

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

ESCUELA DE POSGRADO



**ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL
LIQUEN *Stereocaulon glareosum (Sav.) H. Magn.***

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA

AUTOR

Erika Lizet Milagros Calla Quispe

ASESOR

Dra. Juana Rosa María Robles Caycho

Junio, 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al gobierno peruano que a través de CIENCIACTIVA del CONCYTEC con el convenio 231-2015 FONDECYT me fue otorgada una beca de posgrado para estudios de Maestría en Química, para poder desarrollar investigación básica y aplicada en el Perú. Asimismo, a la Pontificia Universidad Católica del Perú por acogerme en sus aulas durante los estudios de maestría, donde los profesores y el personal de la Sección Química me brindaron los conocimientos y herramientas necesarias para llevar a cabo un buen desempeño en la investigación.

A mi profesora y asesora, Dra. Juana Robles Caycho, por su constante asesoría, apoyo y guía durante el desarrollo de esta investigación.

Al estimado Dr. Nino Castro, por el constante apoyo y consejos brindados durante el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Carlos Areche, por su apoyo e interés mostrado durante la estancia que realicé en su "Laboratorio de Productos Naturales Extremos" de la Universidad de Chile, Chile, que gracias a sus conocimientos, consejos y soportes brindados pude complementar los estudios realizados en Lima, y permitir el desarrollo de esta investigación. Asimismo, agradecerle por los espectros de RMN-¹H que se pudieron obtener de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

Al Dr. Jorgue Borques y al Qco. Ruben Muñoz, por la orientación y apoyo brindado durante la estancia en el "Laboratorio de Productos Naturales" de la Universidad de Antofagasta, Chile, donde se realizó una parte del presente trabajo de investigación.

Al Quim. Moraima Molina Saez, por el apoyo y conocimiento brindado para la realización de los análisis de ácidos grasos.

Al Bgo. Ángel Ramirez, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por la identificación de la muestra liquénica.

Al Decimotercer encuentro del grupo latinoamericano de Liquenólogos en conjunto con el Primer Congreso Nacional de Liquenología del Perú por la media beca brindada para participar en el GLAL XIII-Iquique-Chile.

De manera muy particular, agradezco el apoyo brindado por mi familia, sobretodo mis madres Luzmila y Nelly por sus palabras de apoyo y enseñarme a siempre ser perseverante.

A mis queridos amigos "EscandalOSOS" Miki, Alonso y Miguel, quienes me han brindado su apoyo, consejos y compañía durante la realización de mi trabajo de investigación.

Son muchas las personas que me han ayudado durante el proceso de mi trabajo, a todos ellos mi aprecio y agradecimiento por su compromiso y su apoyo incondicional.

DEDICATORIA



A mis madres Luzmila y Nelly
por su esfuerzo y apoyo incondicional.

