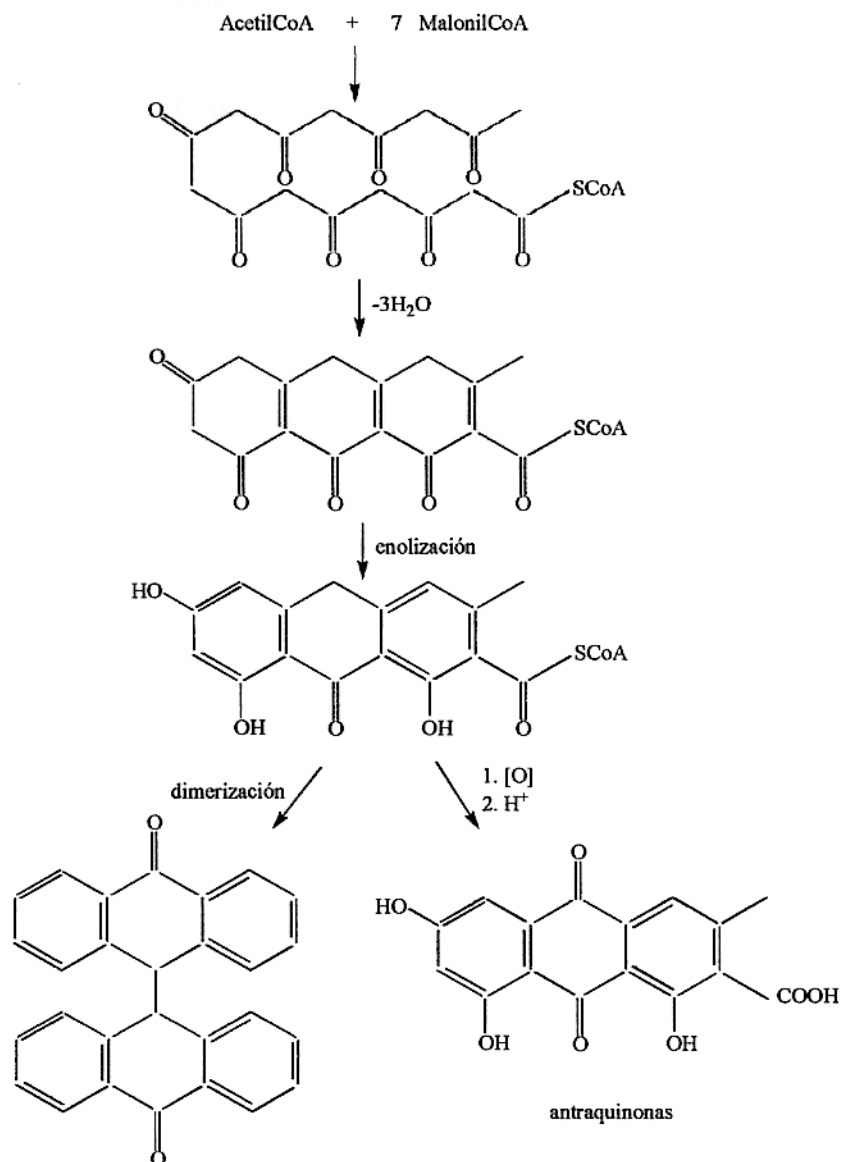


Figura 5.- Biosíntesis de compuestos antraquinónicos

#### 4. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

- i Aislamiento e identificación (espectroscópica) de los metabolitos secundarios de los líquenes *X. tasmanica* y *X. mendozae*.
- ii Análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de los metabolitos secundarios presentes en los líquenes *X. tasmanica* y *X. mendozae*.

Esta tesis comprende 4 capítulos:

Capítulo I: Introducción General

Capítulo II: Estudio Fitoquímico del líquen *Xanthoparmelia tasmanica*

Capítulo III: Estudio Fitoquímico del líquen *Xanthomendoza mendozae*

Capítulo IV: Resultados y Conclusiones

---

# CAPITULO II

---

## ESTUDIO QUÍMICO DEL LIQUEN

*Xanthoparmelia tasmanica*

---

## A. INTRODUCCIÓN

*Parmeliaceae* es la familia más grande y mejor estudiada dentro de los líquenes con aproximadamente 2000 especies en 85 géneros. Los géneros más conocidos son: *Xanthoparmelia* (más de 800 especies), *Usnea* (más de 500 especies), *Parmotrema* (más de 350 especies) e *Hypotrachyna* (más de 190 especies) [12].

Esta familia tiene una distribución cosmopolita, y se puede encontrar en una amplia gama de hábitats y zonas climáticas. Esto incluye todos los lados de la calzada en carretera a las rocas alpinas, a partir de árboles de la selva tropical a tundra ártica. Estos pueden ser encontrados en la mayoría de los ambientes terrestres [13].

Existe poca información al respecto de *X. tasmanica* (Figura 6). Se hizo una búsqueda bibliográfica profunda en bibliotecas (Biblioteca del Departamento de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica del Perú y Biblioteca de la Universidad Paulista (Brasil)) y bases de datos (Web of Science, Scirus, etc.) con la ayuda de amigos que viven el exterior (Dra. Ingrid Collantes Díaz\*) y con ocasión de la estadía de investigación que se realizó en el Instituto de Recursos Naturales de Química de la Talca (Talca-Chile), se completó la recopilación de referencias, en particular aquellas referidas al análisis espectroscópico de la estructura de los compuestos liquénicos.



**Figura 6.-** Líquen *X. tasmanica* (Procedencia: Dist. Muquiyauyo, Prov. Jauja, Dpto. Junín, May'10) (Foto E. Cóndor)

\* Actualmente es profesora titular de la Universidad Paulista (São Paulo-Brasil).

No se ha encontrado un estudio acerca de la composición química del líquen *X. tasmanica*, sin embargo, hay información de otras especies de *Xanthoparmelia* donde hacen referencia del aislamiento de metabolitos secundarios. En todos estos estudios se han reportado la presencia de un principal compuesto llamado (+) ácido úsnico (Figura 3) [5, 7, 8, 9, 10, 11].

El líquen *X. tasmanica* crece en las rocas, y fue identificado por el biólogo Ángel Ramirez del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (ver Anexo I) y presenta la siguiente clasificación:

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Lecanoromycetes
Orden	Lecanorales
Familia	Parmeliaceae
Género	<i>Xanthoparmelia</i>
Especie	<i>Xanthoparmelia tasmanica</i>

## B. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. EQUIPOS Y MATERIALES

- **Instituto de Recursos Naturales de la Universidad de Talca (Chile)**
  - Cromatógrafo de Gas: Perkin Elmer Turbo Mass. Autosystem XL. Las muestras fueron disueltas en diclorometano e inyectadas directamente al equipo.
  - Espectrofotómetro Infrarrojo Nicolet Nexus 470 FT-IR (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA).
  - Lámpara UV 254 / 366 nm
  - Polarímetro DIP-370
  - Sephadex LH-20 (Farmacia)
  - Sílica gel 60 (0.063-0.200 mm), Merck
- **Universidad de Chile (Santiago de Chile – Chile)**
  - Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance 400 (Bruker, Rheinstetten, Germany). Los desplazamientos químicos fueron dados en  $\delta$  (ppm) y se usó como estándar interno TMS. Las muestras fueron disueltas en  $\text{CDCl}_3$ .



- **Laboratorio de Investigación de Química de los Productos Naturales. Facultad de Ciencias (UNI- Perú)**

- Rotaevaporador Buch R-169
- Equipo para determinar punto de fusión: melting point, Fisher – Johns

## 2. COLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El líquen con que se trabajó en esta investigación, fue colectado en el distrito de Muquiyauyo (3200 msnm), provincia de Jauja (Dpto. de Junín), el 28 de marzo del 2010 (primera recolección para los estudios preliminares) y el 15 de mayo del 2010 (segunda colecta para el aislamiento de compuestos liquénicos).

## 3. SECADO Y MOLIENDA DEL MATERIAL VEGETAL

El líquen se limpió cuidadosamente y se secó en una estufa “Labor” (Hungria) a 40 °C, disponiéndose al inicio de nuestro trabajo (Mayo 2010) de suficiente material seco. Esta muestra se pulverizó a grano fino en un molino doméstico “Moulinex” (750W).

## 4. ANALISIS CUALITATIVO (Marcha fitoquímica)

**4.1 Muestra:** 6 g del líquen, *X. tasmanica*. Se realizaron dos análisis, con resultados similares:

- i Primer análisis: 30 Abr.- 15. Jun. 2010
- ii Segundo análisis: 06 - 13. Ago.2010

**4.2 Procedimiento:** Reyna(1999), de acuerdo a Rondina & Coussio (1969) (ver Anexo 2).

### 4.3 Resultados

Las dos muestras analizadas nos dieron idénticos resultados, los cuales se detallan en el Anexo 3 y el resumen se da continuación:

- i. **Contiene:** Aminogrupos primarios o secundarios (++), grupos fenólicos libres (+), taninos (+), alcaloides (+), catequinas (+), triterpenos y esteroides (+).

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

- ii. **No contiene:** Flavonoides, saponinas, quinonas y leucoantocianidinas

## 5. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS Y AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS

**5.1 Material vegetal:** 430 g del líquen *X. tasmanica*

**5.2 Extracción sólido- líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico (EBO) (2.Sep.'10 - Ene'11)**

La muestra del líquen seco y molido se maceró en acetona (500 mL) por tres veces a temperatura ambiente, obteniéndose un volumen total de aproximadamente 1,5 L. Estos extractos acetónicos, se concentraron en rotaevaporador, para obtener un extracto bruto orgánico (EBO) de color marrón oscuro (masa aproximada 6,1 g).

El extracto obtenido (ca. 6,1 g) se extrajo primero con cloroformo a temperatura ambiente, con un volumen aproximadamente de 50 mL, obteniéndose de esta fracción unos cristales de color amarillo (X1). Luego se extrajo con cloroformo en caliente con una cantidad aproximadamente de 200 mL. Se dejó reposar por una semana observándose la formación de cristales amarillos (X2) que fueron separados por filtración simple. Finalmente, del resto de volumen (ca. 100 mL), que se dejó reposar por una semana, se separaron por filtración simple unos cristales de color amarillo (X3).

Las masas de los cristales fueron de 20,9 mg (X1), 424 mg (X2) y 21,9 mg (X3), respectivamente.

El sólido insoluble de color marrón oscuro se guardó para su posterior purificación (ver Sec.5.4. Pág. 14) (masa 5,09 g).

### 5.3 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: EBO, obtenida en la Sec.5.2 precedente.
- ii Referencia: no se dispuso de patrón de compuestos líquénicos.
- iii Observaciones: se realizaron cromatografías en placa fina observándose en general que el extracto contenía hasta 10 manchas (se usó como revelador *p*-anisaldehído en calor) y se decidió realizar una separación con Sephadex LH-20 (ver Anexo 4).

#### 5.4 Purificación por cromatografía (9. Ago – 26. Ago '11)

Los procedimientos cromatográficos que se realizaron para la purificación de los compuestos del extracto bruto de la *X. tasmanica* fueron:

- i Análisis preliminar: Cromatografía de capa fina-CCF (ver Sec.5.3).
- ii Cromatografía en columna-CC (ver Sec. 5.5. y 5.6).

Esta etapa del trabajo se realizó durante la estadía de investigación en el Laboratorio del Instituto de Recursos Naturales de la Universidad de Talca (Talca-Chile), bajo la asesoría de la Dra. María del Pilar Caramantín Soriano y el Dr. Guillermo Schmeda, del 9 de Agosto al 26 de Agosto del 2011.

#### 5.5 Cromatografía en columna-CC en Sephadex LH-20

El objetivo de este procedimiento cromatográfico, es obtener fracciones enriquecidas, y si fuera posible puras, del compuesto que se quiere purificar.

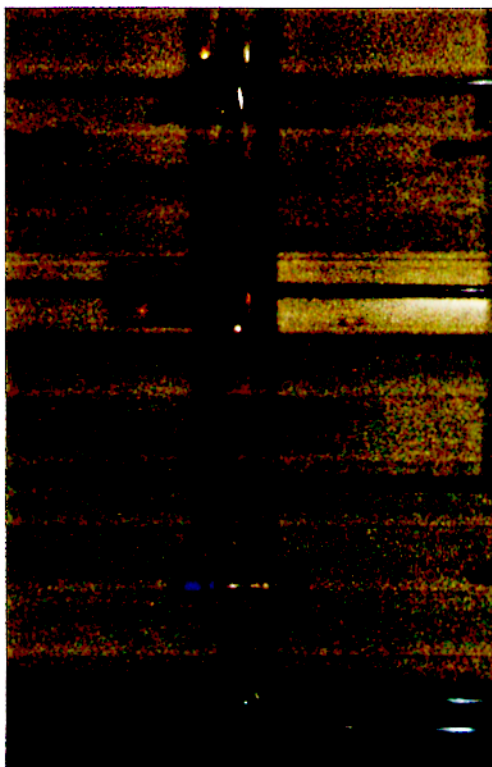
- i Muestra: EBO (0,5269 g\*), obtenida en la Sec. 5.2 (pág. 13).
- ii Características de la columna:  $\phi_1 = 4$  cm,  $h = 69,5$  cm; altura de la Sephadex LH -20 31 cm.
- iii Adsorbente : Sephadex LH-20
- iv Eluentes utilizados: diclorometano:metanol:éter (1:1:1)  
metanol (para limpiar el sephadex)

#### v Procedimiento

- El extracto bruto orgánico se disolvió con 10 mL de la mezcla de solvente diclorometano: metanol: éter (1:1:1) y se trasvasó en la superficie de la columna, procediéndose a pasar el eluente (Figura 7).
- Se recolectaron 69 fracciones, de las cuales después de realizar una cromatografía en placa fina se juntaron en 10 fracciones de la siguiente manera:

F1	=	5,2 mg	F6	=	1,2 mg
F2	=	8,0 mg	F7	=	14,0 mg
F3	=	4,6 mg	F8	=	1 mg
F4	=	11,5 mg	F9	=	36 mg
F5	=	1,6 mg	F10	=	320 mg

\* La cantidad total de EBO obtenido fue de 5,09 g, pero sólo se utilizó en esta etapa 0,5269 g.



**Figura 7.- Columna cromatográfica del EBO del líquen *X. tasmanica* (Foto E. Córdor)**

Debido a la alta polaridad que presentan los compuestos por cromatografía en capa fina, se procedió a realizar la derivatización del extracto para proceder a separar en sílica gel, para ello se realizó la acetilación del extracto (Anexo 5).

### **5.6 Cromatografía en columna-CC en Sílica gel**

- i Muestra: EBO acetilado (0,4863 g\*).
- ii Características de la columna:  $\phi_i = 2,5$  cm,  $h = 67,5$  cm; altura de la sílica gel = 24,5 cm.
- iii Adsorbente : Sílica Gel
- iv Procedimiento
  - El extracto bruto orgánico acetilado se trasvasó en un balón de 200 mL y se adicionó, aproximadamente, 5 g de sílica y 100 mL de cloroformo y se concentró para realizar una papilla homogénea, hasta llevar a sequedad.

---

\* La cantidad total de EBO obtenido fue de 5,09 g, pero sólo se utilizó en esta etapa 0,4863 g.

