

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**



TESIS

**“AISLAMIENTO DEL METABOLITO SECUNDARIO A  
PARTIR DEL LIQUEN *UMBILICARIA CALVESENS* NYL”**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO EN QUÍMICA

ELABORADA POR:  
NICOL GIORJINA LOPEZ HUILLCA

 0009-0008-3422-8368

ASESOR:  
MSc. ELENA ALICIA CÓNDROR CUYUBAMBA

 0000-0001-6099-3639

LIMA – PERÚ

2024

Citar/ How to cite	Lopez Huillca [1]
Referencia/ Reference	N. Lopez Huillca, " <i>Aislamiento del metabolito secundario a partir del liquen Umbilicaria Calvescens Nyl</i> " [Tesis de pregrado]. Lima, Perú: Universidad Nacional de Ingeniería, 2022.
Estilo/ Style: IEE (2020)	
Citar/ How to cite	(Lopez, 2024)
Referencia/ Reference	Lopez, N. (2024). <i>Aislamiento del metabolito secundario a partir del liquen Umbilicaria Calvescens Nyl</i> [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Ingeniería]. Repositorio Institucional UNI.
Estilo/ Style: APA (7ma ed.)	

### ***Dedicatoria***

*A Dios por darme la vida y bendiciones.*

*A mi querido padre Pablo que siempre me apoyó, por su noble  
esfuerzo y me comprendió a lo largo de este camino.*

*A mi bebés, Mauricio y Alejandro, son la razón por la cual cada  
día decido ser mejor.*

*A mi madre Lidia y mi hermano Jair, que siempre me animaron  
a seguir adelante.*

*A todos mis amigos y conocidos que me animaron y apoyaron  
en todo momento.*

## **Agradecimientos**

Quiero agradecerle a mi asesora, MSc. Elena Córdor Cuyubamba, por todas sus enseñanzas y recomendaciones que me ha dado desde que la conozco, por el tiempo invertido en este proyecto, por la dedicación y pasión que tiene para investigar Productos Naturales.

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que forman parte del Grupo de Investigación de Productos Naturales, en especial al Dr. Victor Reyna Pinedo y a la MSc. Virginia Torpoco Carmen. Ellos me brindaron apoyo y consejo durante todo el proceso experimental y la redacción de mi Tesis.

Asimismo, quiero agradecer al director del Laboratorio de Química Inorgánica N° 12 (FC-UNI), el MSc. Max Carlos Salazar, y a su equipo de laboratorio. Ellos contribuyeron a que mi estadía fuera agradable, me proporcionaron los materiales y equipos necesarios para llevar a cabo el trabajo de investigación.

También, agradecer a la Dra. Helena Maruenda del Laboratorio de RMN-CERMN de la Pontificia Universidad Católica Del Perú, por su apoyo en la obtención de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Por último, quiero agradecer a todas mis amistades que contribuyeron con sus comentarios y apoyo para finalizar mi Tesis.

## Resumen

Este estudio comprende la marcha fitoquímica que fue abordada en el curso de Proyecto de Tesis I CQ 4E2, donde se verificó la presencia de los metabolitos secundarios: aminogrupos primarios y/o secundario, grupos fenólicos libres, taninos y triterpenos y/o esteroides. En el curso de Proyecto de Tesis II CQ 541, se abordó la identificación del metabolito secundario presentes en el extracto bruto orgánico de éter de petróleo (EBO/éter). Para lo cual se utilizó la metodología de la extracción, separación y/o purificación mediante técnicas cromatográficas (cromatografía en capa fina, cromatografía en columna y/o placa preparativa), identificándose, en su mayoría, ácidos grasos y la presencia, en pequeñas cantidades, del metabolito secundario metil  $\beta$ -orcinolcarboxilato por CG-EM.

En el curso Proyecto de Tesis III CQ 542, se realizó la extracción sólido-líquido del líquen *Umbilicaria Calvescens* Nyl con los solventes, diclorometano y etanol, obteniéndose el EBO/ diclorometano y EBO/ etanol. A partir del EBO/ diclorometano, se realizó la separación de éste mediante CC flash. Los extractos obtenidos se separaron por CC en sílica gel, identificándose el ácido úsnico y el orcinol mediante CG-EM, este último se purificó por recristalización. Así mismo, el EBO/ etanol se separó por partición líquido-líquido y CC sílica gel, a partir de uno de los extractos obtenidos se identificó el etil orselinato mediante CG-EM. Por último, se caracterizó el orcinol y etil orselinato por  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, CG-EM, UV-Vis e IR.

El lugar donde se llevó a cabo el trabajo experimental es el Laboratorio de Investigación de Química de Productos Naturales, que se encuentra en el Laboratorio de Química Inorgánica N°12, ubicada en el Pabellón C (Facultad de Ingeniería Química y Textil).

Palabras claves- Metabolitos secundarios, ácidos grasos, *Umbilicaria Calvescens* Nyl., líquenes

## Abstract

This research includes the phytochemical path that was addressed in the course of Thesis Project I CQ 4E2, where the presence of secondary metabolites was verified: primary and/or secondary aminogrupos, free phenolic groups, tannins and triterpenes and/or steroids. In the course of Thesis Project II CQ 541, the identification of the secondary metabolite present in the organic crude petroleum ether extract (EBO/ ether) was addressed. For which the extraction, separation and/or purification methodology was used by chromatographic techniques (CCF, CC and/or PP), identifying, for the most part, fatty acids and the presence, in small quantities, of the secondary metabolite methyl  $\beta$ -orcinolcarboxylate by CG-EM.

In the course Thesis Project III CQ 542, solid-liquid extraction of the lichen *Umbilicaria Calvescens* Nyl was performed with solvents, dichloromethane and ethanol, obtaining EBO/ dichloromethane and EBO/ ethanol. From the EBO/ dichloromethane, separation of this was performed by CC flash. The extracts obtained were separated by CC in silica gel, identifying the usnic acid and orcinol by CG-EM, the latter was purified by recrystallization. Likewise, EBO/ ethanol was separated by liquid-liquid partition and silica CC gel, from one of the extracts obtained ethyl orselinate was identified by CG-EM. Finally, orcinol and ethyl orselinate were characterized by  $^1\text{H-RMN}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$ , CG-EM, UV-Vis and IR.

The experimental work was carried out in the Research Laboratory of Chemistry of Natural Products, located in Pavilion C, Faculty of Chemical and Textile Engineering.

Keywords- Secondary metabolites, fatty acids, *Umbilicaria Calvescens* Nyl., lichens.

## Tabla de Contenido

	Pág.
Resumen.....	v
Abstract.....	vii
Capítulo I. Parte Introductoria del trabajo.....	1
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Descripción del problema de investigación.....	1
1.3 Objetivos del estudio.....	1
1.4 Antecedentes investigativos- estudios químicos generales.....	2
Capítulo II. Marco teórico y conceptual.....	7
2.1 Marco teórico.....	7
2.2 Marco conceptual.....	29
Capítulo III. Desarrollo del trabajo de investigación.....	31
3.1 Presentación.....	31
3.2 Trabajo preliminar.....	32
3.3 Trabajo experimental.....	33
3.4 Secado y Molienda de la muestra.....	34
3.5 Análisis cualitativo (Marcha fitoquímica).....	34
3.6 Aislamiento de compuestos liquénicos.....	34
3.7 Riesgos del proyecto de investigación y plan de acción para mitigar sus efectos...51	
3.8 Manejo de Residuos y Normas de Seguridad.....	52
Capítulo IV. Análisis y Discusión de los Resultados.....	53
4.1 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios.....	53
4.2 Análisis e identificación de compuestos orgánicos por CG-EM.....	53
Conclusiones.....	76
Recomendaciones.....	77
Referencias bibliográficas.....	78
Anexos.....	82

## Lista de Tabla

	Pág.
Tabla 1: Hábitat de algunos líquenes.....	8
Tabla 2: <sup>1</sup> H-(500 MHz) y <sup>13</sup> C-(100 MHz) NMR Datos espectrales de la Atranorina en CDCl <sub>3</sub> .....	20
Tabla 3: Clasificación taxonómica del líquen <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl.....	32
Tabla 4: Información del metabolito secundario detectado por el CG-EM a partir del EBO-Éter.....	54
Tabla 5: Información de los ácidos grasos mayoritarios detectados por el CG-EM a partir del extracto G4* .....	54
Tabla 6: Información del metabolito secundario detectado por el CG-EM a partir del EBO-Diclorometano.....	57
<sup>1</sup> Tabla 7: Información del metabolito secundario detectado por el CG-EM a partir del EBO-Diclorometano-extracto B5.....	61
Tabla 8: Datos recopilados del espectro RMN <sup>1</sup> H del orcinol aislado.....	64
Tabla 9: Datos obtenidos del espectro RMN <sup>13</sup> C del orcinol aislado a partir del líquen <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl.....	66
Tabla 10: Información del metabolito secundario detectado por el CG-EM a partir del EBO-etanol.....	70
Tabla 11: Datos recopilados del espectro RMN <sup>1</sup> H del etil orselinato aislado a partir del Líquen <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl.....	72
Tabla 12: Datos obtenidos del espectro RMN <sup>13</sup> C del etil orselinato aislado a partir del líquen <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl.....	73

## Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1: Comunidades de líquenes.....	9
Figura 2: Tipos de talo. A) Fruticoso, <i>Usnea</i> . B) Dimórfico, <i>Cladonia</i> . C) Costroso, <i>Graphis</i> . D) Folioso, <i>Parmotrema</i> . E) Folioso o filamentososo, <i>Cora</i> .....	10
Figura 3: Liqen <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl.....	12
Figura 4: Dépsidos a) para- dépsido b)meta-dépsido c) Depsidonas d) Dibenzofuranos.....	14
Figura 5: Dépsidos. Ácido hematamnólico.....	15
Figura 6: Depsidonas. Ácido estíctico.....	15
Figura 7: Dibenzofuranos. Ácido pannárico.....	16
Figura 8: Ácido Úsnico. a) (-) ácido úsnico. b) (+) ácido úsnico.....	16
Figura 9: Estructura química del metil $\beta$ -orcinolcarboxilato.....	17
Figura 10: Espectro de masas del ácido atrárico.....	18
Figura 11: Estructura química de la atranorina.....	19
Figura 12: Difracción de Rayos X de la atranorina.....	17
Figura 13: Estructura química del orcinol.....	19
Figura 14: Estructura química del etil orselinato.....	21
Figura 15: Sistemas conjugados de enlaces dobles de enlaces carbono-carbono y carbono- oxígeno.....	27
Figura 16: Tipos de orbitales existentes en el enlace carbonilo C=O.....	28
Figura 17: Liqen <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl.....	32
Figura 18: Liqen <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl. seco y triturado.....	35
Figura 19: Extracto bruto orgánico- Éter.....	36
Figura 20: Extracto bruto orgánico- diclorometano.....	39
Figura 21: Cromatograma (TIC) obtenido del extracto G4* a partir del análisis CG-EM.....	40
Figura 22: Extracto bruto orgánico- Etanol.....	46
Figura 23: Cromatografía de filtración por gel Sephadex de la fracción clorofórmica.....	48
Figura 24: Cromatografía en columna de la fracción E2.....	49
Figura 25: Cromatograma (TIC) de la fracción orgánica G4* a partir del análisis CG-EM.....	53
Figura 26: Espectro de masas del Metil $\beta$ -orcinolcarboxilato obtenido del extracto G4* del liqen <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl.....	55

Figura 27: Cromatograma (TIC) del extracto F4.....	56
Figura 28: Espectro de masas del ácido úsnico obtenido del extracto F4.....	56
Figura 29: Cromatograma (TIC) del patrón ácido úsnico.....	57
Figura 30: Espectro de masas del patrón ácido úsnico.....	57
Figura 31: Espectro UV-Vis del compuesto liquénico ácido úsnico, obtenido a partir del extracto F4 puro.....	59
Figura 32: Espectro IR-ATR del compuesto ácido úsnico, obtenido a partir del extracto F4.....	60
Figura 33: Cromatograma (TIC) del extracto B5 puro.....	61
Figura 34: Espectro de masas del orcinol, obtenido a partir del extracto B5 puro.....	62
Figura 35: Espectro UV-Vis del compuesto orcinol, obtenido a partir del extracto B5 puro.....	63
Figura 36: Espectro IR-ATR del compuesto liquénico orcinol, obtenido a partir del extracto B5 puro.....	65
Figura 37: Espectro RMN <sup>1</sup> H del metabolito secundario orcinol, obtenido a partir del extracto B5 puro.....	67
Figura 38: Espectro RMN <sup>13</sup> C del metabolito secundario orcinol, obtenido a partir del extracto B5 puro.....	68
Figura 39: Cromatograma del extracto X4 puro obtenido del EBO- etanol.....	68
Figura 40: Espectro de masas del orsellinato de etilo obtenido del extracto X4 puro.....	69
Figura 41: Espectro UV-Vis del compuesto etil orselinato, obtenido a partir del extracto X4 puro.....	71
Figura 42: Espectro RMN <sup>1</sup> H del metabolito secundario etil orselinato, obtenido a partir del extracto X4 puro.....	74
Figura 43: Espectro RMN <sup>13</sup> C del metabolito secundario etil orselinato, obtenido a partir del extracto X4 puro.....	75

## Lista de Abreviaturas

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia.

**UV:** Espectroscopia ultravioleta-visible.

**IR:** Espectroscopía infrarroja.

**EM:** Espectrometría de Masas.

**<sup>1</sup>H-RMN:** Resonancia magnética nuclear de protón.

**<sup>13</sup>C-RMN:** Resonancia magnética nuclear de carbono.

**EBO:** Extracto bruto orgánico.

**CG-EM:** Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

**CCF:** Cromatografía en capa fina

**CC:** Cromatografía en columna

**g:** Gramo

**MHN-UNMSM:** Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Lima

**MeOH:** Metanol

**DCM:** Diclorometano

**EtOAc:** Acetato de etilo

**PP:** Placa preparativa

## Introducción

Los líquenes representan una de las especies iniciales en la colonización de las superficies rocosas. Su acción consiste en desintegrar las rocas, contribuyendo así a la formación del suelo. Además, su presencia facilita el crecimiento de diferentes tipos de vegetación, como musgos, plantas vasculares y vegetación rupícola o saxícola (Herrera & Ulloa., 1990). Desde la antigüedad, en distintas partes del mundo como Asia y Europa, los líquenes han sido usados en la medicina natural para los dolores estomacales, del hígado, de la piel, como antiséptico (Illana Esteban, 2012). En América latina, parte del Perú, es una de las grandes fuentes de diversas especies de líquenes (Geir, 2010).

El presente estudio de investigación se enmarca en la Química Orgánica de Productos Naturales y se llevó a cabo en el laboratorio de Investigación de Química de Productos Naturales, ubicado en el laboratorio de Química Inorgánica N°12. Este estudio comprendió la marcha fitoquímica que fue abordada en el curso de Proyecto de Tesis I CQ 4E2, donde se verificó la presencia de los metabolitos secundarios: aminogrupos primarios y/o secundario, grupos fenólicos libres, taninos y triterpenos y/o esteroides. En el curso de Proyecto de Tesis II CQ 541, se abordó la identificación de compuestos orgánicos presentes en el EBO/ éter, para lo cual se utilizó la metodología de la extracción, separación y/o purificación mediante técnicas cromatográficas, posteriormente, se identificó el metabolito secundario metil  $\beta$ -orcinolcarboxilato y ácidos grasos usando la técnica CG-EM. Asimismo, en el curso Proyecto de Tesis II CQ 541, se realizó la obtención del EBO/ diclorometano y el EBO/ etanol mediante la extracción sólido-líquido con dichos solventes. A partir del EBO/ diclorometano, se realizó la separación mediante cromatografía en columna flash, posteriormente, se identificó el ácido úsnico mediante CG-EM. Con el EBO/ etanol se realizó la separación y purificación mediante técnicas cromatográficas, luego, se identificó etil orselinato mediante la técnica CG-EM. Por último, en el curso CQ 542 Proyecto de Tesis III, se realizó la separación por CC en sílica gel de todos los grupos obtenidos de la CC Flash del EBO/ diclorometano, posteriormente, se identificó el orcinol y el ácido úsnico. Finalmente, se purificó mediante recristalización los extractos que presentaban los metabolitos secundarios en mayor porcentaje.

Para la realización de todo este trabajo se desarrolló los siguientes pasos:

- i. Selección de la muestra. Se ha seleccionado el liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl debido a los pocos estudios químicos que posee hasta la actualidad, además, la escasa información encontrada sobre este liquen.

- ii. Recolección (adquisición) de la muestra. La recolecta de la muestra fue realizada por Judith Ramos el día 31 de octubre del 2015. En la ruta de Huaytapallana, ubicada a una altitud de 4000 a 4500 metros sobre el nivel del mar, se encuentra en el distrito de Huancayo, perteneciente a la provincia de Huancayo, Junín
- iii. Determinación sistemática (Identificación botánica). El líquen está debidamente identificado como *Umbilicaria Calvescens* Nyl (Anexo 1). Fue determinada en el MHN-UNMSM, por el Blgo. Ángel Manuel Ramírez Ordaya.
- iv. Estudio bibliográfico. Se ha realizado la búsqueda bibliográfica y esta muestra presenta un estudio químico, realizado por Judith Ramos y Elena Córdor, en la que se reporta el aislamiento del ácido úsnico y ácido lecanórico.
- v. Secado y molienda del líquen. La muestra se nos proporcionó previamente seca y triturada, sin embargo, debido a la exposición a la humedad se volvió a secar a 40°C por 4 horas.
- vi. Análisis cualitativo (Marcha fitoquímica) tomando como base los procedimientos experimentales propuestos por (Rondina & Coussio,1969) y (Villacrés, 1995).
- vii. Obtención de extractos brutos orgánicos mediante la extracción sólido líquido con los solventes éter de petróleo, diclorometano y etanol, a partir del líquen *Umbilicaria Calvescens* Nyl seco.
- viii. Separación y purificación de los extractos brutos mediante CC con sílica gel, columna Flash y cromatografía de filtración por gel Sephadex, además, partición líquido- líquido.
- ix. Identificación de metabolito secundario presente mediante GC-MS, IR-ATR, <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN y UV-Vis.

# Capítulo I. Parte Introductoria del trabajo

## 1.1 Generalidades

A lo largo de la historia los líquenes fueron empleados en el campo de la medicina natural, y actualmente es empleado en la industria farmacéutica debido a las propiedades biológicas que poseen sus metabolitos secundarios (actividad antitrombótica, antibacteriano, antioxidante), además, es usado en los campos como la textilera y cosmética. Por ello, es de interés científico seguir investigando nuevos líquenes como el liquen *Umbilicaria Calvescens* Nyl.

El liquen en estudio, *Umbilicaria Calvescens* Nyl., se encuentra a lo largo del centro de la Cordillera de los Andes, comprendiendo los países Perú y Bolivia, además, pertenece a la familia *Umbilicariaceae*, reportado por primera vez por el biólogo explorador Nylander. En la literatura, (Ramos & Cóndor, 2018) aislaron ácido lecanórico y ácido úsnico a partir del liquen en estudio, pero, nos mencionan que aún queda otros metabolitos secundarios por aislar. Por lo cual, se decidió seguir con el estudio químico del liquen en mención, abarcando un amplio rango de polaridad y así extraer la mayor cantidad posible de metabolitos secundarios del liquen *Umbilicaria Calvescens* Nyl.

## 1.2 Descripción del problema de investigación

Desde la antigüedad, en distintas partes del mundo como Asia y Europa, los líquenes han sido usados en la medicina natural para los dolores estomacales, del hígado, de la piel, como antiséptico (Illana Esteban, 2012).

En América latina, la cordillera de los Andes y nuestro país, el Perú, es una de las grandes fuentes de diversas especies de líquenes (Geir, 2010). Sin embargo, en la bibliografía hay pocos estudios químicos relacionados con los líquenes recolectados en el Perú. Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo el estudio químico del liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl, mediante el aislamiento de uno o más de sus principales metabolitos secundarios.

## 1.3 Objetivos del estudio

### 1.3.1 Objetivo General

Aislar uno de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- i. Revisión y estudio bibliográfico relativo a los líquenes y del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.
- ii. Marcha fitoquímica del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.
- iii. Obtención del EBO-éter, EBO-diclorometano y EBO-etanol, a partir del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.
- iv. Separación de los Extractos Brutos Orgánicos mediante técnicas cromatográficas.
- v. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl por CG-EM.
- vi. Purificación de los extractos obtenidos que contienen compuestos liquénicos en gran porcentaje.
- vii. Caracterización de los compuestos liquénicos puros por <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, CG-EM, UV-Vis e IR.

## **1.4 Antecedentes investigativos- estudios químicos generales**

### **1.4.1 Composición Química del material liquénico**

#### **a. Marcha fitoquímica**

Durante la exploración bibliográfica, se hallaron varios enfoques para llevar a cabo la evaluación fitoquímica. Sin embargo, se decidió emplear el método propuesto por (Rondina R. y Coussio, 1969), el cual fue adaptado por (Reyna Pinedo, 2014). Este procedimiento se basa en reacciones de coloración y precipitación, permitiendo así la identificación de diversos tipos de metabolitos secundarios presentes en la muestra vegetal. Para obtener más detalles, se puede consultar el Anexo 2.

#### **b. Aislamiento de compuestos liquénicos**

##### **b.1. Método empleado por (Ramos & Córdor, 2018)**

#### **i. Muestra estudiada**

Líquén *Umbilicaria calvescens* Nyl.

#### **ii. Extracción sólido-líquido**

Se realizaron dos ciclos de extracción para obtener extractos de líquenes. Inicialmente, 500 gramos de líquén seco y molido se maceraron en 1,7 litros de n-hexano por un día. Después de filtrar y concentrar, se obtuvieron 840 mg del extracto del líquén en n-hexano. El residuo sólido se sometió a un segundo proceso de maceración utilizando 1,8 litros de acetona a temperatura ambiente por un día, repitiendo la maceración dos veces. Al final, se obtuvieron 82,75 gramos de extracto de acetona.

### **iii. Separación cromatográfica**

#### **❖ EBO/acetona**

Se llevaron a cabo tres CC utilizando sílica gel como fase estacionaria. Los solventes utilizados fueron éter de petróleo y acetato de etilo, en las siguientes proporciones: 0:100, 1:3 y 1:1 para la primera, segunda y tercera CC, respectivamente. En la primera columna cromatográfica, se procesaron 500 mg del extracto de liquen en acetona, obteniendo 5 sub-fracciones (G1-G5), que luego se concentraron. En la segunda columna cromatográfica, se utilizó la fracción G3 (la más abundante), resultando en 7 extractos (etiquetadas como S1-S7), que también se concentraron. Dado que la fracción S6 tenía la mayor cantidad, se realizó una tercera columna cromatográfica, recolectando 4 extractos (etiquetadas como T1-T4), que nuevamente se concentraron.

Al analizar los valores de punto de fusión y el índice de retención de los extractos obtenidos, se observó ciertas similitudes en las fracciones G4, S5 y T3. Por lo tanto, se combinaron y se denominaron como compuesto A. Este compuesto se recristalizó utilizando acetona:agua (1:1), obteniendo 206 mg de un precipitado blanco

#### **❖ EBO/n-hexano**

Se llevaron a cabo dos procedimientos de cromatografía en columna. En el primero, se utilizó EBO/n-hexano como fase estacionaria, y como eluyentes se empleó una mezcla de acetato de etilo y éter de petróleo en diferentes proporciones (3:1- 1:0). Durante este proceso, se recolectaron siete sub-fracciones, etiquetadas como I1-I7. Posteriormente, la fracción I3 se purificó nuevamente mediante cromatografía en columna, utilizando una mezcla de acetato de etilo y éter de petróleo en proporción 3:7. Como resultado, se obtuvieron cuatro sub-fracciones, identificadas como U1-U4. Finalmente, en la fracción U3, se aisló un sólido amarillo, al que se le asignó la etiqueta de compuesto B.

### **iv. Purificación y caracterización**

#### **❖ Compuesto A**

Este compuesto fue recristalizado en acetona: agua (1:1), obteniéndose 206 mg de un precipitado blanco. La determinación del compuesto A se llevó a cabo analizando los espectros de absorción ultravioleta (UV), infrarrojos (IR), resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$ -RMN) y resonancia magnética nuclear de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN).

#### **❖ Compuesto B**

El compuesto en cuestión experimentó un proceso de recristalización utilizando etanol, lo que resultó en la obtención de cristales amarillos. Además, durante el análisis, la cromatografía en capa fina del compuesto B reveló un valor de  $R_f$  de 0,62 en etanol:acetona (1:1), que coincidió con el patrón de ácido úsnico al 98 % de pureza. La identificación

específica del compuesto B se basó en la interpretación de los espectros UV, IR, EM, <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN.

## **v. Resultados**

### **❖ Compuesto A**

Sólido de color blanco, soluble en metanol y acetona, poco soluble en cloroformo. Su punto de fusión oscila entre 182°C y 184°C. Al analizar los espectros espectroscópicos y compararlos con fuentes bibliográficas, se llegó a la conclusión de que el compuesto A corresponde al ácido lecanórico.

### **❖ Compuesto B**

Los cristales, que adoptan una forma de agujas y presentan un color amarillo, son solubles en acetona, pero poco solubles en etanol. Su punto de fusión oscila entre 204°C y 205°C. Basándonos en los datos espectroscópicos obtenidos y al compararlos con lo reportado en la bibliografía, llegamos a la conclusión de que este compuesto corresponde al ácido úsnico.

## **b.2. Método empleado por (Córdor, 2012)**

### **i. Muestra estudiada**

Liquen *Xanthoparmelia tasmanica* seco

### **ii. Extracción sólido - líquido (Obtención del EBO)**

- i. Se realizó la maceración con 430 mg de liquen seco y pulverizado con 500 mL de acetona a temperatura ambiente.
- ii. Se repitió el proceso 3 veces, obteniéndose luego de filtrar aproximadamente un volumen total de 1.5 L de extracto acetónico.
- iii. Luego, se concentró en un rotavapor, obteniéndose 6.1 g de extracto bruto orgánico (EBO/acetona).
- iv. El EBO/acetona obtenida se extrajo primero con 50 mL de cloroformo a temperatura ambiente, observándose unos cristales de color amarillo (rotulado como X1). Luego, se extrajo con 200 mL de cloroformo en caliente y se dejó reposar por una semana, observándose la formación de unos cristales amarillos (rotulado como X2), los cuales fueron filtrados.
- v. La solución filtrada de la sección anterior (aprox. 100 mL) se dejó reposar por una semana y se obtuvo unos cristales amarillos (rotulado como X3).

### **iii. Separación Cromatográfica**

- i. Se realizó un análisis preliminar en CCF. Luego, se realizó una CC-Sephadex LH-20 de 0.5269 g de EBO, empleándose como eluente la mezcla de diclorometano: metanol: éter (1:1:1), obteniéndose 10 fracciones.

- ii. Se realizó una derivatización del extracto, debido a que los compuestos presentaban una alta polaridad en CCF; para lo cual se acetiló el extracto.
- iii. El EBO acetilado (0.4863 g) fue tratado en CC en Sílica gel, empleándose como eluentes éter: acetato de etilo (6:4, 1:1, 6:4), acetato de etilo y metanol; obteniéndose 10 extractos.

#### **iv. Purificación y caracterización**

- i. Los cristales (X1, X2 y X3) obtenidos en la Sec. b fueron caracterizados mediante punto de fusión y el análisis de los espectros: CG-EM, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C e IR.
- ii. Las fracciones obtenidas en la Sec. c fueron analizadas por CG-EM y RMN<sup>1</sup>H.

#### **v. Resultados**

Ácidos grasos insaturados y ácido úsnico.

### ***b.3. Procedimiento experimental empleado por (Martino, 2015)***

#### **i. Muestra estudiada**

Liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale

#### **ii. Extracción Sólido- líquido**

- ❖ Realizó 3 colectas del liquen en distintas fechas.
- ❖ Se rotuló cada frasco A, B y C correspondientes a la fecha de colecta.
- ❖ Se dejaron macerando en Acetona (200 mL), cada muestra de liquen en su respectivo frasco, por un intervalo de 48 h. El proceso se repitió 4 veces cada vez con 200 mL.
- ❖ Se llevaron a sequedad en un rotavapor por separado. Por CCF se comprobó que los 3 extractos tenían similar comportamiento por lo que se reunió las fracciones.
- ❖ Se obtuvo 6,9 g de EBO/ Acetona.

#### **iii. Separación**

- ❖ Cromatografía en Columna-Sephadex del EBO/ acetona, se obtuvieron 10 extractos, X1-X10, de los cuales los extractos X7 y X5 presentaron comportamiento definidos en CCF.
- ❖ Filtración simple al extracto X7.
- ❖ Cromatografía en columna con Sílica gel del extracto X5, se obtuvieron 13 grupos, G1- G13, los extractos G2 y G3 se agruparon por lo cual se denominó extracto P, los grupos desde G9 al G12 se unieron para formar el extracto Q.

- ❖ Se realizó Cromatografía por placa preparativa a los grupos P y Q por separado. Se obtuvo cuatro grupos (P1-P4) a partir de la CPP del grupo P. Para la CPP del grupo Q se obtuvo 5 grupos, Q1-Q5.

#### **iv. Purificación y caracterización**

- ❖ Recristalización acetona: agua (1:1) a la fracción X7.
- ❖ Se caracterizaron los extractos X7 y P2 mediante las técnicas UV-Vis, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C y HMBC.

#### **v. Resultados**

Los metabolitos secundarios: ácido lecanórico y metil β- orcinolcarboxilato.

#### ***b.4. Procedimiento empleado en Proyecto de Tesis III***

El líquen en cuestión ha sido estudiado con n-hexano y acetona por (Ramos & Córdor, 2018), mientras que (Martino Cruz, 2015) y (Córdor Cuyubamba, 2012) han estudiado algunos líquenes solo con acetona. Para ampliar el rango de polaridad y profundizar en las investigaciones del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl., se decidió realizar extracciones con éter de petróleo, diclorometano y etanol, los cuales son solventes de diferentes polaridades. El procedimiento seguido en esta Tesis fue planteado en el Proyecto de Tesis III (Lopez Huillca, 2022)\*, en el cual se puede resumir en los siguientes pasos:

##### **i. Extracción sólido - líquido (Obtención del EBO)**

- ❖ Extracción con éter de petróleo, diclorometano y etanol.
- ❖ Concentración de extractos mediante un rotavapor.

##### **ii. Separación Cromatográfica**

- ❖ Análisis preliminar por CCF.
- ❖ Separación mediante técnicas cromatográficas.

##### **iii. Purificación y caracterización**

- ❖ Recristalización de los metabolitos secundarios aislados.
- ❖ Caracterización de los metabolitos secundarios aislados mediante la técnica CG-EM, UV, IR, <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN

---

\* Informe presentado y sustentado en el curso CQ542 Proyecto de Tesis III por la alumna Nicol Giorjina Lopez Huillca en el año 2022.

## Capítulo II. Marco teórico y conceptual

### 2.1 Marco teórico

#### 2.1.1 *Líquenes*

Los líquenes son aquellos organismos que son formados a partir de la asociación simbiótica de un hongo con una especie fotobiótica (puede realizar fotosíntesis), el organismo mencionado al final puede ser un alga, una cianobacteria o una combinación de estas, por ello, el líquen posee una naturaleza dual. Se han realizado diversas investigaciones, donde se ha podido identificar más de 17 000 especies de líquenes, estos se encuentran alrededor de todo el mundo, esto se debe a que los líquenes presentan una notable habilidad para ajustarse a variados entornos climáticos y hábitats. Hay varios tipos de líquenes, las cortícolas su crecimiento ocurre en la parte externa de los troncos de los árboles, saxícolas o rupícolas son aquellas que se forman encima de las rocas, las terrícolas se desarrollan encima de la tierra, por último, las zoobióticas que se forma encima de los tejidos muertos de animales (Montañez, 2000).

Es frecuente hallar líquenes en rocas, en las zonas costeras donde las olas salpican, así como en regiones montañosas elevadas, sobre la corteza de los árboles y en ciertos tipos de suelos. Algunos de estos organismos tienen la capacidad de resistir temperaturas bajas y largos periodos de sequía. De hecho, los líquenes pueden permanecer secos durante meses sin sufrir daños y, además, son capaces de absorber agua del aire de manera higroscópica. La Tabla 1 presenta algunos ejemplos ilustrativos. (Robles et al., 1992).

Los líquenes se agrupan en estructuras llamadas talos, que a su vez se dividen en capas superior e inferior, incluyendo una capa tipo alga y médula. Estos talos se categorizan según su apariencia, estratificación y la forma en que se adhieren al sustrato. Pueden ser talos gelatinosos, costrosos, foliosos o fruticosos. Su reproducción generalmente ocurre asexualmente mediante la desintegración del talo o la creación de diásporas vegetativas, como los soredios o los isidios. Los soredios resultan de la unión de células fotobióticas cubierto por hifas y sin corteza. Por otro lado, los isidios se forman en la superficie del talo y sobresale por los poros o al romper la corteza. Cuando las diásporas maduran, se esparce a través del agua, el viento, los insectos y las aves, permitiendo que los líquenes se desarrollen en otros lugares. Además, algunos líquenes también pueden reproducirse sexualmente, generalmente a través de organismos fértiles producidos por los hongos de la división Ascomycotina, que son muy similares a los no liquenizados (Montañez, 2000).