RESUMEN

Una fuente potencial de compuestos biológicamente activos son los líquenes, debido a que producen más de 800 metabolitos secundarios exclusivos de ellos. Dentro de su diversidad podemos mencionar al género *Stereocaulon*, el cual está distribuido alrededor del mundo y se cuenta con aproximadamente 130 especies. El *Stereocaulon glareosum* presenta un talo dimórfico, en su mayoría crecen en regiones montañosas. Se han realizado estudios de esta especie enfocados al tema botánico y relaciones filogenéticas del género *Stereocaulon*; sin embargo, no se ha reportado ningún estudio científico acerca de la composición química de esta especie. En el presente trabajo se realiza el estudio químico del extracto metanólico del líquen *Stereocaulon glareosum* (Sav.) H. Magn., recolectado en el Departamento de Junín, Provincia de Huancayo, camino al Nevado de Huaytapallana. El estudio comienza con el análisis cualitativo para determinar metabolitos y compuestos liquénicos presentes. Asimismo, se realiza el perfil metabolómico del extracto metanólico del líquen en modo negativo mediante UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS, de este modo se identifican por primera vez 36 compuestos entre aromáticos, dépsidos, depsidonas, difeniléteres, dibenzofuranos, lípidos y polioles y otros 12 se proponen en base a sus espectros característicos UV-vis y ESI-MS-MS. Además, se identifican 16 ácidos grasos como metilésteres mediante el uso de GC-FID al comparar los tiempos de retención obtenidos de los estándares. Por otro lado, el estudio químico permite aislar 9 compuestos, que se someten a procesos de separación y purificación por cromatografía en columna y/o cristalización. Estos son haematomato de metilo, ácido 2,4-dimetoxi-6-pentilbenzoico, ácido 2,4-dimetoxi-6-propilbenzoico, β -orcinol carboxilato de metilo, orselinato de metilo, atranorina, ácido lobárico, brasicasterol y ácido glucónico; cuyas estructuras se determinan en base a análisis espectroscópicos en comparación con referencias citadas. Finalmente, se realiza el análisis cuantitativo de ácido úsnico mediante la técnica de espectrofotometría UV-Visible, que evidencia un contenido de 0,52 % de (+)-ácido úsnico.

Palabras claves: *Stereocaulon glareosum*, UHPLC-MS-MS y FAMES.

ABSTRACT

Lichens are a potential source of bioactive substances because they produce more than 800 substances unique to them. According to its diversity, we can mention the genus *Stereocaulon*, which is widely distributed around the world and comprises approximately 130 species. For instance, *Stereocaulon glareosum* presents a dimorphic thallus, it is mostly grown in mountainous regions. Some biological studies of *S. glareosum* have been reported previously; however, no scientific study of the chemical composition of this species has not been reported. The aim of this work is to perform the chemical study of the methanolic extract from the lichen *Stereocaulon glareosum* (Sav.) H. Magn. Its specimen was collected in the Department of Junín, Province of Huancayo, on the way to “Nevado de Huaytapallana”. The study begins with the qualitative analysis to determine metabolites and lichenic substances. To the best of our knowledge, this is the first time that forty-eight compounds are detected in the methanolic extract using UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS in mode negative. Thirty-six compounds identified were mainly aromatics, depsides, depsidones, diphenyl ethers, dibenzofurans, lipids and polyols and another twelve are proposed based on their UV-vis and ESI-MS-MS spectrums. In addition, sixteen fatty acids are identified as methyl esters by the use of GC-FID when comparing the retention times obtained from the standards. On the other hand, the chemical study allows isolating nine compounds, which are subjected to separation and purification processes by column chromatography and/or crystallization. These compounds are methyl haematomate, 2,4-dimethoxy-6-pentylbenzoic acid, 2,4-dimethoxy-6-propylbenzoic acid, methyl- β -orcinol carboxylate, methyl orsellinate, atranorin, lobaric acid, brassicasterol and gluconic acid; whose structures are determined based on the spectroscopic analysis in comparison with reported studies. Finally, the quantitative analysis of usnic acid using the UV-Vis spectrophotometry evidences a content of 0.52 % of (+) - usnic acid.

Keywords: *Stereocaulon glareosum*, UHPLC-MS-MS and FAMES.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Formulación del problema de investigación	20
1.2. Objetivos.....	20
1.2.1. Objetivo general	20
1.2.2. Objetivos específicos.....	20
2. MARCO TEÓRICO.....	22
2.1. Líquenes	22
2.1.1. Importancia de los líquenes	24
2.1.2. Biosíntesis.....	26
2.1.3. Identificación de compuestos liquénicos.....	31
2.2. Liquenología del género <i>Stereocaulon</i>	32
2.2.1. Distribución y hábitat	32
2.2.2. Etnoliquenología.....	33
2.2.3. Liquenoquímica	34
2.2.4. Actividad biológica.....	48
2.2.5. <i>Stereocaulon glareosum</i> (Sav.) H. Magn.....	50
2.3. Técnicas de separación, identificación y cuantificación.....	51
2.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés).....	51
2.3.2. Cromatografía en columna (CC).....	51
2.3.3. Cromatotrón	52
2.3.4. Cromatografía de gases (GC)	53