- En la columna se agregó la sílica gel junto con el éter de petróleo hasta cubrir el empaque.
- La papilla se trasvasó sobre la parte superior del empaque de sílica gel (en la columna) que contenía un poco de éter de petróleo (0,2 cm de altura). Finalmente, se colocó una capa de algodón, para proteger la capa de muestra.
- Se agregó cuidadosamente el primer eluyente, éter: acetato de etilo (6:4); y se procedió a coleccionar fracciones de aproximadamente 10 mL en tubos de ensayo.
- Conforme se iban corriendo la columna cromatográfica se aumentó la polaridad del eluyente utilizándose los siguientes eluentes: éter: acetato de etilo (1:1); éter: acetato de etilo (4:6); acetato de etilo y finalmente metanol.
- Se recolectaron 220 fracciones, de las cuales después de realizar una cromatografía en placa fina se juntaron en 10 fracciones de la siguiente manera:

Q1	=	5,2 mg	Q6	=	20,7 mg
Q2	=	4,8 mg	Q7	=	10,6 mg
Q3	=	20,6 mg	Q8	=	3,3 mg
Q4	=	44,3 mg	Q9	=	82,1 mg
Q5	=	25,8 mg	Q10	=	250,2 mg

## 5.7 Resultados y Discusiones:

### 5.7.1 Cristales X1, X2 y X3

Una pequeña cantidad de X1, X2 y X3, fueron disueltos en diclorometano y analizados en CG/EM. Para el caso de X1 se observó un pico a un tiempo de retención de 22,50 min.; para el caso de X2 y X3 se observaron varios picos, de los cuales uno de ellos correspondía a X1 (tiempo de retención 22,50 min.). Debido a que tanto para X2 y X3 poseían una mezcla de compuestos, se decidió invertir el tiempo en análisis de X1.

El compuesto X1 es un sólido de color amarillo en forma de agujas, con un punto de fusión de 204-205° C, soluble en cloroformo, poco soluble en acetona y metanol. Su rotación óptica dio  $[\alpha]^{25} = (+) 498$ . Se analizó este sólido por CG /EM, obteniéndose un espectro de Masas tal como se muestra en la Figura 8, en la que se pueden resaltar las siguientes fragmentaciones:

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

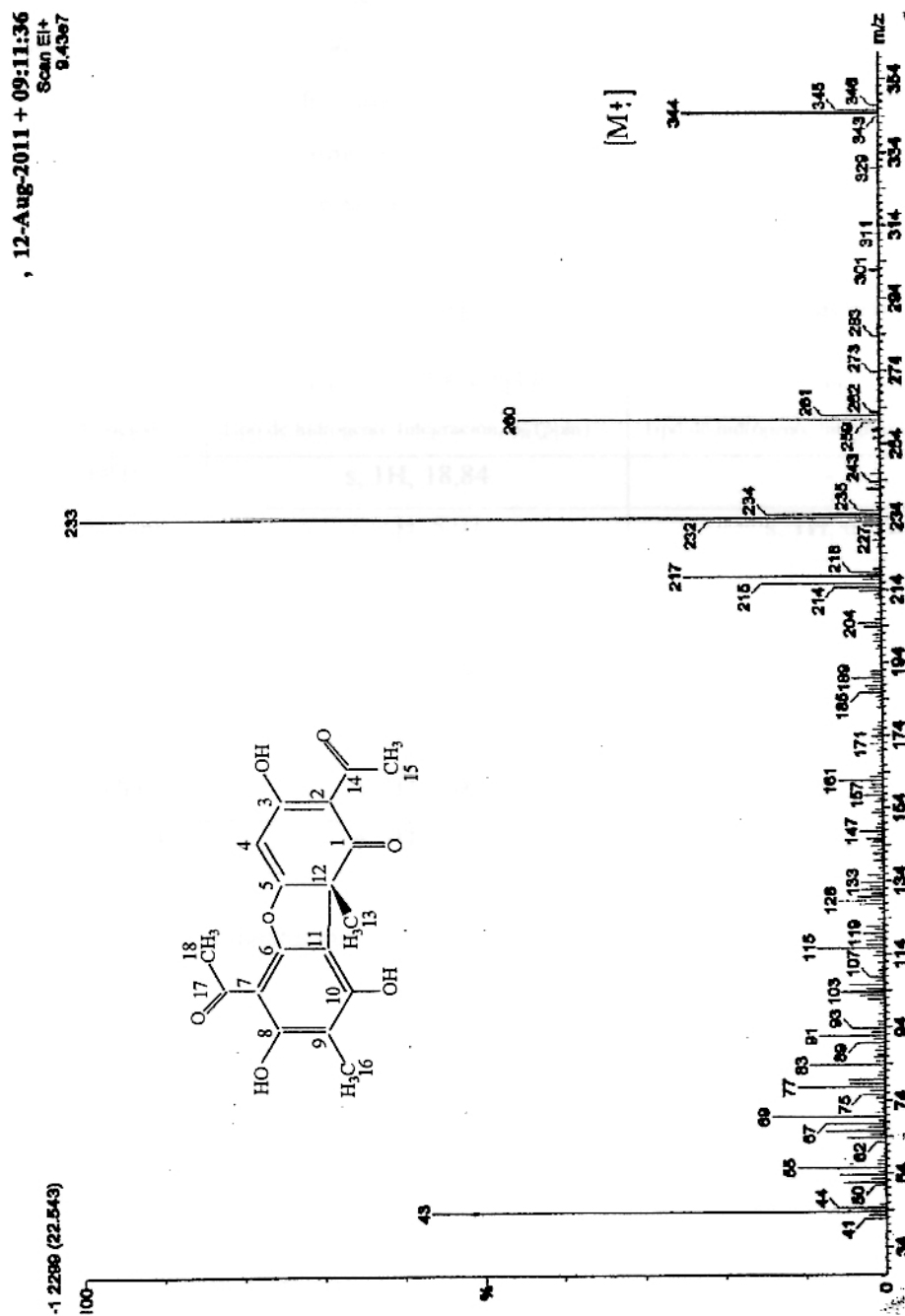


Figura 8.- Espectro de Masas EI del compuesto XI

Con respecto al espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto X1 (Figura 9), se observaron 2 singuletes correspondientes a 2 grupos metilos ( $\delta = 1,78$  ppm y  $2,12$  ppm); este último tiende a desplazarse un poco debido a que se encuentra unido a un anillo aromático. Seguidamente, se observó 2 señales de singuletes, bastante juntas correspondientes a 2 grupos metoxilos. Estas señales están muy próximas debido que el entorno de ambos grupos son bastante similares ( $\delta = 2,68$  ppm y  $2,70$  ppm). Por otro lado, se verificó la presencia de un protón aromático ( $\delta = 7,26$  ppm). Las señales correspondientes a  $\delta = 11,06$  ppm y  $13,3$  ppm corresponderían a los hidrógenos del grupo OH. Según bibliografía, el tercer hidrógeno del grupo OH debería encontrarse a  $\delta = 18,1$  ppm sin embargo, en el espectro no es observado (ver Tabla 1 con los datos de RMN  $^1\text{H}$ ).

**Tabla 1: Datos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto X1**

Posición	Castro M. (2004)*[17]	X1
	Tipo de hidrógeno/ Integración, $\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Tipo de hidrógeno/ Integración, $\delta_{\text{H}}$ (ppm)
3 (-OH)	s, 1H, 18,84	-
4 (Ar - H)	s, 1H, 5,97	s, 1H, 6,00
8 (-OH)	s, 1H, 13,30	s, 1H, 13,34
10 (-OH)	s, 1H, 11,02	s, 1H, 11,06
13 (-CH <sub>3</sub> )	s, 3H, 1,76	s, 3H, 1,78
15 (-CH <sub>3</sub> )	s, 3H, 2,67	s, 3H, 2,68
16 (-CH <sub>3</sub> )	s, 3H, 2,09	s, 3H, 2,12
18 (-CH <sub>3</sub> )	s, 3H, 2,67	s, 3H, 2,70

\* Referencia de comparación

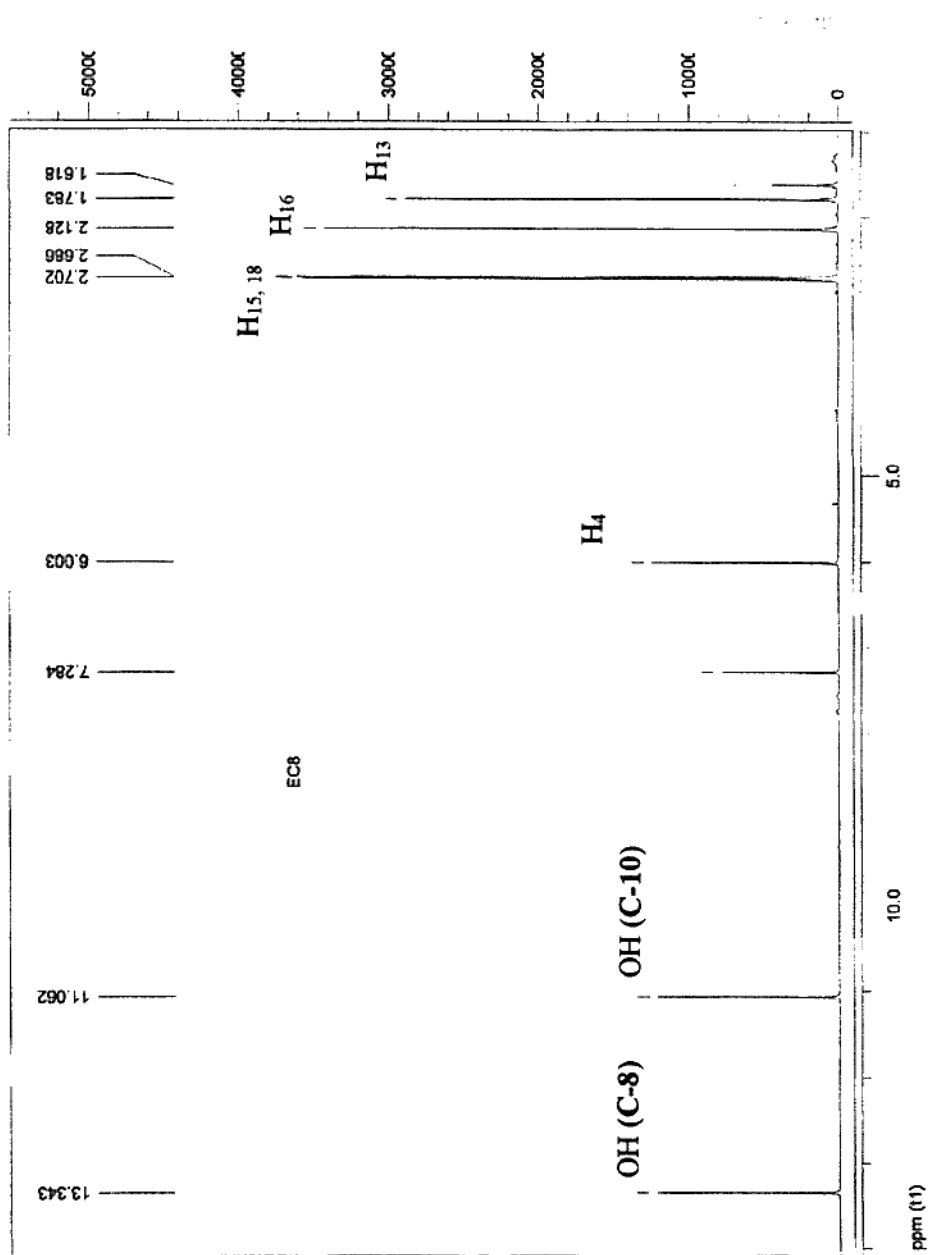


Figura 9.- Espectro de  $\text{RMN } ^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto XI



En el espectro de IR (ver Figura 10) se observan bandas a 3093  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la presencia del grupo  $\text{-OH}$ . A 1625  $\text{cm}^{-1}$  se puede ver una banda correspondiente al alargamiento del grupo  $\text{C=O}$ . En la Tabla 2 se presenta todos los valores.

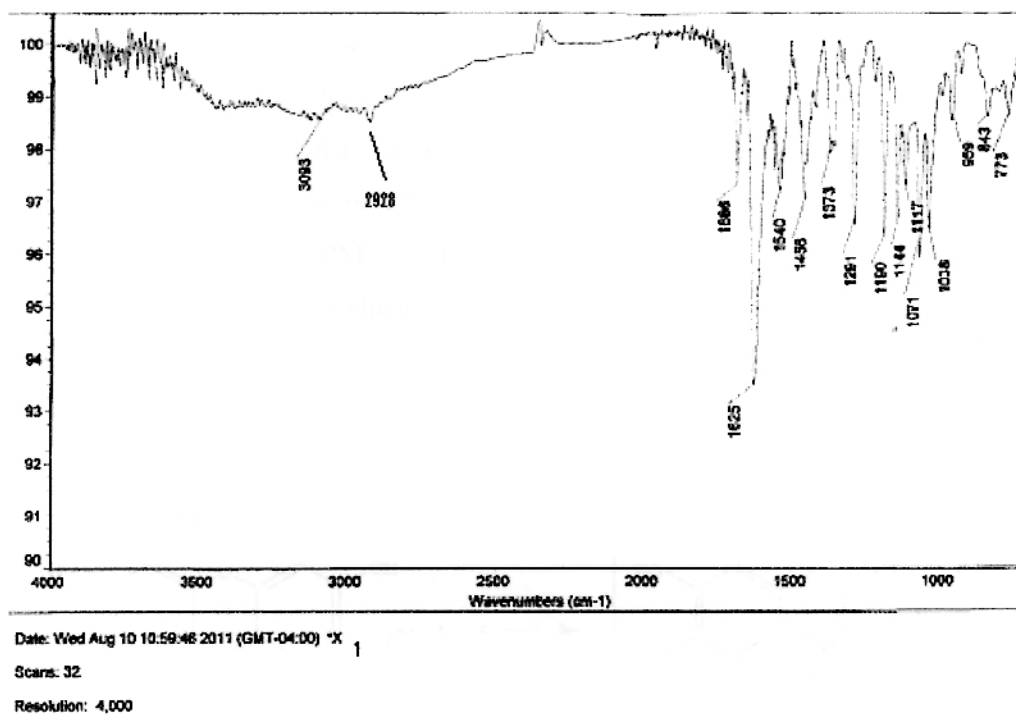


Figura 10.- Espectro de IR del compuesto X1

Tabla 2: Datos de IR del compuesto X1

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
3093	Alargamiento OH
2928	Flexión C-H Aromáticos
1625	Alargamiento $\text{C=O}$
1686	Alargamiento C – C Aromáticos
1373	Flexión O-H carbonílico

Comparando los datos con los de la literatura, el compuesto XI corresponde a la estructura del (+) ácido úsnico (Figura 3):

Se presenta como un sólido en forma de agujas de color amarillo.

Soluble en cloroformo, poco soluble en acetona y metanol

Presenta un punto de fusión de 204 – 205 °C.

Su rotación óptica lo cual nos dio  $[\alpha]^{25} = (+) 498$ .

IR (cm<sup>-1</sup>): 3093, 2928, 1625, 1373.

RMN <sup>1</sup>H (δ, ppm): 1,78 (s, -CH<sub>3</sub>); 5,99 (s, H-Ar); 13,30 (s, -OH); 11,06 (s, -OH);  
2,68 (s, -CH<sub>3</sub>); 2,70 (s, CH<sub>3</sub>); 2,12 (s, -CH<sub>3</sub>);

EM (m/z): C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>: PM= 344, 260 (45 %), 233 (100%), 217 (25%). Las fragmentaciones correspondientes se presentan en la Figura 11.