**Tabla 1***Hábitat de algunos líquenes*

<b>Liquen</b>	<b>Sustrato</b>
	<b>Suelos</b>
<i>Peltigera aphthosa</i>	Ladera de montaña, Canadá
<i>Pseudoparmelia texana</i>	Andes, Venezuela
<i>Stereocaulon vesuvianum</i>	Antigua corriente de lava del Etna, Italia
<i>Stereocaulon curtatum</i>	Monte Hohken-dake, Japón
<i>Cladonia rangiferina</i>	tundras árticas
	<b>Rocas</b>
<i>Lobodirina cerebriformes</i>	costa ribereña, Chile
<i>Lecania brialmontii</i>	marítimas, Antártica
<i>Lobaria scrobiculata</i>	pared sombreada, Escocia
<i>Alectoria scrobiculata</i>	sierra norte, Perú
	<b>Arboles</b>
<i>Erioderma chilense</i>	Baccharis magellanica, Chile
<i>Psoroma pulchrum</i>	Nothofagus ssp., Chile
<i>Cornicularia epiphorella</i>	Araucaria araucana, Chile
<i>Protusnea malacea</i>	Nothofagus pumilio, Chile
<i>Parmelia lívida</i>	raíces de roble, EE.UU
<i>Lobaria amplissima</i>	corteza de roble, Francia
<i>Protusnea magellanica</i>	Nothofagus obliqua, Chile
<i>Physcia aegialita</i>	Quercus virginiana, EE.UU.
<i>Parmelia furfurácea</i>	Pinus pinea, Italia
<i>Usnea longissima</i>	Taxus; Picea, Japón
<i>Evernia prunastri</i>	corteza de maples, Francia

*Nota:* Adaptado de (Robles et al., 1992).

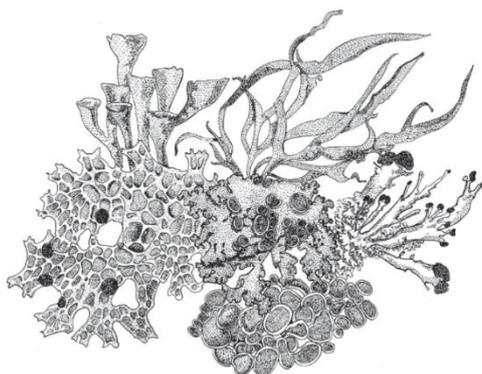
La diversidad de propiedades y tonalidades de este organismo se debe a la presencia de diferentes metabolitos secundarios, también conocidos como sustancias o ácidos liquénicos, los cuales son estructuras complejas. Alrededor del mundo, podemos encontrar más de 800 ejemplares de compuestos liquénicos, poseen actividad antibiótica y son eficaces ante la presencia de microorganismos. (Illana Esteban, 2012).

Los líquenes generalmente producen y almacenan compuestos fenólicos en altas cantidades. Se han realizado investigaciones utilizando diversas especies de líquenes y sus extractos disueltos en distintos solventes. Estos extractos se evaluaron frente a distintos tipos de

bacterias. Los resultados indican que los compuestos de alta polaridad exhiben alta actividad antibacteriana. Además, se ha observado que la actividad biológica de las moléculas está influenciada por el tipo de grupo sustituyente y la posición de este. En relación a su actividad biológica, el número de grupos metilo unidos a los anillos bencénicos y a los oxígenos fenólicos es relevante (Robles et al., 1992).

## Figura 1

*Comunidades de líquenes.*



**Nota:** Tomado de K. Roncallo, C. Morales-Baquero, J. Ospino-Cerpa, J. Jiménez-Vásquez, M. Negritto-Chebel, 2017, pág. 1.

### **a. Clasificación de los líquenes**

Los líquenes se pueden clasificar de acuerdo a su morfología del talo (Moreno et al., 2007), y según a su taxonomía (De Los Ángeles Herrera-Campos et al., 2014), como se muestra a continuación.

#### **a.1. Morfología del talo**

Según (Amo de Paz & Burgaz, 2009), la clasificación de los líquenes ha dependido históricamente de sus propiedades morfológicas y anatómicas. Los aspectos morfológicos de las frondas permiten identificar seis musgos o biotipos que componen diferentes patrones de crecimiento. Así podemos tener a:

##### **❖ Líquenes fruticulosos**

Los talos de este tipo de líquenes permanecen unidos a la base mediante un punto o pie y crecen perpendicularmente al área donde se levantan o suspenden. Estos talos pueden tener una forma circular, como en el caso de los líquenes del género *Usnea*, o ser planos, por ejemplo, los líquenes del género *Ramalina*.

##### **❖ Líquenes foliáceos**

El talo es una estructura que crece paralela a su base y se puede separar fácilmente con una cuchilla. Comúnmente, se integran a la superficie del sustrato por medio de ricinas o diversos tomentos. Los líquenes del género *Parmelia* son un excelente caso de talos

foliáceos. En el caso de que se unan a la base mediante un punto central, se denominan talos umbilicados, como ocurre en los líquenes del género *Umbilicaria*.

#### ❖ Líquenes gelatinosos

Poseen talos con tonalidades oscuras y apariencia foliácea o levemente fruticuloso reseco, que una vez que se hidrata aumenta su tamaño de forma notable y se muestran bastante blandos al tacto. Este tipo de líquenes el fotobionte es una cianobacteria. Un buen ejemplo de líquenes gelatinosos es aquellos del género *Collema*.

#### ❖ Líquenes crustáceos

Este tipo de líquenes permanecen poderosamente ligados a su base y no tienen la posibilidad de separarse sin quebrar una parte del hábitad en el que crecen. En este contexto, podemos distinguir entre aquellos que crecen sobre la madera (epifleódicos) y aquellos que crecen en el interior de la madera (endofleódicos). En el caso de las especies que se desarrolla sobre piedras (saxícolas), estos crecen en el talo al centro de la piedra.

#### ❖ Líquenes escuamulosos

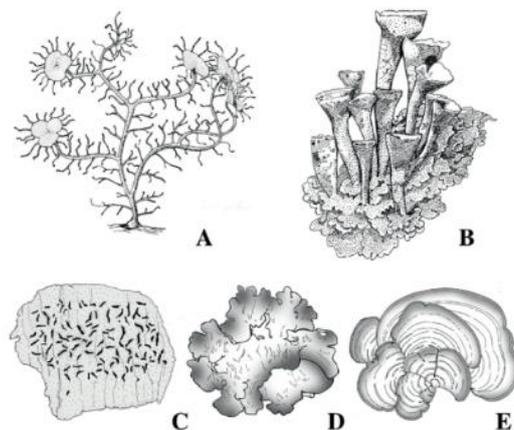
Estos líquenes poseen fracciones integras, las cuales son denominadas como escuámulas, su borde no está unificado a su base. Un ejemplo de líquenes escuamulosos son los *Fuscopannaria mediterránea*.

#### ❖ Líquenes de talo compuesto

Estos líquenes son formados por dos tipos de talo: escuamuloso y fruticuloso. Un buen ejemplo de líquenes de talo compuestos es aquellos del género *Cladonia*.

### Figura 2

Tipos de talo. A) Fruticoso, *Usnea*. B) Dimórfico, *Cladonia*. C) Costroso, *Graphis*. D) FoliOSO, *Parmotrema*. E) FoliOSO o filamentoso, *Cora*.



*Nota:* Tomado de K. Roncallo, C. Morales-Baquero, J. Ospino-Cerpa, J. Jiménez-Vásquez, M. Negritto-Chebel, 2017, pág. 4.

## **a.2. Taxonomía**

Los líquenes experimentan una etapa sexual (conocida como teleomorfo) y una asexual (llamada anamorfa). La clasificación taxonómica de estos se basa en sus estructuras de reproducción sexual, que pueden ser Ascomicetes o Basidiomicetes

### **❖ Ascomicete**

Los líquenes que producen ascas y ascosporas se agrupan en peritecios y apotecios. Los peritecios son cuerpos fructíferos cerrados, esféricos o con forma de botella, sin himenio expuesto, y tienen un tubo que se abre hacia el ostiolo, a través del cual se secretan las ascosporas. Los apotecios, por otro lado, son estructuras abiertas, en forma de disco o copa, que tienen un himenio expuesto y varios mecanismos de separación de sacos para liberar los ascoporosas.

### **❖ Basidiomicetes**

Los basidiomicetes liquenizados forman basidiomas, los cuales son muy usual entre los *Aphylophorales* y los *Agaricales*.

## **2.1.2 Descripción del líquen *Umbilicaria Calvescens* Nyl**

El líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl se encuentra en los Andes centrales, en Bolivia domina completamente las altitudes más bajas (2500–4000 m). El género *Umbilicaria* son hongos formadores de líquenes que se encuentran presentes en rocas silíceas y acantilados en ambientes alpinos, árticos y antárticos, pero también afloramientos rocosos y acantilados costeros en zonas de vegetación boreal y nemobórea. Las colecciones estudiadas por Nylander indicaron la presencia en los Andes centrales de un grupo endémico de especies de *Umbilicaria* con su centro biogeográfico en Bolivia y Perú, y nombró y describió varias especies y variedades nuevas (Hestmark, 2009).

La primera descripción publicada de *U. calvescens* fue presentada en el artículo escrito por Nylander, en este examina las colecciones de líquenes realizadas por el recolector de plantas francés Gilbert Mandon. La descripción es realmente solo una declaración sobre cómo este taxón es similar a *U. vellea*, pero también difiere en tamaño y forma de ascosporas. Sin embargo, la referencia al segundo volumen de la Sinopsis Lichenum de Nylander indica que el propio Nylander consideró la descripción y la ilustración como la primera descripción de *U. calvescens*, por lo tanto, el protólogo de la especie (Geir, 2010).

El líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl presenta un talo folioso y umbilicado, de forma amorfa, que puede ser redonda o ligeramente elíptica. Su diámetro varía entre 3 y 10 cm, y muestra sutilmente incisiones en los bordes. La parte superior del talo es gris y rugosa,

con puntuaciones de color negro, mientras que la parte inferior también es negra y contiene rizonomorfos cortos que se extienden por toda la lámina. Hacia el centro del talo, se encuentran engrosamientos de hifas (Ramos et al., 2013).

### **Figura 3**

*Liquen Umbilicaria calvescens Nyl.*



*Nota:* Foto tomado de (J. Ramos, 2016).

#### **2.1.3 Usos de los líquenes**

##### **a. Bioindicadores de aire**

Varias especies de líquenes tienen la capacidad de acumular elementos degradantes como el azufre, plomo y flúor, que provienen de la atmósfera. Esta característica, junto con su desarrollo lento, les permite resistir condiciones adversas y vivir durante mucho tiempo. La resistencia de los líquenes a estos elementos degradantes se atribuye a la resistencia del protoplasma de sus células, específicamente durante la fase metabólica, así como a su dinamismo y capacidad para resistir los efectos. (Canseco et al., 2006).

El dióxido de nitrógeno es un factor clave en el crecimiento de los líquenes, esto se debe a su capacidad catalizadora de la reacción de peroxidación de su membrana lipídica, ocasionando estragos en la membrana celular. En adición, el material particulado afecta significativamente el prorrato de los líquenes en zonas urbanizadas, debido a que pueden absorber varios contaminantes del aire en su superficie, en particular los elementos metálicos a nivel traza. Esto justifica la relación del  $PM_{10}$  promedio con la variedad de líquenes, ya que estos organismos son excelentes bioindicadores de la calidad del aire, en

otras palabras, reflejan el impacto global de los contaminantes en la atmosfera. (Gonzales Vargas et al., 2016).

A lo largo del tiempo, se han desarrollado métodos para usar los líquenes como indicadores y monitores de la contaminación atmosférica. Estos métodos suelen asociar la existencia o carencia de especies, su densidad, frecuencia de aparición, porcentaje de cobertura y/o existencia y nivel de síntomas de daño externo o interno, con la calidad del aire. De esta manera, se pueden suplementar los análisis químicos complejos, identificando la diversidad de líquenes en zonas libres de contaminación y examinando cómo su estructura y cantidad merma a medida que se aproxima a zonas contaminadas, hasta ausentarse por completo en áreas con altas concentraciones de compuestos dañinos. A diferencia de los análisis químicos, que proporcionan resultados limitados a los momentos específicos de la medición, los líquenes muestran los efectos de la contaminación durante largos períodos de tiempo. (Canseco et al., 2006).

#### **b. Uso en la medicina natural**

En la vieja Grecia, Pedanio Dioscórides (botánico y farmacólogo) redacta sobre los líquenes en su libro "Tratado de Plantas Medicinales", en el cual menciona: "Se trata de un musgo que se adhiere a las piedras mojadas. Cuando se aplica como cataplasma, detiene el sangrado, alivia la inflamación y cura las protuberancias de la piel. También se incorpora en los perfumes de bellotas y en las pomadas. Además, es útil para la elaboración de inciensos y remedios para el agotamiento. (Illana Esteban, 2012).

Durante la mitad del siglo XIX, en algunas regiones de Inglaterra, se utilizaba el liquen *Lobaria pulmonaria* para elaborar una infusión que se consumía para tratar afecciones respiratorias, y todavía se utiliza en las montañas de Escocia. Hoy en día, se emplea para aliviar el asma y los problemas de vejiga, además de ser un tónico que estimula el apetito. Varias especies de *Cladonia*, *Evernia*, *Parmelia*, *Peltigera*, *Pertusaria* y *Roccella*, se utilizaban anteriormente como purgantes, antipiréticos, antidiarreicos y para tratar la epilepsia y las infecciones cutáneas. (Illana Esteban, 2012).

En la Isla Paulino, ubicada en la provincia de Buenos Aires, Argentina, se llevaron a cabo entrevistas a los habitantes locales, quienes mencionaron el uso del liquen Ramalina celastri. Este liquen era utilizado por sus múltiples propiedades: como abortivo, para tratar la artritis, el asma, los dolores de cabeza, la diabetes, la inflamación, los cálculos, las enfermedades renales, los piojos, el prurito, el reumatismo, como antiséptico, para la tos, como cardiotónico, colirio, depurativo, digestivo, diurético, para el estómago,

expectorante, para el hígado, como pectoral, purgante, refrescante y para curar heridas (Hernández, 2011).

### c. Perfumería

En este campo, los líquenes más utilizados son *Pseudevernia furfuracea* y *Evernia prunastri*, debido a su propiedad fijadora de esencias, cuyo aroma es de tierra fresca y brindan las “notas bajas” de los perfumes de calidad, estos beneficios no se pueden obtener mediante síntesis. El uso de los líquenes para perfumes es costoso, a pesar de ello aún se usan en la industria, pero se debe regular su recolección ya que esta industria necesita grandes cantidades de líquenes para obtener los extractos, tendría repercusión medioambiental (Margulis, 1993).

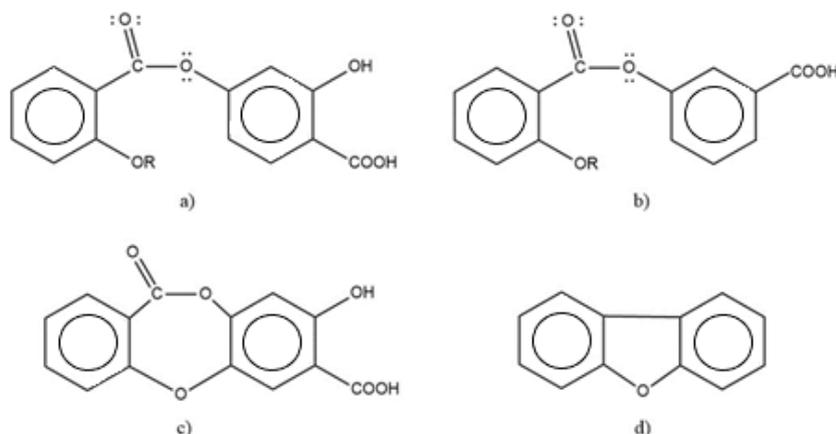
### 2.1.4 Sustancias Líquénicas

Las sustancias líquénicas comprenden diversas clases de compuestos como: aminoácidos, alcoholes de azúcar, alifáticos, dibenzofuranos, depsidonas, terpenoides, esteroides, carotenoides, entre otras. Esta multitud de compuestos hizo atractivo su estudio químico desde los primeros tiempos de la química orgánica. Bebert (1831) aisló ácido vulpénico en 1831, Alms (1832) ácido picrolínico en 1832, y Knop (1844) ácido usnico en 1844. (Huneck & Yoshimura, 1996).

Las sustancias líquénicas son sintetizadas solo a partir de los líquenes y correspondientes a compuestos determinados, su estructura se muestra en la Figura 4.

**Figura 4**

*Dépsidos a) para- dépsido b) meta-dépsido c) Depsidonas d) Dibenzofuranos.*



*Nota:* Adaptado de Juana Robles C., Patricia Morales B., Ana Pastor de Abram, 1992, pág. 69.

Se pueden clasificar de acuerdo a su estructura: dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos.

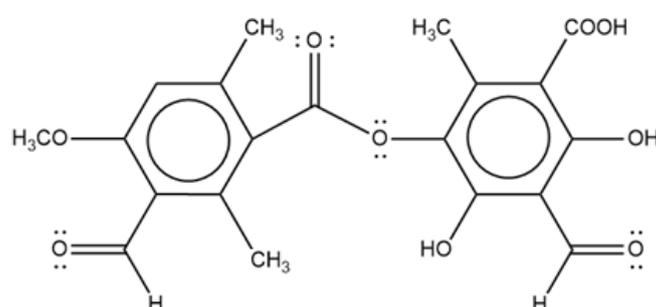
### 2.1.5 Clasificación de las sustancias líquénicas de acuerdo a su estructura

#### a. Dépsidos

Los dépsidos son ésteres de policétidos aromáticos que poseen la posibilidad de sufrir acoplamiento C-O (depsidonas) y C-C (depsonas). Se aíslan primordialmente de líquenes y tienen la posibilidad de formardímeros y trímeros. Un ejemplo es el ácido hematamnólico (Hasegawa, 2018).

#### Figura 5

Dépsidos. Ácido hematamnólico.



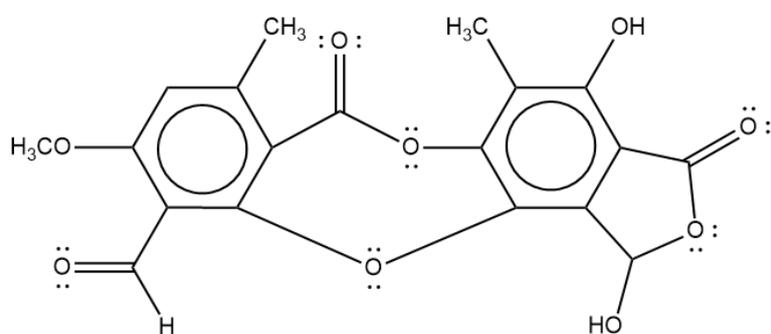
Nota: Adaptado de C. Córdoba, 1975, pág. 20.

#### b. Depsidonas

Son compuestos que muestran en su composición dos núcleos bencénicos que están unidos entre sí mediante puentes del tipo éster y éter. Tales como, el ácido estíctico, ác. norstíctico y el ác. salacínico (Córdoba, 1975).

#### Figura 6

Depsidonas. Ácido estíctico.



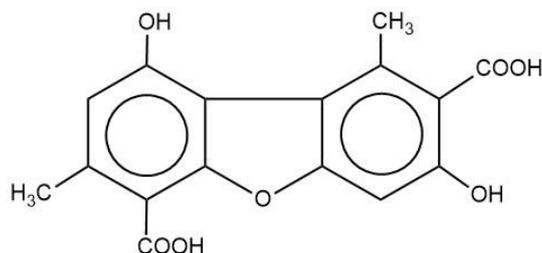
Nota: Adaptado de C. Córdoba, 1975, pág. 25.

### c. Dibenzofuranos

Los dibenzofuranos poseen dos anillos fenólicos unidos entre sí por un enlace éter y un enlace C-C. Se pueden dividir en dos grupos, el primero con carboxilo sustituyente en la posición del anillo y el otro sin carboxilo en dicha posición. Como muestra el ácido didímico, ácido esquizopéltico y el ácido pannárico (Córdoba, 1975).

#### Figura 7

Dibenzofuranos. Ácido pannárico.



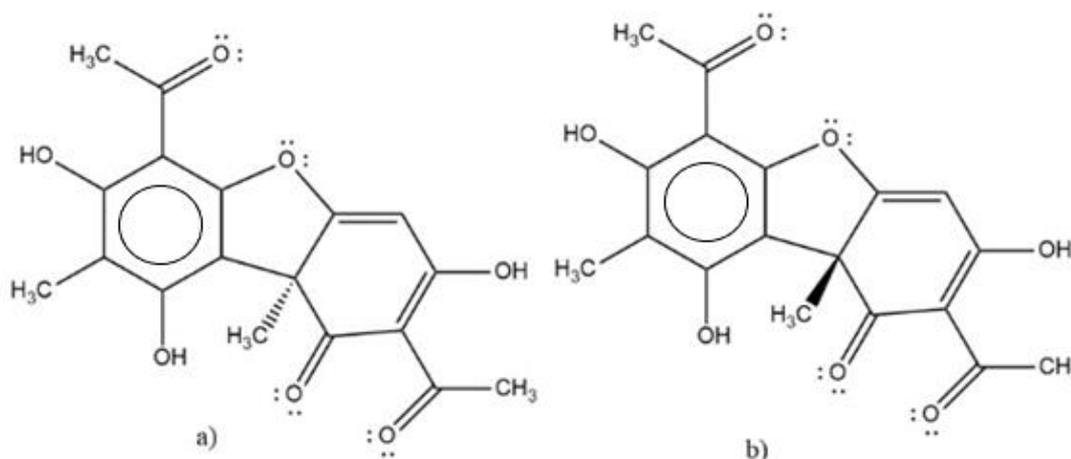
Nota: Adaptado de C. Córdoba, 1975, pág. 28.

### d. Ácidos Úsnicos

Fue aislada por primera vez por Rochlender y Heldt en 1843 de las especies *Ramalina calicaris* y *Usnea barbata*. Posteriormente, descubrieron la existencia de dos formas con distinto poder rotatorio, el ácido D-úsrico, o (+)-úsrico y el ácido L-úsrico, o (-)-úsrico. Las cuatro formas de los ácidos Úsnicos están constituidos por dos unidades fenólicas ambas metiladas en posición 4 como metilfloroacetofenona (Córdoba, 1975).

#### Figura 8

Ácido Úsnico. a) (-) ácido úsnico. b) (+) ácido úsnico.



Nota: Adaptado de C. Córdoba, 1975, pág. 31 y 33.

A continuación, se detallarán algunos compuestos liquénicos y sus principales propiedades físico químicas:

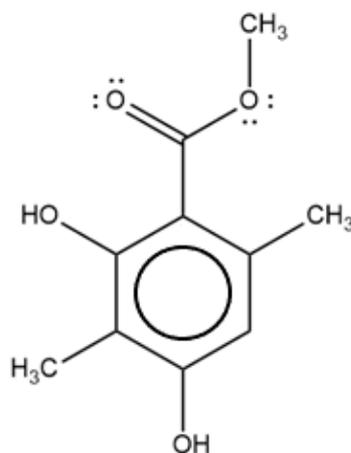
### 2.1.6 Metil $\beta$ -orcinolcarboxilato

El metil  $\beta$ -orcinolcarboxilato o también conocido como ácido atrárico, es un compuesto fenólico mononuclear derivado del ácido hidroxibenzoico (Müller, 2001), además se puede obtener a partir de la hidrólisis de la atranorina (Bourgeois et al., 1999). (Huneck & Yoshimura, 1996) presentan los siguientes datos sobre esta sustancia liquénica:

- i. Punto de fusión: 140-141, 143- 144 °C
- ii. Reactividad: naranja NaOCl, (EtOH) violeta-negro en dilución con EtOH verde oliva, en adición con H<sub>2</sub>O violeta.
- iii. UV: 267 y 299 nm
- iv. IR(KBr): 734, 790, 810, 834, 950, 1000, 1038, 1064, 1110, 1160, 1192, 1280, 1310, 1370, 1420, 1442, 1502, 1502, 1600, 1620, 2950, 3100, 3450 cm<sup>-1</sup>.
- v. <sup>1</sup>H-NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 2.10 (3H,s,Me-8), 2.45 (3H,s,Me-9), 3.92 (3H,s,-COOMe), 5.23 (1H,s,OH-4), 6.20 (1H,s,H-5), 12.04 (1H,s, OH-2)
- vi. <sup>13</sup>C-NMR (50.3MHz, CDCl<sub>3</sub>): C-1: 105.2, C-2: 158.0, C-3: 108.5, C-4: 163.1, C-5: 110.5, C-6: 140.2, C-7: 172.6, C-8: 7.6, C-9: 24.1, -COOMe: 51.8
- vii. MS, m/z 196 (M<sup>+</sup>,490/0), 165 (26), 162 (100), 137 (10),136 (99), 108 (10),107 (10), 83 (11),44 (48), 43 (17)
- viii. StL: *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale, *Stereocaulon alpinum* Laur., *Stereocaulon vesuvianum* Pers.
- ix. TLC: A: 64, B: 70, C: 52
- x. HPLC: R<sub>T</sub> 3.34 min

### Figura 9

Estructura química del metil  $\beta$ -orcinolcarboxilato.

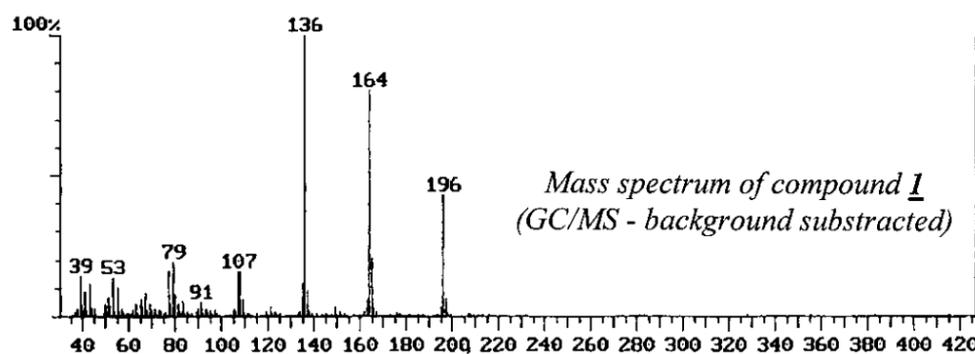


Nota: Adaptado de Huneck S. & Yoshimura I., 1996, pág. 160.

Además, (Bourgeois et al., 1999) realizó la identificación y cuantificación del ácido atrárico en una mezcla de los robles *Quercus petraea* (Mattusch.) Liebl. y *Quercus robur* L. que contienen líquenes, obtuvieron la concentración de  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  de ácido atrárico mediante CG-EM, el espectro resultante se muestra en la Figura 10.

### Figura 10

*Espectro de masa del ácido atrárico.*



*Nota:* Tomado de Bourgeois et al., 1999, pág. 2.

#### 2.1.7 Atranorina

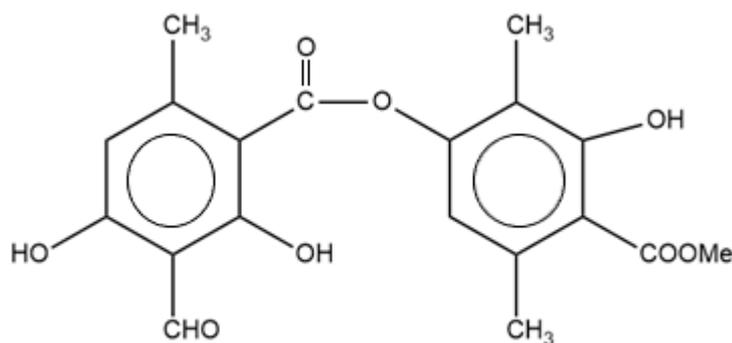
(Huneck & Yoshimura, 1996) presentan los siguientes datos sobre esta sustancia líquénica:

- i. Punto de fusión:  $196^{\circ}\text{C}$  (dec.)
- ii. Reactividad: KOH amarillo, PD amarillo,  $\text{FeCl}_3$  rojo-marrón
- iii. UV (MeOH): 210, 252, 312 nm
- iv. IR (KBr): 790, 810, 830, 870, 960, 990, 1010, 1030, 1078, 1108, 1166, 1198, 1210, 1250, 1270, 1285, 1360, 1382, 1410, 1458, 1580, 1652, 3000, 3500  $\text{cm}^{-1}$
- v.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.09 (3H,s,Me-8'), 2.69 (6H,s,Me-9,Me-9'), 3.99 (3H,s,7'-COOMe), 6.40 (1H,s,H-5), 6.51 (1H,s,H-5'), 10.36 (1H,s,CHO-8), 11.96 (1H,s,HO-2'), 12.51 (1H,s,HO-2), 12.56 (1H,s,HO-4)  $^{13}\text{C-NMR}$  (25.05MHz, $\text{CDCl}_3$ ): C-1: 103.0, C-2: 169.0, C-3: 108.7, C-4: 167.5, C-5: 112.8, C-6: 152.3, C-7: 169.6, C-8: 193.6, C-9: 24.4, C-1': 116.8, C-2': 162.8, C-3': 110.4, C-4': 152.1, C-5': 116.0, C-6': 139.8, C-7': 172.1, C-8': 23.8, C-9': 9.4, C-7' -COOMe: 52.2
- vi. MS, m/z 375 (9%), 374 ( $\text{M}^+$ ,30), 197 (30), 196 (100), 180 (35), 179 (98), 178 (26), 177 (25), 176 (35), 165 (61), 164 (94), 163 (13), 151 (14), 150 (61), 149 (26), 137 (17), 136 (78), 135 (22), 85 (15),83 (30),79 (12), 77 (22), 69 (15), 67 (24),66 (11),65 (12),55 (17),52 (13), 51 (17),43 (22),41 (15)
- vii. Derivados: Pentaacetilatránorina, prismas (MeOH), punto de fusión:  $153\text{-}154^{\circ}\text{C}$ , de la atránorina con  $\text{Ac}_2\text{O-H}_2\text{SO}_4$ .

- viii. StL: *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale
- ix. TLC: A: 75, B: 78, B': 73, C: 79, E: 57, F: 85
- x. HPLC: R<sub>T</sub> 38

**Figura 11**

*Estructura química de la atranorina.*

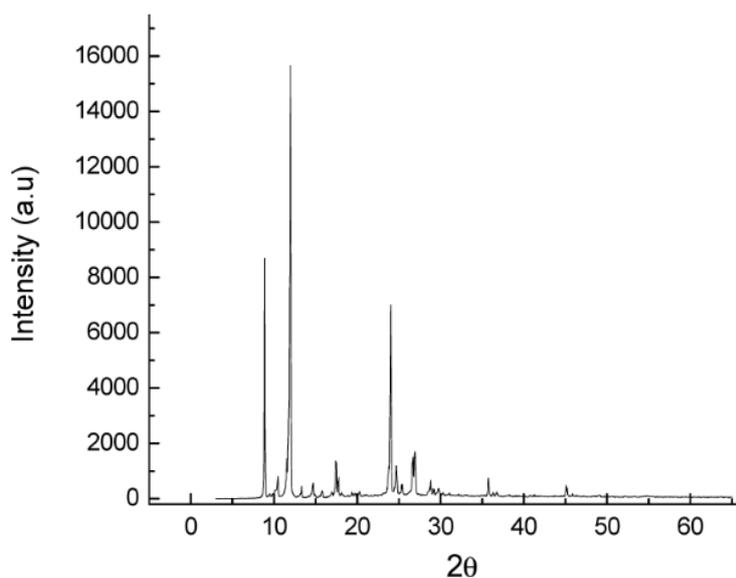


*Nota:* Adaptado de Huneck S. & Yoshimura I., 1996, pág. 238.

(Melo et al., 2008) aislaron la atranorina a partir del líquen *Cladina kalbii*, la extracción fue con cloroformo, como solvente y en un equipo Soxhlet, la atranorina fue identificado mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN (Tabla 2) y Difracción de Rayos X (Figura 12).

**Figura 12**

*Difracción de Rayos X de la atranorina.*



*Nota:* Tomado de Melo et al., 2008, pág. 2.

**Tabla 2***<sup>1</sup>H-(500 MHz) y <sup>13</sup>C-(100 MHz) NMR Datos espectrales de la Atranorina en CDCl<sub>3</sub>.*

C/H	δ <sub>c</sub> (CH <sub>x</sub> )	δ <sub>H</sub> (n <sub>H</sub> , m)
1	102.83 C	-
2	169.09 C	-
3	108.54 C	-
4	167.48 C	-
5	112.86 (CH)	6.39 (1, s)
6	152.46 C	-
7	169.71 C	-
8	193.86 (CH)	10.35 (1, s)
9	25.60 (CH <sub>3</sub> )	2.68 (3, s)
1'	151.98 C	-
2'	116.78 C	-
3'	162.88 C	-
4'	110.25 C	-
5'	139.88 C	-
6'	116.02 (CH)	6.51 (1, s)
7'	172.21 C	-
8'	9.37 (CH <sub>3</sub> )	2.09 (3, s)
9'	24.00 (CH <sub>3</sub> )	2.54 (3, s)
H <sub>3</sub> C-O	52.36 (CH <sub>3</sub> )	3.98 (3, s)
OH-2	-	12.49 (1, s)
OH-4	-	12.54 (1, s)
OH-3'	-	11.93 (1, s)

*Nota:* Tomado de Melo et al., 2008, pág. 2.

### 2.1.7 Orcinol

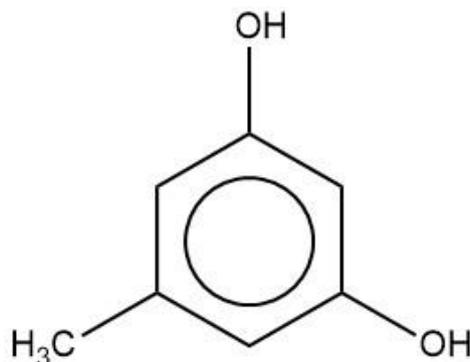
Los autores (Huneck & Yoshimura, 1996) recopilaron los siguientes datos sobre el compuesto liquénico orcinol.