2.3.5. Ultra cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un espectrofotómetro ESI- MS/MS (UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS)	53
2.3.6. Espectrometría por absorción molecular UV-Visible	55
3. METODOLOGÍA	58
3.1. Reactivos, materiales y equipos.....	58
3.1.1. Reactivos	58
3.1.2. Equipos	58
3.2. Recolecta e identificación del material liquénico	59
3.3. Secado y molienda del material liquénico	59
3.4. Análisis cualitativo.....	61
3.4.1. Análisis preliminar	61
3.4.2. Perfil metabolómico del liquen <i>S. glareosum</i> usando UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS	62
3.4.3. Análisis de ácidos grasos mediante cromatógrafo de gases (GC-FID)	64
3.5. Aislamiento: extracción, separación y purificación	65
3.5.1. Extracción	65
3.5.2. Análisis preliminar por cromatografía en capa fina (TLC)	66
3.5.3. Separación y purificación.....	66
3.6. Análisis cuantitativo de ácido úsnico	72
3.6.1. Procedimiento	72
3.6.2. Preparación de la muestra liquénica.....	72
3.6.3. Curva de calibración.....	72
3.6.4. Determinación cuantitativa de ácido úsnico en la muestra liquénica.....	73

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	73
4.1. Análisis cualitativo.....	73
4.2. Perfil metabolómico del liquen <i>S. glareosum</i> usando UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS.....	73
4.2.1. Compuestos aromáticos.....	80
4.2.2. Dépsidos	81
4.2.3. Depsidonas	81
4.2.4. Difeniléteres	83
4.2.5. Dibenzofuranos	85
4.2.6. Lípidos.....	86
4.2.7. Polioles.....	89
4.3. Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases (GC-FID).....	90
4.3.1. Preparación de la muestra líquénica.....	90
4.3.2. Identificación de ácidos grasos.....	91
4.4. Elucidación estructural de los compuestos aislados.....	93
4.4.1. Compuestos aromáticos.....	94
4.4.2. Dépsido.....	99
4.4.3. Depsidona	101
4.4.4. Esteroide	103
4.4.1. Poliol	105
4.5. Análisis cuantitativo de ácido úsnico.....	106
4.5.1. Preparación de la muestra líquénica.....	106
4.5.2. Curva de calibración.....	106

4.5.3. Determinación cuantitativa de ácido úsnico en la muestra líquénica.....	107
5. CONCLUSIONES	110
6. RECOMENDACIONES	112
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8. ANEXOS	120
8.1. Anexo 1: Determinación botánica del líquen <i>Stereocaulon glareosum (Sav.) H. Magn.</i>	120
8.2. Anexo 2: Ingreso del líquen <i>Stereocaulon glareosum (Sav.) H. Magn.</i> a la colección del Herbario San Marcos	121
8.3. Anexo 3: Reacciones de coloración para compuestos líquénicos	122
8.4. Anexo 4: Marcha fitoquímica.....	124
8.4.1. Obtención de las Fracciones	124
8.4.2. Pruebas de identificación de los principios activos	125
8.5. Anexo 5: Perfil metabólico.....	130
8.6. Anexo 6: Análisis de ácidos grasos mediante cromatógrafo de gases (GC-FID)	134
8.7. Anexo 7: Espectros RMN- ¹ H, RMN- ¹³ C e IR de los compuestos aislados.....	140
8.8. Anexo 8: Análisis cuantitativo de ácido úsnico	154
8.8.1. Espectro UV-visible de ácido úsnico.....	154
8.8.2. Validación de la curva de calibración.....	154
8.8.3. Incertidumbres de los coeficientes de regresión	155
8.8.4. Incertidumbre de la concentración de ác. úsnico en la muestra líquénica.....	157
8.8.5. Incertidumbre del porcentaje de ác. úsnico en la muestra líquénica	158