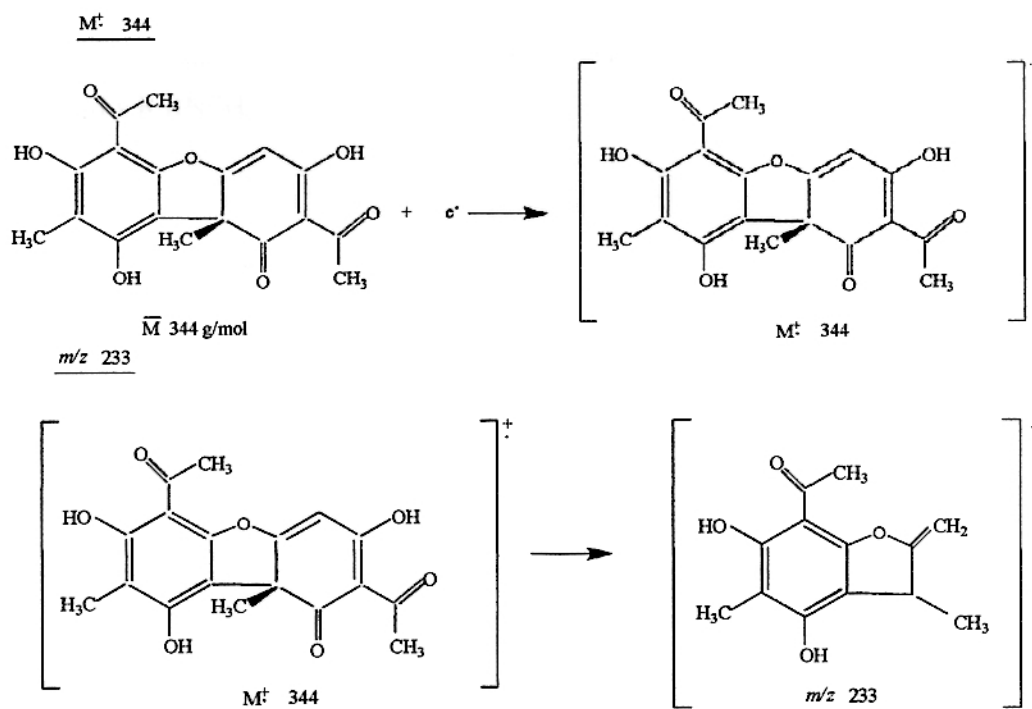


Figura 11.- Camino de fragmentación del ácido úsnico

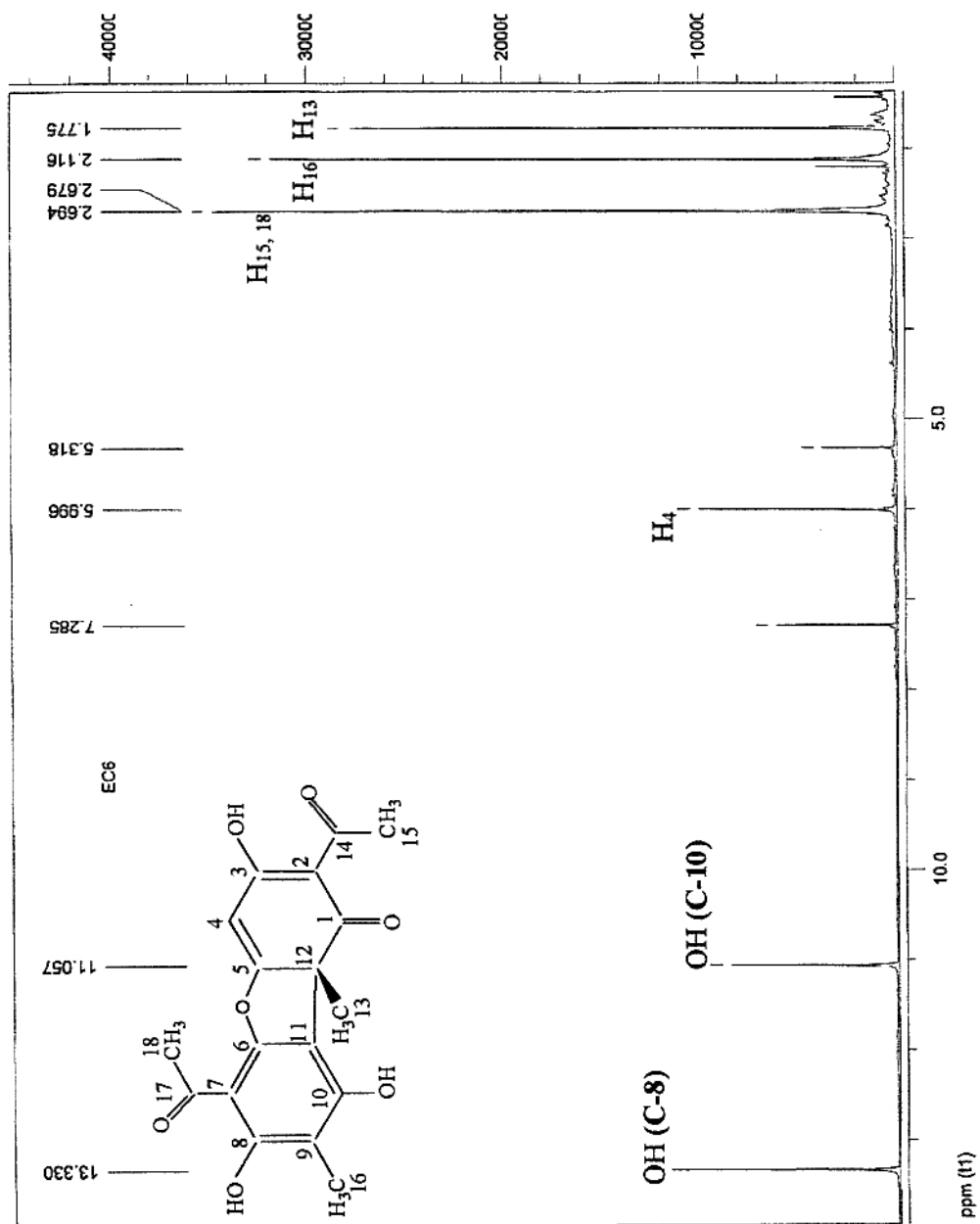


Figura 15.- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de F7

### 5.7.2 Cromatografía en columna-CC en Sephadex LH-20

Las fracciones F2, F3 y F7 que resultaron de la separación por Sephadex LH-20 fueron inyectadas al CG/EM confiriendo ser una mezcla de compuestos. Se decidió analizarlas estas fracciones por RMN  $^1\text{H}$ .

El cromatograma de la fracción F2 (Figura 12) resultó ser una mezcla de ácidos grasos insaturados que fue confirmado por el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 13). El cromatograma de la fracción F3 (Anexo 6) también resultó ser una mezcla de compuestos pero de ftalatos que fueron confirmados por RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 7). La fracción F7 mostró un cromatograma (Figura 14) donde el compuesto minoritario con tiempo de retención 22,43 min. y el análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  confirmó ser el ácido úsnico (Figura 15).

### 5.7.3 Cromatografía en columna-CC en Sílica gel

Actualmente las fracciones mayoritarias obtenidas están siendo analizadas por CG/EM y RMN  $^1\text{H}$ .