- i. Punto de fusión: 106-108 °C
- ii. Reactividad: NaOCl (rojo)
- iii. IR (KBr): 690, 720, 835; 850, 980, 1035, 1155, 1205, 1300, 1330, 1380, 1480, 1515, 1600, 1620, 3350 cm<sup>-1</sup>
- iv. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, acetona d<sub>6</sub>): 2.14 (3H, s, Me-), 6.15 (3H, s, 3 arom -H), 8.10 (2H, s, 2x -OH)

- v.  $^{13}\text{C}$ -NMR (75.47 MHz, DMSO-  $d_6$ ): C-1: 139.19, C-2, C-6: 107.11, C-3,C-5: 158.25, C-4: 99.77, C-7: 21.24
- vi. MS, m/z 124 ( $\text{M}^+$ ,100%), 107, 94
- vii. Liquen estudiado: *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Roccella montagnei* Bél.

### Figura 13

Estructura química del orcinol



Nota: Adaptado de Huneck S. & Yoshimura I., 1996, pág. 162.

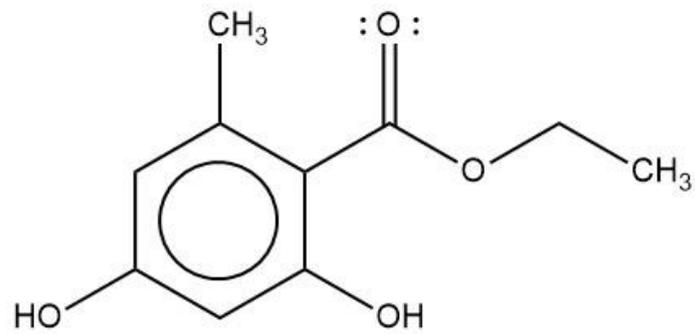
#### 2.1.8 Etil orselinato

Los autores (Huneck & Yoshimura, 1996) recopilaron los siguientes datos sobre el compuesto liquénico etil orselinato.

- i. Punto de fusión: 131-132 °C
- ii. Reactividad: NaOCl (rojo)
- iii. UV (EtOH): 219 (4.27), 265 (4.11), 302nm (3.71)
- iv. IR (KBr): 700, 894, 1062, 1178, 1270, 1320, 1368, 1380, 1405, 1447, 1470, 1478, 1500, 1585, 1640, 3360, 3420 $\text{cm}^{-1}$
- v.  $^1\text{H}$ -NMR (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.42 (3H, t, J= 6.9Hz, -O-CH<sub>2</sub>-Me), 2.53 (3H, s, -Me), 4.046 (2H, q, J= 6.9Hz, -O-CH<sub>2</sub>-Me), 6.36 (2H, s, H-3, H-5), 11.92 (2H, s, 2x-OH)
- vi.  $^{13}\text{C}$ -NMR (75.47 MHz, DMSO-  $d_6$ ): C-1: 139.19, C-2, C-6: 107.11, C-3,C-5: 158.25, C-4: 99.77, C-7: 21.24
- vii. MS, m/z 196 ( $\text{M}^+$ ,35%), 167 (1), 151 (25), 150 (100), 122 (20), 94 (5), 69 (8)
- viii. Liquen estudiado: *Roccella fuciformis* (L.) DC.

**Figura 14**

*Estructura química del etil orselinato.*



*Nota:* Adaptado de Huneck S. & Yoshimura I., 1996, pág. 158.

### **2.1.9 Identificación Espectroscópica de Compuestos Orgánicos (Reyna Pinedo, 2005)**

Hay cuatro técnicas espectroscópicas clave para determinar la estructura de un compuesto en química orgánica. Estas incluyen: EM, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IR y UV- Visible. Estas técnicas son vitales ya que permiten identificar una amplia gama de elementos estructurales. La relevancia de cada método depende de la cantidad de información útil que se pueda extraer de él, lo cual no solo depende de la cantidad total de información, sino también de cuán interpretable es, y esto depende de la complejidad de la estructura de una molécula. En general, se sigue el siguiente orden para interpretar la estructura de la molécula en estudio:

- I. Resonancia magnética (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C)
- II. Espectrometría de masa
- III. Espectroscopía de infrarrojo
- IV. Espectroscopía Ultravioleta

#### **a. Espectrometría de Masas, EM**

En esta técnica las moléculas en estado gaseoso y a presión reducida son sometidas a un haz de electrones de alta energía. Lo que origina este bombardeo es la eliminación de uno de los electrones de la molécula, lo que resulta en la formación de un ion con carga positiva (con un número impar de electrones). Este ion se conoce como "ion molecular" y se representa como M<sup>•+</sup>

Por otro lado, el haz de electrones proporciona a los iones moleculares un exceso de energía considerable, que supera con creces lo necesario para romper los enlaces covalentes de las moléculas. Como resultado, poco después de la formación de los iones moleculares, gran parte de ellos se particionan en varias estructuras, dependiendo de la naturaleza específica del ion molecular. A continuación, se separa la mezcla resultante de iones según la proporción masa/carga, m/z, y se registra la abundancia relativa de cada fragmento iónico. El espectrómetro muestra estos resultados en un gráfico que representa las intensidades de los fragmentos iónicos positivos en función de la proporción carga/masa. De esta manera, se obtiene el espectro de masas.

El valor del "pico base", que corresponde a la señal más intensa en el espectro, se establece en un 100%. Las intensidades de los demás picos, incluyendo el del ión molecular, se expresan como porcentaje con relación al pico base.

La técnica espectrometría de masas se utiliza en dos áreas clave para investigar compuestos orgánicos:

- i. La precisión en la determinación de la masa molecular del compuesto analizado supera la de cualquier otro método instrumental; y
- ii. La estructura del compuesto se infiere mediante el análisis minucioso de los diferentes fragmentos presentes en el espectro de masas.

### **b. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN<sup>1</sup>H**

La resonancia magnética nuclear (RMN) se refiere a la transformación del núcleo de un elemento cuando absorbe energía al ser expuesto a un campo magnético fuerte y a la vez es irradiado con energía electromagnética. La absorción de energía por parte del núcleo se puede cuantificar. Este fenómeno solo ocurre cuando la fuerza del campo magnético y la frecuencia de la radiación electromagnética tienen valores particulares para dicho proceso.

Los espectrómetros RMN pueden cuantificar la absorción de energía en los núcleos de hidrógeno presentes en las moléculas orgánicas. Este equipo está diseñado para irradiar energía electromagnética de frecuencia constante a la molécula, mientras se ajusta la fuerza del campo magnético. Cuando este alcanza la intensidad adecuada, los núcleos de hidrógeno absorben energía, lo que da lugar al fenómeno de resonancia. Esta absorción se registra como una señal, un pico o más, a lo largo del espectro. El espectro obtenido muestra la frecuencia de los picos de absorción ( $\delta$ , ppm) en función de sus intensidades.

Cuando interpretamos un espectro de resonancia magnética nuclear (RMN), analizamos los tres aspectos principales que se observan en estos espectros:

- i. **Desplazamientos químicos**, se refieren a las posiciones (ppm) y cantidades de señales distintas que aparecen en el espectro. Estos desplazamientos proporcionan información sobre los diversos tipos de hidrógeno presentes en el compuesto y su entorno químico específico para cada protón.
- ii. **Intensidad de señal**, específicamente la Integración, el cual representa el número de hidrógenos para cada señal, muchas veces de manera proporcional.
- iii. **Acoplamiento spin – spin**, es la relación entre hidrógenos adyacentes, en el espectro se muestra como partición del pico, esto indica la cantidad de hidrógenos adyacente que tiene el hidrógeno de cada señal.

Un espectro de resonancia magnética nuclear es totalmente analizado cuando cada señal en el espectro puede asignarse a uno o más hidrógenos del compuesto analizado. En otras palabras, cada hidrógeno o hidrógenos equivalentes debe tener una señal en el espectro que cumpla con los requisitos anteriormente mencionados (ítem i, ii y iii de la presente sección).

### **c. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN<sup>13</sup>C**

La técnica RMN<sup>13</sup>C desempeña un papel crucial al realizar la elucidación de compuestos orgánicos. Del mismo modo, con la técnica RMN<sup>1</sup>H visualizamos los tipos de hidrógenos enlazados a los carbonos del compuesto, RMN<sup>13</sup>C identificamos los átomos de carbono. Por lo tanto, la técnica RMN<sup>13</sup>C complementa perfectamente a la RMN<sup>1</sup>H en la elucidación de la estructura de compuestos orgánicos. Además, las teorías físico- cuántica de la RMN<sup>13</sup>C son igual de aplicables que en la RMN<sup>1</sup>H, solo hay una disparidad importante. Mientras que la RMN<sup>1</sup>H se centra en el fenómeno ocurrido solo el isótopo de hidrógeno (<sup>1</sup>H), la RMN<sup>13</sup>C se enfoca específicamente en el isótopo de carbono (<sup>13</sup>C), este isótopo es escaso lo cual es ventajoso para su estudio, ya que no presentará desdoblamientos <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C en el espectro resultante.

Una limitación derivada de su despreciable abundancia isotópica del <sup>13</sup>C es la necesidad de emplear técnicas mayor potencias. Estas técnicas alteran las áreas de los picos en el espectro, lo que no refleja proporcionalmente el número real de átomos de carbono en la molécula. Además, el término integración como no existe para RMN<sup>13</sup>C. Otra limitación es la necesidad de mayor cantidad de muestra a comparación de RMN<sup>1</sup>H (RMN<sup>13</sup>C: ~ 20 mg; RMN<sup>1</sup>H: ~ 4mg). Al observar el espectro RMN<sup>13</sup>C podemos identificar los picos, según su desplazamiento podemos identificar el tipo de carbono o el grupo funcional el cual pertenece. El espectro RMN<sup>13</sup>C tiene alcance de desplazamiento: 0 a 250 ppm. Esto supone una ventaja para la elucidación del espectro RMN<sup>13</sup>C, porque a un mayor rango del desplazamiento, probablemente no habrá solapamiento de señales.

### **d. Espectroscopía de Infrarrojo, IR**

El espectro infrarrojo de un compuesto se representa gráficamente en función de la transmitancia (%) en el eje "Y" y el número de onda ( $\nu^{-1}$ ) en el eje "X", este último toma valores de todo el rango infrarrojo. En la literatura, se encuentran espectros infrarrojos en términos del número de onda y de la longitud de onda, estos son muy diferentes entre sí, lo más recomendable es transformar los gráficos en términos de número de onda en caso se requiera hacer comparación de espectros.

Si en caso la muestra no interactúa con la radiación en una  $\lambda$  específica, la señal mostrada en el espectro es 100% de T, lo cual es un caso utópico. La parte del espectro donde el %T es 100 o cercano a este valor se denomina "línea base" y se muestra en la zona superior del gráfico. Si en caso la muestra absorbe radiación a una  $\lambda$  particular, se observa una disminución en el %T, lo que se manifiesta como un "pico", señal, más precisamente, como una "banda de absorción" en el espectro. La colocación de los picos

en el espectro IR se expresa generalmente en términos de números de onda ( $\nu^{-1}$ ) en centímetros ( $\text{cm}^{-1}$ ). Además, las intensidades de absorción de las señales pueden ser expresados tanto en términos de transmitancia (%T) como de absorbancia (A), estos están relacionados entre sí\*.

Contrario a los espectros de las técnicas EM y RMN, los espectros IR suelen tener cierto grado de complejidad para su elucidación, incluso si son compuestos de estructura simple. Pero, los químicos orgánicos aprovechan esta complejidad al comparar el espectro de un compuesto desconocido con el de una muestra de referencia. La coincidencia señal a señal en ambos espectros es una sólida evidencia de que el compuesto en estudio es el mismo al de referencia. Es prácticamente imposible que dos compuestos distintos, excepto los enantiómeros ópticos, posean igual espectro resultante.

Aunque esta técnica es compleja y requiera regular cantidad de muestra (alrededor de 40 mg), y el espectro obtenido es único para cada compuesto. Existen picos característicos para ciertos grupos funcionales, ya sea la misma frecuencia o cercana a esta, esta característica es independiente a la estructura de la molécula o su entorno químico. Esta característica permite identificar grupos funcionales existentes en la estructura de la molécula en estudio, con solo observar el espectro, luego, identificar los picos característicos y por último compararlo con las tablas de frecuencia IR, estos se encuentran como anexos en los libros de química orgánica.

---

\* La transmitancia es igual a la proporción de la intensidad radiante transmitida por una muestra con respecto a la intensidad radiante incidente sobre el compuesto

$$\% T = \frac{\text{intensidad transmitida}}{\text{intensidad incidente}} \times 100\%$$

La absorbancia se puede relacionar a la transmitancia, mediante la siguiente ecuación:  $A = \text{Log}_{10} T^{-1}$

### e. Espectroscopía de Ultravioleta, UV-Vis

Un espectro UV-Vis es una gráfica de la longitud de onda  $\lambda$  (nm) frente a la absorción (A) a lo largo de la región UV-Visible. El espectro está formado por bandas de absorción a lo largo de longitudes de onda, donde la posición punto máximo de absorción se denota como  $\lambda_{\max}$ , este también es el nivel más alto de la curva de absorción, la cual cuenta con la energía requerida para realizar una transición electrónica. La absorbancia en la  $\lambda_{\max}$  sigue la Ley de Lambert-Beer, en la cual involucra también la transmitancia T y la absorptividad molar  $\epsilon$  como muestra la siguiente relación:

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

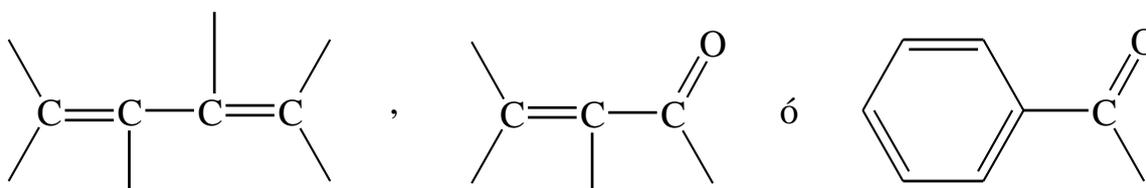
$$\epsilon = A/cb$$

La absorbancia a cierta longitud de onda depende de tres factores: concentración del analito, la estructura electrónica y la anchura de la celda usada en la medición (b), por lo general es 1 cm. Si en caso el valor de  $\epsilon$  excede en cantidad, usualmente es expresado en función logaritmo para la representación del espectro UV-Visible. Las absorciones cuyo coeficiente de absorptividad molar es mayor a 10 000 son considerados como absorciones de alta intensidad, si es menor a este se considera de baja intensidad, comúnmente llamados transiciones prohibidas.

A comparación de las anteriores técnicas, el espectro UV-Visible no nos brinda tanta información de un compuesto, pero sirve como complemento de estudio de compuestos con sistemas conjugados, así como muestra la Figura 15. La mayor parte de una molécula resulta transparente, no presenta señal notoria en el rango UV-Visible, por consiguiente, si presenta picos o bandas de absorción es evidencia de que el compuesto posee grupos conjugados.

**Figura 15**

*Sistemas conjugados de enlaces dobles de enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno.*

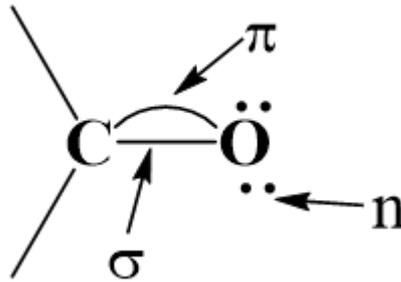


**Principio fundamental de absorciones UV.** La estructura del compuesto orgánico en estado basal contiene electrones de valencia que coexisten en diferentes orbitales

moleculares: orbitales sigma " $\sigma$ ", orbitales pi " $\pi$ " y orbitales de no enlace "n". Por ejemplo, representando el grupo carbonilo:

**Figura 16**

*Orbitales existentes en el enlace carbonilo.*



A lo largo de la región de luz ultravioleta (200- 400nm), en caso el compuesto absorba energía en esta región, producirá el traslado de electrones de un orbital en estado basal a un orbital excitado de mayor energía.

## 2.2 Marco conceptual

En la búsqueda bibliográfica solo se encontró un estudio químico relativo al líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl, realizado por Elena Córdor y Judith Ramos, por lo que este trabajo es la continuación de las investigaciones de este líquen.

### 2.2.1 Composición química del líquen *Umbilicaria Calvescens Nyl*

#### a. Análisis preliminar (Marcha fitoquímica)

El análisis preliminar o marcha fitoquímica tiene como finalidad la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en una muestra vegetal u organismo vivo, en base a la extracción con solventes adecuados del material en estudio e identificando el tipo de producto natural mediante reacciones de coloración y/o precipitación. (Ramos Chávez, 2018) realizó la marcha fitoquímica obteniendo los siguientes metabolitos secundarios: Aminogrupos primarios y/o secundarios, Grupos fenólicos libres, Taninos y Triterpenos y/o esteroides.

#### b. Aislamiento de compuestos liquénicos en el líquen

La única referencia relativa al líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl fue publicado por (Ramos & Córdor, 2018), quienes reportaron el aislamiento del ácido úsnico y ácido lecanórico, mientras que (Martino, 2015) aisló el metil  $\beta$ -orcinolcarboxilato a partir del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale. A continuación, se detalla las características de estos metabolitos secundarios aislados.

##### b.1. Ácido lecanórico

Características reportadas por (Ramos & Córdor, 2018):

- i. Sólido de color blanco.
- ii. Soluble en metanol y acetona, poco soluble en cloroformo.
- iii. Punto de fusión: 182°C – 184°C.
- iv. Reactividad frente al  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  da una coloración rojiza.
- v.  $R_f = 0,29$  en el sistema n-hexano: acetato de etilo (80:20) al ser revelado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10%.

(Ramos & Córdor, 2018) identificaron mediante la técnica espectroscópica UV-Vis, mostrando tres bandas de máxima absorción a 213, 270,8 y 304,2 nm. Posteriormente, en el espectro IR identificaron cinco bandas correspondientes al grupo – OH a 3533,6  $\text{cm}^{-1}$ , CH a 2980  $\text{cm}^{-1}$ , C=O a 1658,8  $\text{cm}^{-1}$ , C=C a 1606,7  $\text{cm}^{-1}$  y OH (carboxílico) a 1240,2  $\text{cm}^{-1}$ . Luego, al realizar la identificación usando la técnica espectroscopía de masas, se mostró

en el espectro un ión molecular [M-H] a  $m/z=317$ , concuerda para la fórmula molecular  $C_{16}H_{14}O_7$  (318 uma). Finalmente, los espectros de  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN fueron identificados las señales de los diferentes hidrógenos y de los 16 carbonos.

### ***b.2. Ácido Úsnico***

Características reportadas por (Ramos & Córdor, 2018):

- i. Cristales en forma de agujas de color amarillo
- ii. Soluble en acetona, poco soluble en etanol
- iii. Punto de fusión:  $204^{\circ}C - 205^{\circ}C$
- iv.  $R_f = 0,62$ ; sistema etanol: acetona (1:1) al ser revelado con  $H_2SO_4$  al 10%.

(Ramos & Córdor, 2018) identificaron mediante la técnica espectroscópica UV-Vis, el espectro presentó dos bandas a 233,7 y 283,8 nm. Posteriormente, en el espectro IR identificaron las bandas correspondientes al OH a  $3086,2\text{ cm}^{-1}$ , CH a  $2913,4\text{ cm}^{-1}$ , C=O a  $1691,6\text{ cm}^{-1}$ , C=C a  $1629,8\text{ cm}^{-1}$  y C-O-C a  $1284\text{ cm}^{-1}$ . Luego, al realizar la identificación usando la técnica espectroscopía de masas, se mostró en el espectro un ión molecular [M-H] a  $m/z = 343$  (pico base), este concuerda con la fórmula molecular  $C_{18}H_{16}O_7$  (344 uma). Finalmente, los espectros de  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN fueron identificados las señales de los diferentes hidrógenos y de los 18 carbonos.

### ***b.3. Metil $\beta$ -orcinol carboxilato***

Características del metabolito secundario reportado por (Martino, 2015):

- i. Masa obtenida: 5,1 mg
- ii. Soluble en acetona
- iii. Banda máxima de absorción UV-Vis: 307 nm

(Martino, 2015) realizó la identificación por espectroscopía UV-Vis obteniendo el máximo pico de absorción 307 nm, luego, analizaron mediante  $^1H$ -RMN,  $^{13}C$ -RMN y HMBC, obteniendo espectros acordes con lo esperado según las referencias bibliográficas. 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.

## Capítulo III. Desarrollo del Trabajo de Investigación

### 3.1 Presentación

Construir un estudio de investigación se basa en el uso del método de investigación científica, que se centra en la investigación preliminar, la investigación experimental y la publicación o informe del trabajo. En el presente estudio, el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. fue recolectado cerca al nevado de Huaytapallana, en el departamento de Junín, la recolecta fue realizada en octubre del año 2015 por Judith Ramos. Posteriormente, se realizó la identificación botánica, el cual fue identificado como líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. Luego, se procedió a la búsqueda bibliográfica en la base de datos hasta el 2021, encontrándose una publicación relativa al aislamiento de ácido lecanórico y ácido úsnico a partir de este líquen (Ramos & Cóndor, 2018). Sin embargo, según las referencias revisadas y el análisis fitoquímico realizado por estos autores, se reportan para esta especie, otros metabolitos secundarios (compuestos liquénicos, triterpenos y/o esteroides y compuesto fenólicos), que han sido identificados y no aislados, por lo que se decidió seguir trabajado con este líquen con la finalidad de contribuir con el estudio fitoquímico de este organismo.

Como parte del estudio experimental, primero, La muestra fue secada a pesar de que la muestra se nos proporcionó seca y molida. A continuación, se realizó la Marcha Fitoquímica identificando los principales metabolitos secundarios. Para el aislamiento de los metabolitos secundarios existentes en el líquen, primero, se obtuvo los EBO's a partir de la extracción sólido-líquido usando éter de petróleo, diclorometano y etanol como solventes. Se realizó la separación de los EBO's mediante técnicas cromatográficas, lográndose identificar los metabolitos secundarios: metil  $\beta$ -orcinoilcarboxilato (EBO/éter), ácido úsnico (EBO/ diclorometano) y orselinato de metilo (EBO/ etanol); mediante un cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas. Es importante destacar que el desarrollo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Química de Productos Naturales, este se encuentra en el Laboratorio de Química Inorgánica N°12, que se encuentra en el Pabellón C de la Facultad de Ingeniería Química y Textil. El estudio se llevó a cabo entre junio del 2021 y febrero del 2022 (secado de muestra, marcha fitoquímica, parte de la identificación de los compuestos liquénicos)

El presente trabajo siguió la estrategia de investigación para el análisis de plantas medicinales, el cual se ha adaptado para nuestro trabajo de (Reyna, 2001), además, la etapa de la extracción y purificación se realiza de acuerdo al proceso químico presentado en el Anexo 4.

### 3.2 Trabajo Preliminar

#### 3.2.1 Recolección de la muestra

La recolecta de la muestra fue realizada por Judith Ramos el día 31 de octubre del 2015, cerca al nevado de Huaytapallana, en el departamento de Junín. Posteriormente, el líquen se nos proporcionó previamente seca y triturada, sin embargo, debido a la exposición a la humedad se volvió a secar a 40°C por 4 horas.

#### 3.2.2 Determinación e identificación botánica

El líquen está debidamente identificado como *Umbilicaria calvescens* Nyl (Anexo 1). La identificación fue determinada en el Museo de Historia Natural de la UNMSM, por el Blgo. Ángel Manuel Ramírez Ordaya.

#### Tabla 3

*Clasificación taxonómica del líquen Umbilicaria calvescens Nyl.*

---

#### Figura 17

*Líquen Umbilicaria calvescens Nyl.*



*Nota:* Foto tomada por Judith Ramos en 2016.

---

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Lecanoromycetes
Orden	Lecanorales
Familia	Umbilicariaceae
Género	Umbilicaria
Especie	<i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl

---

### **3.3 Trabajo Experimental**

#### **3.3.1 Equipos y materiales**

##### **a. Equipos**

- i. Rotavapor Buchi R-215
- ii. Lámpara UV Model UVGL-58 Mineralight Lamp, Multiband UV-254/ 366 nm.
- iii. Balanza analítica marca Denver Instrument (con un error de  $\pm 0.00005$  g).
- iv. Estufa marca Memmert.
- v. Bomba de vacío Diaphragm Vacuum Pump GM-0.20
- vi. Plancha de calentamiento Velp Scientifica 230V/50\_60 Hz.
- vii. Cromatógrafo de gases Shimadzu GCMS-QP2010 SE (Columna: RESTEK. RTX-5MS, 30m x 0,25 mm ID x 0.25 $\mu$ m df.)
- viii. Espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu Modelo UV-1800
- ix. Espectrómetro IR Perkin Elmer Modelo Frontier
- x. Espectrómetro RMN Bruker Avance III HD 500

##### **b. Materiales de vidrio**

- i. Columna cromatográfica de diversas alturas y diámetros
- ii. Balones de vidrio de diferentes volúmenes.
- iii. Tubos de ensayo 13x100 mm.
- iv. Matraz de Erlenmeyer 125 mL, 300, 250, 350.
- v. Vaso precipitado 100 mL, 150, 50.
- vi. Viales de vidrio 10 mL.

##### **c. Solventes orgánicos**

- i. Metanol seco grado ACS, Merck.
- ii. Cloroformo grado ACS, Merck.
- iii. Éter de petróleo grado ACS, Merck.
- iv. Acetato de etilo grado ACS, Merck.
- v. Diclorometano grado ACS, Merck.
- vi. Etanol grado ACS, Merck.
- vii. Butanol grado ACS, Merck.

##### **d. Reactivos químicos**

- i. Ácido sulfúrico al 50%
- ii. Adsorbente: Sílica gel, tamaño de poro 60 Å, tamaño de partícula 35 - 75  $\mu$ m (marca SIGMA-ALDRICH).

### **3.4 Secado y Molienda de la muestra**

El líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl pre secado y triturado, se secó a 40°C por 3 horas. Luego, se procedió a pesar la muestra, obteniéndose 734,85 g.

### **3.5 Análisis cualitativo (Marcha fitoquímica)**

#### **3.5.1 Muestra**

A partir de 11 g de la líquen seco y triturado, de los cuales 6 g para los ensayos de (Rondina R. y Coussio, 1969) y 5 g para pruebas específicas de (Villacrés, 1995) se desarrolló el análisis para identificar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.

#### **3.5.2 Procedimiento experimental**

Se realizó los ensayos según (Rondina R. y Coussio, 1969) adaptado por (Reyna Pinedo, 2014), Anexo 2, para comprobar los resultados obtenidos por (Ramos Chávez, 2018). Se encontró resultados diferentes para la reacción de Shinoda (flavonoides excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas). Por ello, se volvió a realizar las pruebas específicas de (Villacrés, 1995).

#### **3.5.3 Resultados**

Luego de realizar los ensayos de (Rondina R. y Coussio, 1969) y las pruebas específicas de (Villacrés, 1995) podemos afirmar que la muestra en estudio

- i. **Contiene:** aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, taninos y triterpenos y/o esteroides.
- ii. **No contiene:** quinonas, antronas o antranoles, flavonoides, alcaloides, leucoantocianidas, catequinas y saponinas.

La Tabla de resultados con mayor se muestra en Anexo 3.

### **3.6 Aislamiento de compuestos liquénicos\***

#### **3.6.1 Muestra**

El líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl previamente seco y triturado, se procedió a secar a 40°C por 3 horas. Luego, pesamos 500,35 g de líquen para su posterior estudio.

---

\*El diagrama de proceso experimental de esta Tesis se encuentra en el Anexo 4

## Figura 18

*Liquen Umbilicaria calvescens* Nyl. seco y triturado.



*Nota:* Foto tomada por Nicol Lopez en 2021.

### 3.6.2 Procedimiento

Con el propósito de obtener compuestos liquénicos de diferentes polaridades, se realizaron extracciones sólido- líquido seguidas con los solventes éter de petróleo, diclorometano y etanol (baja, media y alta polaridad, respectivamente). Posteriormente, estos extractos fueron separados por técnicas cromatográficas. Para lo cual se usaron las siguientes técnicas cromatográficas:

- i. Cromatografía en capa fina
- ii. Cromatografía en Columna
- iii. Cromatografía en Columna Flash
- iv. Partición líquido- líquido
- v. Cromatografía de filtración por gel Sephadex

Luego, los extractos obtenidos en la anterior etapa fueron purificados por recristalización, finalmente se identificó y caracterizó por las técnicas  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, CG-EM, UV-Vis e IR. La etapa experimental de esta Tesis se desarrolló del 12 de julio de 2021 al 28 de agosto de 2023 en el Laboratorio de Química Inorgánica N°12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería. Ahora, se proporcionan el paso a paso que se siguió para cada polaridad.

### 3.6.3 *Polaridad baja: Éter de petróleo*

#### a. Extracción con éter de petróleo (EBO- éter)

- i. En un recipiente ámbar de 4L forrado totalmente de aluminio, la muestra seca y pulverizada se maceró con 500 mL de éter de petróleo durante 24 horas a temperatura ambiente. Se utilizaron 500,35 g de la muestra.
- ii. Se filtró por gravedad usando papel de filtro rápido, el extracto se guardó en otro frasco ámbar de 2L.
- iii. El residuo sólido se colocó nuevamente en el frasco ámbar de 4L (Sec. i) y se adicionó 500mL de éter de petróleo, se dejó macerando a temperatura ambiente por 2 días.
- iv. Se realizó una filtración utilizando papel de filtro rápido y la solución se juntó con el extracto obtenido en la Sec. ii.
- v. El sólido se colocó nuevamente en el frasco ámbar de 4L (Sec. i), se incorporaron 500 mL de éter de petróleo y se permitió que la mezcla macerara durante una semana a temperatura ambiente.
- vi. Se filtró con papel de filtro rápido, el sólido se secó en una campana extractora y se almacenó para futuras investigaciones. El extracto se juntó con los obtenidos en las Sec. ii y iv.
- vii. El extracto orgánico obtenido se concentró usando el rotavapor, obteniéndose el EBO/éter (Figura 19) cuya masa fue 0,4132 g.

#### **Figura 19**

*Extracto bruto orgánico- Éter.*



*Nota:* Foto tomada por Nicol Lopez en 2021.

## **b. Separación del EBO/éter mediante Cromatografía en Columna**

### ***b.1. Cromatografía en Columna del EBO/Éter***

- i. Muestra: 0,4132 g de EBO/éter
- ii. Fecha: 8 de Julio del 2021
- iii. Procedimiento: CC con sílica gel, el procedimiento se describe en el Compendio de Química Orgánica Experimental I según (Victor Reyna, 2012).
- iv. Características de la columna:  $h = 40$  cm y  $\phi = 1$  cm.
- v. Adsorbente: Sílica gel (características mencionado en el ítem Reactivos químicos)
- vi. Eluentes utilizados: 145 mL EP (Éter de petróleo), 100 mL EP/ EtOAc (9,5:0,5), 150 mL EP/ EtOAc (9:1), 50 mL EP/ EtOAc (4:1), 50 mL EP/ EtOAc (1:1) y 10 mL metanol.

**Observaciones:** Al realizar la separación por CC se obtuvieron 49 fracciones en total, se analizó el comportamiento de las fracciones mediante CCF, luego de realizar este análisis se agruparon las fracciones en 4 grupos, los cuales denominaremos G1, G2, G3 y G4. Observándose compuestos de interés en G1, debido a que al realizar el análisis por CCF se observaron manchas definidas, circulares y separadas, por lo cual se procedió a realizar una segunda columna cromatográfica de G1. Asimismo, para los extractos G2, G3 y G4 se realizó el análisis por CCF, se observó en la placa cromatográfica manchas alargadas, por lo cual se infirió que hay una gran probabilidad que estos extractos contengan ácidos grasos. Para corroborar, se llevaron a cabo análisis de los extractos mencionados mediante CG-MS.

### ***b.2. Segunda Columna Cromatográfica G1***

- i. Muestra: 300 mg de G1
- ii. Fecha: 18 de Agosto del 2021
- iii. Procedimiento: CC con sílica gel, el procedimiento se describe en el Compendio de Química Orgánica Experimental I según (Victor Reyna, 2012).
- iv. Características de la columna:  $h = 32$  cm y  $\phi = 1,5$  cm.
- v. Adsorbente: Sílica gel (características mencionado en el ítem Reactivos químicos)
- vi. Eluentes utilizados: 85 mL EP, 100 mL EP/EtOAc (9,5:0,5), 100 mL EP/EtOAc (9:1), 100 mL EP/EtOAc (4:1), 100 mL EP/EtOAc (1:1) y 50 mL metanol.

**Observaciones :** Al realizar la separación por CC se obtuvieron 53 fracciones en total, se analizó el comportamiento de las fracciones mediante CCF, luego de realizar este análisis se agruparon las fracciones en 4 grupos, los cuales denominaremos G1\*, G2\*, G3\* y G4\*. Al realizar el análisis por cromatografía en

capa fina de los extractos, por la forma alargada de las manchas que presentabas las placas cromatográficas de los extractos G1\*-G3\* nos da indicio que presenta ácidos grasos, sin embargo, se identificaron compuestos de interés en la muestra G4\* debido a la aparición de manchas circulares y separadas en la placa cromatográfica, por el comportamiento diferente que presenta G4\* se analizó por CG-MS.

### **c. Identificación por CG-EM del extracto G4\***

Condiciones: del equipo instrumental GC MS, tomado de (Bourgeois et al., 1999).