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grado centígrado
CC	Cromatografía en columna
cm	Centímetro
cm ⁻¹	Número de onda
CoA	Coenzima A
<i>d</i>	Duplete
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Extracto metanólico
ESI	Ionización por electroespray
FAMEs	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FID	Detector de ionización de llama
g	Gramo
GC	Cromatografía de gases
HCD	Disociación colisional de mayor energía
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRMS	Espectrómetro de masas de alta resolución
IR	Espectroscopía Infrarroja
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kV	Kilovoltio
L	Litro
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MAAs	Micosporina
MALDI	Desorción/ ionización mediante láser asistida por matriz
Me ₂ CO	Acetona
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
[M – H] ⁻	Composición elemental en modo negativo
MHz	Megahertz
min	Minuto

mL	Mililitro
mm	Milimetro
MS	Espectrómetro de masas
MS-MS o MS ²	Espectrometría de masas en tándem
mult.	Multiplicidad
N	Normalidad
nm	Nanómetro
OT	Orbitrap
PDA o DAD	Detector de arreglo de diodos
ppm	Partes por millón
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
Q	Cuadrupolo
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
rpm	Revolución por minuto
S.	<i>Stereocaulon</i>
s	Singulete
S.D.	Desviación estandar
<i>t</i>	Triplete
T amb	Temperatura ambiente
TLC	Thin layer chromatography
TOF	Tiempo de vuelo
tr	Tiempo de retención
% trans	Porcentaje de ácidos grasos transesterificados
UHPLC	Ultra cromatografía líquida de alta eficiencia
µm	Micrometro
UV	Ultravioleta
V	Volumen
Vis	Visible
λ _{max}	Longitud de onda máxima
δ	Desplazamiento químico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la formación de un líquen.....	22
Figura 2. Clasificación de líquenes de acuerdo a su sustrato.....	23
Figura 3. Clasificación de líquenes según su morfología.....	24
Figura 4. Rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios presentes en los líquenes	29
Figura 5. Distribución del género <i>Stereocaulon</i>	33
Figura 6. Características morfológicas del líquen <i>S. glareosum</i>	51
Figura 7. Cromatotrón	53
Figura 8. UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate RSLC 3000	54
Figura 9. Esquema de acoplamiento de HPLC-MS-MS.....	55
Figura 10. Rangos de absorción UV de clases de compuestos liquénicos.....	56
Figura 11. Lugar de recolección.	60
Figura 12. Líquen <i>Stereocaulon glareosum</i>	61
Figura 13. Proceso de reacciones de coloración para compuestos liquénicos	62
Figura 14. Diagrama de proceso de la marcha fitoquímica.....	63
Figura 15. Obtención del extracto metanólico.....	66
Figura 16. Proceso de separación y purificación del extracto metanólico EM.....	71
Figura 17. Estructuras químicas de los compuestos identificados mediante el UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS	79
Figura 18. a) Espectro MS del ión molecular $[M - H]^-$ de atranol. b) MS^2 . c) Propuesta de fragmentación	80