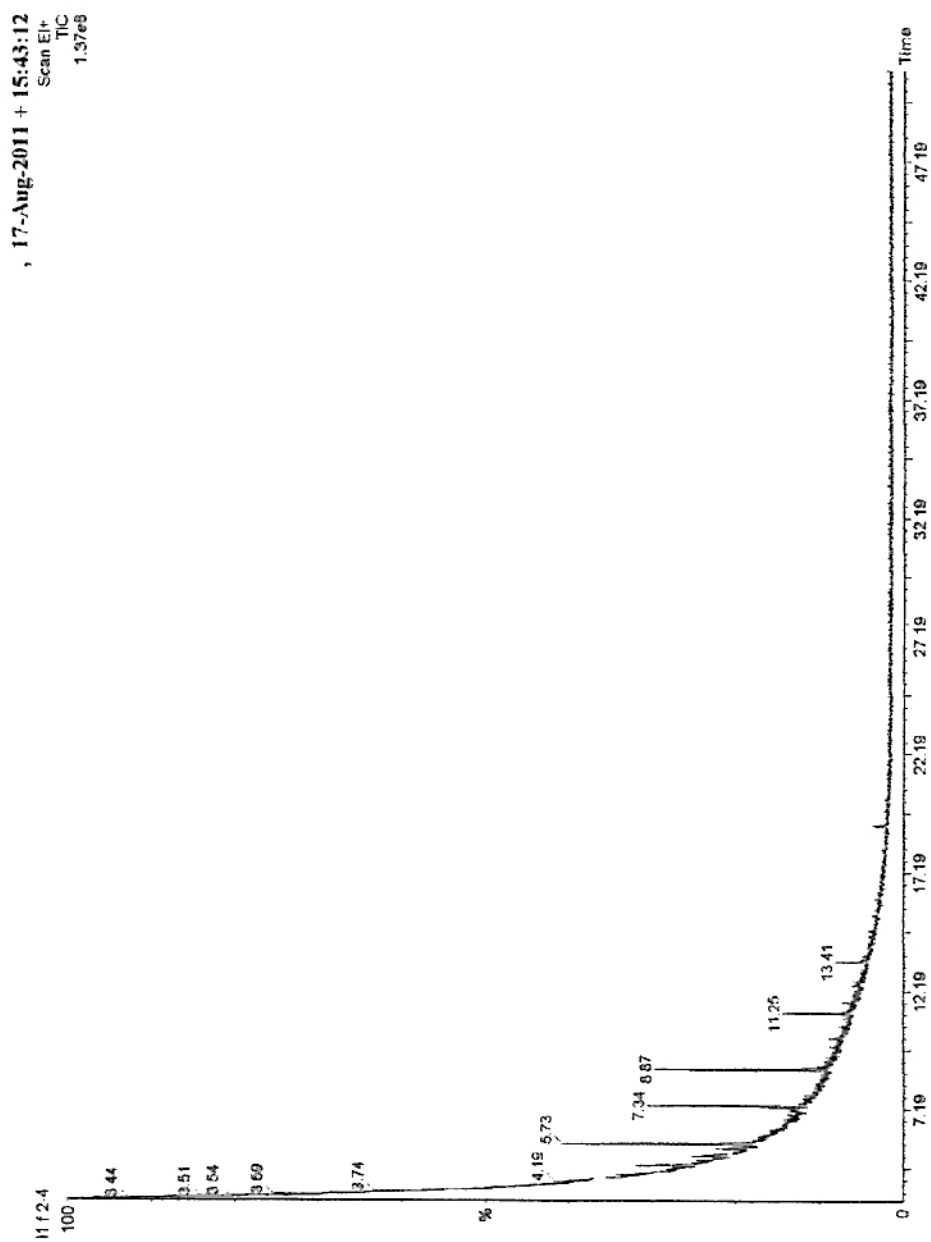


Figura 12.- Cromatograma CG/EM de F2

---

# CAPITULO III

---

## ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL LIQUEN

*Xanthomendoza mendozae*

---

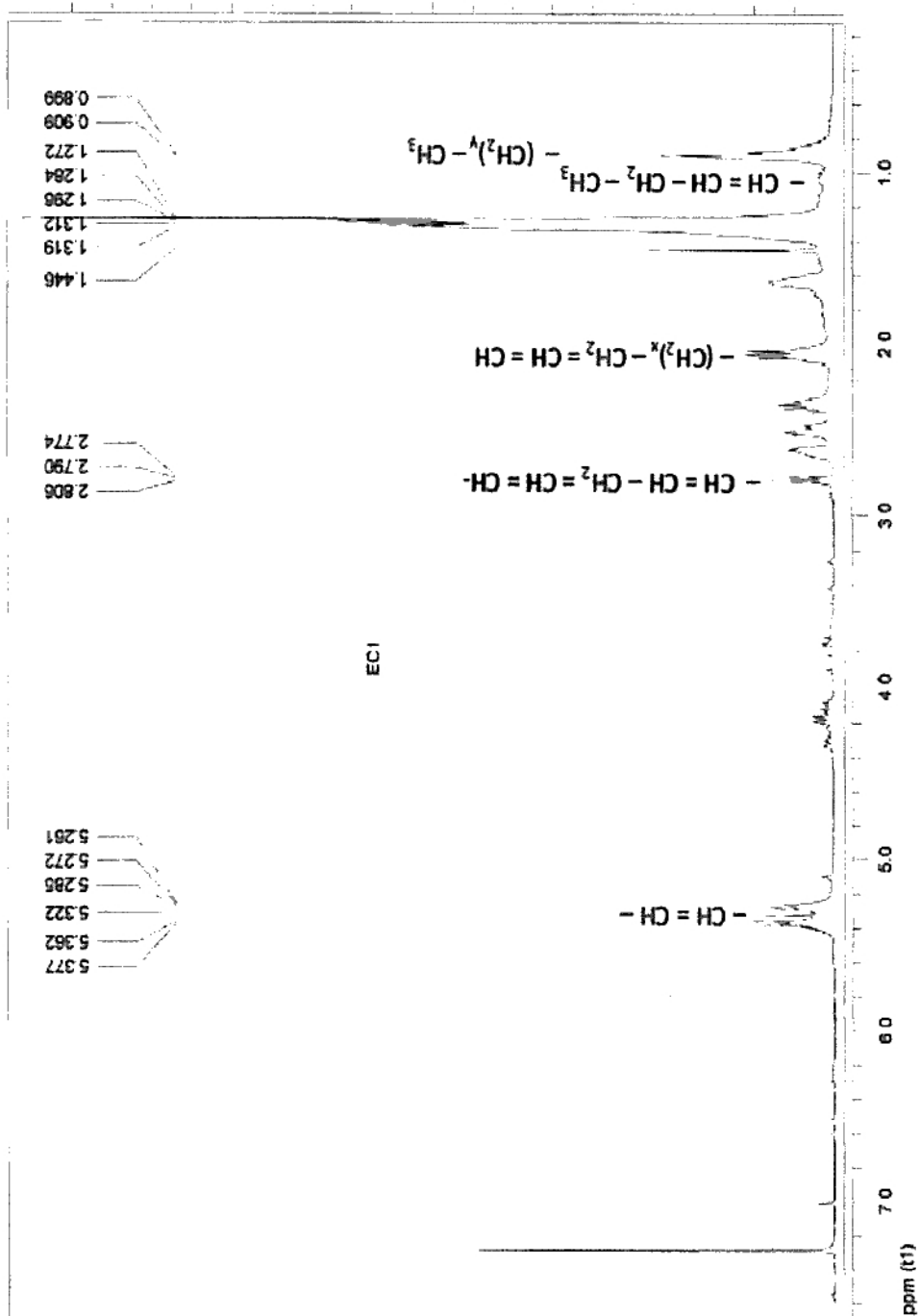


Figura 13.- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de F2

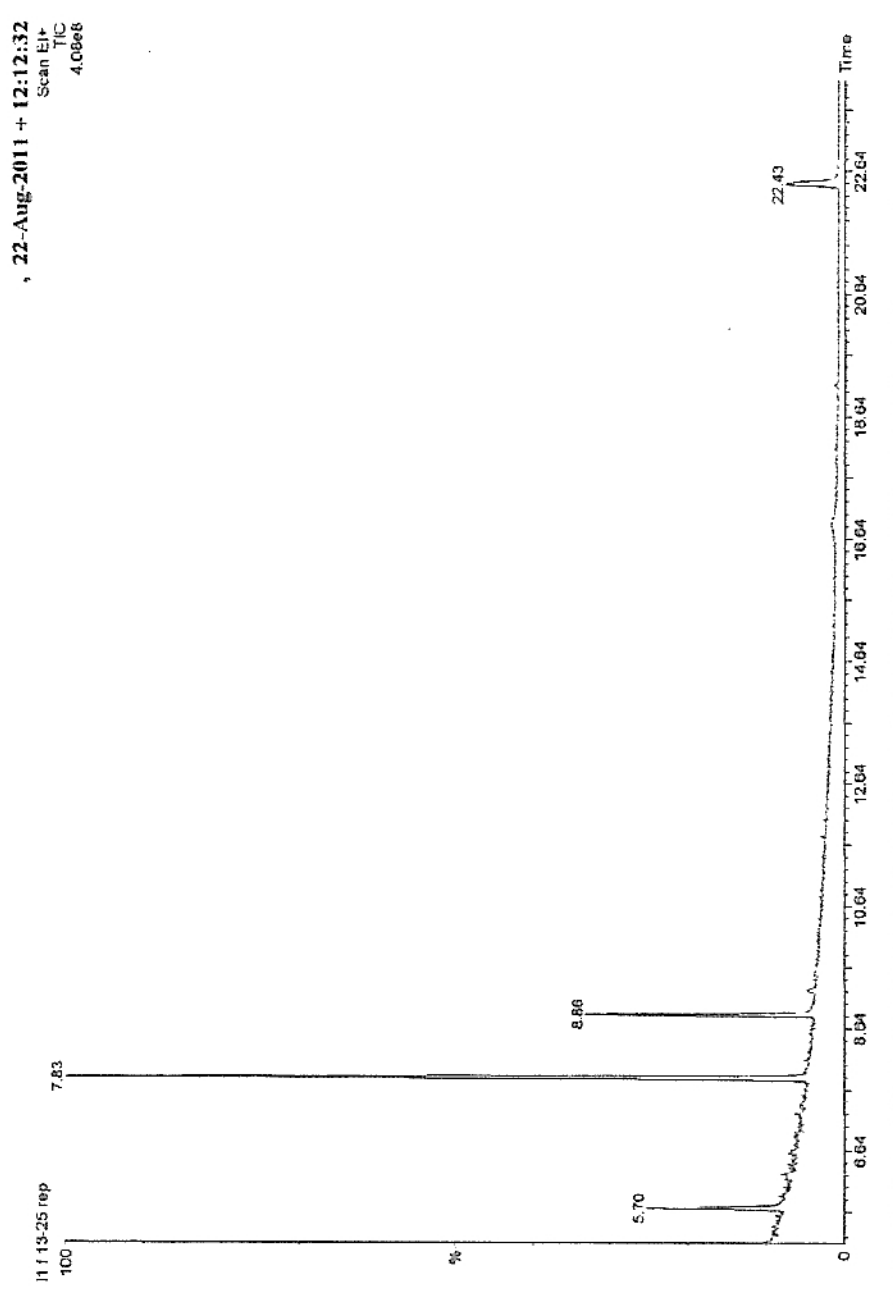


Figura 14 Cromatograma CG/EM de F7



## A. INTRODUCCIÓN

*Teloschistaceae* es una familia extensa con gran heterogeneidad morfológica y ecológica a través de géneros y grupos de especies [19].

Existe poca información al respecto del líquen de género *Xanthomendoza*. Se hizo una búsqueda bibliográfica profunda en bibliotecas (Biblioteca del Departamento de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica del Perú y Biblioteca de la Universidad Paulista (Brasil)) y bases de datos (Web of Science, Scirus, etc.) con la ayuda de amigos que viven el exterior (Dra. Ingrid Collantes Díaz\*) y con ocasión de la estadía de investigación que se realizó en el Instituto de Recursos Naturales de Química de la Talca (Talca-Chile), se completó la recopilación de referencias, en particular aquellas referidas al análisis espectroscópico de la estructura de los compuestos liquénicos.

No se ha encontrado un estudio acerca de la composición química de *X. mendozae*. Por lo que esta sería el primer trabajo relacionado a este líquen.

El líquen *X. mendozae* crece sobre rocas (Figura 16), fue identificado por el biólogo Ángel Ramirez del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (ver Anexo 8) y presenta la siguiente clasificación:

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Lecanoromycetes
Orden	Teloschistales
Familia	Teloschistaceae
Genero	Xanthomendoza
Especie	<i>Xanthomendoza mendozae</i>

\* Actualmente es profesora titular de la Universidad Paulista (São Paulo-Brasil).



**Figura 16.-** Líquen *X. mendozae* (Procedencia: Dist. Muquiyaayo, Prov. Jauja, Dpto. Junín, May'10) (Foto E. Cóndor)

## **B. PARTE EXPERIMENTAL**

### **1. EQUIPOS Y MATERIALES**

- **Instituto de Recursos Naturales de la Universidad de Talca (Chile)**
  - Espectrómetro de Masas, Bruker Amazon SL, Ion Trap mass spectrometer. Las muestras fueron disueltas en acetonitrilo, filtradas e inyectadas directamente al equipo.
  - Cromatógrafo de Gas: Perkin Elmer Turbo Mass . Autosystem XL
  - Espectrofotómetro Infrarrojo Nicolet Nexus 470 FT-IR (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA).
  - Lámpara UV 254 / 366 nm
  - Sephadex LH-20 (Pharmacia)
  - Sílica gel 60 (0.063-0.200 mm), Merck
- **Universidad de Chile (Santiago de Chile- Chile)**
  - Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance 400 (Bruker, Rheinstetten, Germany). Los desplazamientos químicos fueron dados en  $\delta$  (ppm) y se usó como estándar interno TMS. Las muestras fueron disueltas en  $\text{CDCl}_3$ .

- **Laboratorio de Investigación de Química de los Productos Naturales. Facultad de Ciencias (UNI- Perú)**

- Rotaevaporador Buch R-169

## 2. COLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El líquen fue colectado en el distrito de Muquiyauyo (3200 msnm), provincia de Jauja (Dpto. de Junín) el 28 de marzo del 2010 (primera recolección para los estudios preliminares) y el 15 de mayo del 2010 (segunda colecta para el aislamiento de compuestos liquénicos).

## 3. SECADO Y MOLIENDA DEL MATERIAL VEGETAL

El líquen se limpió cuidadosamente y se secó en una estufa “Labor” (Hungría) a 40 °C, disponiéndose al inicio de nuestro trabajo (Mayo 2010) de suficiente material seco. Esta muestra se pulverizó a grano fino en un molino doméstico “Moulinex” (750W).

## 4. ANALISIS CUALITATIVO (Marcha fitoquímica)

**4.1 Muestra:** 6 g del líquen, *X. mendozae*. Se realizaron dos análisis, con resultados similares:

i Primer análisis: 30 Abr.- 15. Jun. 2010

ii Segundo análisis: 06 - 13. Ago.2010

**4.2 Procedimiento:** Reyna (1999), de acuerdo a Rondina & Coussio (1969) (ver Anexo 3).

**4.3 Resultados** (Ver Anexo 9)

En resumen los resultados fueron los siguientes:

- i. **Contiene:** Aminogrupos primarios o secundarios (+), grupos fenólicos libres (+), taninos (++) , alcaloides (+), quinonas, antranas y antranoles (+++), triterpenos y esteroides (+) y catequinas (+).

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

- ii. **No contiene:** Flavonoides, saponinas y leucoantocianidinas

## 5. OBTENCIÓN DEL LOS EXTRACTOS Y AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS

**5.1 Material vegetal:** 50 g del líquen *X. mendozae*

**5.2 Extracción sólido– líquido: Obtención del Extracto Bruto Orgánico (EBO) (2.Sep.'10 - Ene'11)**

La muestra del líquen seco y molido se maceró en acetona (100 mL) por tres veces a temperatura ambiente, obteniéndose un volumen total de aproximadamente 300 mL. Estos extractos acetónicos, se concentraron en rotaevaporador, para obtener un extracto bruto orgánico de color verde oscuro (masa aproximada 2,1g).

**5.3 Análisis preliminar por cromatografía en capa fina – CCF**

Para tener una idea general del extracto se decidió hacer CCF. La elección del eluyente fue importante para posterior purificación del extracto bruto orgánico ya sea por cromatografía en columna (CC) y/o cromatografía en placa preparativa (CPP).

i Muestra: Extracto Bruto Orgánico (EBO), obtenida en la Sec.5.2 precedente.

ii Referencia: no se dispuso de patrón de compuestos líquénicos.

iii Observaciones: se realizaron cromatografías en placa fina observándose en general que el extracto contenía hasta 9 manchas (se usó como revelador *p*-anisaldehído en calor) y se decidió realizar una separación con Sephadex LH-20 .

**5.4 Purificación por cromatografía (16. – 26.Ago'11)**

Los procedimientos cromatográficos que se realizaron para la purificación de los compuestos del extracto bruto de la *X. mendozae* fueron:

i Análisis preliminar: Cromatografía de capa fina-CCF (ver Sec. 5.3).

ii Cromatografía en columna-CC (ver Sec. 5.5).

Esta etapa del trabajo se realizó durante la estadía de investigación en el Laboratorio del Instituto de Recursos Naturales de la Universidad de Talca (Talca-Chile), bajo la asesoría de la Dra. María del Pilar Caramantín Soriano y el Dr. Guillermo Schmeda, del 9 de Agosto al 26 de Agosto del presente.

**5.5 Cromatografía en columna-CC en Sephadex LH-20**

El objetivo de este procedimiento cromatográfico, es obtener fracciones enriquecidas, y si fuera posible puras, del compuesto que se quiere purificar.

- i Muestra: EBO (aproximadamente 0,670 g\*), obtenida en la Sec.5.2.
- ii Características de la columna:  $\phi_i = 4$  cm,  $h = 69,5$  cm; altura de la Sephadex LH -20 31 cm.
- iii Adsorbente : Sephadex LH-20
- iv Eluentes utilizados: diclorometano:metanol:éter (1:1:1)  
metanol (para limpiar el sephadex)

iv Procedimiento

- El extracto bruto orgánico se disolvió con 10 mL de la mezcla de solvente diclorometano: metanol: éter (1:1:1) y se trasvasó en la superficie de la columna, procediéndose a pasar el eluente. (Figura 17).
- Se recolectaron 57 fracciones, de las cuales después de realizar una cromatografía en placa fina se juntaron en 6 fracciones de la siguiente manera:

f1	=	7,3 mg	f4	=	162, 3 mg
f2	=	17,4 mg	f5	=	185,1 mg
f3	=	1,8 mg	f6	=	106, 1 mg

Al realizar la cromatografía en capa fina nos permitió no sólo realizar las uniones de fracciones, sino que observar interesantes manchas que corresponderían a posibles compuestos, por lo que se inyectaron al CG/EM las fracciones f1, f4, f5 y f6.

Debido a la alta polaridad que presentan los compuestos por cromatografía en capa fina, se procedió a realizar la derivatización del extracto para proceder a separar en sílica gel, por ello se realizó la acetilación del extracto (ver Anexo 5).

---

\* La cantidad de EBO orgánico fue de 2,1 g, pero se utilizó sólo 0,670 g.



**Figura 17.- Columna cromatográfica del EBO**  
(Foto E. Córdor)

### 5.6 Cromatografía en columna-CC en Sílica gel

- i Muestra: EBO acetilado (Anexo 5) (aproximadamente 0,5012 g)\*, obtenida precedentemente.
- ii Características de la columna:  $\phi_i = 2,5$  cm,  $h = 67,5$  cm; altura de la sílica gel = 24,5 cm.
- iii Adsorbente: Sílica Gel

---

\* El peso de este EBO era de 2,1 g, pero sólo se separó 0,5012g para la acetilación para luego ser utilizada en la columna.

iv Procedimiento

- El extracto bruto orgánico acetilado se trasvasó en un balón de 200 mL y se adicionó, aproximadamente, 5 g de sílica y 100 mL de cloroformo y se concentró para realizar una papilla homogénea, hasta llevar a sequedad.
- En la columna se agregó la sílica gel junto con el éter de petróleo hasta cubrir el empaque.
- La papilla se trasvasó sobre la parte superior del empaque de sílica gel (en la columna) que contenía un poco de éter de petróleo (0,2cm de altura). Finalmente se colocó una capa de algodón, para proteger la capa de muestra.
- Se agregó cuidadosamente el primer eluyente, éter: acetato de etilo (6:4); y se procedió a coleccionar fracciones de aproximadamente 10 mL en tubos de ensayo.
- Conforme se iban corriendo la columna cromatográfica se aumentó la polaridad del eluyente utilizándose los siguientes eluentes: éter: acetato de etilo (1:1); éter: acetato de etilo (4:6); acetato de etilo y finalmente metanol. (Figura 18).
- Se recolectaron 146 fracciones, de las cuales después de realizar una cromatografía en placa fina se juntaron en 12 fracciones de la siguiente manera:

q <sub>1</sub>	=	15,9 mg	q <sub>7</sub>	=	18,7 mg
q <sub>2</sub>	=	1,4 mg	q <sub>8</sub>	=	2,2 mg
q <sub>3</sub>	=	3,5 mg	q <sub>9</sub>	=	6,3 mg
q <sub>4</sub>	=	0,7 mg	q <sub>10</sub>	=	2,7 mg
q <sub>5</sub>	=	118,6 mg	q <sub>11</sub>	=	82 mg
q <sub>6</sub>	=	10,3 mg	q <sub>12</sub>	=	154 mg

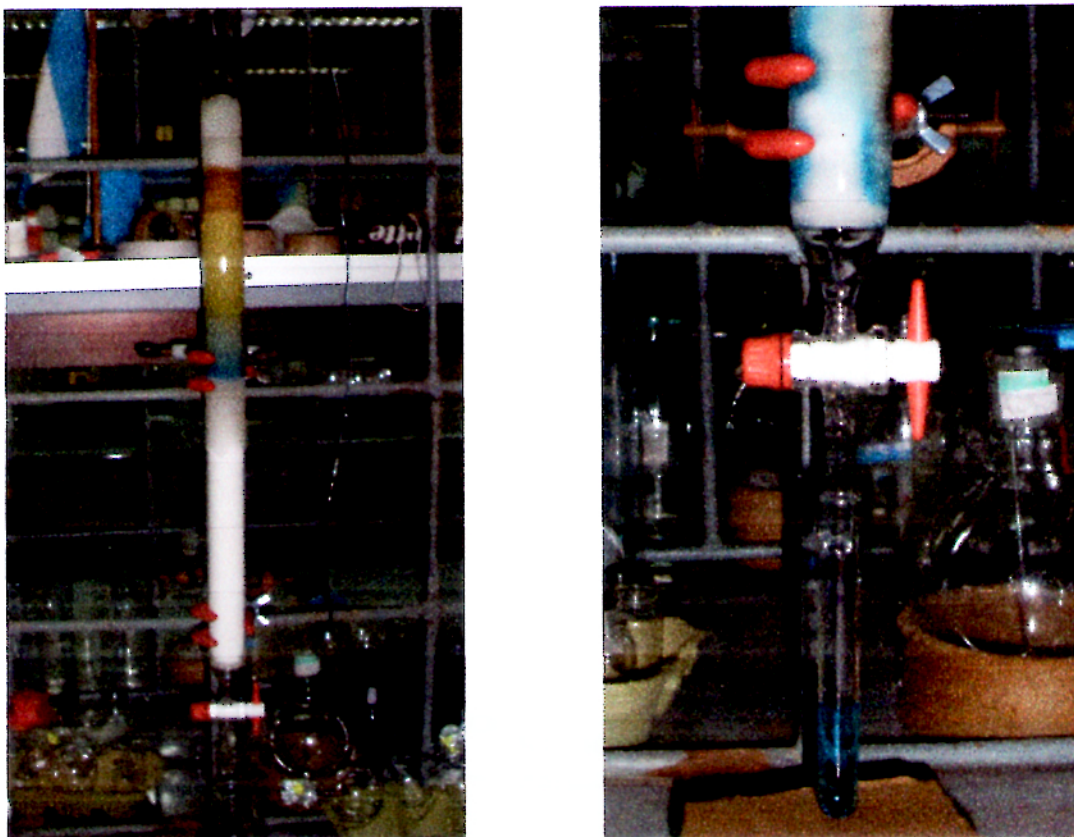


Figura 18.- Columna cromatográfica del EBO acetilado (Foto M. Caramantín)

## 5.7 Resultados y discusiones:

### 5.7.1 Cromatografía en columna-CC en Sephadex LH-20

Las fracciones f1, f4, f5 y f6 que resultaron de la separación por Sephadex LH-20 fueron inyectadas al CG/EM mostraron mezcla de compuestos aparentemente interesantes por lo que se decidió analizarlas por RMN  $^1\text{H}$ .