- i. Equipo: Shimadzu GCMS-QP2010 SE
- ii. Muestra: 1mg de G4\* mL<sup>-1</sup> C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O
- iii. Fase móvil: He 99,99% de pureza
- iv. Rapidez de flujo: 1 mL min<sup>-1</sup>
- v. Split: 10:1
- vi. Temperatura de la muestra: 180°C
- vii. Temperatura de la columna: A partir de 190 °C se incrementa a 250 °C, a una velocidad de 5°C min<sup>-1</sup>. Permaneciendo en 250 °C por 48 minutos, tiempo total 1 hora.
- viii. Modo de Ionización: IE<sup>+</sup>
- ix. Energía del electrón: 70 eV
- x. Temperatura de interfaz: 220 °C
- xi. Temperatura de la fuente de ión: 200 °C
- xii. Voltaje de detección: 350 V
- xiii. Carga de muestra: 4,0 µL

**Resultados:** Se identificó el metabolito secundario Metil β-orninolcarboxilato y en su mayoría ácidos grasos, ver Anexo 6.

### **3.6.4 Polaridad media: Diclorometano**

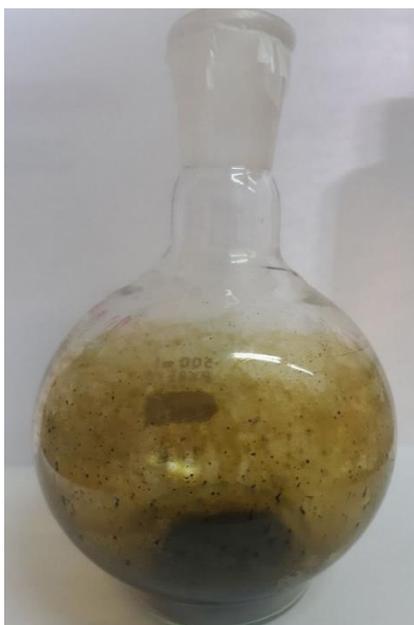
#### **a. Extracción con diclorometano (EBO- diclorometano)**

- i. En un recipiente ámbar de 4L forrado totalmente de aluminio, se maceró el residuo sólido obtenido en la sección (a.vi) con 0,5 L de diclorometano, durante 1 día a temperatura ambiente.
- ii. Se filtró por gravedad usando papel de filtro rápido, el extracto se guardó en otro frasco ámbar de 2L.

- iii. El residuo sólido se colocó nuevamente en el frasco ámbar de 4L (Sec. i) y se adicionó 500 mL de diclorometano, se dejó macerando a temperatura ambiente por 2 días.
- iv. Se filtró con papel de filtro rápido y la solución se juntó con el extracto obtenido en la Sec. ii.
- v. El sólido se colocó nuevamente en el frasco ámbar de 4L (Sec. i), se añadió 0.5 L de diclorometano y se dejó macerar durante una semana a temperatura ambiente.
- vi. El filtrado se realizó utilizando papel de filtro rápido, el sólido se secó en una campana extractora y se almacenó para futuras investigaciones. El extracto se juntó con los obtenidos en las Sec. ii y iv.
- vii. El extracto orgánico obtenido se concentró usando el rotavapor, obteniéndose el EBO/diclorometano (Figura 20) cuya masa fue 1,6701 g.

### **Figura 20**

*Extracto bruto orgánico- diclorometano.*



*Nota:* Foto tomada por Nicol Lopez en 2021.

### **b. Separación del EBO/diclorometano mediante Cromatografía en Columna**

#### ***b.1. Cromatografía en Columna Flash del EBO/diclorometano***

- i. Muestra: 1,6701 g de EBO/diclorometano
- ii. Fecha: 30 de Setiembre del 2021

- iii. Procedimiento: Cromatografía en columna Flash con sílica gel, el procedimiento se describe en el artículo de (A. B. Roge, S. N. Firke, R. M. Kawade, S. K. Sarje, 2011) y (Kramer & Deming, 2010).
- iv. Características de la columna:  $h = 26 \text{ cm}$  y  $\phi = 3 \text{ cm}$ .
- v. Adsorbente: Sílica gel (características mencionado en el ítem Reactivos químicos)
- vi. Eluentes utilizados: 500 mL EP, 900 mL EP/ EtOAc (9,5:0,5), 600 mL EP/ EtOAc (9:1), 300 mL EP/ EtOAc (4:1), 500 mL cloroformo y EtOAc (1:1), y 200 mL MeOH.
- vii. Fecha de la CC EBO/éter: 30 de Setiembre del 2021

**Observaciones** :Al realizar la separación por Cromatografía en Columna se obtuvieron 15 fracciones en total, se analizó el comportamiento de las fracciones mediante CCF, luego de realizar este análisis se agruparon las fracciones en 4 grupos, los cuales denominaremos Y1 (493,5 mg), Y2 (250,6 mg), Y3 (715,3 mg) y Y4 (318,7 mg). Observándose compuestos de interés en Y1, debido a la similitud del índice de retención ( $R_f$ ) de una mancha de Y1 con el índice de retención ( $R_f$ ) del patrón ácido úsnico.

### Figura 21

*Columna cromatográfica Flash del EBO/diclorometano.*



*Nota:* Foto tomada por Nicol Lopez en 2021.

### ***b.2. Cromatografía en Columna de Sílica gel del extracto Y1***

- i. Muestra: 493,5 mg de Y1
- ii. Fecha: 30 de Junio del 2022
- iii. Procedimiento: CC Sílica Gel, el procedimiento se describe en el Compendio de Química Orgánica Experimental I según (Victor Reyna, 2012).
- iv. Características de la columna:  $h = 42$  cm y  $\phi = 3$  cm.
- v. Adsorbente: Sílica gel (características mencionado en el ítem Reactivos químicos)
- vi. Eluentes utilizados: 500 mL EP, 700 mL EP/ EtOAc (9,5:0,5), 300 mL EP/ EtOAc (9:1), 300 mL EP/ EtOAc (4:1), 300 mL EP/ EtOAc (1:1) y 300 mL MeOH.

**Observaciones** :Al realizar la separación por CC se obtuvieron 119 fracciones en total, se analizó el comportamiento de las fracciones mediante CCF, luego de realizar este análisis se agruparon las fracciones en 4 grupos, los cuales denominaremos F1 (88,2 mg), F2 (68,3 mg), F3 (54,8 mg) y F4 (180,7 mg). Luego, al realizar cromatografía en capa fina y usando como patrón de referencia al ácido úsnico, se observó que el extracto F4 posee comportamiento similar al patrón ácido úsnico. Para corroborar dicho análisis cualitativo, se realizó el análisis del extracto F4 por CG-EM.

### ***b.3. Cromatografía en Columna de Sílica gel del extracto Y2***

- i. Muestra: 250,6 mg de Y2
- ii. Fecha: 14 de Julio del 2022
- iii. Procedimiento: CC sílica gel, el procedimiento se describe en el Compendio de Química Orgánica Experimental I según (Victor Reyna, 2012).
- iv. Características de la columna:  $h = 28$  cm y  $\phi = 3$  cm.
- v. Adsorbente: Sílica gel (características mencionado en el ítem Reactivos químicos)
- vi. Eluentes utilizados: 400 mL EP, 400 mL EP/ EtOAc (4:1), 600 mL EP/ EtOAc (1:1) y 200 mL MeOH.

**Observaciones:** Al realizar la separación por CC se obtuvieron 90 fracciones en total, por lo cual, se analizó el comportamiento de las fracciones mediante CCF, luego de realizar este procedimiento se agruparon las fracciones en 9 grupos, los cuales denominaremos M1 (4,8 mg), M2 (4 mg), M3 (5,6 mg), M4 (4,5 mg), M5 (58,3 mg), M6 (6,7 mg), M7 (5,8 mg), M8 (7,9 mg) y M9 (93,6 mg). Al ser una de las fracciones con mayor masa y tener un comportamiento típico de los metabolitos secundarios al realizarse cromatografía en capa fina, se decidió analizar al extracto M5 por CG-EM.

#### ***b.4. Cromatografía en Columna de Sílica gel del extracto Y3***

- i. Muestra: 715,3 mg de Y3
- ii. Fecha: 14 de Octubre del 2022
- iii. Procedimiento: CC sílica gel, el procedimiento se describe en el Compendio de Química Orgánica Experimental I según (Victor Reyna, 2012).
- iv. Características de la columna:  $h = 29$  cm y  $\phi = 4$  cm.
- v. Adsorbente: Sílica gel (características mencionado en el ítem Reactivos químicos).
- vi. Eluentes utilizados: 1L EP, 1L EP/ EtOAc (4:1), 1L cloroformo y EtOAc (1:1) y 500 mL MeOH.

**Observaciones:** Al realizar la separación por CC se obtuvieron 172 fracciones, estas se agruparon en 7 grupos luego de ser analizados por CCF y comparar su comportamiento, estos grupos fueron denominados como: B1 (3,6 mg), B2 (0,8 mg), B3 (6,2 mg), B4 (40,4 mg), B5 (321,4 mg), B6 (60,2 mg) y B7 (174,4 mg). Notamos que el grupo B5 posee un comportamiento definido cuando fue analizado por CCF, además, es el grupo de mayor masa, por ello, se procedió a analizar mediante CG-EM.

#### ***b.5. Cromatografía en Columna de Sílica gel del extracto Y4***

- i. Muestra: 318,7 mg de Y4
- ii. Fecha: 5 de Octubre del 2022
- iii. Procedimiento: CC Sílica Gel, el procedimiento se describe en el Compendio de Química Orgánica Experimental I según (Victor Reyna, 2012).
- iv. Características de la columna:  $h = 28,5$  cm y  $\phi = 3$  cm.
- v. Adsorbente: Sílica gel (características mencionado en el ítem Reactivos químicos)
- vi. Eluentes utilizados: 500 mL EP, 500 mL EP/ EtOAc (4:1), 200 mL EP/ EtOAc (1:1), 500 mL cloroformo y EtOAc (1:1) y 300 mL MeOH.

**Observaciones :** Al realizar la separación por CC se obtuvieron 101 fracciones en total, los cuales se agruparon en 8 grupos según su comportamiento mediante CCF, estos son: A1 (61,7 mg), A2 (19,8 mg), A3 (7,7 mg), A4 (3,9 mg), A5 (89,6 mg), A6 (61,3 mg), A7 (61,9 mg) y A8 (170, 8 mg). El grupo A5 presentó un comportamiento similar al grupo B5, además, su comportamiento es definido al ser analizado por CCF, por ello se decidió analizarlo mediante CG-EM.

#### **c. Purificación del extracto B5 por recristalización**

- i. Muestra: 321,4 mg B5

- ii. Fecha: 29 de noviembre del 2022
- iii. Solvente: Éter de petróleo.
- iv. Procedimiento: Recristalización, el procedimiento se describe en el Compendio de Química Orgánica Experimental I según (Victor Reyna, 2012).

**Resultado:** Se obtuvo 292, 2 mg del extracto B5 puro.

#### **d. Identificación y/o caracterización de los metabolitos secundarios obtenidos**

##### **d.1. Análisis del extracto F4**

###### **▪ Cromatografía de gases GC-EM**

Condiciones: del equipo instrumental GC EM, tomado de (Smeds & Kytviita, 2010).

- ❖ Equipo: Shimadzu GCMS-QP2010 SE
- ❖ Muestra: 1mg de F4 mL<sup>-1</sup> C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O
- ❖ Fase móvil: He 99,99% de pureza
- ❖ Rapidez de flujo: 1 mL min<sup>-1</sup>
- ❖ Split: 10:1
- ❖ Temperatura de la muestra: 200 °C
- ❖ Temperatura de la columna: A partir de 120 °C se incrementa a 300 °C, a una velocidad de 6 °C min<sup>-1</sup>. Permaneciendo en 250 °C por 20 minutos, tiempo total 30 minutos.
- ❖ Modo de Ionización: IE<sup>+</sup>
- ❖ Energía del electrón: 70 eV
- ❖ Temperatura de interfaz: 290 °C
- ❖ Temperatura de la fuente de ión: 250 °C
- ❖ Voltaje de detección: 350 V
- ❖ Carga de muestra: 4,0 µL

**Resultados:** Se identificó el metabolito secundario ácido úsnico (87 %)

###### **▪ Espectrofotómetro UV-Visible**

- ❖ Equipo: Espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu Modelo UV-1800
- ❖ Analista: Nicol Lopez Huilca
- ❖ Muestra: 20 mg F4
- ❖ Solvente: Acetona
- ❖ Fecha: 21 de diciembre del 2022

**Resultados:** Picos de máxima absorción 234 nm y 283 nm

###### **▪ IR-ATR**

- ❖ Equipo: Espectrómetro IR Perkin Elmer Modelo Frontier
- ❖ Analista: Nicol Lopez Huilca
- ❖ Muestra: 40 mg F4

❖ Fecha: 21 de diciembre del 2022

**Resultados:** Picos característicos, tales como, 3095  $\text{cm}^{-1}$  -OH, 2931  $\text{cm}^{-1}$  aromático C-H, 1689  $\text{cm}^{-1}$  C=O y 1606  $\text{cm}^{-1}$  -C=C.

## ***d.2. Análisis del extracto B5 puro***

### ▪ **Cromatografía de gases CG-EM**

Condiciones: del equipo instrumental GC MS, tomado de (Smeds & Kytviita, 2010).

- ❖ Equipo: Shimadzu GCMS-QP2010 SE
- ❖ Muestra: 1mg de B5  $\text{mL}^{-1}$   $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$
- ❖ Fase móvil: He 99,99% de pureza
- ❖ Rapidez de flujo: 1  $\text{mL min}^{-1}$
- ❖ Split: 10:1
- ❖ Temperatura de la muestra: 200 °C
- ❖ Temperatura de la columna: A partir de 120 °C se incrementa a 300 °C, a una velocidad de 6 °C  $\text{min}^{-1}$ . Permaneciendo en 250 °C por 20 minutos, tiempo total 30 minutos.
- ❖ Modo de Ionización:  $\text{IE}^+$
- ❖ Energía del electrón: 70 eV
- ❖ Temperatura de interfaz: 290 °C
- ❖ Temperatura de la fuente de ión: 250 °C
- ❖ Voltaje de detección: 350 V
- ❖ Carga de muestra: 4,0  $\mu\text{L}$

**Resultados:** Se identificó el metabolito secundario orcinol (100 %).

### ▪ **Espectrofotómetro UV-Visible**

- ❖ Equipo: Espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu Modelo UV-1800
- ❖ Analista: Nicol Lopez Huillca
- ❖ Muestra: 20 mg B5
- ❖ Solvente: Acetona
- ❖ Fecha: 21 de diciembre del 2022

**Resultados:** Picos de máxima absorción 204,5 nm y 274 nm

### ▪ **IR-ATR**

- ❖ Equipo: Espectrómetro IR Perkin Elmer Modelo Frontier
- ❖ Analista: Nicol Lopez Huillca
- ❖ Muestra: 40 mg B5
- ❖ Fecha: 21 de diciembre del 2022

**Resultados:** Picos característicos, tales como, 3354  $\text{cm}^{-1}$  -OH, 2924  $\text{cm}^{-1}$  aromático C-H y 1600  $\text{cm}^{-1}$  -C=C.

▪  **$^1\text{H}$  RMN**

- ❖ Equipo: Espectrómetro Bruker Avance III HD 500
- ❖ Laboratorio: Centro de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (CERMN), PUCP.
- ❖ Analista: Ermelan Pernia
- ❖ Muestra: 40 mg B5
- ❖ Solvente: Cloroformo deuterado  $\text{CDCl}_3$
- Fecha: 12 de setiembre del 2023

**Resultados:**

Desplazamientos químicos ( $\delta$ ): 6.20 ppm (3H, Ar-H, d), 2.16 ppm (H, Ar-C-H, m), 1.59 ppm (H, - $\text{CH}_3$ , m), 1.25 ppm (H, - $\text{CH}_3$ , m) y 0.88 ppm (H, - $\text{CH}_3$ , m).

▪  **$^{13}\text{C}$  RMN**

- ❖ Equipo: Espectrómetro Bruker Avance III HD 500
- ❖ Laboratorio: Centro de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (CERMN), PUCP.
- ❖ Analista: Ermelan Pernia
- ❖ Muestra: 40 mg B5
- ❖ Solvente: Cloroformo deuterado  $\text{CDCl}_3$
- ❖ Fecha: 12 de setiembre del 2023

**Resultados:**

Desplazamiento químico ( $\delta$ ): 156.72, 140.69, 108.63, 100.14, 77.05 y 21.38.

### **3.6.5 Polaridad alta: Etanol**

#### **a. Extracción con etanol (EBO- etanol)**

- i. En un recipiente ámbar de 4L forrado totalmente de aluminio, se maceró el residuo sólido obtenido en la sección (b.vi) con 0.5 L de etanol, durante un día a 25 °C.
- ii. Se filtró por gravedad usando papel de filtro rápido, el extracto se guardó en otro frasco ámbar de 2L.
- iii. El residuo sólido se colocó nuevamente en el frasco ámbar de 4L (Sec. i) y se adicionó 500 mL de etanol, se dejó macerando a temperatura ambiente por 2 días.
- iv. Se realizó una filtración utilizando papel de filtro rápido, y la solución se combinó al extracto obtenido en la Sec. ii.

- v. El sólido se colocó nuevamente en el frasco ámbar de 4L (Sec. i), se añadió 500 mL de etanol y se dejó macerar durante una semana a temperatura ambiente.
- vi. Se filtró con papel de filtro rápido, el sólido se secó en una campana extractora y se almacenó para futuras investigaciones. El extracto se juntó con los obtenidos en las Sec. ii y iv.
- vii. El extracto orgánico obtenido se concentró usando el rotavapor, obteniéndose el EBO/etanol (Figura 22) cuya masa fue 8,2583 g.

### **Figura 22**

*Extracto bruto orgánico- Etanol.*



*Nota:* Foto tomada por Nicol Lopez en 2021.

#### **b. Separación del EBO/etanol**

##### ***b.1. Partición Líquido-Líquido***

Fecha: 1 de Diciembre del 2021

Muestra: 8,2583 g EBO/etanol

La muestra se deja macerando un día antes en éter de petróleo.

A partir de 8,2583 g de EBO/Etanol se solubilizó con 2,5 mL de MeOH, 2mL de  $\text{CHCl}_3$  y 5 gotas de agua. En un paso posterior, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido.

- i. En una bureta de 50mL, primero, se adiciona agua hasta completar el volumen muerto.
- ii. Se adiciona la muestra previamente disuelta y se aumenta 1mL más de metanol.

- iii. Se inicia la partición adicionando cloroformo hasta completar los 50mL de la bureta y se deja reposar por un tiempo de tal forma que las fases polares (agua/MeOH) y apolar (CHCl<sub>3</sub>) se separen.
- iv. Se colecta la fase clorofórmica.
- v. Se repite el proceso con 10mL más de cloroformo y se unen las dos fases clorofórmicas obtenidas para dejar secar en la campana.
- vi. Concentrar la fase clorofórmica total usando el rotavapor.
- vii. La fase superior acuosa o polar restante, también se lleva a campana para evaporar el CHCl<sub>3</sub> remanente.
- viii. Antes de adicionar a la bureta la fase superior acuosa; primero se adiciona a esta unos 40mL de n-butanol y luego la fase acuosa o polar.
- ix. Luego del reposo y al diferenciarse dos fases, se separa ambas fases, se colecta la fase butanólica.
- x. Luego, se añadieron 45 mL de n-butanol a la bureta, seguido de la fase acuosa.
- xi. Posteriormente, se recolectó la fase acuosa, que se colocó en la refrigeradora para congelarla y luego liofilizarla. Simultáneamente, la fase butanólica se combinó con la anterior y se evaporó el solvente en una campana extractora

**Observaciones:** Se obtuvo 3 fracciones, fracción acuosa-FA (10 mL), fracción clorofórmica concentrada-FC (7.08 g) y fracción butanólica-FB (2,3 mL).

### ***b.2. Cromatografía de filtración por gel Sephadex de la fracción clorofórmica***

- i. Muestra: 7.08g fracción clorofórmica (FC).
- ii. Fecha: 25 de enero del 2022
- iii. Solventes: Éter de petróleo (EP) 50 mL, diclorometano (DCM) 1.5L y metanol (MeOH) 200 mL.
- iv. Medidas de la columna: 72 cm altura y 20 mm diámetro.
- v. Fase estacionaria: Sephadex LH-20, GE Healthcare.
- vi. Procedimiento: En la columna se empacó con sephadex hasta una altura de 10 cm en éter de petróleo. La muestra se disolvió en EP con DCM y se vertió en la columna. Se efluyó con 50 mL de EP, posteriormente con 1 500 mL de DCM y finalmente con 200 mL de MeOH. Los extractos se recolectaron en balones y fueron concentrados en rotavapor y colocados en viales de 10 mL.

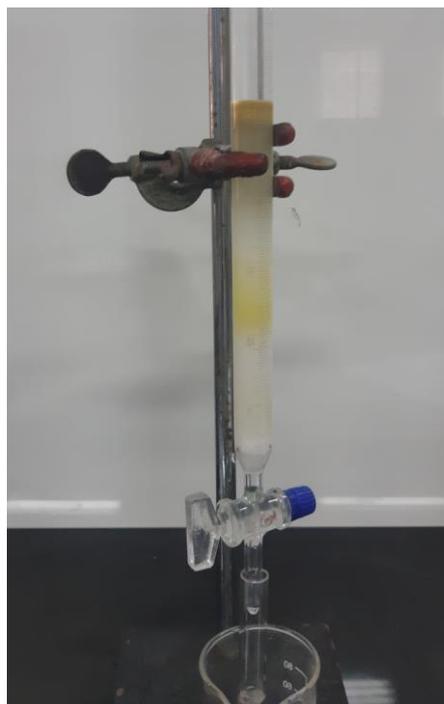
**Resultados:** Se obtuvo tres grupos correspondiente a los solventes que se utilizaron en la columna los cuales fueron concentrados en rotavapor, obteniendo los siguientes grupos:

- E1 (Éter de petróleo), masa obtenida 0.65 g, se conservó para estudios posteriores.

- E2 (Diclorometano), masa obtenida 3,54 g, al realizar CCF para E1, E2 y E3, E2 mostró manchas definidas (forma circular) y separadas, por ello, se purifica esta fracción mediante cromatografía en columna con sílica gel.
- E3 (Metanol), masa obtenida 0.63 g, se conservó para estudios posteriores.

### Figura 23

*Cromatografía de filtración por gel Sephadex de la fracción clorofórmica.*



*Nota:* Foto tomada Nicol Lopez en 2022.

#### ***b.3. Cromatografía en columna con sílica gel de la fracción E2***

- Muestra: 3.54g de E2
- Fecha: 3 de Febrero del 2022
- Procedimiento: Cromatografía en columna con sílica gel, el procedimiento se describe en el Compendio de Química Orgánica Experimental I según (Victor Reyna, 2012).
- Características de la columna:  $h = 38$  cm y  $\phi = 4$  cm.
- Adsorbente: Sílica gel, tamaño de poro 60 Å, tamaño de partícula 35 - 75  $\mu\text{m}$  (marca SIGMA-ALDRICH).
- Eluentes utilizados: 200 mL Éter de petróleo, 600 mL éter de petróleo y acetato de etilo (9:1), 300 mL éter de petróleo y acetato de etilo (8,5:1,5), 400 mL éter de petróleo y acetato de etilo (4:1), 300 mL éter de petróleo y acetato de etilo (7,5:2,5), 300 mL éter de petróleo y acetato de etilo (7:3), 300 mL éter de

petróleo y acetato de etilo (3:2), 800 mL éter de petróleo y acetato de etilo (1:1), 400 mL éter de petróleo y acetato de etilo (1:9), y 400 mL metanol.

**Observaciones** :Al realizar la separación por CC se obtuvieron 206 fracciones en total, se analizó el comportamiento de las fracciones mediante CCF, luego de realizar este análisis se agruparon las fracciones en 8 grupos, los cuales denominaremos X1 (17,7 mg), X2 (10,5 mg), X3 (124 mg), X4 (128,7 mg), X5 (38,5 mg), X6 (17,8 mg), X7 (4,8 mg) y X8 (127,4 mg).

#### **Figura 24**

*Cromatografía en columna de la fracción E2.*



*Nota:* Foto tomada por Nicol Lopez en 2022.

#### **c. Purificación del extracto X4 por recristalización**

- i. Muestra: 128,7 mg X4
- ii. Fecha: 15 de diciembre del 2022
- iii. Solventes: Acetato de etilo: éter de petróleo (1:9).
- iv. Procedimiento: Recristalización, el procedimiento se describe en el Compendio de Química Orgánica Experimental I según (Victor Reyna, 2012).

**Resultado:** Se obtuvo 47,2 mg del extracto X4 puro.

**d. Identificación y/o caracterización del metabolito secundario obtenidos del extracto X4**

▪ **Cromatografía de gases CG-EM**

Condiciones: del equipo instrumental GC MS, tomado de (Smeds & Kytviita, 2010).

- ❖ Equipo: Shimadzu GCMS-QP2010 SE
- ❖ Muestra: 1mg de X4 mL<sup>-1</sup> C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O
- ❖ Fase móvil: He 99,99% de pureza
- ❖ Rapidez de flujo: 1 mL min<sup>-1</sup>
- ❖ Split: 10:1
- ❖ Temperatura de la muestra: 200 °C
- ❖ Temperatura de la columna: A partir de 120 °C se incrementa a 300 °C, a una velocidad de 6 °C min<sup>-1</sup>. Permaneciendo en 250 °C por 20 minutos, tiempo total 30 minutos.
- ❖ Modo de Ionización: IE<sup>+</sup>
- ❖ Energía del electrón: 70 eV
- ❖ Temperatura de interfaz: 290 °C
- ❖ Temperatura de la fuente de ión: 250 °C
- ❖ Voltaje de detección: 350 V
- ❖ Carga de muestra: 4,0 µL

**Resultados:** Se identificó el metabolito secundario orselinato de metilo (96 %).

▪ **Espectrofotómetro UV-Visible**

- ❖ Equipo: Espectrofotómetro UV-Visible Modelo UV-1800
- ❖ Analista: Nicol Lopez Huillca
- ❖ Muestra: 20 mg X4
- ❖ Solvente: Acetona
- ❖ Fecha: 21 de diciembre del 2022

**Resultados:** Picos de máxima absorción 215.86, 263.12 y 300.41 nm

▪ **<sup>1</sup>H RMN.**

- ❖ Equipo: Espectrómetro Bruker Avance III HD 500
- ❖ Laboratorio: Centro de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (CERMN), PUCP.
- ❖ Analista: Ermelan Pernia
- ❖ Muestra: 18 mg X4
- ❖ Solvente: Cloroformo deuterado CDCl<sub>3</sub>
- ❖ Fecha: 12 de setiembre del 2023

**Resultados:**

Desplazamientos químicos ( $\delta$ ): 11.82 ppm (H, Ar-OH, s), 6.28 ppm (3 H, Ar-H, d), 4.41 ppm (2H, O=C-O-CH, t), 2.50 ppm (3H, Ar-CH<sub>3</sub>, m) y 1.43 ppm (3H, -CH<sub>3</sub>, m).

▪ **<sup>13</sup>C RMN**

- ❖ Equipo: Espectrómetro Bruker Avance III HD 500
- ❖ Laboratorio: Centro de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (CERMN), Pontificia Universidad Católica del Perú.
- ❖ Analista: Ermelan Pernia
- ❖ Muestra: 18 mg X4
- ❖ Solvente: Cloroformo deuterado CDCl<sub>3</sub>
- ❖ Fecha: 12 de setiembre del 2023

**Resultados:**

Desplazamiento químico ( $\delta$ ): 171.88, 165.35, 160.51, 144.08, 111.44, 105.64, 101.29, 61.28, 24.40 y 14.13.

### **3.6.6 Identificación de compuestos liquénicos por Espectrometría de Masas**

Finalmente, se logró identificar los metabolitos secundarios aislados mediante CG-EM al comparar sus espectros y fragmentaciones con los presentes en la base de datos NIST, la cual está incorporada en el equipo GC MS-QP2010. Adicionalmente, se corroboró al comparar los espectros obtenidos con aquellos publicados en los artículos científicos.

### **3.7 Riesgos del proyecto de investigación y plan de acción para mitigar sus efectos**

Debido a la coyuntura actual del país, debemos tener en cuenta que las medidas sanitarias dadas por el gobierno pueden cambiar, por ello, nos linearemos a las medidas sanitarias, esto incluye establecer horarios de entrada y salida de laboratorio teniendo en cuenta el toque de queda.

Además, de no conseguir algunos reactivos, éstos se podrían reemplazar, con previos estudios bibliográficos para que no varíe sustancialmente los resultados esperados. Por ejemplo, para la etapa de la extracción sólido-líquido de la muestra (EBO), podemos sustituir algunos solventes con cloroformo y/o acetona, debido a que algunos autores, por ejemplo, (Manojlovic et al., 2012) realiza la extracción a partir de cloroformo, mientras que (Luo et al., 2009) extrae el EBO usando como solvente la acetona.

Por otro lado, algunos metabolitos secundarios se degradan a altas temperaturas, por ello el secado de la muestra no debe exceder de 40°C. Además, las muestras tienden

a honguearse por la exposición a la humedad, por lo tanto, se deben guardar en frascos herméticamente cerrados y en un ambiente adecuado hasta su posterior uso.

### **3.8 Manejo de Residuos y Normas de Seguridad**

#### **3.8.1 Normas de Seguridad en el laboratorio**

El proceso que implica realizar una investigación conlleva la utilización de herramientas, sustancias químicas, entornos y otros componentes que conllevan ciertos peligros. Estos riesgos deben ser identificados y se implementarán medidas preventivas para evitar accidentes. Las normas básicas del Anexo 12 son una serie de prácticas habituales que se realizan a menudo. Estas pautas son esenciales para llevar a cabo un buen trabajo en el laboratorio.

#### **3.8.2 Manipulación de desechos químicos en el laboratorio**

Dentro del trabajo de laboratorio debemos tener en cuenta la manipulación de los desechos químicos. La adecuada gestión de los desechos químicos es fundamental para proteger la salubridad y protección de los investigadores, analistas, empleados y la sociedad. Una distribución consecuente de estos residuos también disminuirá los riesgos actuales y futuros sobre el entorno. Por lo tanto, es ineludible eliminar todos los desechos químicos de forma fiable, competente, reglamentario y económicamente viable (ver Anexo 13). Por ello, se recurrirá al siguiente protocolo: todos los extractos, fracciones y grupos son concentrados en un rotavapor. El solvente recuperado es entregado al personal del Laboratorio de Química Inorgánica N°12 para su adecuado descarte.

## Capítulo IV. Análisis y Discusión de los Resultados

### 4.1 Análisis cualitativo de Metabolitos Secundarios

El análisis cualitativo (Marcha fitoquímica) teniendo en cuenta los procedimientos de (Rondina R. y Coussio, 1969) adaptado por (Reyna Pinedo, 2014), Anexo 2, mostró que el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl contiene: aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, taninos y triterpenos y/o esteroides.

### 4.2 Análisis e Identificación de compuestos orgánicos por CG-EM

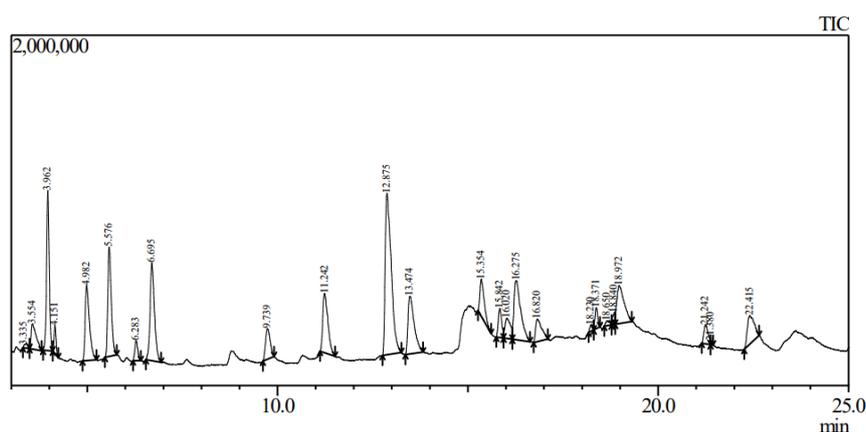
#### 4.2.1 Polaridad baja: Éter de petróleo

##### a. Metil $\beta$ -orcinolcarboxilato

En la siguiente figura podemos observar el cromatograma del grupo G4\* obtenido por GC-EM de la fracción orgánica G4\*.

Figura 25

Cromatograma (TIC) de la fracción orgánica G4\* a partir del análisis CG-EM.



Este cromatograma muestra los diversos compuestos líquénicos presentes en el extracto G4\*, de los cuales, es pertinente resaltar que el pico 3.554 min nos indica la presencia de un metabolito secundario el cual es el Metil  $\beta$ -orcinolcarboxilato (2,42%), cuya información se describe en la Tabla 4, su perfil espectral se presenta en la Figura 26. Asimismo, se lograron identificar algunos ácidos grasos, los mayoritarios se expone en la Tabla 5, además, ver Anexo 5 para más información.

Además, los resultados obtenidos de los extractos G2, G3 y G4 mediante CG-EM mostraron (según su cromatograma) la existencia de ácidos grasos, en los cuales resalta n-heptadecanol-1, ácido hexadecanoico y estearato de metilo debido a que se muestran en una mayor proporción, los resultados se muestran en el Anexo 9, 10 y 11.

Es importante tener presente que los compuestos detectados en cada muestra son el resultado de una estimación probabilística realizada por el software GCMSsolution de empresa SHIMADZU, que utiliza la biblioteca NIST. El Índice de Similitud (SI) que se muestra en cada espectro de masas (en la parte superior del gráfico) representa la probabilidad de cada compuesto identificado. Generalmente, se considera un rango de SI de 85 a 100 como aceptable.