Figura 19. a) Espectro MS del ión molecular $[M - H]^-$ de atranorina. b) MS^2 . c) Propuesta de fragmentación	82
Figura 20. a) Espectro MS del ión molecular $[M - H]^-$ de ácido lobárico. b) MS^2 . c) Propuesta de fragmentación	84
Figura 21. a) Espectro MS del ión molecular $[M - H]^-$ de sakisacaulon esterificado. b) MS^2 . c) Propuesta de fragmentación.....	86
Figura 22. a) Espectro MS del ión molecular $[M - H]^-$ de ácido úsnico. b) MS^2 . c) Propuesta de fragmentación.. ..	87
Figura 23. a) Espectro MS del ión molecular $[M - H]^-$ de ácido pentahidroxidocosanoico. b) MS^2 . c) Propuesta de fragmentación.....	88
Figura 24. a) Espectro MS del ión molecular $[M - H]^-$ de arabitol. b) MS^2 . c) Propuesta de fragmentación	90
Figura 25. Estructura del compuesto 1	95
Figura 26 .Estructura de los compuestos 2 (izquierda) y 4 (derecha).....	97
Figura 27. Estructura del compuesto 6.....	98
Figura 28. Estructura del compuesto 8.....	99
Figura 29. Estructura del compuesto S1.....	100
Figura 30. Estructura del compuesto S3.....	103
Figura 31. Estructura del compuesto 9.....	105
Figura 32. Estructura del compuesto S2.....	106
Figura 33. Curva de calibración de la muestra patrón de ácido úsnico	107
Figura 34. Cromatograma UHPLC-ESI-MS-MS de <i>S. glareosum</i> en modo negativo	130
Figura 35. Propuestas de relaciones biosintéticas para los compuestos aromáticos	131
Figura 36. Propuesta de relación biosintética para las depsidonas	131

Figura 37. Propuesta de relación biosintética para los dépsidos, depsidonas y difeniéteres	132
Figura 38. Propuesta de relación biosintética para los dibenzofuranos	133
Figura 39. Propuesta de relación biosintética para los lípidos	133
Figura 40. Cromatograma GC-FID del estándar de metilésteres de ácidos grasos - FAMEs Mix (28 componentes)	134
Figura 41. Cromatograma GC-FID del extracto metanólico transesterificado	135
Figura 42. Curvas de calibración de los estándares de metilester- FAMEs MIX ...	138
Figura 43. Curvas de calibración de los estándares de metilester- FAMEs MIX ...	139
Figura 44. Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto 1	140
Figura 45. Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto 2	141
Figura 46. Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3	142
Figura 47 . Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto 4	143
Figura 48. Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto 6	144
Figura 49. Espectro RMN- ¹³ C (126 MHz, CDCl ₃) del compuesto 6	145
Figura 50. Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto 8	146
Figura 51. Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto S1	147
Figura 52. Espectro RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) del compuesto S3	148
Figura 53. Espectro RMN- ¹³ C (126 MHz, CDCl ₃) del compuesto S3	149
Figura 54. Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto 9	150
Figura 55. Espectro RMN- ¹³ C (126 MHz, CDCl ₃) del compuesto 9	151
Figura 56. Espectro RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) del compuesto S2	152
Figura 57. Espectro IR del compuesto S2	153

Figura 58.- Espectro UV-Visible de ácido úsnico..... 154

Figura 59. Gráfico de residuos 155



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de compuestos liquénicos de acuerdo a la ruta biosintética.	30
Tabla 2. Reacciones de coloración de algunos compuestos liquénicos.	32
Tabla 3. Uso del género <i>Stereocaulon</i> en medicina tradicional	33
Tabla 4. Compuestos reportados del genero <i>Stereocaulon</i> .	34
Tabla 5. Absorbancias máximas del espectro UV-vis del ácido úsnico.	48
Tabla 6. Contenido de ácido úsnico en dos especies del genero <i>Stereocaulon</i> .	48
Tabla 7. Compuestos liquénicos bioactivos presentes en especies del género <i>Stereocaulon</i> .	49
Tabla 8. Actividades biológicas de diferentes extractos en especies del género <i>Stereocaulon</i> .	50
Tabla 9. Absorciones de algunos compuestos liquénicos.	57
Tabla 10. Condiciones instrumentales del UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS	64
Tabla 11 . Condiciones instrumentales del GC-FID	65
Tabla 12. Fraccionamiento primario de EM	67
Tabla 13. Identificación de metabolitos en <i>Stereocaluon glareosum</i> mediante la técnica UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS	74
Tabla 14. Masas de los extractos metanólicos y porcentajes de transesterificación.	90
Tabla 15. Metilésteres de ácidos grasos identificados en la muestra liquénica.	91
Tabla 16. Composición de ácidos grasos como metilésteres en diferentes especies de <i>Stereocaulon</i> .	93
Tabla 17. Compuestos obtenidos del liquen <i>S. glareosum</i>	94
Tabla 18. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN- ¹ H del compuesto 1	94