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción f1 muestra que se trata de una mezcla de ácidos grasos insaturados (Figura 19).



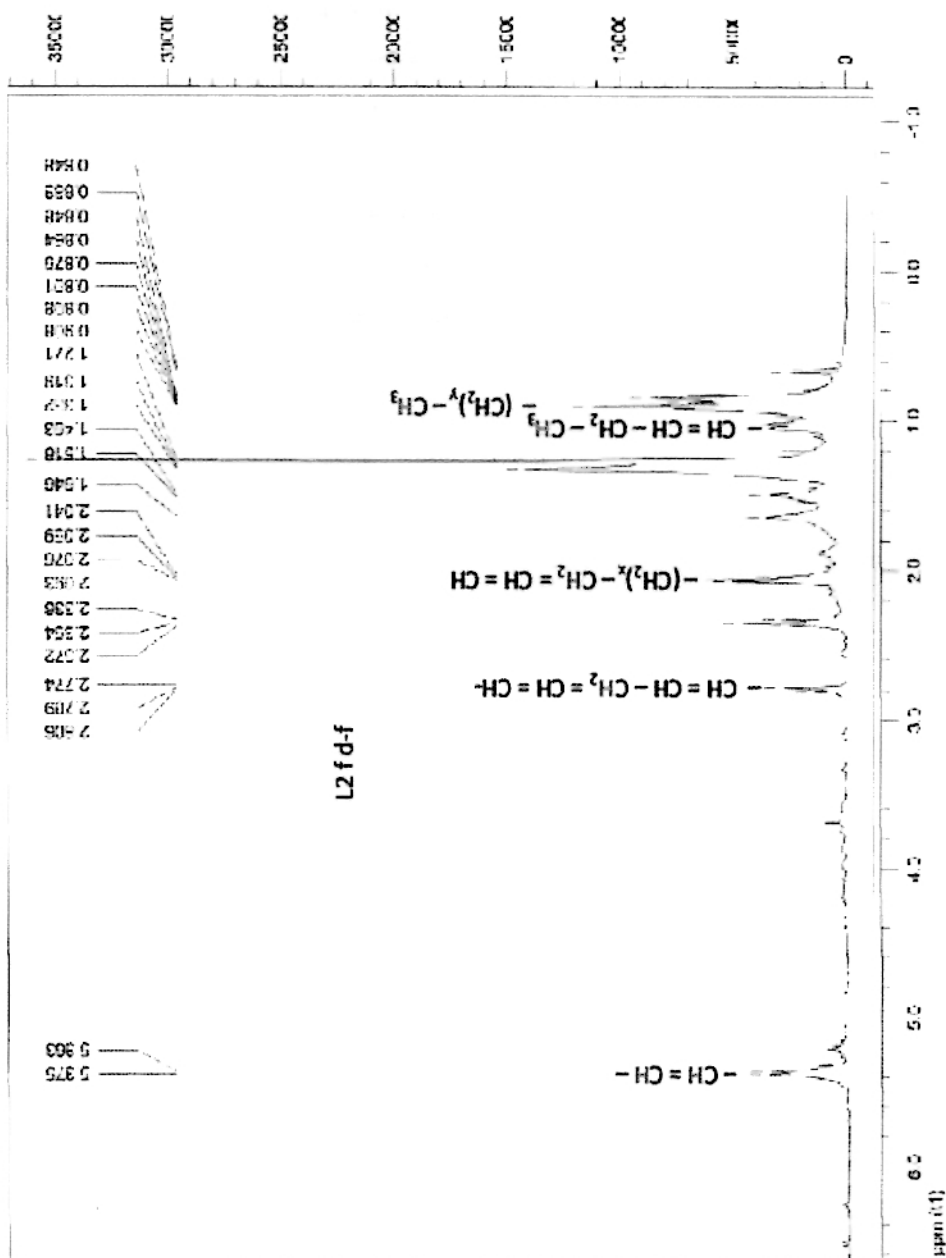


Figura 19.- Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 12fd-f

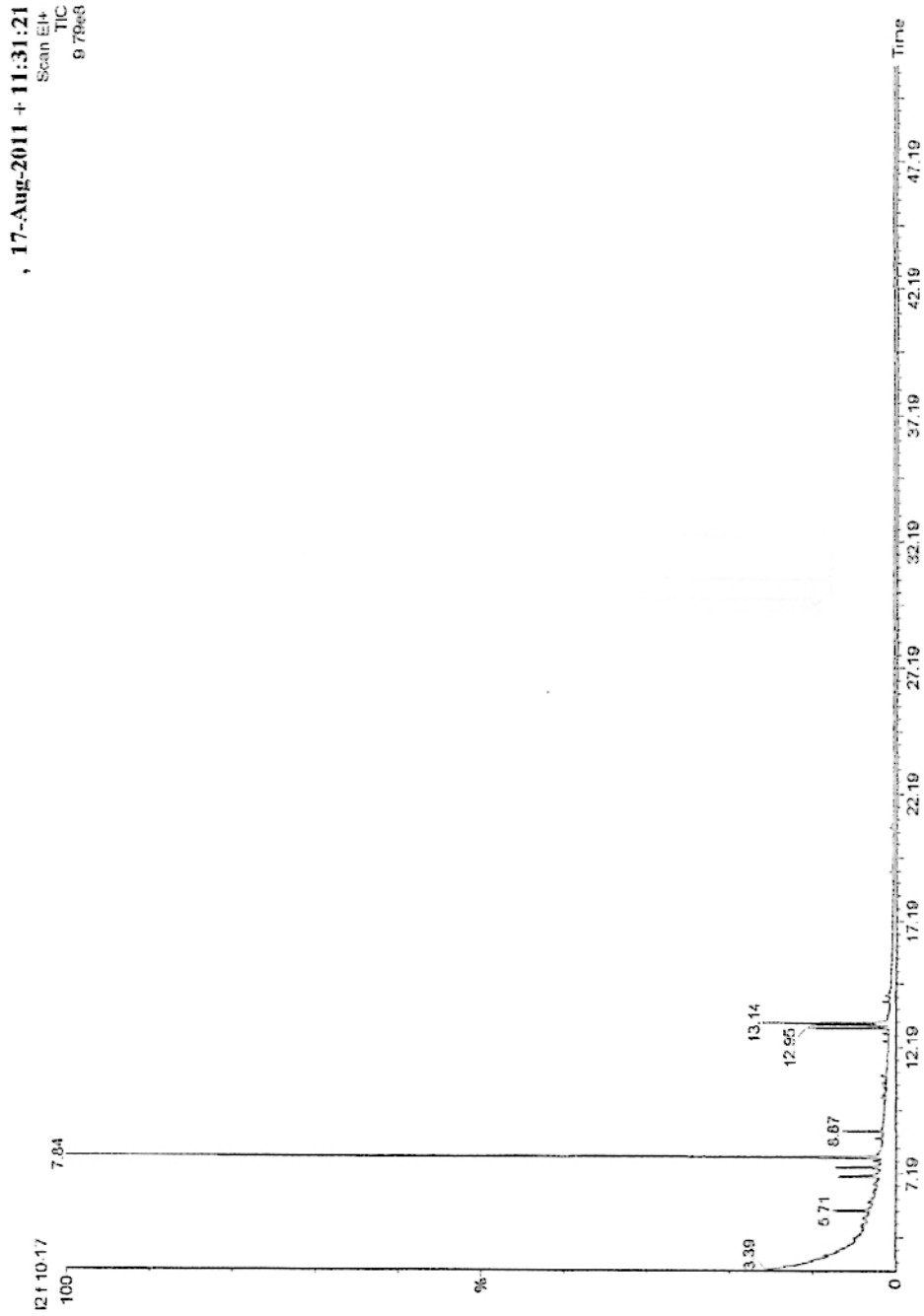


Figura 20.- Cromatograma CG/EM de f4

Por otro lado, el cromatograma de la fracción f4 (Figura 20) revela la presencia de un compuesto mayoritario. Esta fracción fue analizado por RMN  $^1\text{H}$  (Figura 21) y aparentemente se trataría de la antraquinona parietina (fisciona). Para verificarlo, la fracción f4 fue acetilada y caracterizada por sus espectros de RMN mono y bidimensional. Más adelante se relatarán estos datos.

Por otro lado, el cromatograma de la fracción f5 (ver Anexo 10) resultó ser la mezcla de dos compuestos cuyo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (ver Anexo 11) presenta señales que llevarían a pensar que se trata de estructuras que guardan relación con el esqueleto de la parietina. Actualmente se está trabajando en la purificación y elucidación de estos compuestos. El cromatograma de la fracción f6 (ver Anexo 12) también resultó ser la mezcla de dos compuestos. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de esta fracción (ver Anexo 13) mostró señales interesantes que se decidió acetilarla. Actualmente se está trabajando en esto.

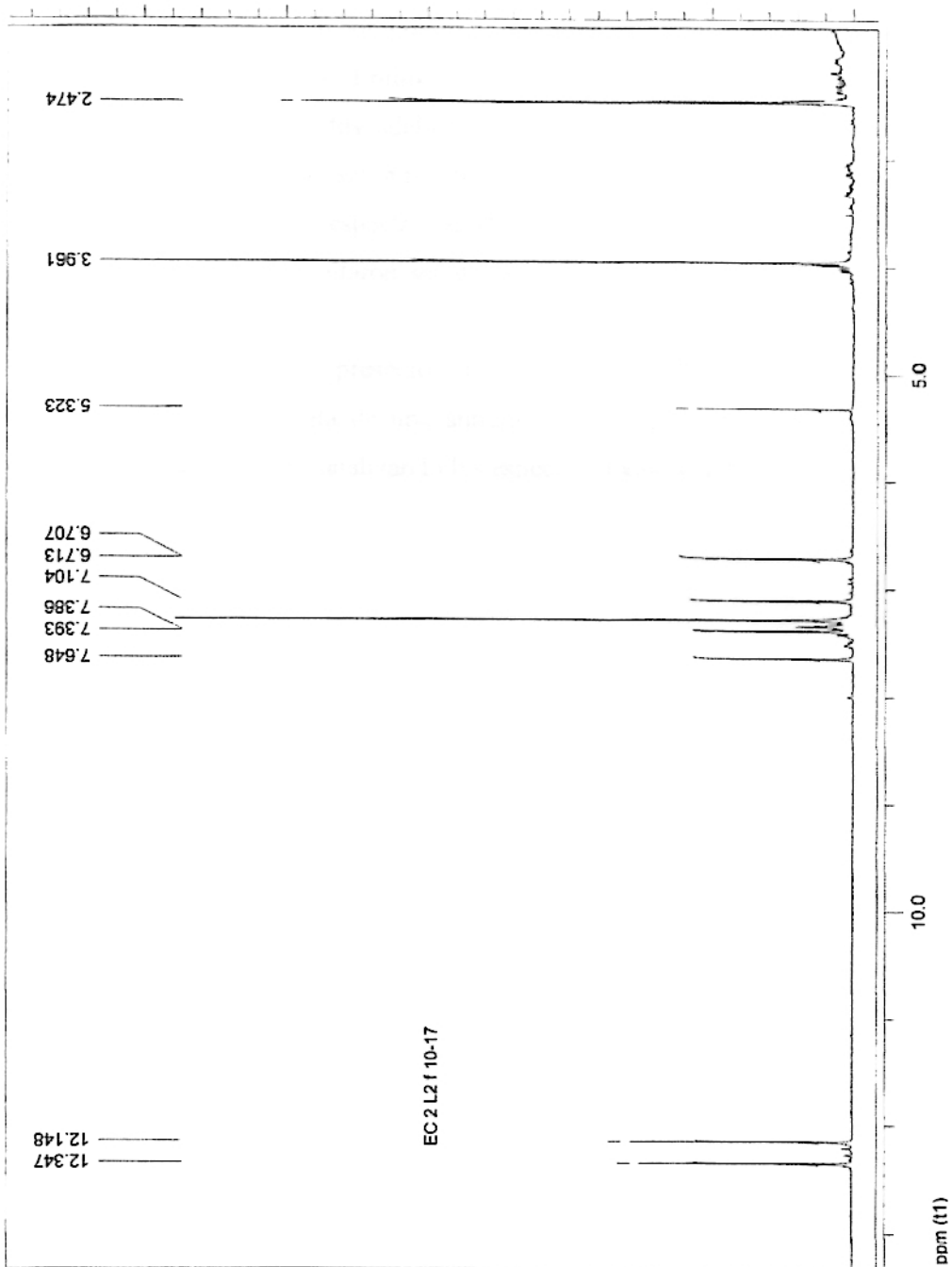


Figura 21.- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) f4

### 5.7.2 Cromatografía en columna-CC de Sílica gel

Las fracciones q<sub>1</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>7</sub>, q<sub>9</sub> y q<sub>10</sub> obtenidas fueron analizadas por RMN <sup>1</sup>H. El espectro de RMN <sup>1</sup>H de la fracción q<sub>1</sub> presentó señales predominantes de ácidos grasos insaturados (Figura 22). La fracción q<sub>3</sub> mostró un espectro de RMN <sup>1</sup>H poco interesante que se descartó esa fracción. La fracción q<sub>5</sub> presentó un espectro de RMN <sup>1</sup>H de apenas un compuesto con señales parecidas a la fracción f4 obtenida por columna en sephadex. Entonces, se decidió obtener los espectros de RMN <sup>13</sup>C, HMBC, IR y EM. Más adelante se describirá la elucidación estructural de este compuesto que resultó ser la parietina acetilada.