**Tabla 4**

*Información del metabolito secundario detectado por el CG-EM a partir del extracto G4\*.*

<b>Compuesto</b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Área (%)</b>	<b>Semejanza SI (%)</b>
Metil $\beta$ -orcinolcarboxilato	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	3,55	2,73	97

**Tabla 5**

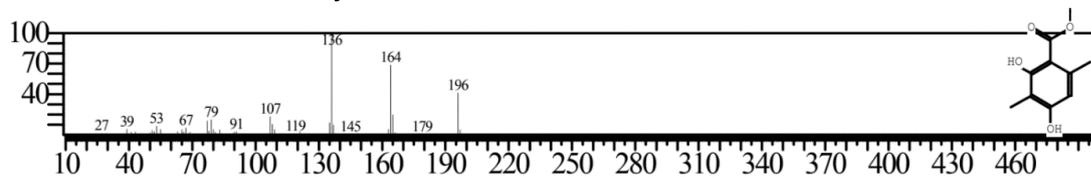
*Información de los ácidos grasos mayoritarios detectados por el CG-EM a partir del extracto G4\*.*

<b>Compuesto</b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Área (%)</b>	<b>Semejanza SI (%)</b>
n-Heptadecanol-1	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O	4,58	4,32	96
Ácido hexadecanoico, metil éster	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	5,58	9,34	95
Ácido hexadecanoico	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	5,29	0,56	98
Estearato de metilo	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	9,10	2,79	96

En el espectro de masas del Metil  $\beta$ -orcinolcarboxilato, el pico del ión molecular 196 m/z coincide con el pico del ión molecular del espectro de masas obtenido por (Bourgeois et al., 1999) y (Martino Cruz, 2015) para el mismo compuesto identificado, además, los picos de las fracciones poseen las mismas intensidades relativas.

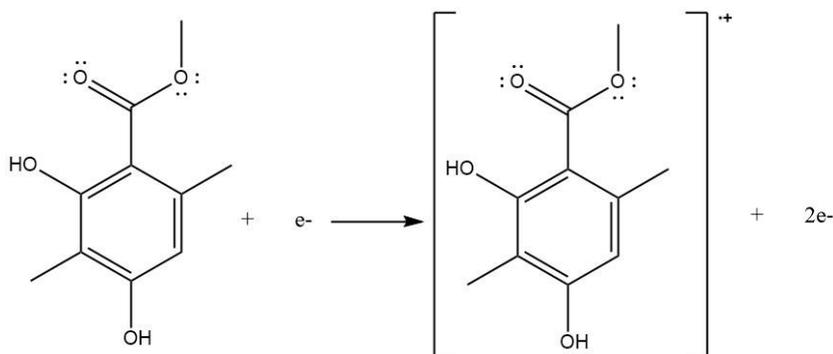
**Figura 26**

*Espectro de masas del Metil β-orcinoicarboxilato obtenido del extracto G4\* del liquen Umbilicaria calvescens Nyl.*

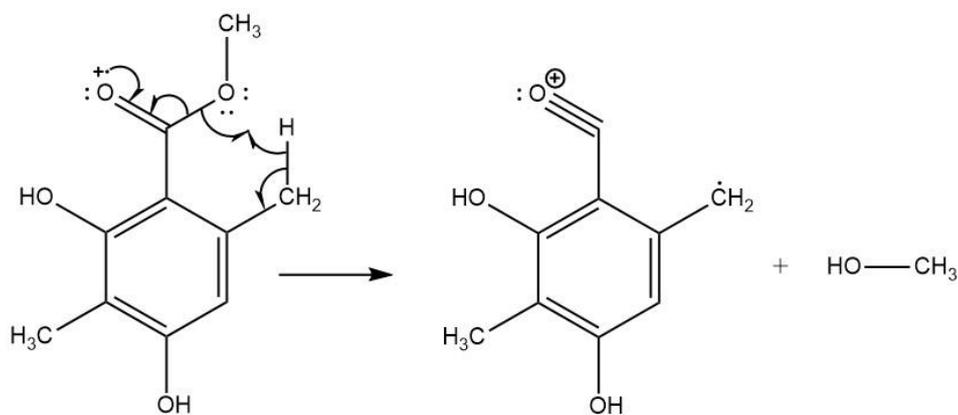


La secuencia de las fragmentaciones obtenidas para el Metil β-orcinoicarboxilato de los principales picos en el espectro de masas se describen a continuación.

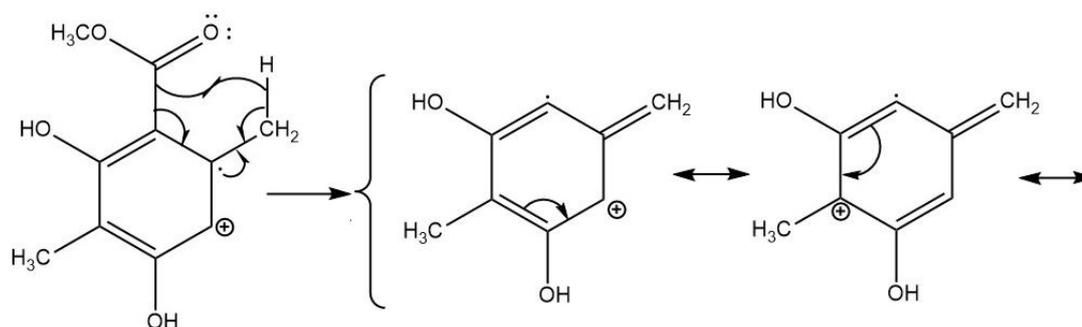
**i. Ión molecular M<sup>+</sup> = 196**

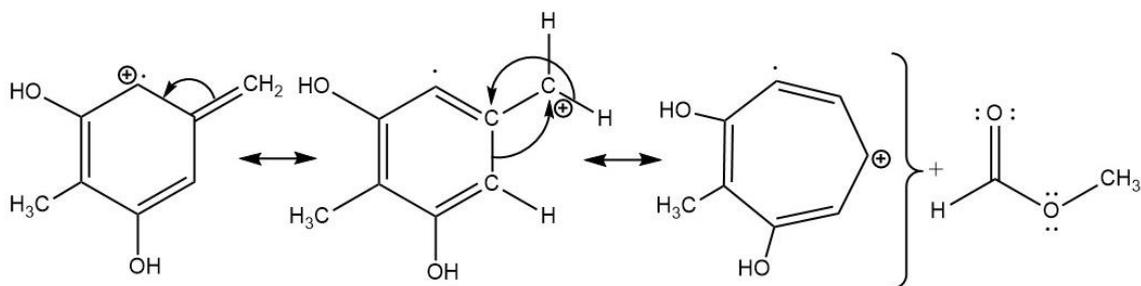


**ii. m/z 164**



**iii. m/z 136**





#### 4.2.2 Polaridad media: diclorometano

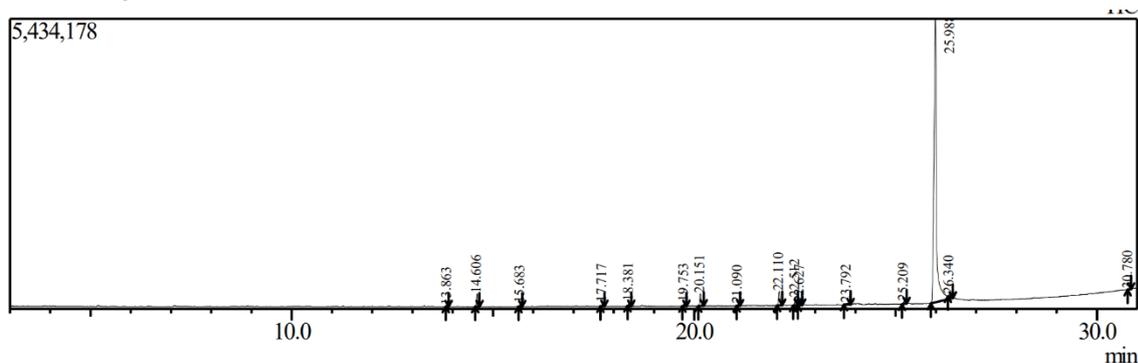
##### a. Ácido úsnico

##### a.1. Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas

La Figura 27 muestra el cromatograma del grupo F4 obtenido mediante CG-EM del concentrado orgánico M5.

**Figura 27**

*Cromatograma (TIC) del extracto F4.*

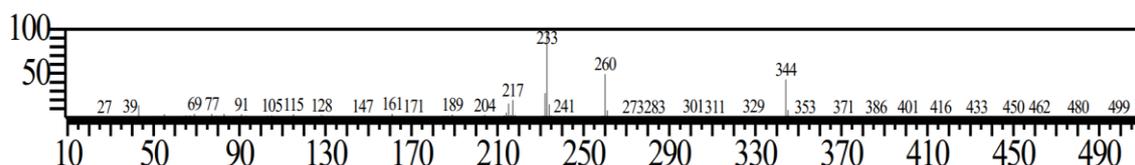


El análisis cromatográfico (ilustrado en la Figura 27) nos revela los diversos compuestos liquénicos presentes en el extracto M%. Entre ellos, resalta el compuesto con un tiempo de retención de 25.988 minutos, que corresponde al metabolito secundario conocido como ácido úsnico (87,38%), cuya información se detalla en la Tabla 6 y su espectro se presenta en la Figura 28.

El espectro del ácido úsnico del extracto F4 (Figura 28) es muy similar al obtenido por (Ramos & Córdor, 2018), ya que, en ambos el ión molecular es 344 m/z y las intensidades relativas de los fragmentos son similares.

**Figura 28**

*Espectro de masas del ácido úsnico obtenido del extracto F4.*



Adicionalmente, se analizó el patrón del ácido úsnico mediante CG-EM. Se obtuvo su cromatograma y espectro de masas, los cuales se muestran en las Figuras 29 y 30, respectivamente. Se observó que el tiempo de retención fue de 25,944 minutos, la forma del pico en el cromatograma fue alargada y el espectro de masas obtenido presentó características similares a las observadas en el extracto F4 (Figuras 27 y 28).

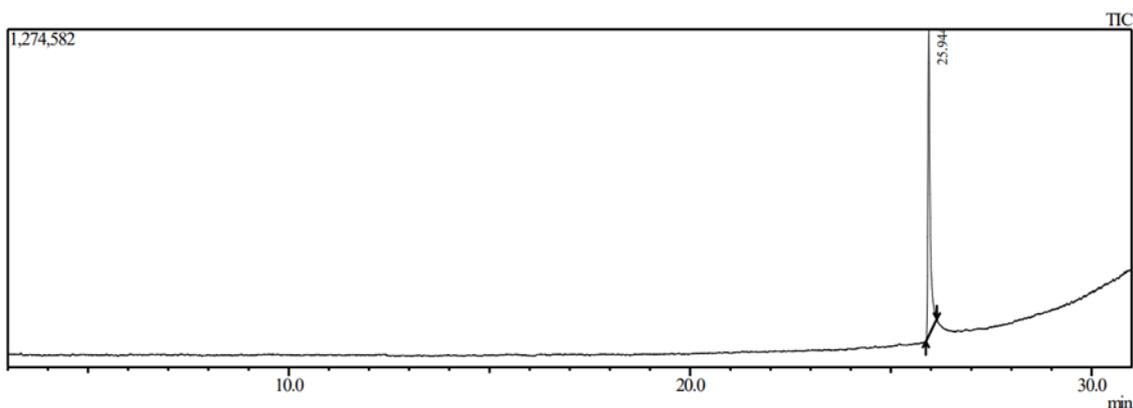
**Tabla 6**

*Información del metabolito secundario detectado por el CG-EM a partir del EBO-Diclorometano*

Compuesto	Fórmula Molecular	Tiempo de retención (min)	Área (%)	Semejanza SI (%)
Ácido úsnico	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	25.99	87,38	95

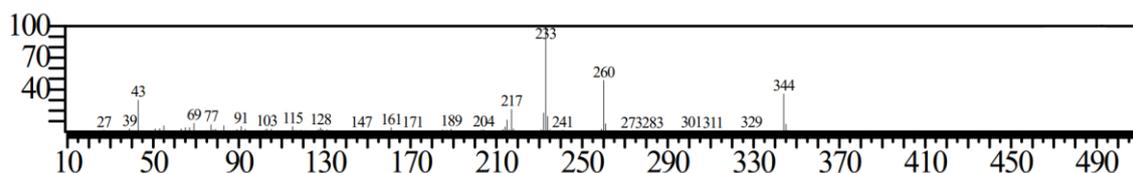
**Figura 29**

*Cromatograma (TIC) del patrón ácido úsnico.*



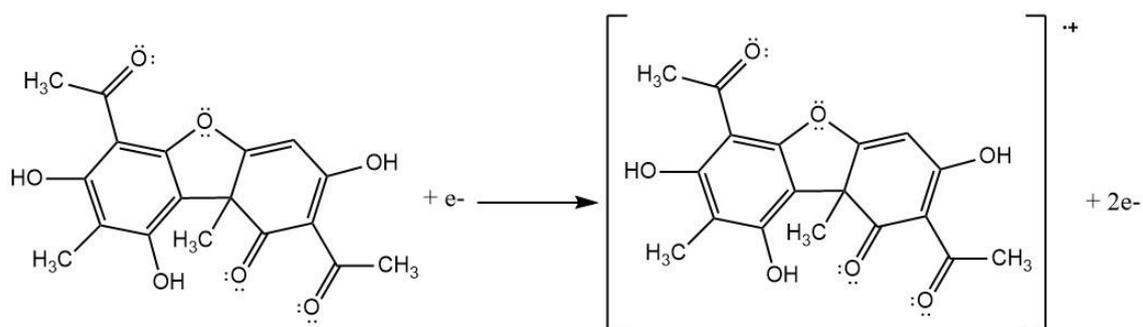
**Figura 30**

*Espectro de masas del patrón ácido úsnico.*

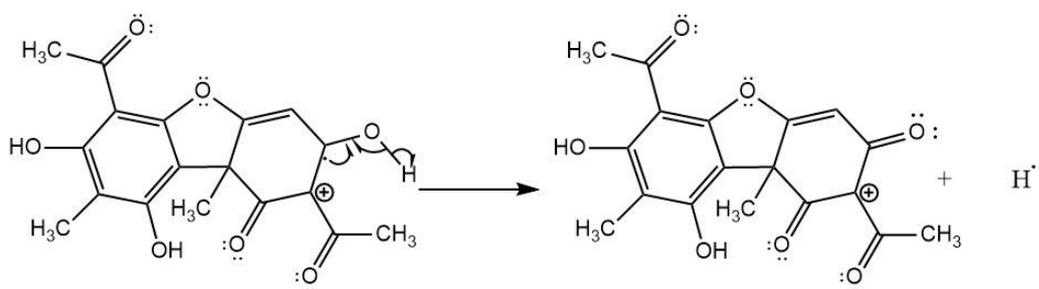


La secuencia de las fragmentaciones del ácido úsnico en las principales señales del espectro de masas se describe a continuación.

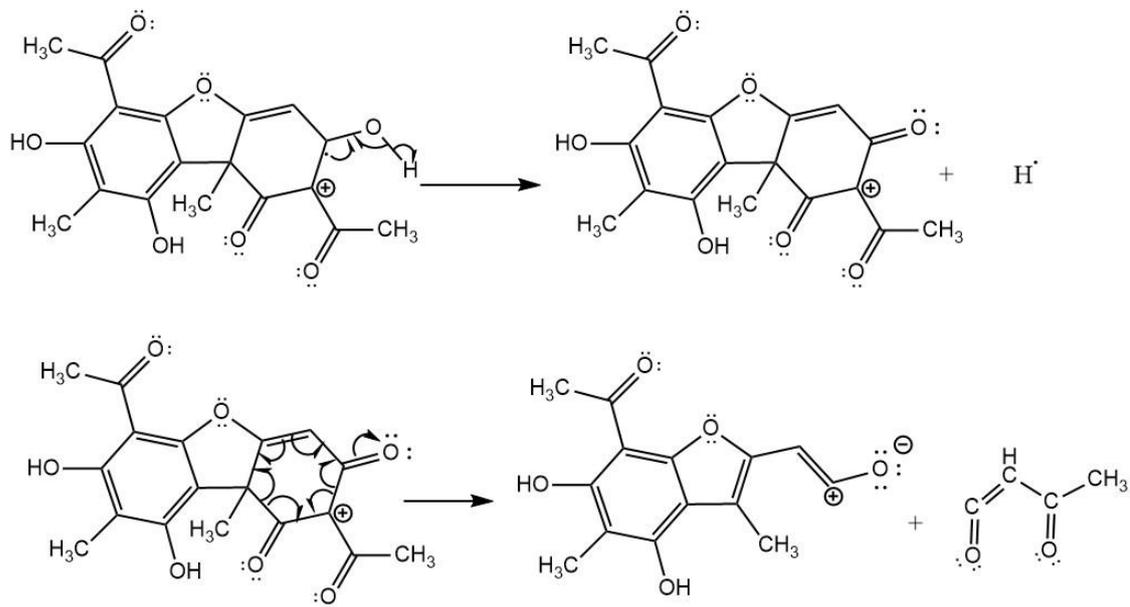
i. **Ión molecular  $M^+ = 344$**



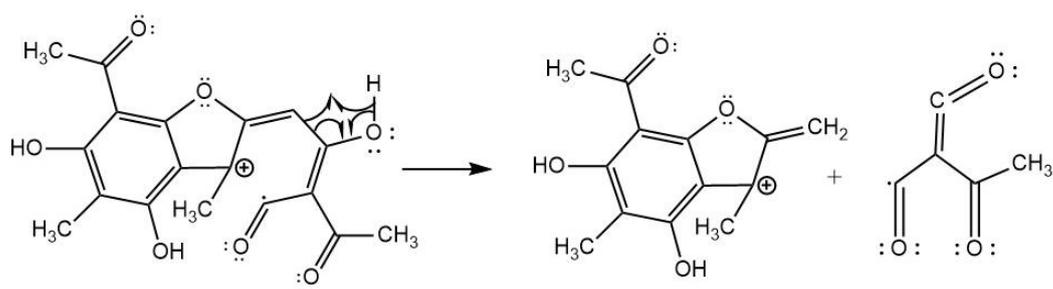
ii. **m/z 343**



iii. **m/z 260**



#### iv. m/z 233



#### a.2. Espectroscopía infrarrojo acoplado reflexión total atenuada

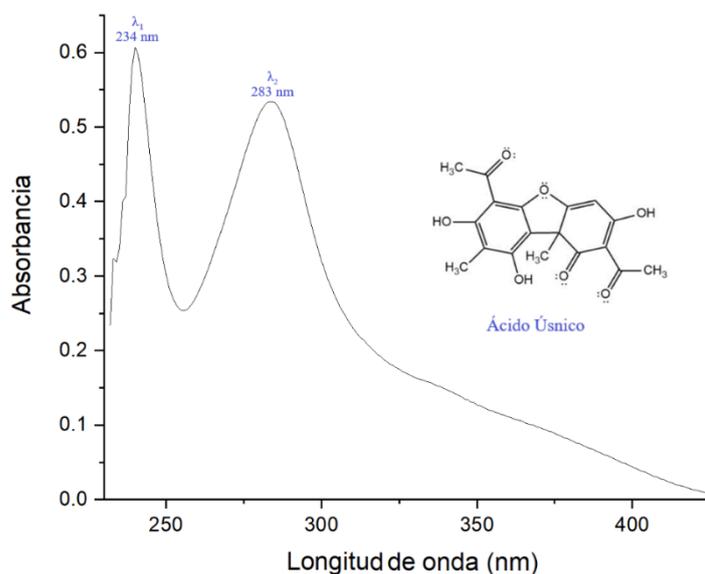
El espectro IR-ATR del ácido úsnico obtenido (Figura 32) muestra picos característicos para ciertos grupos funcionales presentes en su estructura, tales como, el pico 3095 cm<sup>-1</sup> indica la presencia del -OH, en 2931 cm<sup>-1</sup> el alargamiento del enlace aromático C-H, a 1689 cm<sup>-1</sup> es el alargamiento del enlace C=O, el pico en 1606 cm<sup>-1</sup> es debido a la presencia del enlace aromático C=C. El espectro IR-ATR del ácido úsnico extraído del extracto orgánico F4 es muy parecido al que reportaron (Ramos & Córdor, 2018).

#### a.3. Espectroscopía ultravioleta- visible

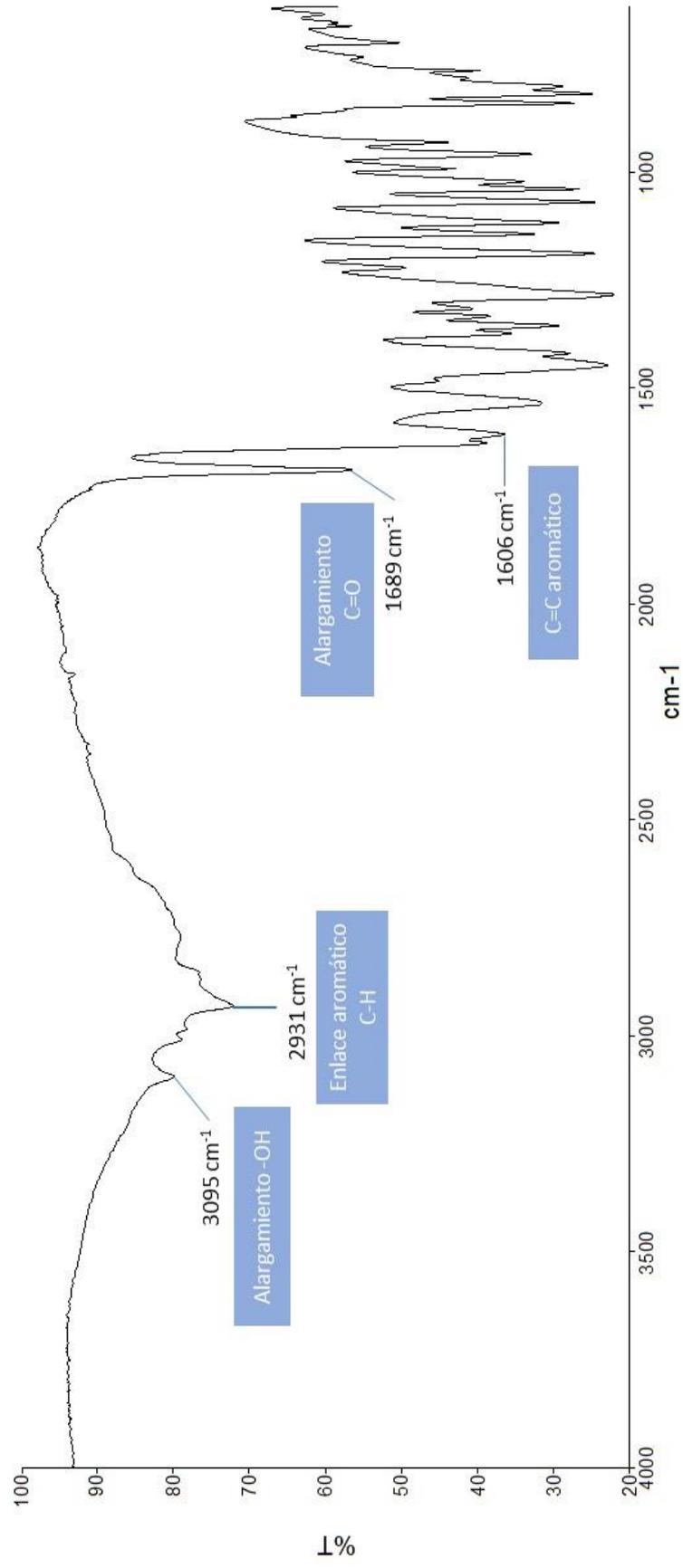
El espectro UV-Vis del ácido úsnico, Figura 31, presenta dos bandas de máxima absorbancia, 234 y 283 nm, estas bandas se deben a la conjugación de los electrones  $\pi$  del anillo aromático. Asimismo, el espectro ultravioleta-visible del ácido úsnico aislado es muy similar al espectro ultravioleta-visible del etil orselinato descrito por (Ramos & Córdor, 2018).

#### Figura 31

*Espectro Ultravioleta-Visible del compuesto liquénico ácido úsnico, obtenido a partir del extracto F4 puro.*



**Figura 32**  
Espectro IR-ATR del compuesto ácido úsrico, obtenido a partir del extracto F4.



## b. Orcinol

Luego de analizar el extracto B5 puro por las técnicas instrumentales CG-MS, IR-ATR y UV-Vis, se obtuvieron los siguientes resultados.

### b.1. Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas

Al realizar el análisis al extracto B5 puro por CG-EM, el equipo solo detectó al metabolito secundario Orcinol (100%),  $C_7H_8O_2$ , siendo este el único pico presente en el cromatograma, como se muestra en la Figura 33, además, su índice de similitud es del 98% y el tiempo de retención 5,443 min (Tabla 7). En adición, el espectro de masas del orcinol aislado se muestra en la Figura 34. En este espectro, el ión molecular con masa de 124 m/z coincide con la masa molar del orcinol. Asimismo, presenta picos característicos de los compuestos fenólicos extraídos de líquenes, como los de 107 m/z y 96 m/z.

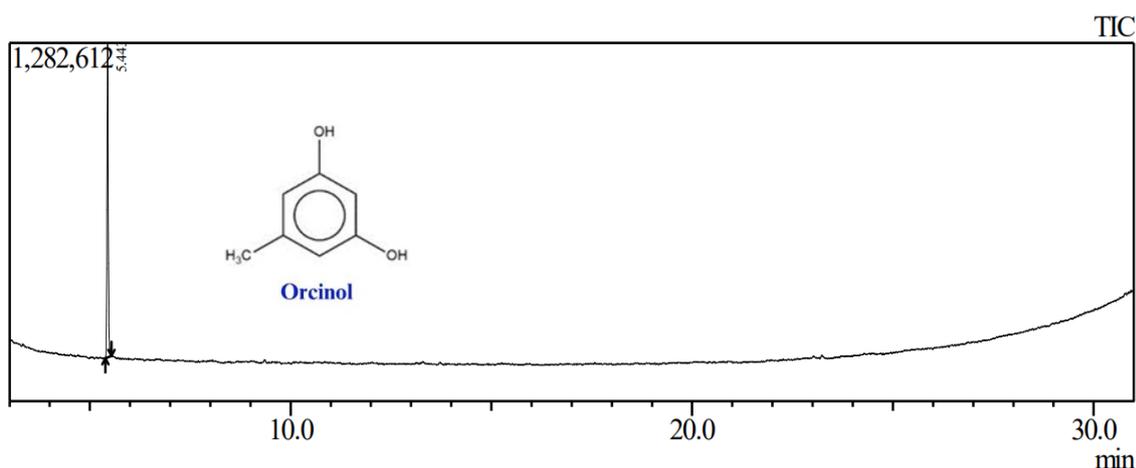
**Tabla 7**

*Información del metabolito secundario detectado por el CG-EM a partir del EBO-Diclorometano-extracto B5.*

Compuesto	Fórmula Molecular	Tiempo de retención (min)	Área (%)	Semejanza SI (%)
Orcinol	$C_7H_8O_2$	5.44	100	98

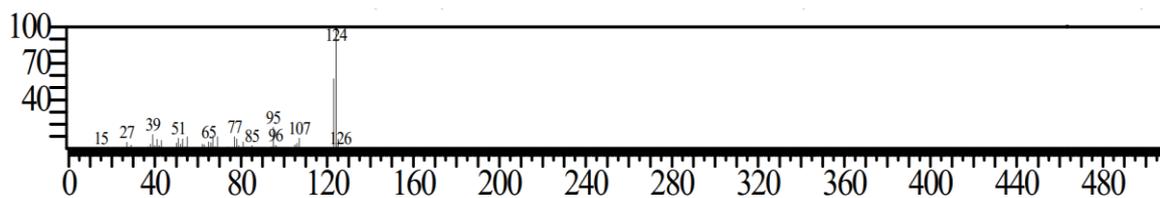
**Figura 33**

*Cromatograma (TIC) del extracto B5 puro.*



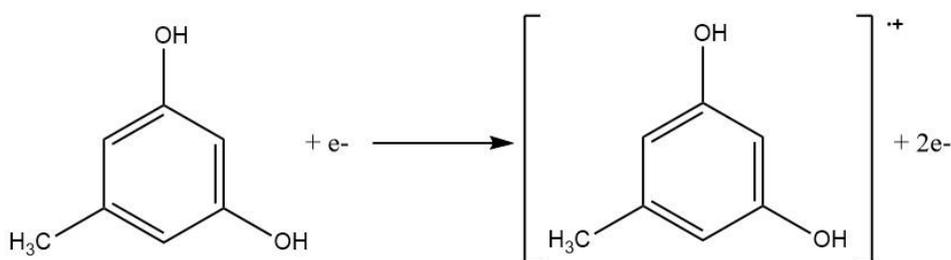
**Figura 34**

*Espectro de masas del orcinol, extraído del extracto B5 puro.*

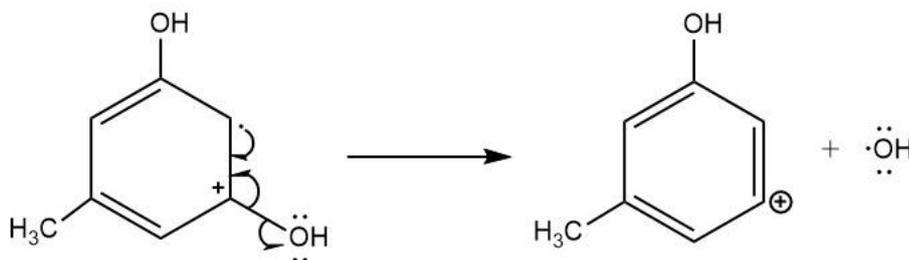


La secuencia de las fragmentaciones del orcinol en las principales señales del espectro de masas se describe a continuación.

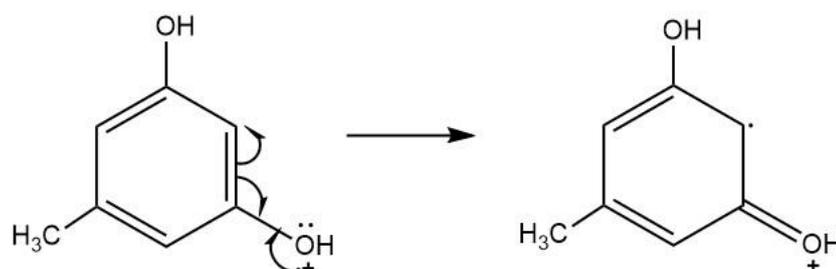
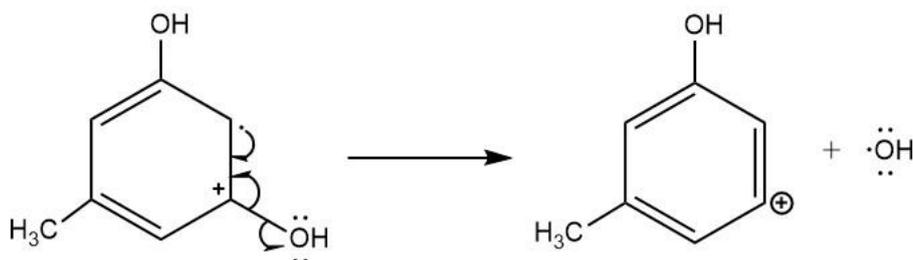
**i. Ión molecular  $M^+ = 196$**

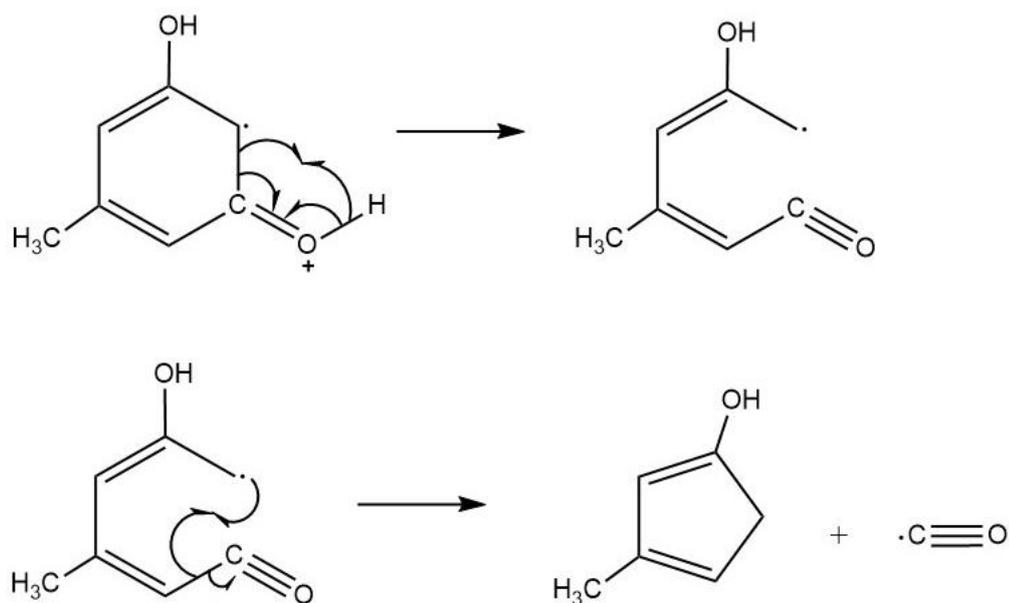


**ii.  $m/z$  107**



**iii.  $m/z$  = 96**



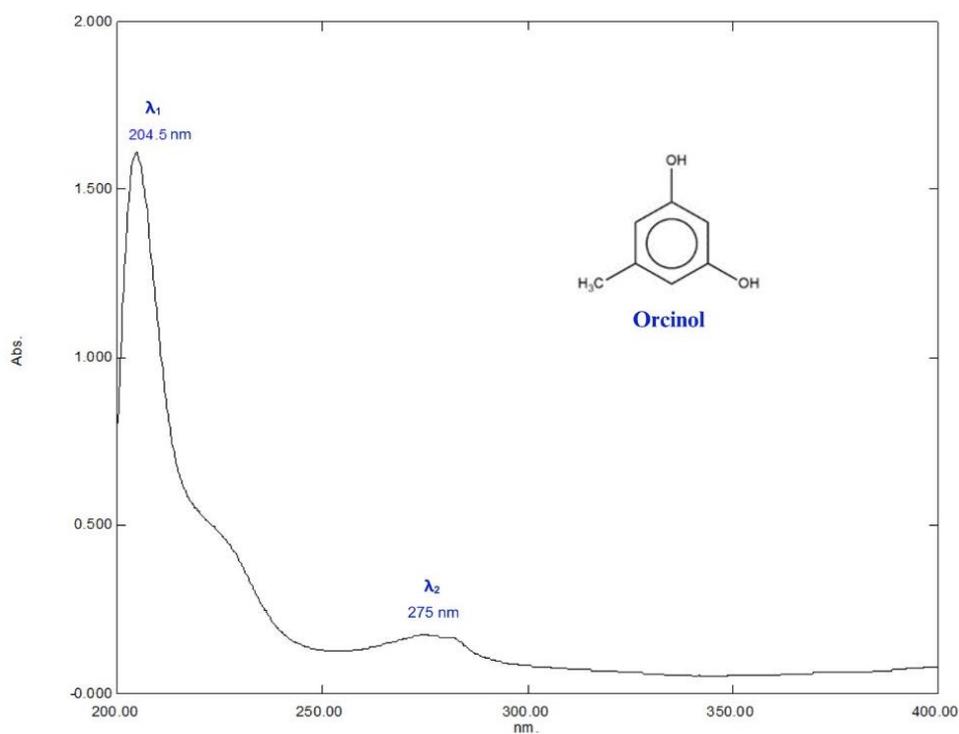


### ***b.2 Espectroscopía ultravioleta- visible***

El espectro UV-Vis del orcinol, Figura 35, presenta dos bandas de máxima absorbancia, 204 y 275 nm, estas bandas se deben a la conjugación de los electrones  $\pi$  del anillo aromático. Además, el espectro UV-Vis del orcinol aislado presenta mucha similitud con el espectro UV-Vis del orcinol de la base de datos NIST Chemistry WebBook.