Tabla 19. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN- ¹ H del compuesto 2.....	96
Tabla 20. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN- ¹ H del compuesto 4.....	96
Tabla 21. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto 6	98
Tabla 22. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN- ¹ H del compuesto 8.....	99
Tabla 23. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN- ¹ H del compuesto S1	100
Tabla 24. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto S3	102
Tabla 25. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto 9	104
Tabla 26. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN- ¹ H del compuesto S2	105
Tabla 27. Masas de la muestra líquénica	106
Tabla 28. Absorbancias máximas del espectro UV-Visible del ácido úsnico.....	107
Tabla 29. Datos de absorbancias obtenidas para cada estándar	107
Tabla 30. Datos de absorbancias obtenidas a diferentes diluciones para cada muestra.....	108
Tabla 31. Porcentaje de ácido úsnico en la muestra líquénica.	108
Tabla 32. Resultado de las reacciones de coloración del líquen <i>Stereocaulon glareosum</i>	123
Tabla 33. Resultado de la marcha fitoquímica del líquen <i>Stereocaulon glareosum</i>	129
Tabla 34. Tiempo de retención de los estándares metilésteres de ácidos grasos - FAMES MIX (28 componentes) a diferentes concentraciones.	136
Tabla 35. Área bajo la curva de los estándares metilésteres de ácidos grasos - FAMES MIX (28 componentes).....	137
Tabla 36. Absorbancia predicha y residual para los datos de la Tabla 29.	155

Tabla 37. Datos de las desviaciones estándar	156
Tabla 38. Datos de los límites de confianza de los coeficientes de regresión.....	157
Tabla 39. Límites de confianza al 95 % de las concentraciones promedio de cada muestra	158
Tabla 40. Errores de medidas del equipo y materiales	158
Tabla 41. Incertidumbre del porcentaje de ác. úsnico en la muestra líquénica.	159



1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el área de productos naturales ha alcanzado un gran desarrollo debido a los estudios multidisciplinarios entre los campos de la medicina, biología y química, que además se pueden llevar a escala industrial. Así el área de los productos naturales le da crecimiento a la industria farmacéutica, a través de la obtención de moléculas farmacológicamente activas provenientes de especies como bacterias, plantas, hongos, algas, líquenes, entre otros (1,2).

Una fuente potencial de compuestos biológicamente activos son los líquenes, debido a que producen más de 800 metabolitos secundarios exclusivos de ellos (3,4).

En la actualidad se han identificado alrededor de 18900 especies de líquenes ubicados en regiones desérticas, trópicos, bosques, zonas polares e incluso en el mar. El interés en el estudio químico y biológico de los extractos y sus compuestos liquénicos se debe a sus diversas aplicaciones entre las que se destacan como bio-indicadores de contaminación ambiental, debido a que tienen mecanismos muy eficientes para absorber el agua y los nutrientes de la atmósfera a través de toda su superficie, por ello, si el medio está contaminado el liquen absorberá los contaminantes junto con los nutrientes y los acumulará en su interior (5,6). Otra aplicación es en usos medicinales, debido a sus actividades biológicas tales como antibióticos, antioxidantes, antimicobacterianos, antivirales, analgésicos y antipiréticas (7).