El análisis de los espectro de RMN <sup>1</sup>H de las fracciones q<sub>7</sub> (ver Anexo 14) y q<sub>9</sub> (ver Anexo 15), resultaron ser una mezcla de compuestos. Estas fracciones están siendo purificadas.

La fracción q<sub>10</sub> presentó un espectro de RMN <sup>1</sup>H (ver Anexo 16) que aparentemente se trata de una antraquinona de estructura parecida a la parietina. Actualmente se están analizando los espectros mono y bidimensionales.

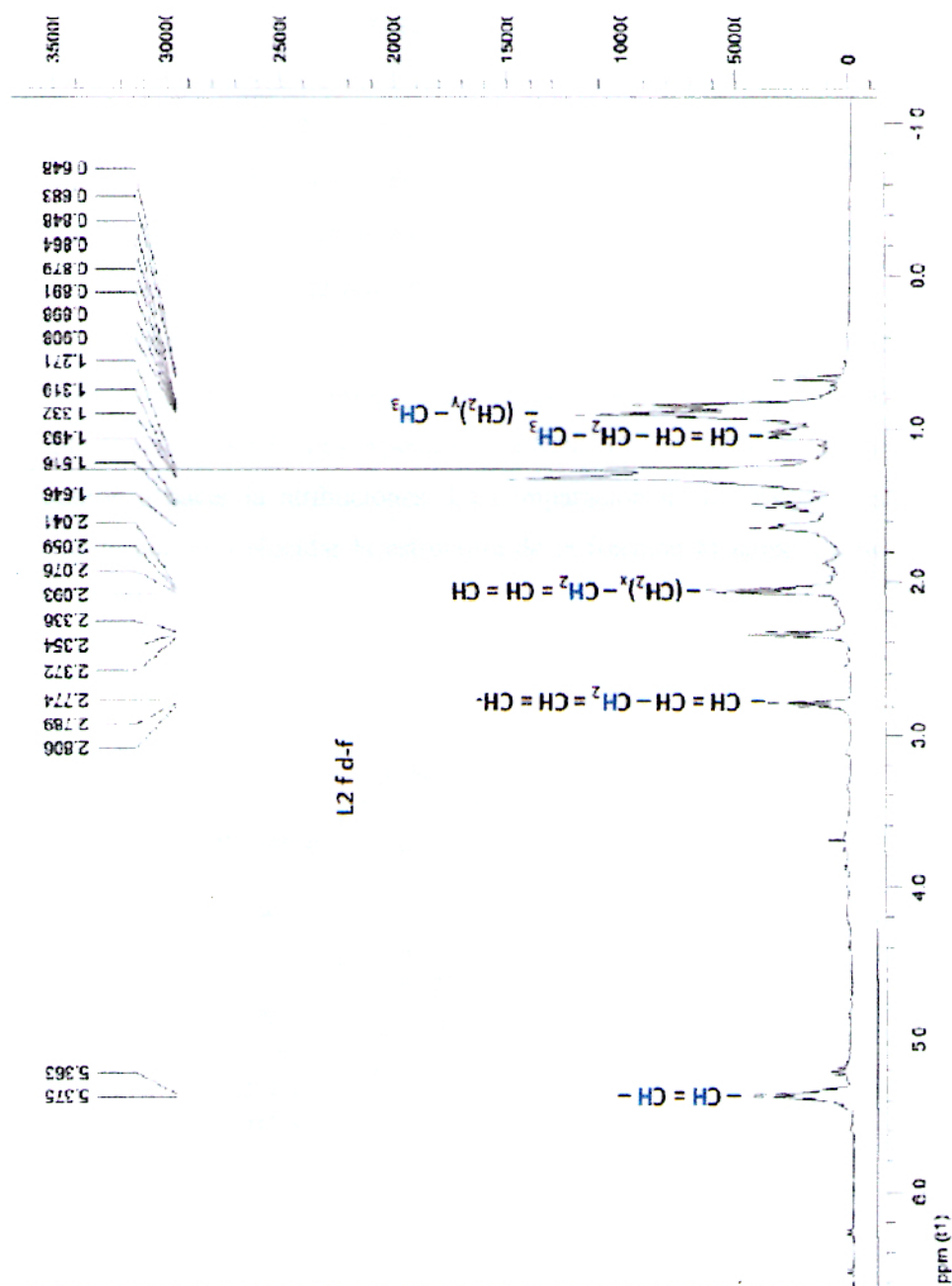
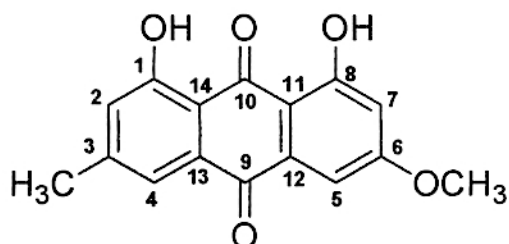


Figura 22.- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de q1

## 5.7.3 Elucidación Estructural de la Parietina (Fisciona)



Estructura de la Parietina

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 21) de la fracción f4 mostró que se trataba de apenas un compuesto. Se observó dos singuletes, uno a  $\delta$  2,47 atribuido a un grupo metilo y el otro a  $\delta$  3,96 designándose a un grupo metoxilo. Marcadamente se observan dos protones de hidroxilos en  $\delta$  12,15 y 12,35. También están presentes señales característica de cuatro protones aromáticos, siendo dos protones en *orto* [ $\delta$  6,71 (*d*,  $J = 2,4$  Hz) y 7,10 (*s*)] y dos en *para* [7,64 (*s*), 7,39 (*d*,  $J = 2,4$  Hz)] a grupos fenólicos (ver Tabla 3). Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , HMBC, IR y EM de f4 acetilado ayudaron a hacer la atribuciones. La comparación de los datos obtenidos con la literatura permitió elucidar la estructura de la fracción f4 como siendo la parietina [20, 21, 22].

Tabla 3: Datos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de f4

	Wang, W. <i>et al</i> (2011)	Fracción f4
Posición	$\delta_{\text{H}}$ ( $J_{\text{HH}}$ , Hz)	$\delta_{\text{H}}$ ( $J_{\text{HH}}$ , Hz)
2	7,08 <i>s</i>	7,10 <i>s</i>
4	7,63 <i>s</i>	7,64 <i>s</i>
5	7,37 <i>d</i> (2,4)	7,39 <i>d</i> (2,4)
7	6,69 <i>d</i> (2,4)	6,71 <i>d</i> (2,4)
6	2,46 <i>s</i>	2,47 <i>s</i>
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3,94 <i>s</i>	3,96 <i>s</i>
<b>OH-1</b>	12,11 <i>s</i>	12,15 <i>s</i>
<b>OH-8</b>	12,31 <i>s</i>	12,35 <i>s</i>

### 5.7.4 Elucidación Estructural de la Parietina acetilada

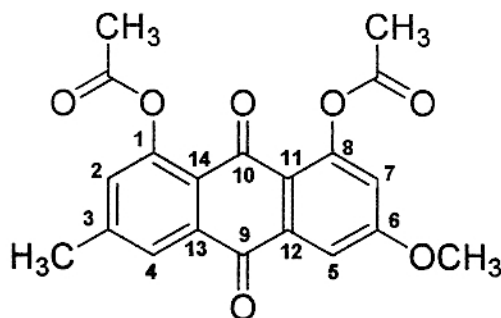


Figura 23.- Estructura de la Parietina acetilada

El espectro de IR (Figura 24) de la fracción  $q_5$  mostró bandas características de varios grupos carbonilos en la región de  $1600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ . Asimismo, se observaron bandas de la presencia de anillos aromáticos ( $3086$ ,  $1604$ , y  $1553 \text{ cm}^{-1}$ ). Ver Tabla 4.

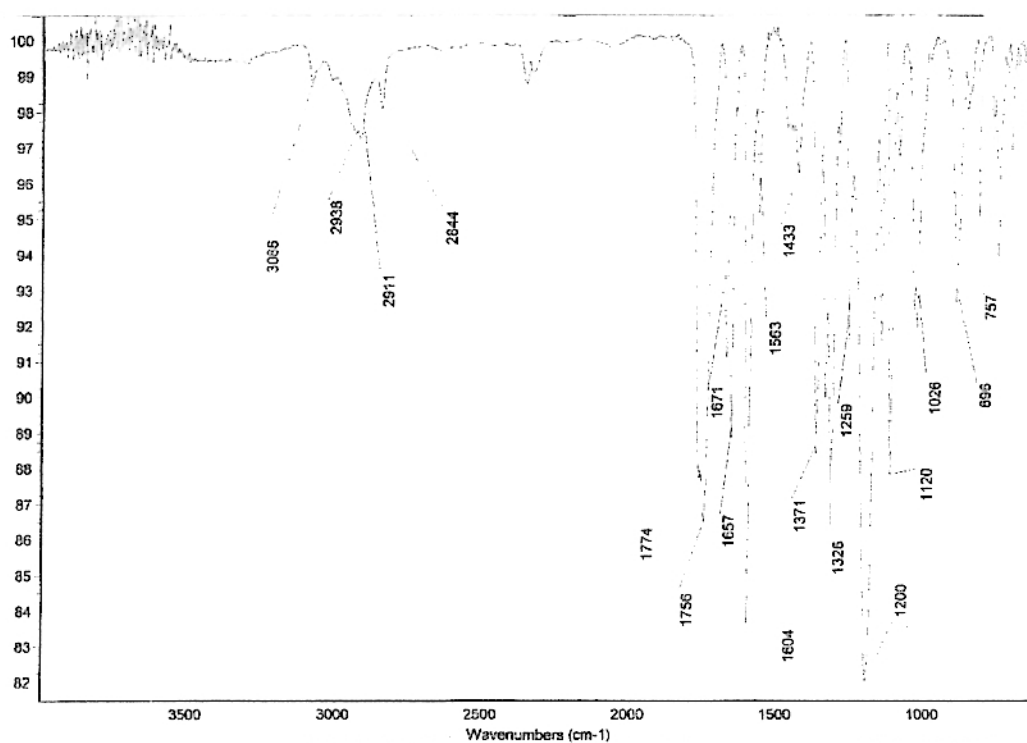


Figura 24.- Espectro de IR de  $q_5$



Tabla 4: Datos de IR de q<sub>5</sub>

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3086	$\nu$ (C=CH) aromático
2928	$\nu$ (CH <sub>3</sub> ) asimétrico
2844	$\nu$ (CH <sub>3</sub> ) asimétrico
1774	$\nu$ (C=O) conjugado y libre
1671	$\nu$ (C=O) conjugado y libre
1657	$\nu$ (C=O) conjugado y libre
1604	$\nu$ (C=C) aromático
1553	$\nu$ (C=C) aromático

El espectro de RMN <sup>1</sup>H de la fracción q<sub>5</sub> (Figura 25) mostró ser un compuesto puro (ver Tabla 5). En el espectro se observó señales características de los grupos OCOCH<sub>3</sub> en  $\delta$  2,43. Las otras señales son parecidas a los de la parietina natural, descrito arriba.

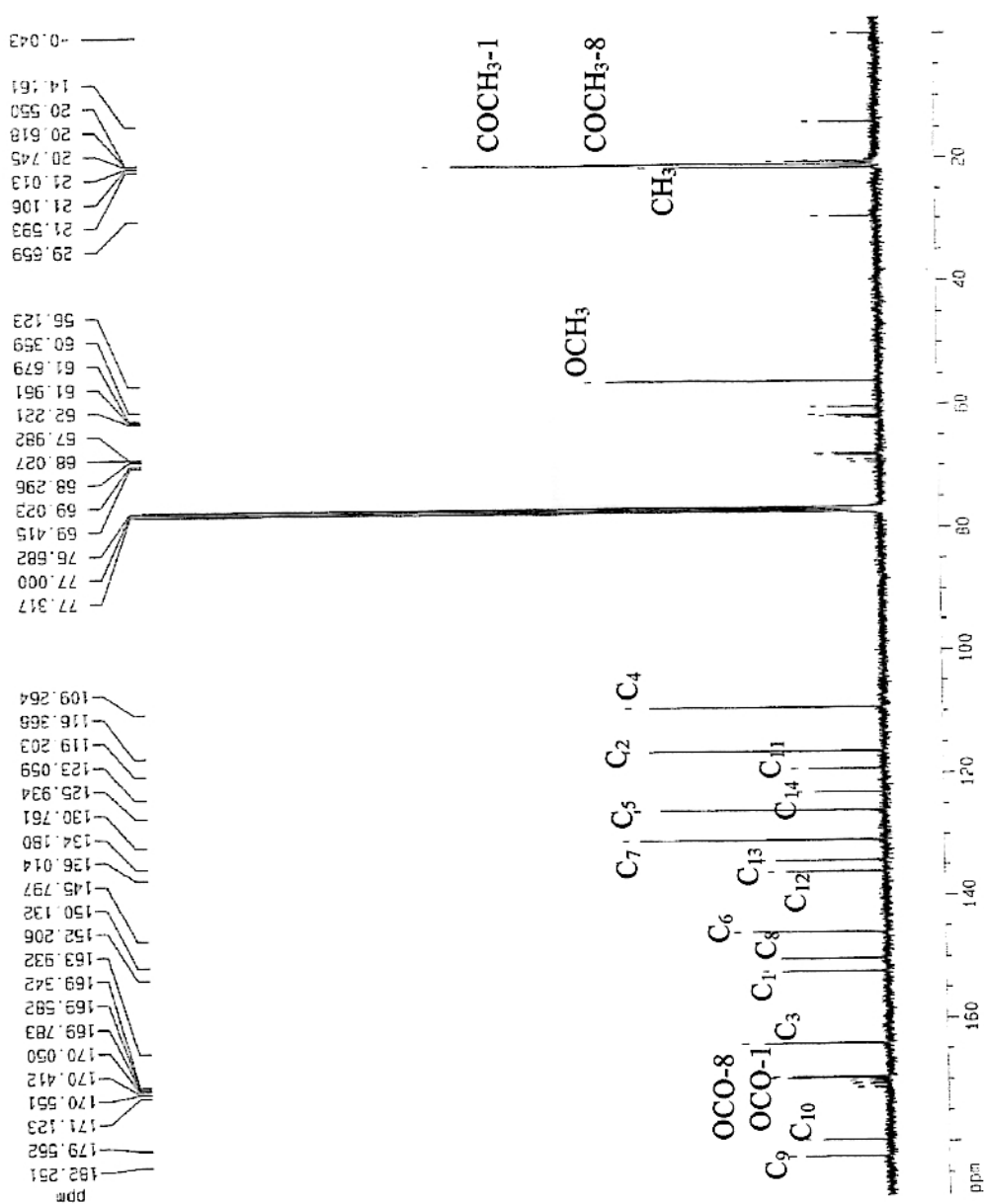


Figura 27.- Espectro de R MN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **q5**