**Figura 35**

*Espectro UV-Vis del compuesto orcinol, obtenido a partir del extracto B5 puro.*



### ***b.3. Espectroscopía infrarroja acoplado reflexión total atenuada***

La Figura 36 presenta el Espectro Infrarrojo del orcinol, donde podemos identificar rasgos distintivos. Por ejemplo, el pico en  $3354\text{ cm}^{-1}$  revela la existencia del grupo O-H en la estructura. Asimismo, el pico en  $2924\text{ cm}^{-1}$  es típico del estiramiento del enlace C-H en anillos aromáticos, mientras que el de  $2854\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de un grupo  $-\text{CH}_2$ . Por otro lado, el pico en  $1711\text{ cm}^{-1}$  evidencia la flexión del enlace O-H, y el de  $1610\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace C=C de un anillo aromático.

### ***b.4. Resonancia magnética Nuclear $^1\text{H}$***

Del espectro RMN $^1\text{H}$  obtenido del orcinol aislado, Figura 37, podemos observar los siguientes picos con sus respectivos desplazamientos químicos, integración y acoplamiento spin-spin, estos están representados en la Tabla 8. Observamos que cada pico del espectro está debidamente asignado con uno o más hidrógenos según su integración y el desplazamiento.

Además, estos valores son similares a los reportados por los autores (Jorgensen et al., 2014), por lo cual podemos afirmar que corresponden al metabolito secundario orcinol.

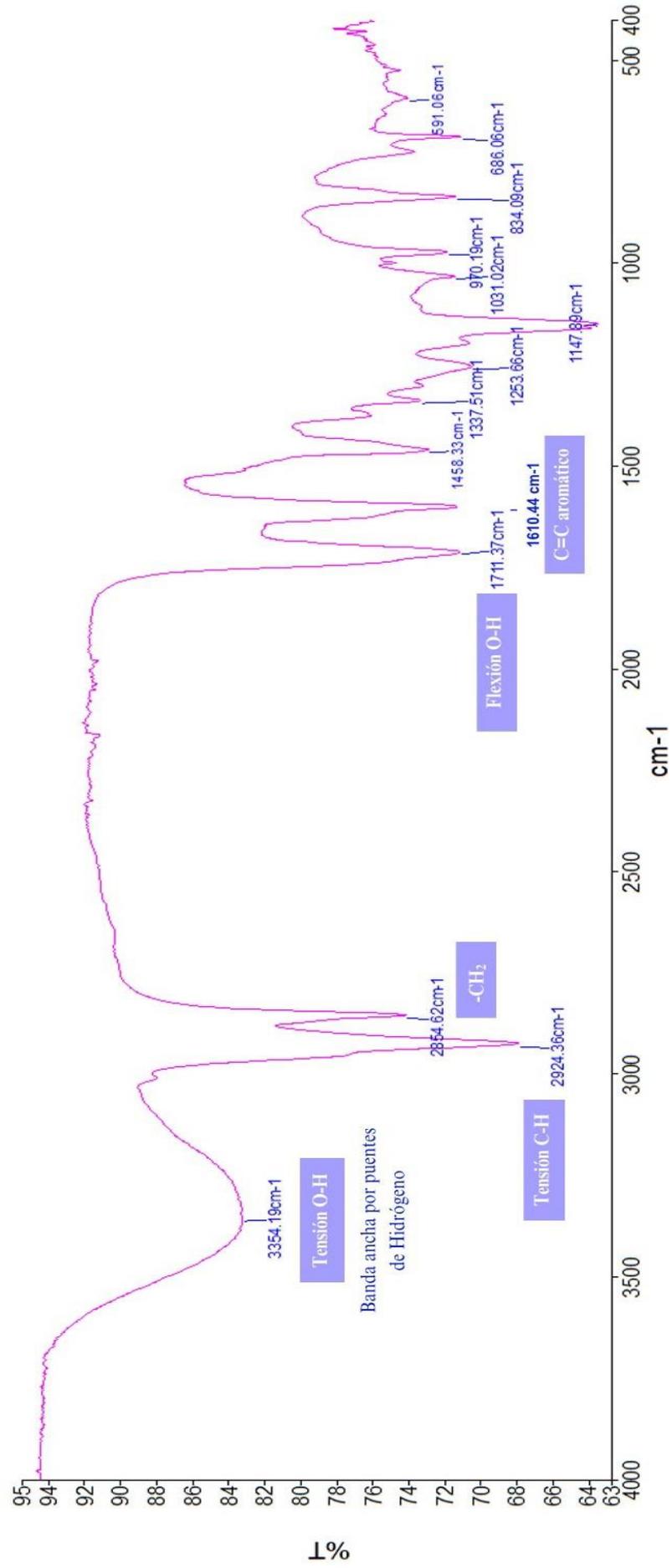
**Tabla 8**

*Datos recopilados del espectro RMN $^1\text{H}$  del orcinol aislado*

<b>Tipo de Hidrógeno</b>	<b>Integración</b>	<b>Desplazamiento (<math>\delta</math>, ppm)</b>	<b>Acoplamiento spin- spin</b>
Ar-H	3H	6.20	s
Ar-CH <sub>3</sub>	3H	2.16	s

**Figura 36**

*Espectro IR-ATR del compuesto liquénico orcinol, obtenido a partir del extracto B5 puro.*



### ***b.5. Resonancia magnética Nuclear <sup>13</sup>C***

Al realizar el análisis por RMN<sup>13</sup>C del extracto B5 puro se obtuvo su respectivo espectro, Figura 38. Los resultados se compilaron en la Tabla 9, la cual muestra 5 señales clave para los siete carbonos de la molécula de orcinol. Esto incluye un carbono primario, tres carbonos terciarios y tres carbonos cuaternarios. Al comparar los datos obtenidos del espectro del extracto B5 con los valores reportados por (Jorgensen et al., 2014), podemos concluir que el extracto B5 corresponde al metabolito secundario orcinol.

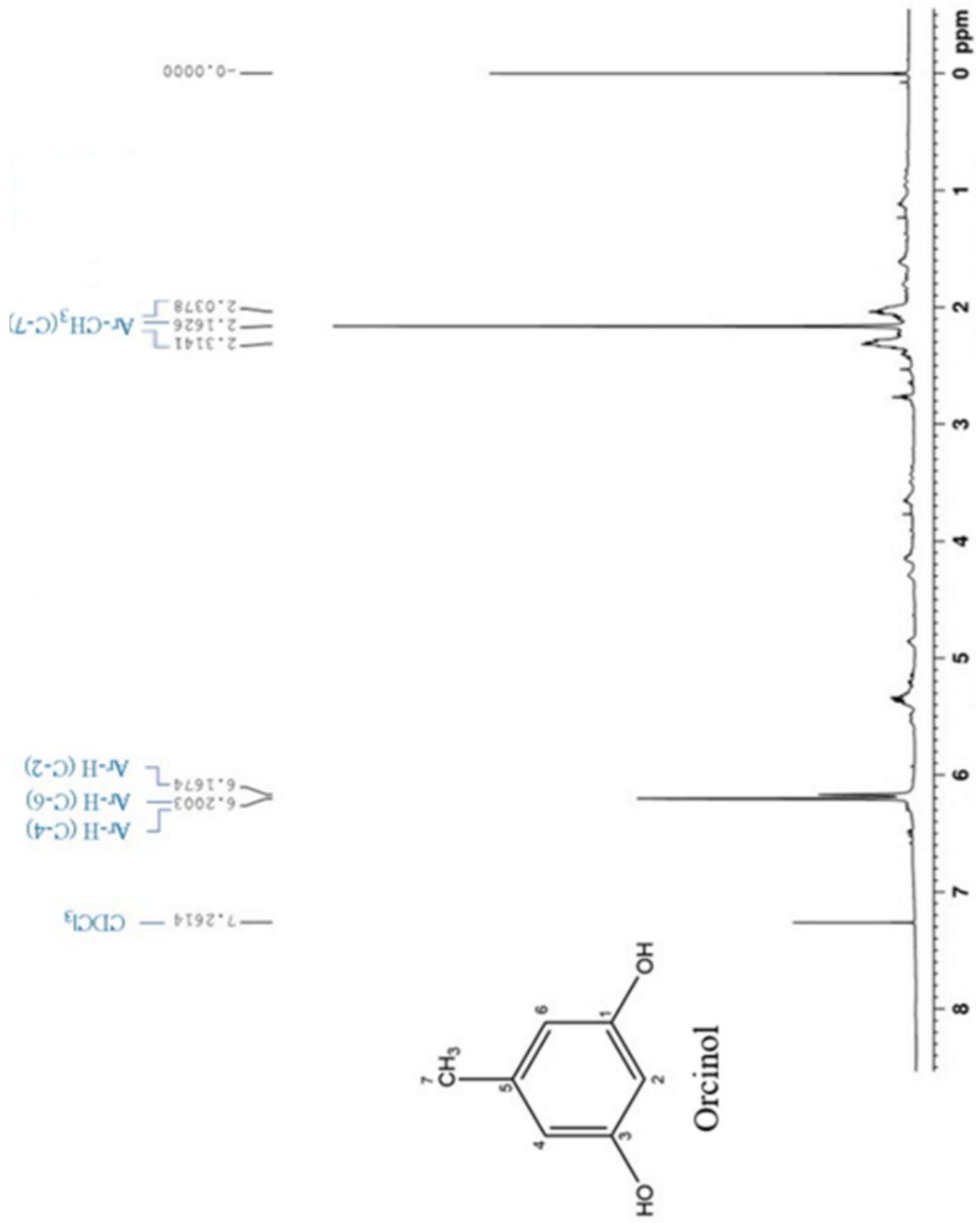
**Tabla 9**

*Datos obtenidos del espectro RMN<sup>13</sup>C del orcinol aislado a partir del líquen Umbilicaria calvescens Nyl.*

<b># Carbono</b>	<b>Tipo de carbono</b>	<b>Desplazamiento (δ, ppm)</b>
C-1 / C-3	Carbono cuaternario	156.72
C-2	Carbono terciario	140.69
C-5	Carbono cuaternario	108.63
C-4 / C-6	Carbono terciario	100.14
C-7	Carbono primario	21.38

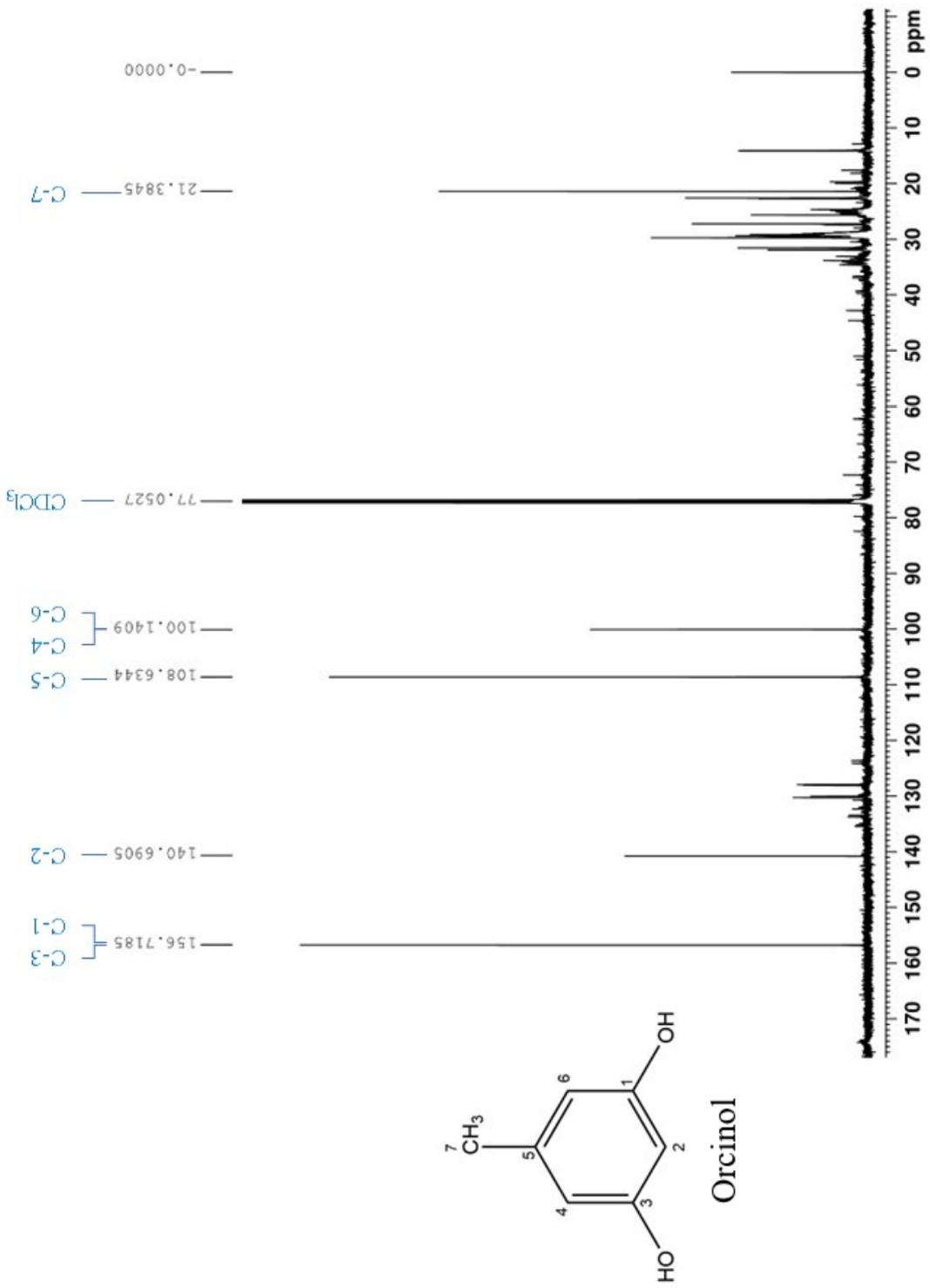
**Figura 37**

Espectro RMN<sup>1</sup>H del metabolito secundario orcinol, obtenido a partir del extracto B5 puro.



**Figura 38**

*Espectro RMN<sup>13</sup>C del metabolito secundario orcinol, obtenido a partir del extracto B5 puro.*



### 4.2.3 Polaridad alta: etanol

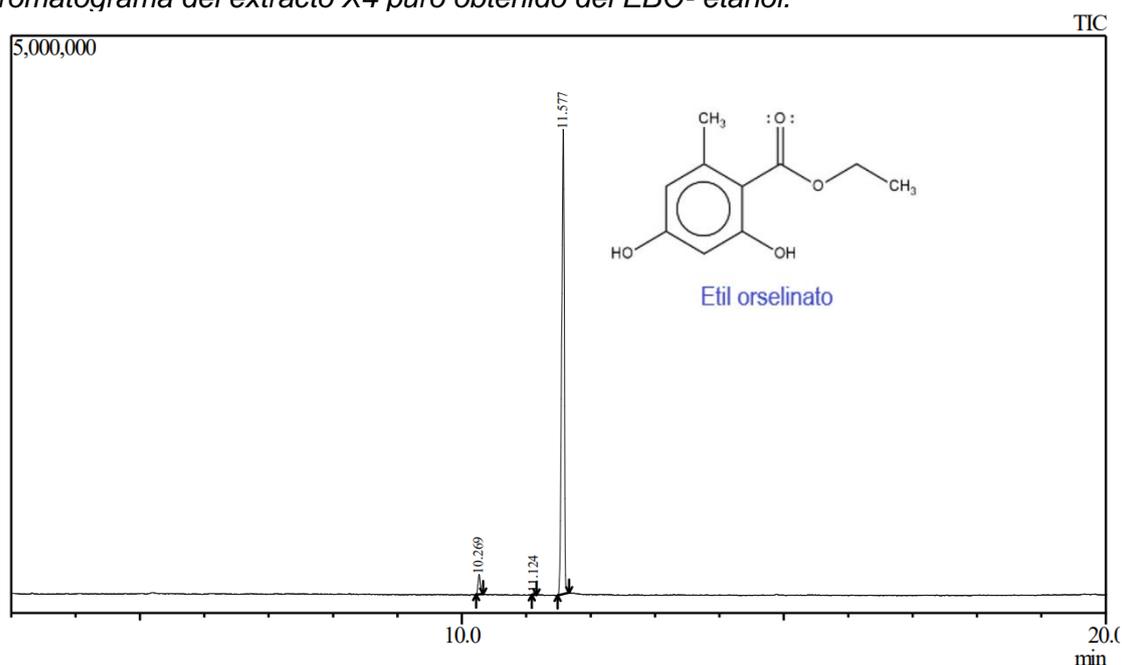
#### a. Etil orselinato

##### a.1. Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas

La Figura 39 presenta el cromatograma del extracto puro X4 obtenido mediante CG-EM, en el cual se observa que el metabolito secundario etil orselinato es el pico mayoritario (96%) en el cromatograma.

**Figura 39**

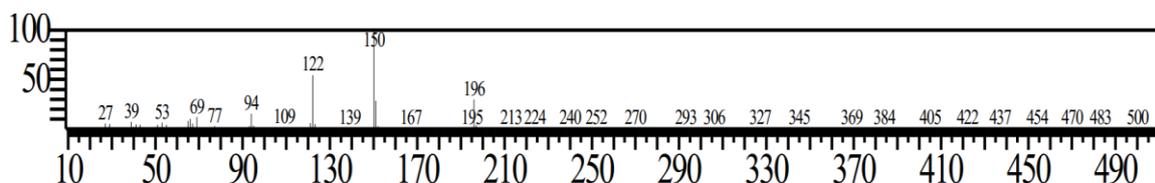
*Cromatograma del extracto X4 puro obtenido del EBO- etanol.*



Además, se ha obtenido el espectro de masas del etil orselinato, tal como se presenta en la Figura 40. Este espectro revela el ión molecular de 182 m/z, el cual concuerda con la masa molar del compuesto etil orselinato. Asimismo, el espectro muestra picos característicos que corresponden a las fragmentaciones comunes en los compuestos fenólicos liquénicos, como 150 m/z, 122 m/z y 69 m/z.

**Figura 40**

*Espectro de masas del orsellinato de etilo obtenido del extracto X4 puro.*



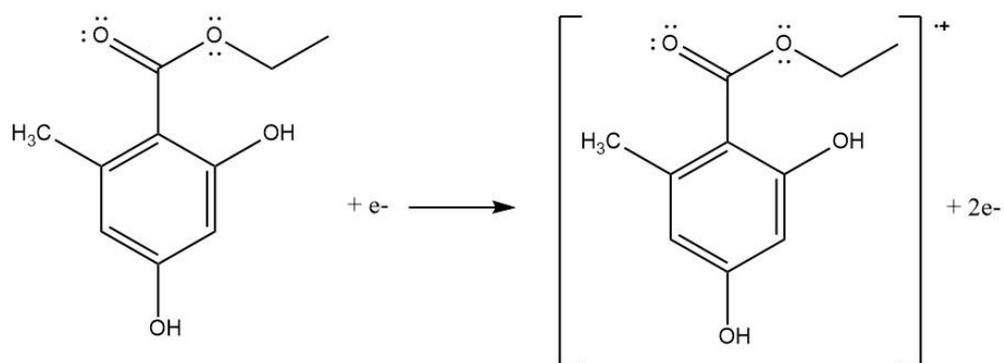
**Tabla 10**

Información del metabolito secundario detectado por el CG-EM a partir del EBO-etanol.

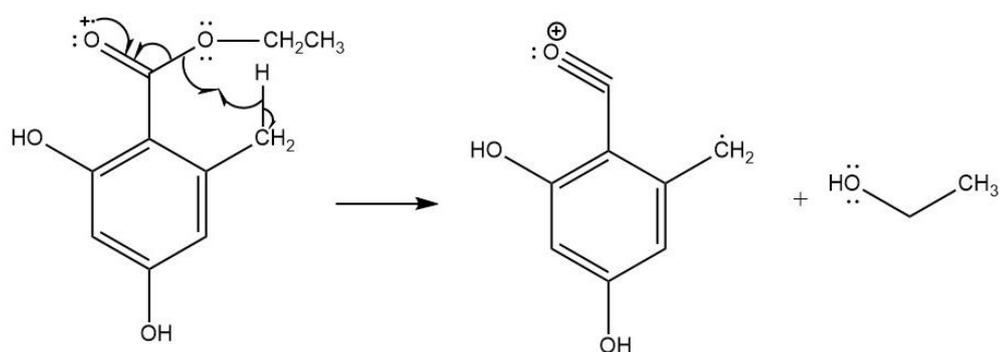
Compuesto	Fórmula Molecular	Tiempo de retención (min)	Área (%)	Semejanza SI (%)
Etil orselinato	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	11,58	96,18	97

La secuencia de las fragmentaciones del etil orselinato en las principales señales del espectro de masas se describe a continuación.

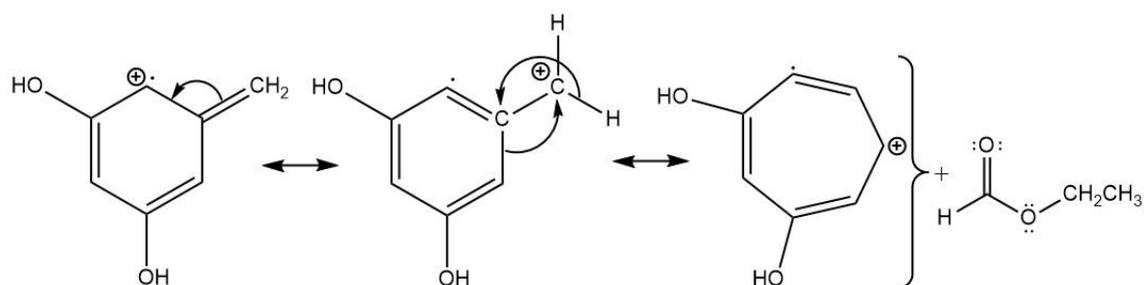
**i. Ión molecular M<sup>+</sup> = 196**



**ii. m/z 150**



**iii. m/z 122**

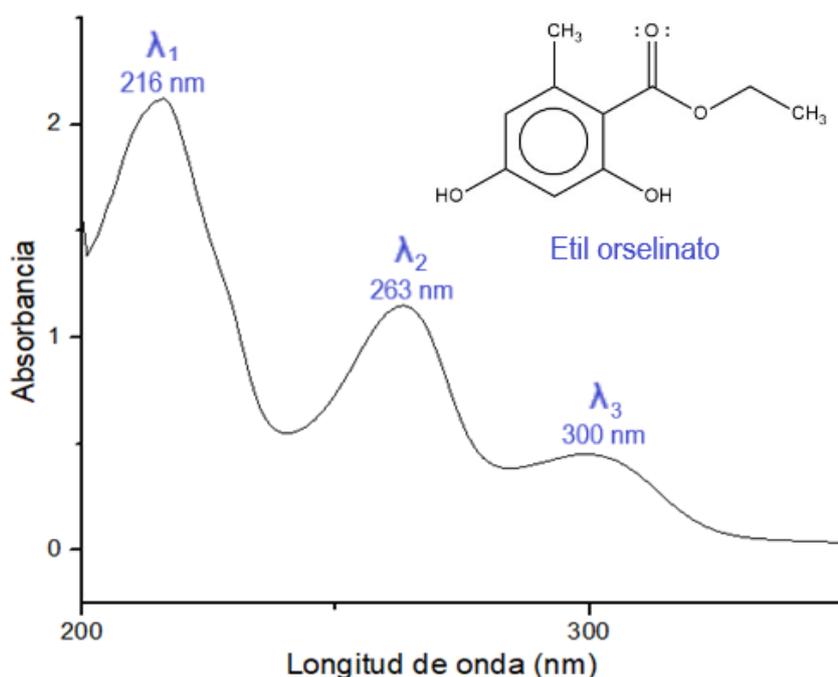


### a.2. Espectroscopía ultravioleta- visible

El espectro UV-Vis del etil orselinato aislado (Figura 41), presenta dos bandas de máxima absorción en las longitudes de onda 216, 263 y 300 nm, estas bandas se deben a la conjugación de los electrones  $\pi$  del anillo aromático y la absorción del grupo carbonilo. Por otro lado, el espectro UV-Vis del etil orselinato aislado presenta mucha similitud con el espectro UV-Vis del etil orselinato de la base de datos NIST Chemistry WebBook.

**Figura 41**

*Espectro UV-Vis del compuesto etil orselinato, obtenido a partir del extracto X4 puro.*



### a.3. Resonancia magnética Nuclear $^1\text{H}$

Se presenta espectro RMN $^1\text{H}$  obtenido a partir del etil orselinato aislado del Liqueen *Umbilicaria calvescens* Nyl. en la Figura 42, los picos están relacionados con sus respectivos desplazamientos químicos, integración y acoplamiento spin-spin, como se observa en la Tabla 11. Notamos que cada pico del espectro está debidamente asignado con uno o más hidrógenos según su integración y el desplazamiento.

Asimismo, estos valores presentados en la Tabla 11 son similares a los reportados por los autores (Tatipamula et al., 2019), por lo cual podemos concluir que el extracto X4 es el metabolito secundario etil orselinato.

**Tabla 11**

*Datos recopilados del espectro RMN<sup>1</sup>H del etil orselinato aislado a partir del Liquen Umbilicaria calvescens Nyl.*

<b>Tipo de Hidrógeno</b>	<b>Integración</b>	<b>Desplazamiento (δ, ppm)</b>	<b>Acoplamiento spin- spin</b>
Ar-OH (C-2)	1H	11.82	s
Ar-H (C-5)	1H	6.28	d
Ar-H (C-3)	1H	6.27	d
C-OH (C-4)	1H	6.22	d
O-CH (C-9)	1H	4.41	t
O-CH (C-9)	1H	4.38	t
Ar-CH (C-7)	3H	2.50	s
-CH <sub>3</sub> (C-10)	1H	1.43	m
-CH <sub>3</sub> (C-10)	1H	1.41	m
-CH <sub>3</sub> (C-10)	1H	1.40	m

#### ***a.4. Resonancia magnética Nuclear <sup>13</sup>C***

Tras analizar el extracto B5 puro mediante RMN<sup>13</sup>C, se generó su correspondiente espectro, que se muestra en la Figura 43. Los datos adquiridos en el espectro se resumen en la Tabla 12, donde se identificaron diez señales distintivas que representan los diez átomos de carbono que conforman la molécula de etil orselinato. Estos incluyen dos carbonos primarios, un carbono secundario, dos carbonos terciarios y cinco carbonos cuaternarios.

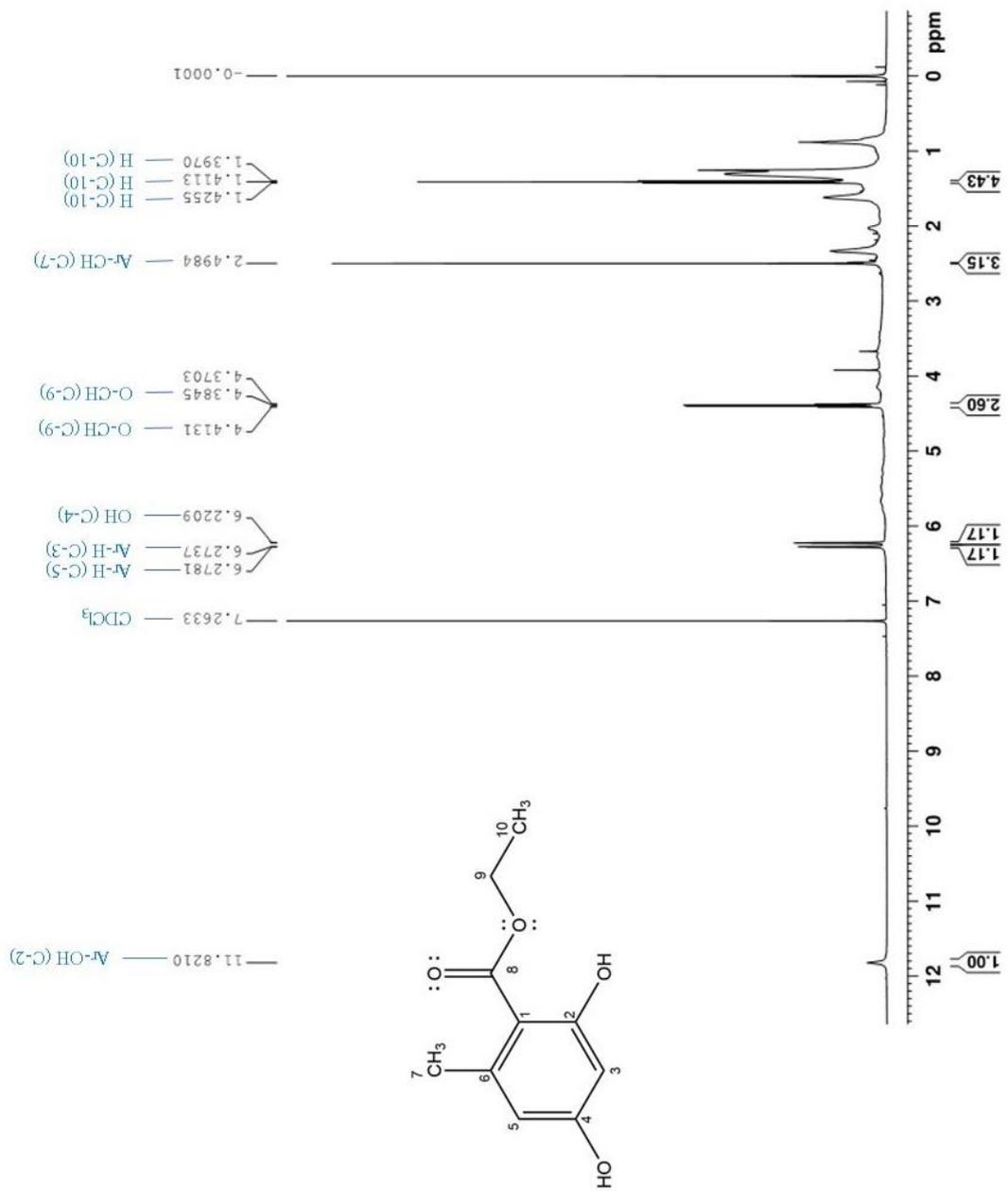
Al comparar los datos obtenidos del espectro del extracto X4 con los valores reportados por (Tatipamula et al., 2019), podemos concluir que el extracto X4 corresponde al metabolito secundario etil orselinato.

**Tabla 12**

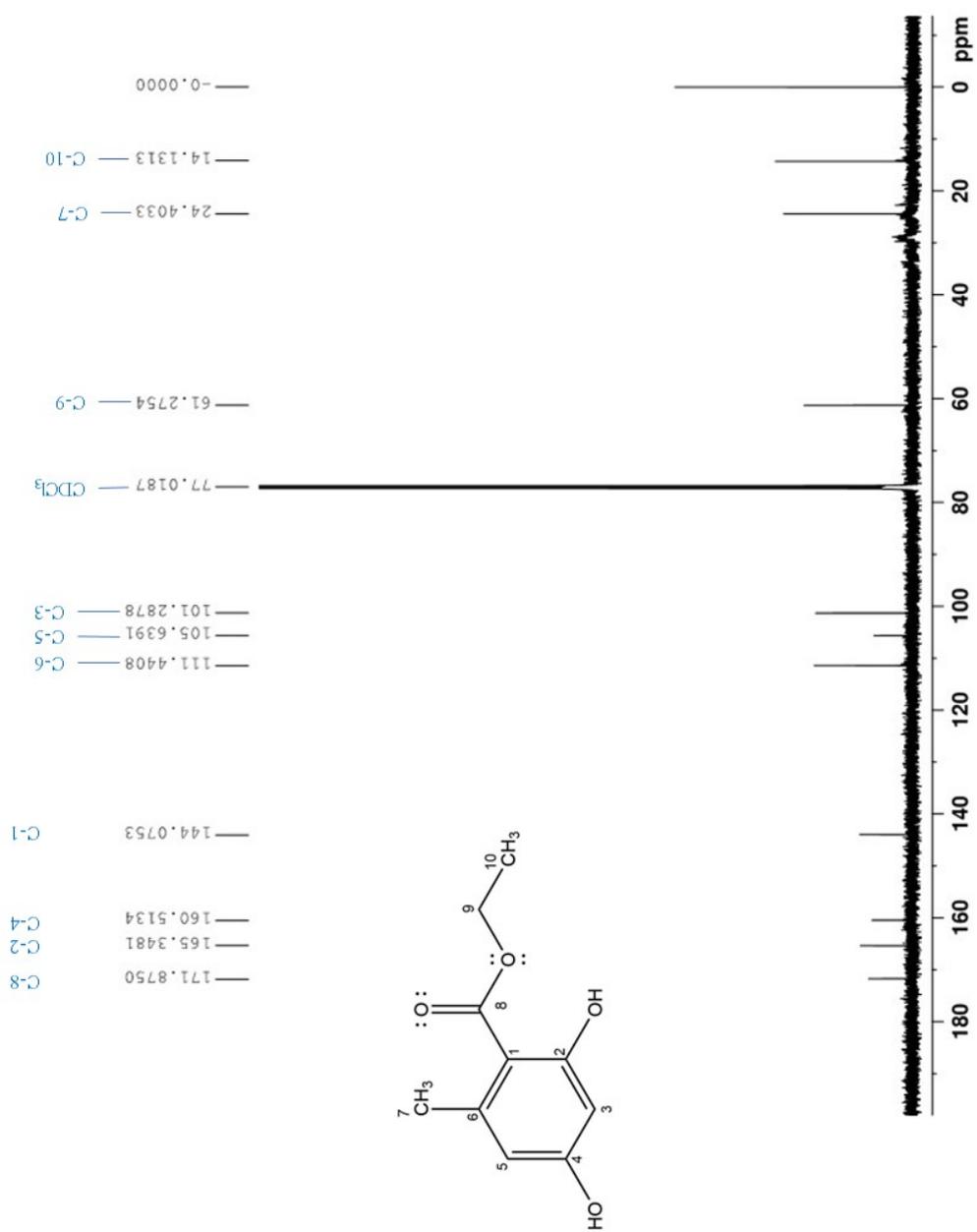
*Datos obtenidos del espectro RMN<sup>13</sup>C del etil orselinato aislado a partir del liquen Umbilicaria calvescens Nyl.*

<b>Número de carbono</b>	<b>Tipo de carbono</b>	<b>Desplazamiento (<math>\delta</math>, ppm)</b>
C-8	Carbono cuaternario	171.88
C-2	Carbono cuaternario	165.35
C-4	Carbono cuaternario	160.51
C-1	Carbono cuaternario	144.08
C-6	Carbono cuaternario	111.44
C-5	Carbono terciario	105.64
C-3	Carbono terciario	101.29
C-9	Carbono secundario	61.28
C-7	Carbono secundario	24.40
C-10	Carbono primario	14.13

**Figura 42**  
Espectro RMN<sup>1</sup>H del metabolito secundario etil orselinato, obtenido a partir del extracto X4 puro.



**Figura 43**  
Espectro RMN<sup>13</sup>C del metabolito secundario etil orselinato, obtenido a partir del extracto X4 puro.



## Conclusiones

- i. Se revisó la mayor cantidad de artículos científicos e información relativa a los líquenes, en especial del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. Lo cual se ve reflejado en el Capítulo II.
- ii. La marcha fitoquímica del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl reveló la presencia de varios compuestos: aminoácidos (primarios y/o secundarios), compuestos fenólicos libres, taninos y triterpenos y/o esteroides. Este estudio permite conocer la composición química de este líquen en particular.
- iii. A partir del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl se obtuvo del Extracto Bruto Orgánico de éter de petróleo (0,4132 g), el Extracto Bruto Orgánico de diclorometano (1,6701 g) y el Extracto bruto orgánico de etanol (8,2583 g).
- iv. Se realizó la separación del EBO-éter mediante CC sílica gel. La primera columna cromatográfica se obtuvo los extractos G1-G4, posteriormente, la segunda columna cromatográfica se separó el extracto G1, obteniéndose los extractos G1\*-G4\*, luego se realizó otra columna cromatográfica para el extracto G4\* y así obtuvimos tres fracciones M1-M3. Así mismo, se realizó la separación del EBO- diclorometano mediante la técnica CC Flash, produciéndose cuatro extractos, Y1-Y4. Luego, se realizó CC sílica gel de los extractos Y1, Y2, Y3 y Y4. Al realizar la CC con sílica gel del extracto Y1 se obtuvo 4 grupos, F1, F2, F3 y F4. Luego, se separó el extracto Y2 mediante CC con sílica gel, se obtuvo 9 grupos, M1, M2, M3, ..., M9. Posteriormente, el extracto Y3 se separó por CC con sílica gel, se obtuvo 7 grupo, B1, B2, ..., B7. Por último, el extracto Y4 se separó por CC con sílica gel, obteniéndose 8 grupos, A1, A2, ..., A8. Se realizó la separación del EBO- etanol mediante partición líquido- líquido, cromatografía de filtración por gel Sephadex y CC sílica gel, al finalizar se obtuvieron 9 fracciones (X1-X9).
- v. Se identificó los metabolitos secundarios por CG-EM: metil  $\beta$ -orcinolcarboxilato (2,42% de G4\*) del EBO/ éter, ácido úsnico (86 % de F4) y orcinol (100% de B5) del EBO/ diclorometano, finalmente, etil orselinato (78% X4) del EBO/ etanol.
- vi. Se purificó los extractos B5 (292,2 mg) y X4 (47,2 mg) mediante la técnica recristalización.
- vii. Se caracterizó el orcinol y etil orselinato aislados mediante CG-EM,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, IR-ATR y UV-Vis.

## Recomendaciones

- i. Se recomienda usar equipo de protección personal, entre estos, mascarilla para solventes, debido a los olores fuertes que emanan los solventes orgánicos.
- ii. Para la extracción sólido-líquido debemos tener cuidado al retirar el solvente macerado, ya que podemos retirar también parte de la muestra.
- iii. Realizar un estudio previo mediante CCF para analizar el comportamiento de nuestra muestra y así elegir los solventes adecuados para su posterior uso.
- iv. En la identificación mediante la técnica instrumental CG-EM, debemos tener la muestra analizar lo más purificada posible, de lo contrario, tendremos picos anchos en el cromatograma, dificultando el análisis.
- v. Elegir el clima adecuado para realizar cromatografía en columna, porque en climas cálidos la sílice tiende a secarse, por lo cual es mejor prender el aire acondicionado a temperatura entre 15- 20 °C.
- vi. Seguir investigando este líquen, en este trabajo de Tesis se intentó abarcar todo el rango de polaridad en estudio, a pesar de ello hay fracciones que no se lograron analizar debido al tiempo, así que se invita al lector a seguir investigando este líquen.

## Referencias bibliográficas

- A. B. Roge\*, S. N. Firke, R. M. Kawade, S. K. Sarje, and S. M. V. (2011). Brief Review on: Flash Chromatography. *IJPSR*, 2(8), 1930–1937.
- Amo de Paz, G., & Burgaz, A. (2009). *Líquenes epifíticos del Hayedo de Montejo de la Sierra (Madrid)*.
- Bourgeois, G., Suire, C., Vivas, N., Benoist, F., & Vitry, C. (1999). Atraric acid, a marker for epiphytic lichens in the wood used in cooperage: Identification and quantification by GC/MS/(MS). *Analisis*, 27(3), 281–283. <https://doi.org/10.1051/analisis:1999100>
- Canseco, A., Anze, R., & Franken, M. (2006). Comunidades de líquenes : indicadores de la calidad del aire en la ciudad de La Paz , Bolivia. *Acta Nova*, 3, 286–307. <http://www.ucbcba.edu.bo/Publicaciones/revistas/actanova/documentos/v3n2/v3.n2.Canseco.pdf>
- Cóndor Cuyubamba, E. A. (2012). *Estudio químico de los líquenes Xanthoparmelia tasmanica y Xanthomendoza mendozae*. Universidad Nacional de Ingeniería.
- Córdoba, C. V. (1975). *Fisiología de las sustancias liquénicas* ([1975] [Madrid] : Alhambra (ed.)).
- De Los Ángeles Herrera-Campos, M., Lücking, R., Pérez-Pérez, R. E., Miranda-González, R., Sánchez, N., Barcenás-Peña, A., Carrizosa, A., Zambrano, A., Ryan, B. D., & Nash, T. H. (2014). Biodiversidad de líquenes en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), 82–99. <https://doi.org/10.7550/RMB.37003>
- Diana Judith Martino Cruz. (2015). *Estudio Químico del líquen Flavopunctelia Flaventior (Stirt.) Hale*.
- Geir, H. (2010). Typification of the Andean taxa of Umbilicaria described by William Nylander. *Mycotaxon*, 111(March 2010), 51–63. <https://doi.org/10.5248/111.51>
- Gonzales Vargas, N., Luján Pérez, M., Navarro Sánchez, G., & Flores Mercado, R. (2016). Aplicabilidad de líquenes bioindicadores como herramienta de monitoreo de la calidad del aire en la ciudad de Cochabamba. *Acta Nova*, 7(4), 455–482.
- Hasegawa, D. M. y M. (2018). Fitoquímica Orgánica. In *Universidad Central de Venezuela*.
- Hernández, M. (2011). Uso medicinal popular de plantas y líquenes de la Isla Paulino, Provincia de Buenos Aires, Argentina. [Popular medical use of plants and lichens from Paulino Island, Province of Buenos Aires, Argentina]. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(4).
- Herrera, T., & Ulloa., M. (1990). El Reino de los Hongos, micología básica y aplicada. *UNAM-Fondo de Cultura Económica*.
- Hestmark, G. (2009). New observations and records for Umbilicaria (Umbilicariaceae) in Bolivia. *The Bryologist*, 112(4), 833–838. <https://doi.org/10.1639/0007-2745->

- Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996). *Identification of Lichen Substances* (Vol. 1). Springer.
- Illana Esteban, C. (2012). *Líquenes usados en medicina tradicional*. 163–174.
- Jiang, H., Zhang, S., Guan, Q., Chen, C., Gao, F., & Zhang, Y. (2007). <sup>1</sup>H NMR Investigations of Inclusion Complexes Between  $\beta$ -Cyclodextrin and 1-Hexadecanol. *Current Drug Discovery Technologies*, 4(4), 295–297. <https://doi.org/10.2174/157016307783220567>
- Jorgensen, S. H., Frandsen, R. J. N., Nielsen, K. F., Lysøe, E., Sondergaard, T. E., Wimmer, R., Giese, H., & Sorensen, J. L. (2014). Fusarium graminearum PKS14 is involved in orsellinic acid and orcinol synthesis. *Fungal Genetics and Biology*, 70, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.008>
- Kalsum, N., Sulaeman, A., Setiawan, B., & Wibawan, I. W. T. (2016). Phytochemical Profiles of Propolis Trigona spp. from Three Regions in Indonesia Using GC-MS. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 6(14), 31–37. [www.iiste.org](http://www.iiste.org)
- Kramer, J. R., & Deming, T. J. (2010). General method for purification of  $\alpha$ -amino acid-N-carboxyanhydrides using flash chromatography. *Biomacromolecules*, 11(12), 3668–3672. <https://doi.org/10.1021/bm101123k>
- Leisewitz, A. (2018). *Manual de normas de bioseguridad y riesgos asociados*.
- Lopez Huillca, N. G. (2022). *Proyecto de Tesis III. Aislamiento del metabolito secundario a partir del liquen Umbilicaria calvescens Nyl.*
- Luo, H., Yamamoto, Y., Kim, J. A., Jung, J. S., Koh, Y. J., & Hur, J. S. (2009). Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from Umbilicaria antarctica in maritime Antarctica (King George Island). *Polar Biology*, 32(7), 1033–1040. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0602-9>
- Manojlovic, N. T., Vasiljevic, P. J., Maskovic, P. Z., Juskovic, M., & Bogdanovic-Dusanovic, G. (2012). Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen Umbilicaria cylindrica (L.) delise (Umbilicariaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/452431>
- Margulis, L. (1993). *Biología de los líquenes*. [http://www.uv.es/barreno/Biologia\\_de\\_los\\_liques.pdf](http://www.uv.es/barreno/Biologia_de_los_liques.pdf)
- Melo, M. G. D., Araújo, A. A. S., Rocha, C. P. L., Almeida, E. M. S. A., De Souza Siqueira, R., Bonjardim, L. R., & Quintans-Júnior, L. J. (2008). Purification, Physicochemical Properties, Thermal Analysis and Antinociceptive Effect of Atranorin Extracted from Cladonia kalbii. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(10), 1977–1980. <https://doi.org/10.1248/BPB.31.1977>
- Méndez, E., Blanco, M., Laguna, A., & García, E. (2003). Isolation and characterization of a mixture of higher primary aliphatic alcohols of high molecular weight from

- henequen (*Agave furcroydes* L.) wax . *CENIC Ciencias Químicas*, 34(1).  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181626017006>
- Moghadasian, M. H., & Shahidi, F. (2017). Fatty Acids. *International Encyclopedia of Public Health*, 114–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00157-0>
- Montañez, A. N. A. L. (2000). *Los Líquenes*. 64–65.
- Moreno, E., Sánchez, Á., & Hernández, J. (2007). *Guía Ilustrada de Hongos Liqueñizados de Venezuela*. 96.
- Müller, K. (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1007/s002530100684>
- Ramos Chávez, J. (2018). *Estudio químico del líquen Umbilicaria calvescens Nyl.* Universidad Nacional de Ingeniería.
- Ramos, D., Ramírez, Á., Quipuscoa, V., Durand, K., & Huallpa, J. (2013). Diversity of lichens in Tuctumpamya, Pochi District, Arequipa, Peru. *Arnaldoa: Revista Del Herbario HAO*, 20(1), 129–154.
- Ramos, J., & Córdor, E. (2018). Aislamiento del ácido lecanórico y ácido úsnico del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 84(2), 197–203. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v84i2.141>
- Reyna Pinedo, V. (2005). *Marcha Fitoquímica. Práctica de Laboratorio (Separata). Curso de Química de Productos Naturales-CQ046*. Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería.
- Reyna Pinedo, V. (2014). Guía N°1: Marcha Fitoquímica preliminar. In *Guía de Productos Naturales* (pp. 1–4).
- Reyna, V. (2001). *Libro de resúmenes del Primer curso nacional de plantas medicinales y fitoterapia – FITO 2001*. Instituto de Fiterapia Americano.
- Reyna, Victor. (2012). *Compendio de Química Orgánica Experimental I* (Editorial).
- Robles, J., Morales, P., & Pastor De Abram, A. (1992). Líquenes y sustancias liquénicas. In *Revista de Química* (Vol. 6, Issue 1). <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/4620>
- Rondina R. y Coussio, J. (1969). Estudio Fitoquímico de Plantas medicinales. *Revista de Investigaciones Agropecuarias-INTA (Argentina)*, Vol VI(Serie 2), 33: 351-366.
- Rude, M. A., Baron, T. S., Brubaker, S., Alibhai, M., Cardayre, S. B. Del, & Schirmer, A. (2011). Terminal Olefin (1-Alkene) Biosynthesis by a Novel P450 Fatty Acid Decarboxylase from *Jeotgalicoccus* Species †. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 77(5), 1718–1727. <https://doi.org/10.1128/AEM.02580-10>
- Rukachaisirikul, T., Siriwattanakit, P., Sukcharoenphol, K., Wongvein, C., Ruttanaweang, P., Wongwattanavuch, P., & Suksamrarn, A. (2004). Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2–3), 173–176.

<https://doi.org/10.1016/J.JEP.2004.01.022>

- Smeds, A. I., & Kytviita, M. M. (2010). Determination of usnic and perlatolic acids and identification of olivetoric acids in Northern reindeer lichen (*Cladonia stellaris*) extracts. *Lichenologist*, 42(6), 739–749. <https://doi.org/10.1017/S002428291000037X>
- Tanaka, M., Hsuan, C., Oeki, M., Shen, W., Goda, A., Tahara, Y., Onodera, T., Sanematsu, K., Rikitake, T., Oki, E., Ninomiya, Y., Kurebayashi, R., Sonoda, H., Maehara, Y., Toko, K., & Matsui, T. (2020). Identification of characteristic compounds of moderate volatility in breast cancer cell lines. *PLOS ONE*, 15(6), e0235442. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0235442>
- Tatipamula, V. B., Vedula, G. S., & Sastry, A. V. S. (2019). Chemical and pharmacological evaluation of manglicolous lichen *Rocella montagnei* Bel em. D. D. Awasthi. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s43094-019-0009-6>
- Universidad Nacional de Ingenieria. (2019). *Manual de seguridad en los laboratorios*. 6, 1–56.
- Villacrés, V. (1995). *Bioactividad de plantas amazónicas* (Abyala (ed.); Ed.).

## Anexos

Anexo 1: Constancia de la determinación botánica del líquen <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl.....	1
Anexo 2: Marcha Fitoquímica. Procedimiento adaptado del Dr. Victor M. Reyna Pinedo (1999) (De acuerdo a Rondina & Coussio, 1969).....	2
Anexo 3: Resultados de la Marcha Fitoquímica preliminar (De acuerdo al procedimiento de Rondina y Coussio-1969).....	7
Anexo 4: Metodología.....	8
Anexo 5: Ácidos Grasos.....	9
Anexo 6: Resultados obtenidos de GC-EM para la muestra G4*.....	12
Anexo 7: Resultados obtenidos de GC-EM para la muestra X4.....	13
Anexo 8: Resultados obtenidos de GC-EM para la muestra F4.....	14
Anexo 9: Resultados obtenidos de GC-EM para la muestra B5 puro.....	15
Anexo 10: Resultados obtenidos de GC-EM para la muestra X4 puro.....	16
Anexo 11: Normas de seguridad en el laboratorio.....	17
Anexo 12: Manipulación de desechos químicos en el laboratorio.....	21

## Anexo 1

### Constancia de la determinación botánica del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl

Por la presente, dejo constancia que:

La muestra de líquen recibida de la **Srta. Judith Ramos Chávez** ha sido estudiada y clasificada como: *Umbilicaria calvescens* Nyl. y tiene la siguiente posición taxonómica:

REINO: Fungi

PHYLUM: Ascomycota

CLASE: Lecanoromycetes

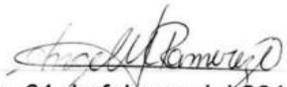
ORDEN: Lecanorales

FAMILIA: Umbilicariaceae

GÉNERO: *Umbilicaria*

ESPECIE: *Umbilicaria calvescens* Nyl.

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

  
Lima, 01 de febrero del 2014



ÁNGEL M. RAMÍREZ ORDAYA  
BIOLOGO  
COLBIOP N° 6632

**Blgo. Ángel Manuel Ramírez Ordaya**

N° de colegio de biólogos: 6632

## Anexo 2

### Marcha fitoquímica

Procedimiento adaptado del Dr. Victor m. Reyna pinedo (1999)

(de acuerdo a Rondina & Coussio, 1969)

#### 1.1 Obtención de las fracciones

##### 1.1.1 Fracción (a)

- i. Se coloca 5,0 gramos de muestra seca en un balón de 100 mL, luego se adiciona 50 mL de metanol, y se deja macerar durante 20 horas a temperatura ambiente.
- ii. Se somete la muestra, ya macerada, a reflujo durante 4 horas. Al cabo de ese tiempo se filtra en caliente, lavando el residuo con metanol, hasta completar 50mL.
- iii. Se separa 5 mL del extracto que se obtiene, lo que constituye la fracción (a). Descartando el residuo sólido.

##### 1.1.2 Fracción (b)

- i. Se lleva a sequedad los 45 mL restantes del extracto metanólico, en un rotavapor.
- ii. El residuo obtenido se extrae con 10 mL de  $\text{HCl}_{(\text{ac})}$  al 1%, calentando ligeramente ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), y se filtra utilizando un papel filtro lento. Se repite una vez más esta operación, pero con 5 mL de  $\text{HCl}_{(\text{ac})}$  al 1%. Las soluciones ácidas obtenidas se reciben en un Erlenmeyer de 50 mL y se guardan para ser utilizadas posteriormente (Sec. 3.i).
- iii. El residuo sólido se disuelve con 5mL de cloroformo, con ayuda de calor ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y agitación vigorosa, luego se filtra a través de un embudo pequeño utilizando papel de filtro lento. El líquido filtrado se seca con sulfato de sodio anhidro, para obtener la fracción (b). El residuo sólido se descarta.

##### 1.1.3 Fracción (c)

- i. La solución ácida obtenida en la sección 2.ii, se basifica con  $\text{NH}_{3(\text{ac})}$  7,5N hasta pH 9-10.
- ii. Se extrae con cloroformo (2x25 mL) en una pera de decantación. La fase acuosa se guarda para su posterior utilización (Sec. 4.i).
- iii. La fase clorofórmica se lava con 10 mL de agua destilada. Se reúne el agua de lavado con la fase acuosa obtenida en la etapa anterior (ii).
- iv. La fase clorofórmica obtenida se seca con sulfato de sodio anhidro, filtrando luego la solución. El filtrado constituye la Fracción (c).

##### 1.1.4 Fracción (d)

- i. La solución acuosa básica obtenida en la sección 3.ii y 3.iii se semisatura con sulfato de sodio, agregando 0.1 g de sal por mL de solución, y se filtra con papel de filtro

rápido. Luego se realizan dos extracciones con 25 mL de una mezcla de cloroformo:etanol (3:2) en un embudo de separación de 125 mL. Se guardan las fases acuosas para su posterior uso (Sec. 5).

- ii. La fase orgánica se lava con una solución semisaturada de sulfato de sodio, 0,1 g en 10 mL de agua destilada. Se junta el lavado acuoso con la obtenida en la etapa anterior.
- iii. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se filtra, obteniéndose la fracción (d).

#### **1.1.5 Fracción (e)**

- i. Las fases acuosas obtenidas en la sección 4.i y 4.ii constituyen la fracción (e).

#### **1.1.6 Fracción (f)**

- i. En un tubo de ensayo de 18x160 se coloca 1 g de muestra seca y pulverizada, y se adiciona 10 mL de agua destilada. Se calienta la mezcla durante 15 minutos en “baño maría”.
- ii. La solución obtenida se filtra en caliente utilizando un papel de filtro lento, completando el filtrado a 10 mL con agua destilada, y se deja enfriar a temperatura ambiente. Constituyendo esta solución la fracción (f).

### **1.2 Pruebas de identificación de metabolitos secundario**

#### **1.2.1 Aminogrupos primarios o secundarios (Prueba de Ninhidrina)**

Se realiza sobre las fracciones (a) y (f)

- i. Tomando cuidado de no tocar la parte central con los dedos, se prepara tres trozos de papel filtro “lento” de 2x3 cm, colocando cada uno sobre una luna de reloj. Luego con la ayuda de una pipeta pasteur se coloca, en el centro de cada uno, 1 gota de las siguientes muestras: fracción (a), fracción (f) y agua destilada. Los papeles se dejan secar a temperatura ambiente.
- ii. Luego se agrega 1 gota de la 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 colocan durante 30 minutos dentro de una estufa a una temperatura de 120 °C.

**Observación:** un color azul o violáceo nos indica prueba positiva.

#### **1.2.2 Grupos fenólicos libres y/o taninos (Prueba con el reactivo férrico)**

Se realiza sobre la fracción (a)

- i. El resto de la fracción (a) se lleva a sequedad en un rotavapor en un balón de 100mL.

- ii. El residuo se disuelve en 0,5 mL de agua destilada y se filtra a través de un papel de filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo (13x100mm), siendo esta la solución (a).
- iii. Se colocan 2 gotas de la solución (a) en una placa de toque, y a continuación se agrega 1 gota de solución acusa de cloruro férrico al 1% y se mezcla con una bagueta.

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

### **1.2.3 Taninos (Prueba de la Gelatina)**

Se realiza sobre “la solución a”.

- i. Se colocan 4 gotas de la “solución a” en una luna e reloj y a continuación se adicionan 2 gotas de solución de gelatina al 0,5%. Esta operación se realiza con 2 gotas de agua destilada como referencia.

**Observaciones:** un precipitado de color blanco o turbidez nos indica prueba positiva.

### **1.2.4 Flavonoides (Reacción de Shinoda) (exceptuando dihidrochalconas, chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas)**

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

- i. Se coloca la fracción (d) en un balón de 100 mL y se lleva a sequedad en un rotavapor.
- ii. Sobre el residuo se agrega 2,5 mL de etanol, dentro de un “baño maría” a 50°C. Luego se filtra 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 colocan 3 gotas de la “solución d” con 2 mL de agua destilada, y en otro tubo 2 mL de la fracción (e). Luego se adiciona 1 mL de HCl 12N y unas limaduras de magnesio, a cada tubo. Se agitan ambos tubos y luego se dejan en reposo durante 5 minutos.
- iv. Se adicionan 10 gotas de alcohol amílico a cada tubo, agitando estos. Luego se dejan en reposo para la separación de las 2 fases.

**Observaciones y resultados:** una coloración amarilla, naranja, rojo de la fase amílica nos indica prueba positiva.

### **1.2.5 Triterpenoides y esteroides (Reacción de Liberman-Burchard)**

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

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

**Observaciones:** una coloración rojo, rosado, púrpura, naranja, azul o verde del anillo, nos indica prueba positiva.

#### **1.2.6 Naftaquinonas y antraquinonas, antronas o antranoles (Reacción de Borrtrager)**

Se realiza sobre la fracción (b)

- i. El resto de la fracción (b) se coloca en un tubo de ensayo de 16x180 mm, y se agrega 5 mL de hidróxido de sodio al 5%. Luego se agita el tubo.

**Observaciones:** Fase acuosa rosada o roja nos indica prueba positiva.

#### **1.2.7 Alcaloides (Test de Dragendorff, Mayer y Wagner)**

Se realiza sobre la Fracción (c) y la “solución d”

- i. El resto de la fracción (c) se lleva a sequedad y el residuo se disuelve con 2,5 mL de HCl al 1%, luego se filtra a través de un papel filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo de 13x100 mm.
- ii. Se disponen de 5 gotas de la solución (d) en un tubo de ensayo de 13x100 mm y se lleva a sequedad, luego se filtra 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 adicionan 5 gotas de la solución final obtenida en la secc.7.i, por separado. Asimismo, a otros 3 tubos de ensayo de 6x50 mm, se adicionan 5 gotas de la solución final obtenida en la secc.7.ii, por separado. Luego se adiciona a cada tubo 2 gotas de los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, respectivamente.

**Observaciones:** la formación de precipitado rojo, crema y pardo, respectivamente nos indica prueba positiva.

### **1.2.8 Leucoantocianidinas y catequinas (Reacción de Rosenbein)**

Se realiza sobre la fracción (e) y la "solución d"

- i. En un tubo de ensayo de 13x100mm se colocan 3 gotas de la "solución (d)" junto con 2 mL de agua destilada, y en otro tubo de ensayo de 13x100 mm 2 mL de la fracción (e).
- ii. Luego a ambos tubos se agrega 1 mL de HCl 12N, se agitan y se colocan en baño maría durante 10 minutos.
- iii. Se dejan enfriar las mezclas, luego se agregan 10 gotas de alcohol amílico, a cada una, se agitan, y se dejan reposar por 5 minutos.

**Observaciones:** una coloración parda de la fase amílica nos indica prueba positiva.

### **1.2.9 Saponinas (Prueba de la espuma)**

Se realiza sobre la fracción (f).

- i. Se coloca 1 mL de la fracción (f) en un tubo de ensayo de 13x100mm y se agita durante 15 segundos. Luego se deja en reposo durante 15 minutos, al cabo de lo cual se debe medir la altura de la espuma.

**Observaciones:** si la espuma tiene una altura mayor o igual de 5mm y persiste por más de 5 minutos nos indica prueba positiva.

### Anexo 3

#### Resultados de la marcha fitoquímica preliminar (De acuerdo al procedimiento de Rondina y Coussio-1969)

**Muestra (Nombre común y científico):** *Umbilicaria calvescens* Nyl.

**Procedencia:** Camino a Huaytapallana, Prov. Huancayo (Junín, 19 Oct. 13)

**Cantidad de la muestra:** 6 g

**Fecha de Análisis:** 13 al 24 de julio del 2022

**Analista:** Nicol Lopez Huillca

Prueba N°	Principio Activo	Pruebas de coloración	Fracción	Resultados (*)	Observaciones (color de soluciones y/o precipitados)
01	Aminogrupos primarios y/o secundario	Ninhidrina	a	+	Mancha color violeta
			f	+++	Mancha color violeta intensa
02	Grupos fenólicos libres y/o taninos	Cloruro férrico	a	++	Color vino – rojo
03	Taninos	Gelatina	a	+	Turbidez
04	Triterpenos y esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	b	+	Anillo color verde-azul
			c	-	No se observa cambio de color
			d	+	Anillo verde-naranja
05	Quinonas, antronas o antranoles	Reacción de Borntrager	b	-	Turbidez
06	Alcaloides	Reactivo de Draggendorff	c	-	No hay precipitado
			d	-	No hay precipitado
		Reactivo de Mayer	c	-	No hay precipitado
			d	-	No hay precipitado
		Reactivo de Wagner	c	-	No hay precipitado
			d	-	No hay precipitado
07	Leucoantocianidinas (rojo), catequinas (marrón)	Reacción de Rosembein	d	-	No se observa cambio de color
			e	-	No se observa cambio de color
08	Flavonoides excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas	Reacción de Shinoda	d	-	No se observa cambio de color
			e	-	No se observa cambio de color
09	Saponinas	Prueba de espuma	f	-	No hay presencia de espuma

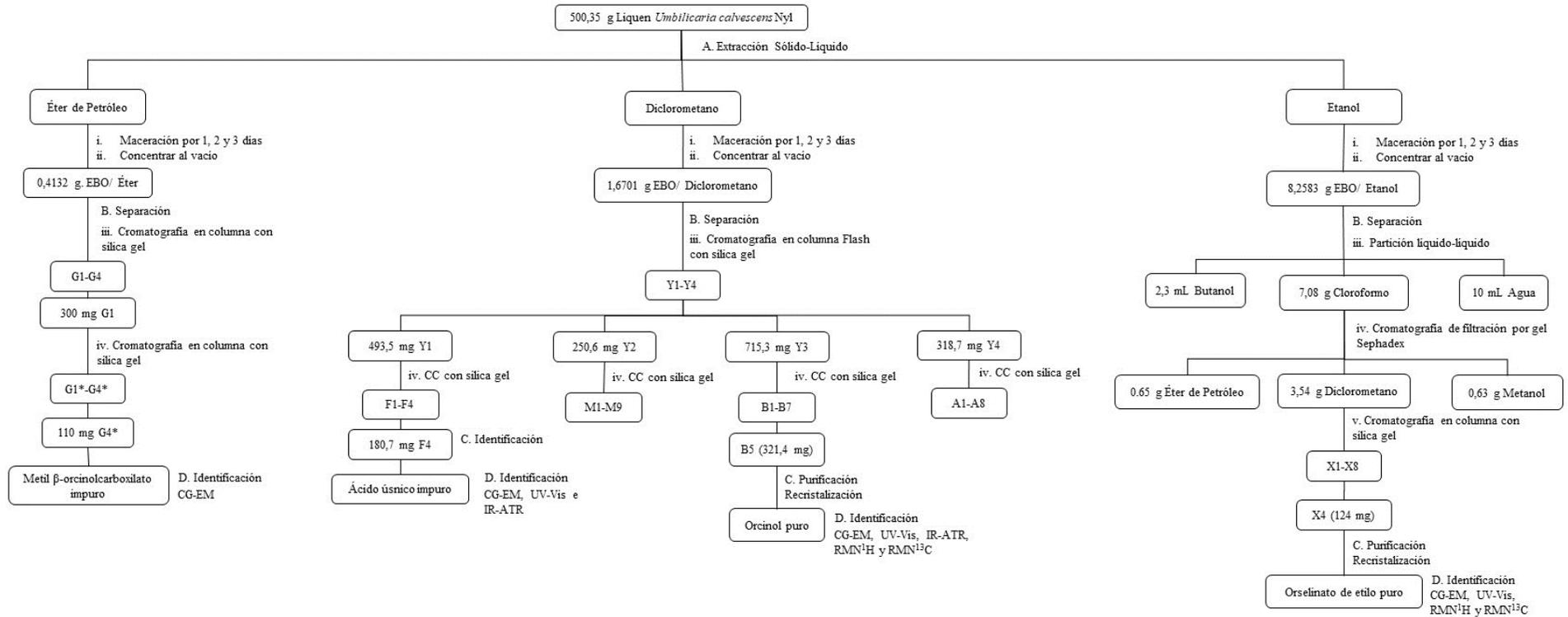
(\*) Convención: Abundante (+++), regular (++) , poco (+), negativo(-)

#### RESUMEN DE RESULTADOS:

**CONTIENE:** Aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos libres, taninos y triterpenos y/o esteroides.

**NO CONTIENE:** Flavonoides, quinonas, alcaloides, leucoantocianidas, catequinas y saponinas.

## Anexo 4 Metodología



Nota: Todos los extractos han sido analizados por CG-EM, pero los que han sido trabajados por CC sílica gel son aquellos que presentan algún metabolito secundario, ya que en su mayoría los extractos analizados presentan ácidos grasos.