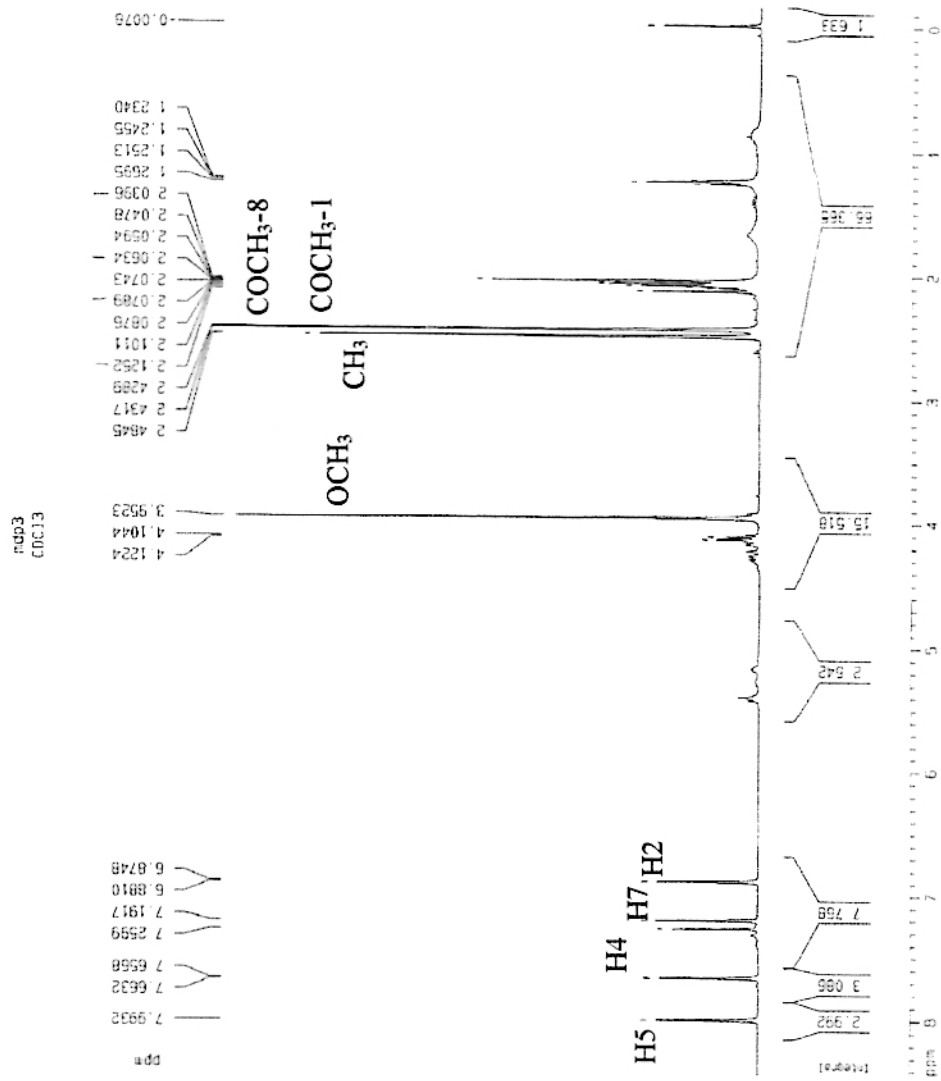


Figura 25.- Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de q5

Tabla 5: Datos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de q5

Posición	Vila <i>et. al</i> (2006)		Fracción q5	
	$\delta_{\text{H}}$ ( $J_{\text{HH}}$ , Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J_{\text{HH}}$ , Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	152.3	-	152.21 <i>s</i>
<b>2</b>	6.9 <i>d</i> (2.7)	116.4	6.88 <i>d</i> (2.5)	116.37 <i>d</i>
<b>3</b>	-	164.0	-	163.93 <i>s</i>
<b>4</b>	7.7 <i>d</i> (2.7)	109.3	7.66 <i>d</i> (2.5)	109.26 <i>d</i>
<b>5</b>	8.0 <i>d</i> (0.2)	126.0	7.99 <i>d</i> (0.6)	125.93 <i>d</i>
<b>6</b>	-	145.8	-	145.80 <i>s</i>
<b>7</b>	7.2 <i>d</i> (0.2)	130.8	7.26 <i>d</i> (0.6)	130.76 <i>d</i>
<b>8</b>	-	150.2	-	150.13 <i>s</i>
<b>9</b>	-	182.3	-	182.25 <i>s</i>
<b>10</b>	-	179.6	-	179.56 <i>s</i>
<b>11</b>	-	119.3	-	119.20 <i>s</i>
<b>12</b>	-	136.1	-	136.01 <i>s</i>
<b>13</b>	-	134.2	-	134.18 <i>s</i>
<b>14</b>	-	123.1	-	123.06 <i>s</i>
<b>CH<sub>3</sub></b>	2.5 <i>s</i>	21.6	2.48 <i>s</i>	21.60 <i>c</i>
<b>OCH<sub>3</sub></b>	4.0 <i>s</i>	56.1	3.95 <i>s</i>	56.12 <i>c</i>
<b>COCH<sub>3</sub>-1</b>	2.4 <i>s</i>	21.1	2.43 <i>s</i>	21.01 <i>c</i>
<b>COCH<sub>3</sub>-8</b>	2.4 <i>s</i>	21.1	2.43 <i>s</i>	21.11 <i>c</i>
<b>OCO-1</b>	-	169.6	-	169.58 <i>s</i>
<b>OCO-8</b>	-	169.3	-	169.34 <i>s</i>

El espectro de masas (Figura 26) fue importantísimo en la elucidación estructural, el ion molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 369$  dio la masa molecular.

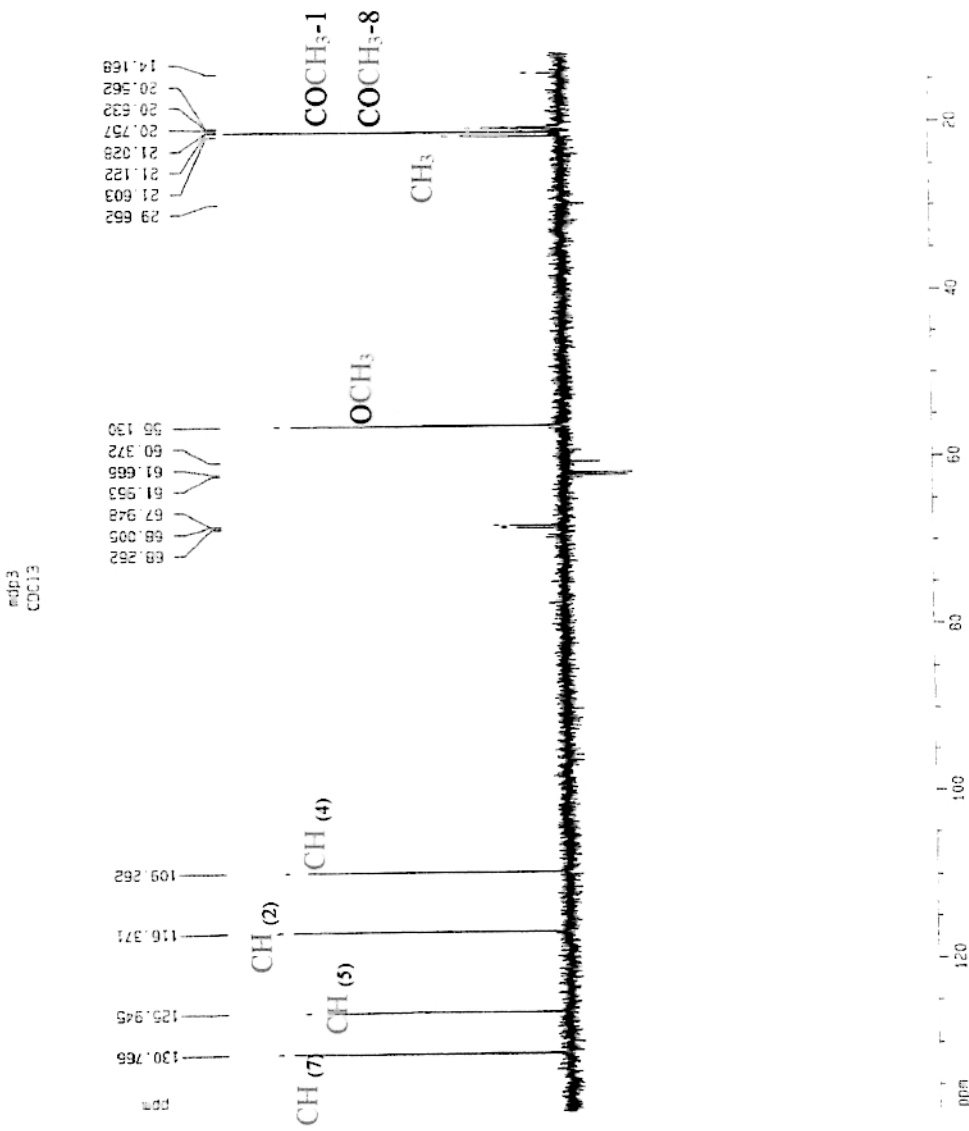
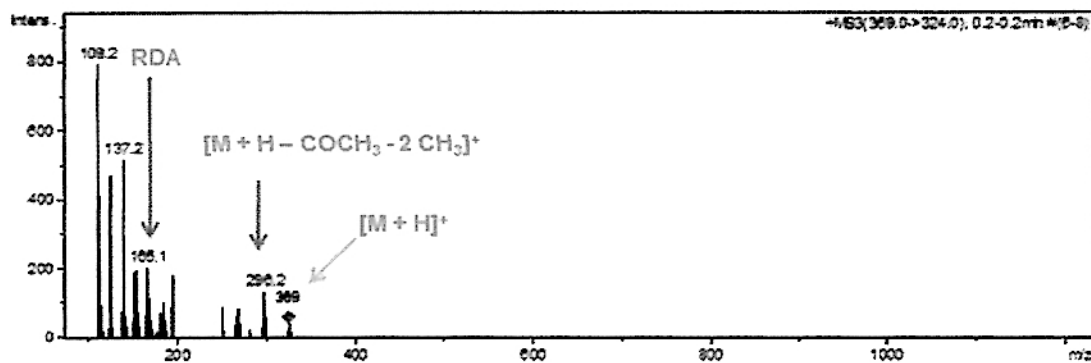


Figura 28.- Espectro RMN <sup>13</sup>C-DEPT (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 4s



**Figura 26.- Espectro de Masas de q5**

El análisis de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 27), DEPT (Fig. 28) y HMBC (Figura 29, 30 y 31) facilitaron la elucidación estructural de la fracción q5 y, por tanto, identificado como parietina acetilada. Los datos de correlación del espectro de HMBC, se pueden observar en la Tabla 6.

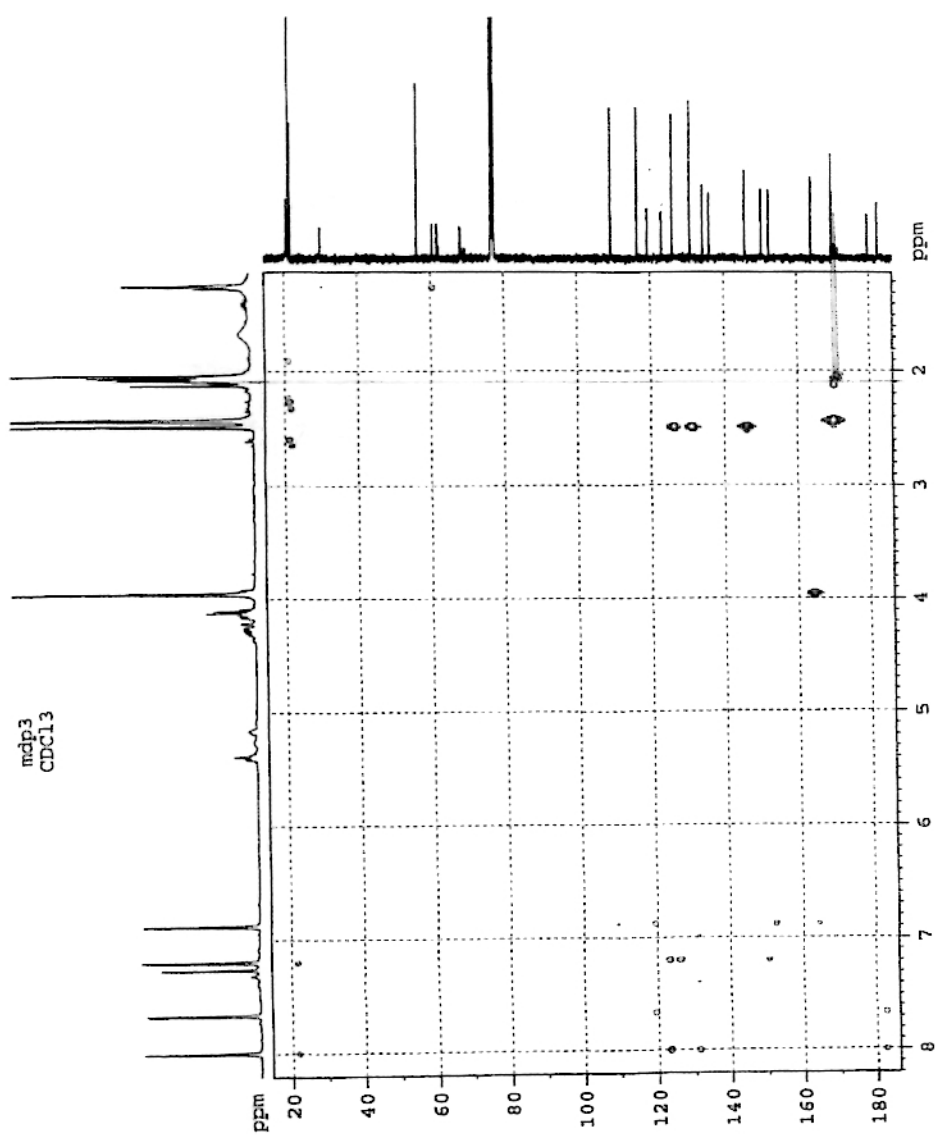


Figura 29 .- HMBC de *qs*

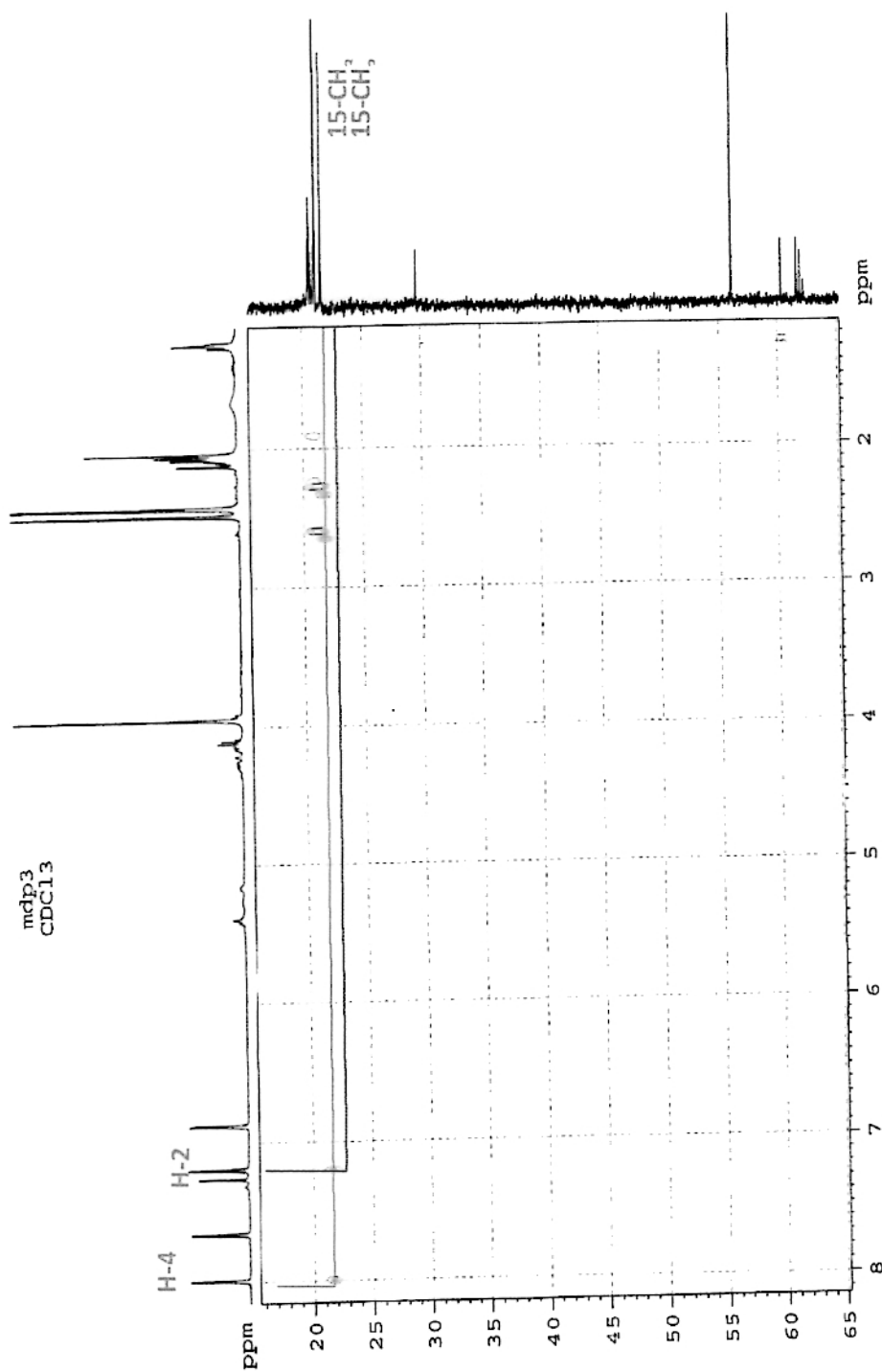


Figura 30.- Ampliación de HMBC de qs



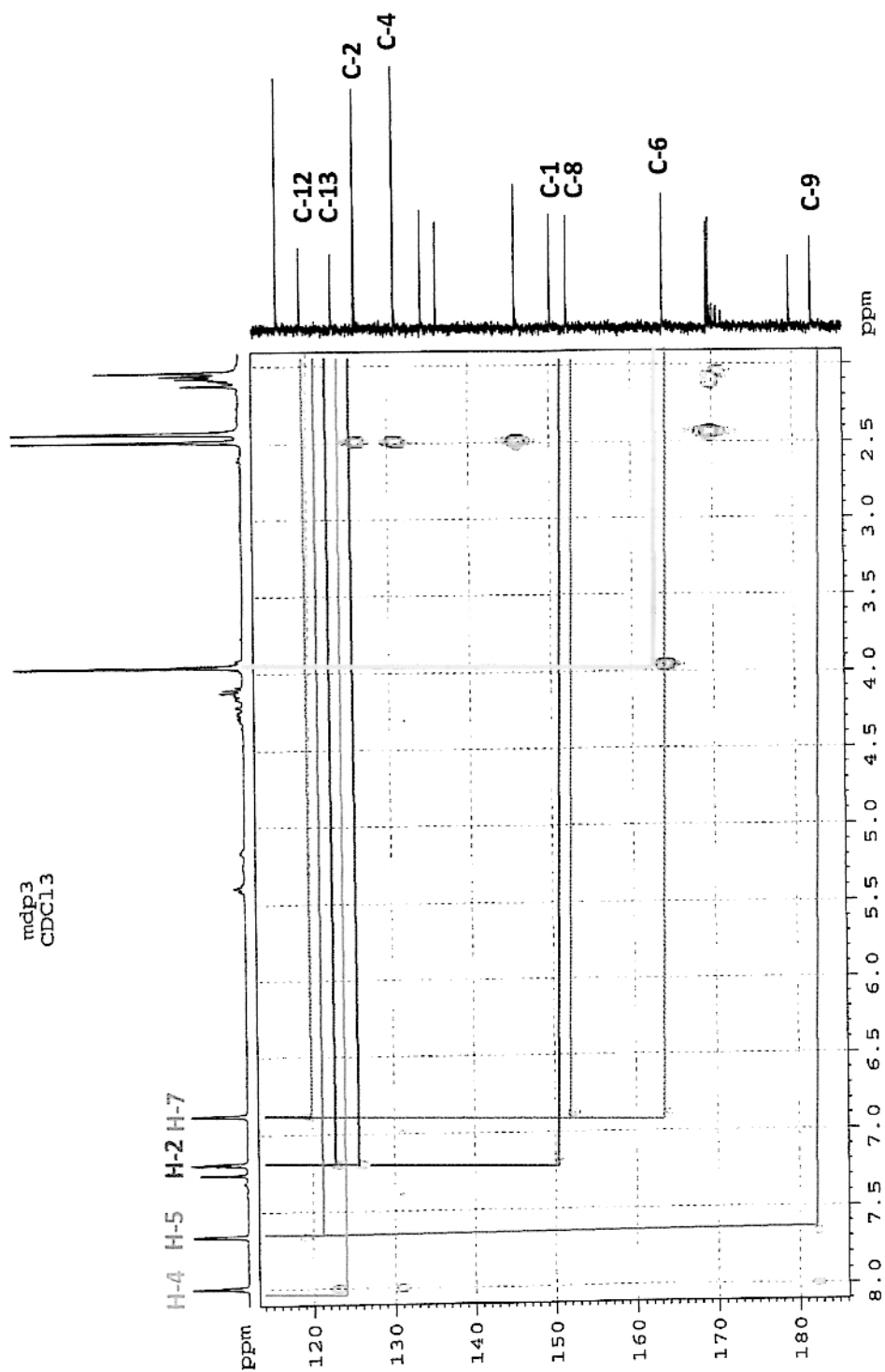


Figura 31.- Ampliación de HMBC de q5

**Tabla 6: Datos de correlación HMBC de q<sub>5</sub>**

	<b>Vila <i>et. al</i> (2006)</b>	<b>Fracción q<sub>5</sub></b>
<b>C/H</b>	<b>HMBC</b>	<b>HMBC</b>
<b>1</b>	-	-
<b>2</b>	C-1, C-2, C-13	C-1, C-2, C-13, C-15
<b>3</b>	-	-
<b>4</b>	C-4, C-9, C-13	C-4, C-9, C-13, C-15
<b>5</b>	C-6, C-7, C-9, C-11	C-9, C-12
<b>6</b>	-	-
<b>7</b>	C-5, C-6, C-11, C-2	C-6, C-8, C-12
<b>8</b>	-	-
<b>9</b>	-	-
<b>10</b>	-	-
<b>11</b>	-	-
<b>12</b>	-	-
<b>13</b>	-	-
<b>14</b>	-	-
<b>15-CH<sub>3</sub></b>	C-2, C-3, C-4	C-2, C-3, C-4
<b>16-OCH<sub>3</sub></b>	C-6	C-6
<b>OCOCH<sub>3</sub>-1</b>	C=O	C=O
<b>OCOCH<sub>3</sub>-8</b>	C=O	C=O
<b>OCOCH<sub>3</sub>-1</b>	-	-
<b>OCOCH<sub>3</sub>-8</b>	-	-

---

# CAPITULO IV

---

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

---

## RESULTADOS

### 1. Estudio químico del líquen *Xanthoparmalia tasmanica*

El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios infirió que el líquen *X. tasmanica* contiene aminogrupos primarios o secundarios (++), grupos fenólicos libres (+), taninos (+), alcaloides (+), catequinas (+), triterpenos y esteroides (+).

A partir de 430 g del líquen *X. tasmanica* seco y molido, se obtuvo mediante extracción con acetona el Extracto Bruto de orgánico, el cual fue tratado con cloroformo a diferentes temperaturas, proporcionando 20,4 mg de (+) ácido úsnico, como un sólido en forma de agujas de color amarillo, con un punto de fusión de 204-205 °C, con una rotación óptica de  $[\alpha]^{25} = (+) 498$ . La elucidación estructural se realizó mediante el análisis detallado de sus espectros de Masas, RMN <sup>1</sup>H e IR que coincidieron con los de la literatura como siendo el ácido úsnico [17].

El análisis del extracto acetónico por CG-EM y RMN <sup>1</sup>H detectó la presencia de una mezcla de ácidos grasos y compuestos liquénicos que actualmente están siendo estudiadas.

### 2. Estudio químico del líquen *Xanthomendoza mendozae*

El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios mostró que el líquen *Xanthomendoza mendozae* contiene aminogrupos primarios o secundarios (++), grupos fenólicos libres (+), taninos (+), alcaloides (+), catequinas (+), triterpenos y esteroides (+).

A partir de 0,67 g del extracto acetónico del líquen *X. mendozae*, se obtuvo por cromatografía en columna de sephadex 162,3 mg de la antraquinona parietina (fisciona) como un sólido de color anaranjado. La elucidación estructural de la parietina fue realizada derivatizándola a su forma acetilada. Fueron obtenidos los espectros de Masas, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, HMBC e IR, que concordaron con los datos de la literatura. El análisis del espectro de masas confirma la fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub> ( $[M]^+$   $m/z$ : 368) correspondiente a la parietina acetilada [22].

Asimismo, en el extracto acetónico fue detectado por CG-EM y RMN <sup>1</sup>H una mezcla de ácidos grasos y compuestos con estructuras base de antraquinonas que están siendo todavía estudiadas.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis son las primeras informaciones que se relatan a cerca del estudio químico de los líquenes peruanos *Xanthoparmelia tasmanica* y *Xanthomendoza mendozae*.

El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios del líquen *X. tasmanica* [según el procedimiento de Rondina y Coussio (1969)] indicó la presencia de aminogrupos primarios o secundarios (++) , grupos fenólicos libres (+), taninos (+), alcaloides (+), catequinas (+), triterpenos y esteroides (+). Para el líquen *X. mendozae*, el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios [Rondina y Coussio (1969)] verificó la presencia de aminogrupos primarios o secundarios (+), grupos fenólicos libres (+), taninos (++) , alcaloides (+), quinonas, antronas y antranoles (+++), triterpenos y esteroides (+) y catequinas (+).

A partir del líquen *X. tasmanica* se aisló el ácido úsnico, el cual fue identificado mediante sus espectros de Masas, RMN  $^1\text{H}$  e IR, los cuales concuerdan con los datos de la literatura.

Del líquen *X. mendozae* se ha aislado la parietina cuya estructura fue elucidada a partir de su derivatización en su forma acetilada. Los espectros de Masas, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HMBC e IR coinciden con los de la literatura.

De ambos líquenes se detectó por CG-EM y RMN  $^1\text{H}$  mezcla de ácidos grasos y compuestos con estructuras base de antraquinonas.

Según esta investigación las especies *X. tasmanica* y *X. mendozae* poseen compuestos que se relatan para sus familias *Parmeliaceae* y *Teloschistaceae* respectivamente; resultados interesantes e importantes que pueden sumarse *a priori* en sus quimiotaxonomías.

---

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Barreno, E., Perez-Ortega, S., *Biología de los líquenes*, Ed. KRK, 2003, pág. 65-66.
2. Chávez, J., Programa conjunto INBio-SINAC, 2005, págs. 2-4.
3. Córdova, Vicente, *Fisiología de las sustancias liquénicas*, Ed. Alhambra, España, 1975, págs. 4-7; 70-73.
4. Ingólfssdóttir, K., *Phytochemistry*, 61, 729-236, (2002). "Molecules of interest: Usnic acid".
5. Candan, M., Yilmaz, M., Tay, T., Kivanç and Türk, H., *Naturforsch*, 61, 319-23 (2006). "Antimicrobial activity of extracts of the Lichen *Xanthoparmelia pokornyi* and its Gyrophoric and stenoporic acid constituents".
6. Podterob, A., *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42, No.10, 32-38(2008). "Medicinal plants chemical composition of lichens and their medical applications".
7. Begg, W., J. Elix and A. Jones, *Tetrahedron Letters*, 12, 1047-1050 (1978). "Nonacyclic amides from lichens of the genus *Xanthoparmelia*"
8. Begg, W., D. Chester and J. Elix, *Australian Journal Chemistry*. 32, 927-929 (1979). "The structure of conorlobaridone and conloxodin. New depsiones from the lichen *Xanthoparmelia xanthosorediata*".
9. Elix, J. and J. Wardlaw, *Australian Journal Chemistry*, 53, 1009-1010 (2000a), "4-O- $\beta$ -Methylconhypoprotocetraric acid, a new -orcinol depsidone from the Lichen *Xanthoparmelia competitiva*".
10. Elix, J. and J. Wardlaw, *Australian Journal Chemistry*, 53, 815-818 (2000b). "Lusitanic acid, peristic acid and verrucigeric acid. Three new - orcinol depsidones from the lichens *Relicina sydneyensis* and *Xanthoparmelia verrucigera*".
11. Yeap, L. and D. Galloway, *Phytochemistry*, 18, 1977-1980 (1979). "Pseudodepsidones and other constituents from *Xanthoparmelia scabrosa*".
12. Martínez, A., *Quinonas y compuestos relacionados*, Universidad de Antioquía, Medellín, 2005, págs. 1-8.
13. Crespo, A., Lumbsch, H.T., Mattsson, J.-E., Blanco, O., Divakar, P.K., Articus, K., Wiklund, E., Bawingan P.A. and Wedin, M., *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 812-824 (2007), "Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in *Parmeliaceae* (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear RPB1 gene".

14. Cannon PF, Kirk PM., *Fungal Families of the World*. Wallingford: CABI, (2007), pág. 256.
15. Reyna P., Victor, *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, 1999, 5 pág.
16. Rondina, R. Coussio, J., *Revista de Investigaciones Agropecuarias-INTA (Argentina)*, 6, 33, 351-366 (1969), “Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales”.
17. Castro M., Estudio fitoquímico del líquen *Psiloparmelia distincta (Nyl.) Hale*, Tesis para optar el Grado de Magister en Ciencias- mención Química, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, 2004. pág. 32-38; 40-51; 104-112.
18. Silverstein, R.M., (2005), *Spectrometric identification of organic compounds*, 7TH. Edition, Ed. John Wiley, pág 127-258.
19. Gaya E, Navarro-Rosine's P, Llimoda X., Hladun N., Lutzoni F, *Micological Research*, 112 ,528-546 (2008), “Phylogenetic reassessment of the *Teloschistaceae* (lichen-forming *Ascomycota*, *Lecanoromycetes*)”.
20. Li, J.L.; Wang, A.Q.; Li, J.S.; He, W.Y.; Kong, M., *Chin. Tradit. Herb. Drugs*, 31, 321-323 (2000), “Studies on the anthraquinones of Hotao Rhubarb (*Pheum hotaoense*)”
21. Yang, X.W.; Gu, Z.M.; Ma, C.M.; Hattori, M., Namba, T., *Chin. Tradit. Herb. Drugs*, 29, 5-10 (1998), “A new indole derivative isolated from the root of Tuber Fleeceflower (*Polygonum multiflorum*)”.
22. Canavari, P.; Bergquist, Karl-Erick, Vila, J., *Revista Boliviana de Química*, 23, 9-12, (2006), “Estudio Fitoquímico del Líquen *Teloschistes flavicans*”.