## Anexo 5

### Ácidos grasos

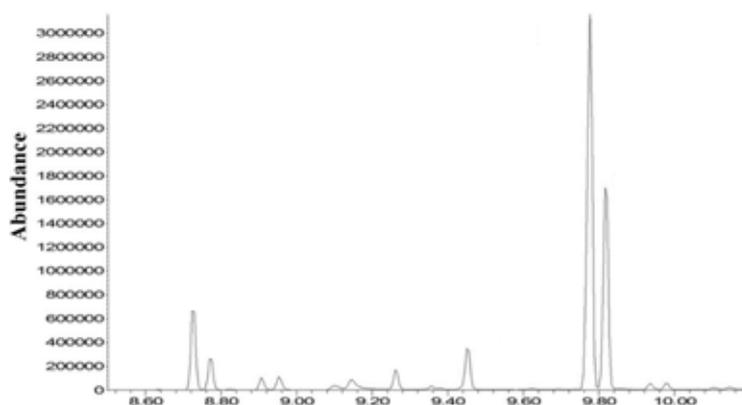
Los lípidos son una clase de nutrientes compuestos principalmente de átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno; estos nutrientes que producen energía son hidrofóbicos en la naturaleza. Nutricionalmente, son una fuente importante de energía ( $9 \text{ kcal g}^{-1}$  o  $37 \text{ kJ g}^{-1}$ ) y transportan vitaminas solubles (A, D, E y K) en todo el cuerpo. Son fuentes igualmente importantes de ácidos grasos esenciales que el cuerpo no puede producir. Los ácidos grasos esenciales incluyen el ácido linoleico y el ácido alfa-linolénico y son necesarios para el crecimiento normal y el desarrollo más la función fisiológica de los sistemas corporales. Además, los lípidos mejoran los alimentos que comemos al proporcionar textura y consistencia, impartiendo sabor y contribuyendo a la sensación de saciedad después de comer. Los lípidos también son importantes funcionalmente en la preparación de muchos productos alimenticios. Pueden actuar como agentes ablandadores, ayudar en la aireación, transmitir sabores y colores, y suministrar un medio de calentamiento para la preparación de alimentos. Las grasas y los aceites están presentes de forma natural en muchos alimentos, como productos lácteos, carnes, aves, pescado y nueces, así como en productos horneados, margarinas, aderezos y salsas (Moghadasian & Shahidi, 2017) .

#### 1.1 1-Nonadeceno

1-Nonadeceno es un ácido graso de cadena larga que muestra actividad antituberculosa, así como la actividad antifúngica (Rukachaisirikul et al., 2004). (Rude et al., 2011) identificaron este ácido graso mediante la técnica instrumental CG- EM, obtuvieron el siguiente cromatograma ( $R_T=9,45 \text{ min}$ ) y el espectro de masas del 1-Nonadeceno identificado en *Jeotgalicoccus* sp.

**Figura 44**

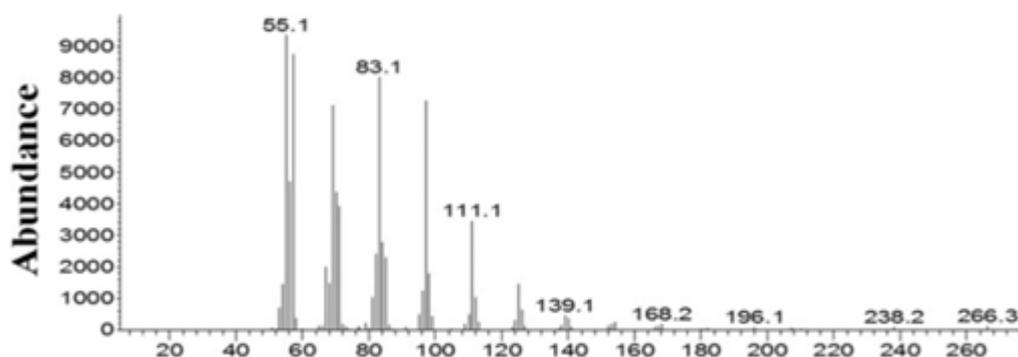
*Cromatograma de Jeotgalicoccus* sp.



*Nota:* Tomado de Rude et al., 2011, pág. 3.

**Figura 45**

*Espectro de masas del 1-nonadeceno identificado del Jeotgalicoccus sp.*



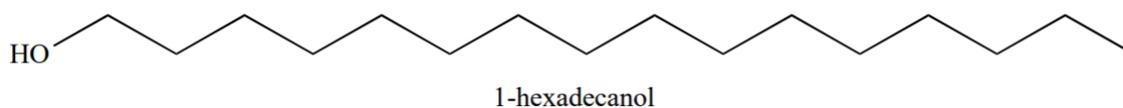
*Nota:* Tomado de Rude et al., 2011, pág. 3.

## 1.2 Alcohol cetílico

El alcohol cetílico, también llamado 1-hexadecanol o alcohol palmitílico, es un alcohol graso. (Tanaka et al., 2020) analizaron mediante GC- MS extractos de los medios de cultivo de las líneas celulares de cáncer de mama, uno de los componentes identificados fue el 1-hexadecanol, el cual esta denotado como P1. Además, (Jiang et al., 2007) caracterizó el 1-hexadecanol usando la técnica  $^1\text{H}$  NMR.

**Figura 46**

*Estructura química del 1-hexadecanol.*

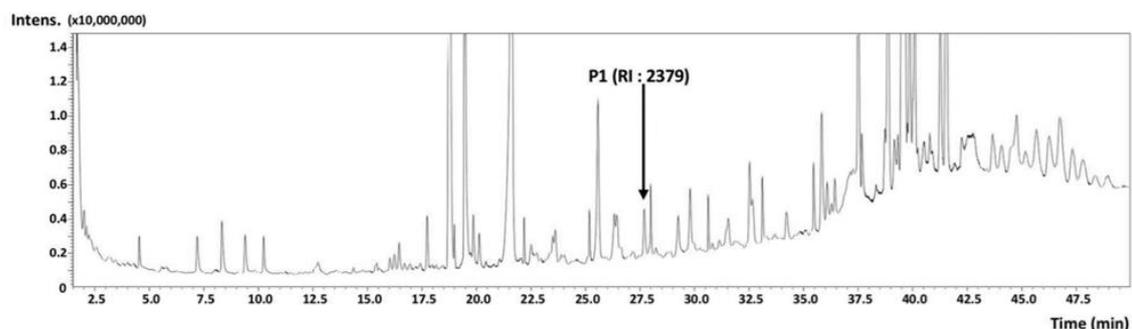


*Nota:* Tomado de Jiang et al., 2007, pág. 2.

### 1.3 1-Heptacosanol

**Figura 47**

*Cromatograma del extracto de cultivo de las líneas celulares de cáncer de mama.*



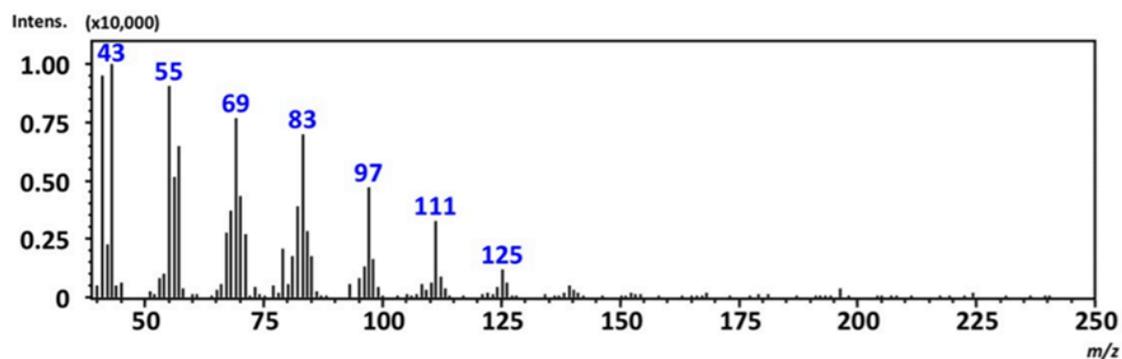
*Nota:* Tomado de Tanaka et al., 2020, pág. 7.

Es un alcohol primario graso, tiene propiedades anticancerígena, antioxidante, antimicrobiano y nematocida (Kalsum et al., 2016). (Méndez et al., 2003) identificaron el 1-heptacosanol usando la técnica de Espectrometría Infrarroja y Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas. Obtuvieron los siguientes datos el espectro de masas:

1-heptacosanol: 453 (100 %), 437, 125, 103, 83, 75 (40 %), 57 y 43 .

**Figura 48**

*Espectro de masas del 1-hexadecanol identificado del extracto de medios de cultivo de las líneas celulares de cáncer de mama.*

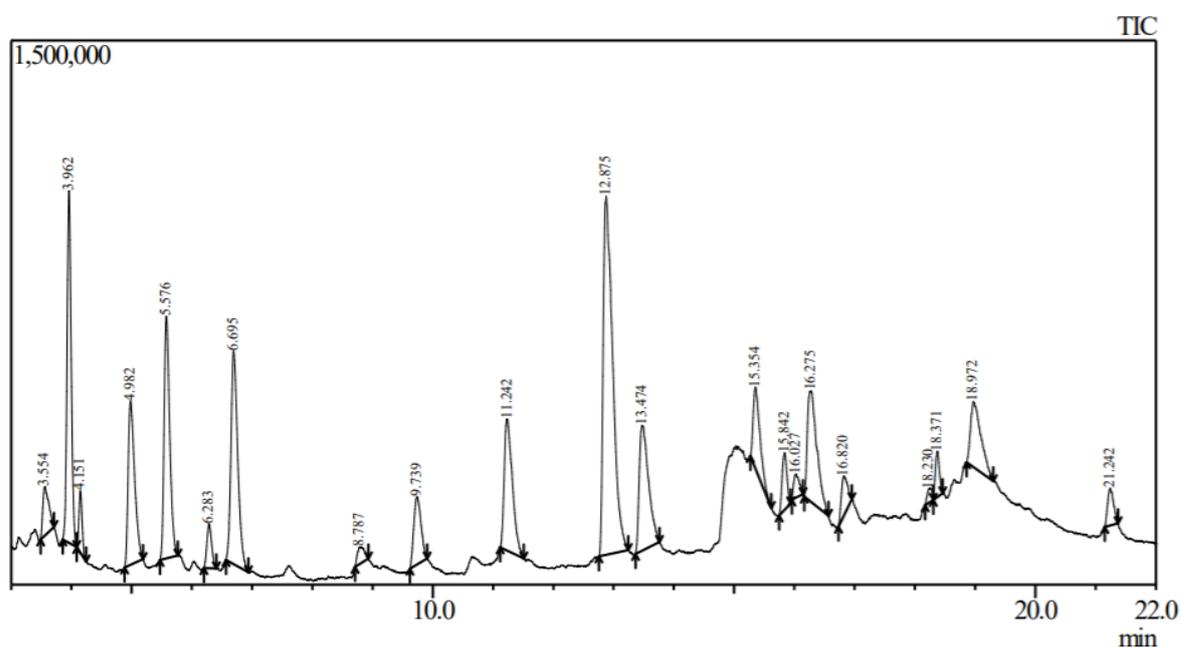


*Nota:* Tomado de Rude et al., 2011, pág. 3.

## Anexo 6

### Resultados obtenidos de CG-EM para la muestra G4\*

Peak#	R.Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	3.554	864881	1.76	126531	2.07	Benzoic acid, 2,4-dihydroxy-3,6-dimethyl-, methyl est
2	3.962	4366191	8.88	906162	14.86	1-Nonadecene
3	4.151	582112	1.18	159282	2.61	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-
4	4.982	3149085	6.40	420411	6.89	1-Hexadecanol
5	5.576	4010276	8.15	623392	10.22	Hexadecanoic acid, methyl ester
6	6.283	620168	1.26	113843	1.87	Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-he
7	6.695	4276746	8.70	548044	8.98	1-Nonadecene
8	8.787	345737	0.70	44311	0.73	n-Nonadecanol-1
9	9.739	1449314	2.95	174425	2.86	Methyl stearate
10	11.242	3184585	6.47	338503	5.55	1-Heptacosanol
11	12.875	10198704	20.74	922622	15.12	Tributyl acetylcitrate
12	13.474	3448383	7.01	322096	5.28	Oxiraneoctanoic acid, 3-octyl-, methyl ester, cis-
13	15.354	1633077	3.32	209544	3.44	1-Heptacosanol
14	15.842	815188	1.66	146702	2.40	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-
15	16.027	393567	0.80	61087	1.00	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-met
16	16.275	3102915	6.31	286239	4.69	9,12-Octadecadienoyl chloride, (Z,Z)-
17	16.820	727747	1.48	102820	1.69	9,12-Octadecadienoyl chloride, (Z,Z)-
18	18.230	204498	0.42	35017	0.57	Bis(2-ethylhexyl) phthalate
19	18.371	587129	1.19	117922	1.93	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-
20	18.972	2045026	4.16	169333	2.78	1-Heptacosanol
21	21.242	649574	1.32	95963	1.57	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-
22	22.415	2527919	5.14	175758	2.88	1,4-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester
		49182822	100.00	6100007	100.00	

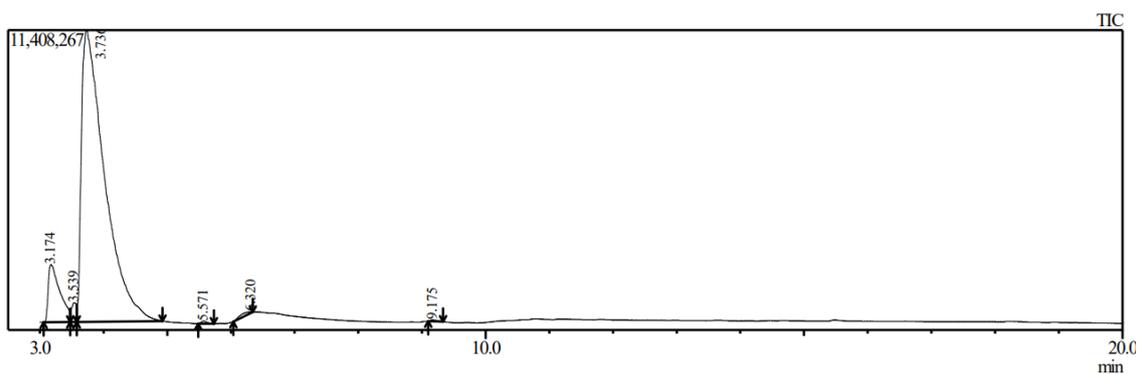


## Anexo 7

### Resultados obtenidos de CG-EM para la muestra X4

Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	3.174	28013691	8.91	2192460	15.41	Benzoic acid, 2,4-dihydroxy-6-methyl-, meth
2	3.539	3994582	1.27	735277	5.17	Benzoic acid, 2,4-dihydroxy-3,6-dimethyl-, r
3	3.736	280090652	89.04	11095096	78.00	Ethyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate
4	5.571	602255	0.19	95661	0.67	Hexadecanoic acid, methyl ester
5	6.320	1421029	0.45	43674	0.31	n-Hexadecanoic acid
6	9.175	425742	0.14	51807	0.36	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-
7	59.588	9872	0.00	10956	0.08	Stannane, (1-methylethyl)tris(phenylmethyl)-
		314557823	100.00	14224931	100.00	

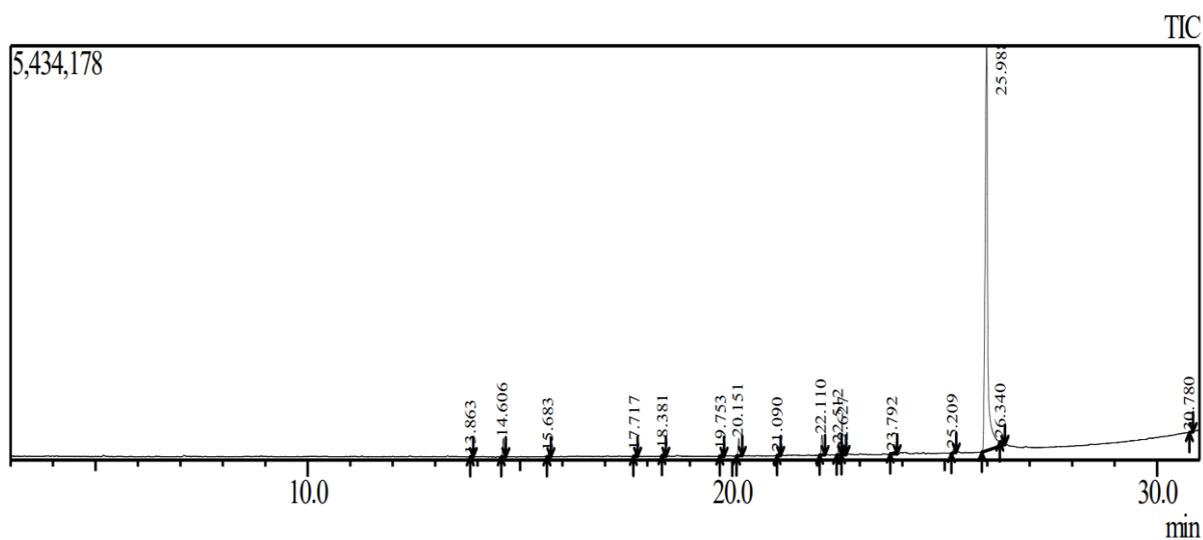


## Anexo 8

### Resultados obtenidos de CG-EM para la muestra F4

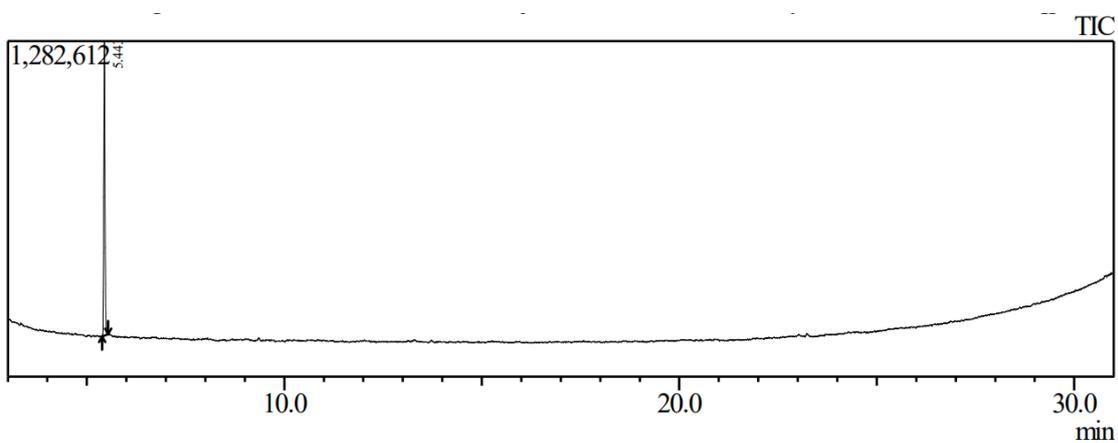
Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area%	Height%	Name
1	13.863	0.16	0.29	Tetradecyl trifluoroacetate
2	14.606	1.96	3.61	Hexadecanoic acid, methyl ester
3	15.683	0.50	0.85	Hexadecanoic acid, ethyl ester
4	17.717	0.59	1.06	Methyl stearate
5	18.381	0.72	1.36	Decanedioic acid, dibutyl ester
6	19.753	0.67	1.23	Tributyl acetylacrylate
7	20.151	2.10	3.40	Oxiraneoctanoic acid, 3-octyl-, methyl ester,
8	21.090	0.31	0.53	9-Octadecenamide, (Z)-
9	22.110	2.29	3.87	9,12-Octadecadienoyl chloride, (Z,Z)-
10	22.512	1.26	2.09	8,11,14-Docosatrienoic acid, methyl ester
11	22.627	0.41	0.63	Octadecanoic acid, 9,10-dihydroxy-, methyl e
12	23.792	0.61	0.43	Cinchonidine
13	25.209	0.51	0.69	2,4-Pentanedione, 1-(7-acetyl-4,6-dihydroxy-
14	25.988	87.38	79.12	Usnic acid
15	26.340	0.45	0.72	13-Docosenamide, (Z)-
16	30.780	0.08	0.12	trisiloxane, 1,1,1,5,5,5-hexamethyl-3-[(trimet
		100.00	100.00	



## Anexo 9

### Resultados obtenidos de CG-EM para la muestra B5 puro

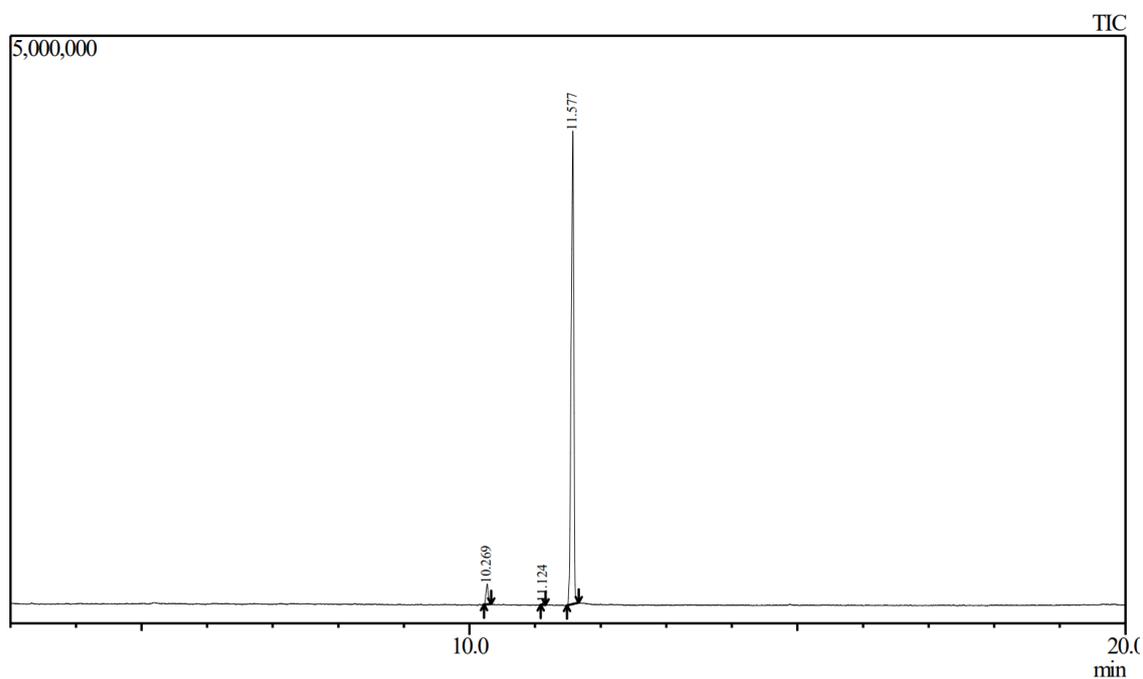


Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area%	Height%	A/H	Name
1	5.443	100.00	100.00	2.22	Orcinol
		100.00	100.00		

## Anexo 10

### Resultados obtenidos de CG-EM para la muestra X4 puro



Peak#	R.Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	10.269	409362	3.47	173998	4.13	Benzoic acid, 2,4-dihydroxy-6-methyl-, methyl ester
2	11.124	40683	0.35	17841	0.42	Benzoic acid, 2,4-dihydroxy-3,6-dimethyl-, methyl ester
3	11.577	11339601	96.18	4024425	95.45	Ethyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate
		11789646	100.00	4216264	100.00	

# Anexo 11

## Normas de seguridad en el laboratorio

### 1.1 Instrucciones generales

Según el Manual de seguridad de laboratorio de la (Universidad Nacional de Ingeniería, 2019) se debe tener en cuenta las siguientes instrucciones generales.

Los laboratorios deberán de disponer de:

- ❖ Pisos lisos e impermeables con un declive suficiente para asear desde sectores limpios hacia sectores sucios.
- ❖ Paredes lisas e impermeables con uniones cóncavas entre pared - piso, pared-techo y pared - pared.
- ❖ Puertas que giren en un sólo sentido para evitar accidentes de personas que transportan materiales, cualquiera sea su naturaleza. Deben estar dotadas en su parte superior de un vidrio (mirilla) que permita visualizar a través de él, si se aproxima una persona.
- ❖ Ventanas que permitan una adecuada iluminación natural, de manera que se facilite la observación y el trabajo en general.
- ❖ Situar los tableros eléctricos fuera de las áreas de trabajo, en un lugar de fácil acceso y visible para el personal.
- ❖ Sectorizar la red eléctrica de acuerdo con el nivel de consumo, con indicación de la carga máxima tolerable, para evitar sobrecargas del sistema.
- ❖ No utilizar el mismo enchufe o terminal eléctrico para equipos que funcionan en forma continua (estufa) y discontinua (refrigerador).
- ❖ Los enchufes no deberán estar cerca de fuentes de agua o gas.
- ❖ Todos los enchufes deben contar con una conexión a tierra.
- ❖ Situar los equipos eléctricos fuera del área en que se utilizan reactivos corrosivos.
- ❖ Proteger luminarias e interruptores.

Además, se debe seguir las normas de conducta:

- ❖ Está prohibido comer y/o en el laboratorio, ya que los alimentos o bebidas pueden contaminarse por productos químicos o biológicos.
- ❖ Está prohibido guardar alimentos y/o bebidas en los frigoríficos del laboratorio.
- ❖ Se debe mantener abrochadas las batas/mandiles, vestidos, camisas, etc.
- ❖ Se debe llevar el pelo recogido.
- ❖ Todo laboratorista se debe quitar la bata al salir de cada laboratorio.
- ❖ Está prohibido el uso de lentes de contacto durante la manipulación de productos químicos o biológicos con riesgo. En caso de accidente, los productos químicos o sus vapores pueden provocar lesiones en los ojos e impedir retirar las lentes. Un

agente biológico puede permanecer un tiempo prolongado entre la córnea y el ojo aumentando el riesgo de infección. Se debe usar gafas de protección superpuestas a las habituales (cubre gafas).

- ❖ Todo laboratorista debe llevar el calzado adecuado (cerrado) para evitar el contacto accidental con productos químicos.

## 1.2 Equipo de protección personal

Según el manual de normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados- CONICYT (Leisewitz, 2018), el laboratorio debe establecer la simbología a utilizar con sus necesidades y los procedimientos de seguridad y bioseguridad establecidos. En general, los accesos a las diferentes dependencias del laboratorio deben contar con señales establecidas, tales como se muestra en la Figura 49.

**Figura 49**

*Señalizaciones usadas en los laboratorios.*



Además, el Manual de seguridad de laboratorio de la (Universidad Nacional de Ingeniería, 2019) nos menciona los equipos de protección personal (EPP) que debe usar cada laboratorista.

### **1.2.1 Protección de las manos**

Los guantes protectores se deben utilizar:

- ❖ Para la manipulación de sustancias corrosivas, irritantes, de elevada toxicidad o de elevado poder de penetración en la piel. Hay que tener especial cuidado cuando se da la posibilidad de contacto con productos tóxicos o material biológico a través de las heridas por cortes.
- ❖ Para la manipulación de elementos calientes o fríos.
- ❖ Para manipular objetos de vidrio cuando hay peligro de rotura o corte.
- ❖ Para la manipulación de agentes biológicos.

### **1.2.2 Protección de los ojos**

- ❖ Se debe utilizar gafas de protección cuando hay riesgo de salpicaduras, proyección o explosión (ya sea por riesgo químico, biológico o radioactivo).
- ❖ Se prohíbe el uso de lentes de contacto en el laboratorio. Si no se puede prescindir de ellas, se deben utilizar gafas de seguridad cerradas o utilizar un cubre gafas sobre las gafas graduadas.

### **1.2.3 Protección de las vías respiratorias**

La protección de las vías respiratorias se deberá utilizar siempre que no sea posible trabajar en vitrina de gases con productos que sean tóxicos o nocivos por inhalación, cuando se puedan generar aerosoles, nieblas o polvo en el ambiente por productos químicos o cuando se utilicen agentes biológicos de riesgo o se puedan generar aerosoles de estos. La protección será siempre adecuada al producto químico utilizado o al agente biológico. En ese caso, usaremos las mascarillas: contra polvo, contra aerosoles y contra productos químicos específicos.

### **1.2.4 Protección para la vista**

Cuando se trabaje con productos químicos, especialmente si son corrosivos, o se confeccione material de vidrio se deberá trabajar con lentes de policarbonato.

### **1.2.5 Protección para los oídos**

- ❖ En caso de ruidos producidos por equipos y/o campanas de extracción, que sobrepasen los 85 decibeles.
- ❖ No se considera protección auditiva los tapones auditivos por ser inefectivos.

### **1.2.6 Protección del cuerpo**

- ❖ En los laboratorios como norma general para la protección del cuerpo, se utilizará la bata, que deberá ir correctamente cerrada. Es aconsejable que disponga de

puños elásticos en las mangas para evitar accidentes y traslado de contaminación de un punto a otro.

- ❖ Al entrar en el laboratorio se pondrá la bata y se la quitará al abandonarlo. Está prohibido acceder a zonas de uso común del resto de usuarios del edificio, con la prenda de vestir que se ha utilizado para protegerse en el laboratorio. Está prohibido entrar con bata a las cafeterías y comedores universitarios. En el caso de los alumnos se recomienda introducirla en una bolsa de plástico al salir del laboratorio.

### **1.3 Equipos de protección colectiva y equipos para emergencias**

#### **1.3.1 Equipos de protección colectiva: campanas extractoras y vitrinas de gases**

Las campanas extractoras y las vitrinas de gases, gracias a su velocidad de aspiración, capturan las emisiones en forma de gas, nieblas, etc. generadas por las sustancias químicas en su interior. En general, es aconsejable realizar todos los experimentos químicos de laboratorio en una vitrina de gases, ya que, aunque se puedan predecir las reacciones o la emisión, siempre se pueden producir sorpresas y las paredes de la campana y su frente actuarán de medio de contención. Se debe utilizar las vitrinas de gases siempre que los productos químicos sean nocivos, tóxicos o muy tóxicos o puedan emanar vapores corrosivos. La superficie de trabajo debe mantenerse limpia y no se debe utilizar la campana como almacén de productos químicos.

#### **1.3.2 Equipos para emergencia**

##### **a. Lavaojos**

Los lavaojos permiten la descontaminación rápida y eficaz de los ojos afectados por una salpicadura de un producto peligroso. Deben lavarse los ojos y parpados durante al menos 15 minutos, asegurándose un barrido por todo el ojo. Se debe forzar la apertura de los parpados para asegurar el lavado detrás de ellos.

##### **b. Duchas de seguridad**

Sistema de emergencia eficaz cuando se producen salpicaduras o derrames de sustancias químicas sobre la piel o la ropa. Las duchas deben proporcionar el suficiente caudal para empapar completamente a la persona. Debe tener un sistema para abrir el paso del agua que sea fácil y rápido. Se deben quitar la ropa contaminada y zapatos mientras se está debajo de la ducha.

## Anexo 12

### Manipulación De Desechos Químicos En El Laboratorio

(Leisewitz, 2018) recomienda que el personal del laboratorio clasifique los residuos químicos que se generen en las diferentes áreas de trabajo para una adecuada manipulación, almacenamiento y disposición dentro del laboratorio y en las zonas de acopio, así también como su eliminación final. Los residuos pueden clasificarse de acuerdo a las características de peligrosidad como se muestra en la siguiente Tabla.

**Tabla 13**

*Clasificación según las características de peligrosidad de los residuos químicos.*

<b>Tipo de residuos químico</b>	<b>Compuesto químico</b>
Residuos inflamables	Orgánicos no halogenados, Orgánicos no halogenados aromáticos y fenoles, líquidos orgánicos con metales pesados y sólidos orgánicos.
Residuos corrosivos	Ácidos sin sulfuros, cianuros, y metales pesados, ácidos orgánicos, bases sin sulfuros, cianuros y metales pesados, y bases orgánicas
Residuos tóxicos	Orgánicos halogenados, líquidos inorgánicos con metales, ácidos y bases con metales pesados.
Residuos reactivos	Sólidos inorgánicos, ácidos y bases con sulfuros y cianuros.

*Nota:* Adaptado de Andrea Leisewitz, 2018, pág. 123.

Si los residuos no presentan ninguna de las características mencionadas en la Tabla 13 es considerado como residuo no peligroso y puede ser evacuado en el alcantarillado, excepto si presenta alguna de estas características:

- ❖ Residuos que contengan sólidos precipitables mayores a 7,0 mg L<sup>-1</sup>.
- ❖ Residuos que contengan grasas o aceites en concentraciones mayores a 100 mg L<sup>-1</sup>.
- ❖ Residuos que contengan metales o cianuro mayores a 100 mg L<sup>-1</sup>.
- ❖ Residuos insolubles en agua.

Si se desconoce la composición de la sustancia, ante la duda lo más conveniente es clasificarlo como residuo peligroso, informando esta condición en el rótulo que identifique al contenedor de residuos químicos.

### **1.1 Almacenamiento transitorio de residuos químicos en el laboratorio**

Es recomendable que el laboratorio establezca y demarque una zona de residuos químicos en tránsito acorde a la cantidad de residuos generados, la cual debe cumplir con las siguientes características:

- ❖ No situarse en áreas de tránsito o vías de evacuación.
- ❖ Ser de fácil limpieza.
- ❖ Con adecuada ventilación (libre de humedad excesiva).
- ❖ Ser de superficie lisa.
- ❖ No colocar un contenedor sobre otro.

Los residuos deberían ser almacenados en contenedores de acuerdo a las recomendaciones que se detallan a continuación y marcados con la etiqueta correspondiente según los criterios, además debemos tener en cuenta lo siguiente:

- ❖ Residuos líquidos: usar envases de 2,5 a 10 L de capacidad sin exceder los 30 kg, por seguridad al transportarlo.
- ❖ Residuos sólidos: usar envases de boca ancha de 4,5 a 20 kg de capacidad sin exceder los 30 kg de peso.