Dentro de la diversidad de los líquenes podemos mencionar al género *Stereocaulon*, el cual está distribuido alrededor del mundo, como en Perú (8), Chile, Colombia, Venezuela (9), Indonesia (10), Japón (11), Antártica (12), entre otros y se cuenta con aproximadamente 130 especies (10). Estos líquenes presentan una gran plasticidad en sus estructuras morfológicas y anatómicas. Algunos de ellos son utilizados en medicina tradicional como antihemorrágicos, antihipertensivos, antidiabéticos y antiulcerosos (10). Asimismo, se reportan compuestos liquénicos en la mayoría de las especies de este género, los cuales presentan diversas actividades biológicas como en el caso del haematoma de metilo (actividad antioxidante, neuroprotector y efecto citoprotector (13)); atranorina (actividad gastroprotectora (12), antioxidante(10) y efecto citoprotector (13,14)); β -orcinol carboxilato de metilo (actividad antimicrobial (15)) y ácido lobárico (actividad antioxidante(10), antimitótica (11), inhibidora frente a la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) (16), gastroprotectora (12) y fotoprotectora (17), antiproliferativa (18), inhibidora en el metabolismo araquidonato(19)).

1.1. Formulación del problema de investigación

Se han reportado alrededor de 1800 especies para la liquenobiota en el Perú (20), sin embargo, pese a que es un país que cuenta con gran biodiversidad de especies líquénicas, son escasos los estudios químicos y biológicos realizados y, a nivel nacional, estos resultan insuficientes. Se pueden destacar el estudio de la liquenobiota realizado por Ramírez et al. (21) en el distrito de Pueblo Libre (Huaylas, Ancash), en el que se identificaron 38 especies líquénicas; adicionalmente, se han encontrado nuevos registros de liquenobiota presentes en el Santuario Histórico de Machu Picchu (Cusco), realizado por Nuñez-Zapata et al. (22) en el que se reportaron 67 especies líquénicas y por último, Castro (8) realiza una determinación cuantitativa de ácido úsnico en 10 especies líquénicas presentes en Junín.

En la literatura revisada, se han realizado estudios de la especie *Stereocaulon glareosum* enfocados al tema botánico en Colombia (23) y Rusia (24); relaciones filogenéticas del género *Stereocaulon*, en Finlandia (25); sin embargo, de acuerdo a Scifinder no se ha encontrado ningún estudio científico acerca de la composición química de esta especie.

El presente trabajo está orientado a investigar la composición química del líquen *Stereocaulon glareosum*, promover su investigación, importancia biológica e incentivar el estudio de las diferentes especies de líquenes, debido que poseen compuestos activos propios. De esta manera, poder resolver la siguiente pregunta ¿qué compuestos líquénicos con actividad biológica establecida estarán presentes en el líquen *Stereocaulon glareosum*, para así valorar esta especie como una fuente potencial de compuestos biológicamente activos y que generen estudios posteriores?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Realizar el estudio químico del extracto metanólico del líquen *Stereocaulon glareosum* (Sav.) H. Magn.

1.2.2. Objetivos específicos

- i. Analizar el perfil metabolómico del extracto metanólico del líquen mediante UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS.

- ii. Identificar ácidos grasos mediante cromatografía de gases con el uso de patrones.
- iii. Aislar, purificar y caracterizar los compuestos liquénicos mayoritarios mediante las técnicas espectroscópicas IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y UV-visible.
- iv. Cuantificar ácido úsnico mediante la técnica de espectrofotometría UV-Visible.



2. MARCO TEÓRICO

2.1. Líquenes

Los líquenes son organismos formados por la asociación simbiótica de uno o dos hongos (micobionte) y uno o dos organismos fotosintéticos (fotobionte), que puede ser un alga (ficobionte), una cianobacteria (cianobionte) o ambos, donde los miembros de la asociación crecen íntimamente asociados formando el talo liquénico, como el ejemplo mostrado en la Figura 1. El liquen se comporta como un solo organismo en el que cada una de las partes depende de la otra, siendo el hongo el que proporciona refugio, agua y nutrientes minerales para el fotobionte, que realiza la fotosíntesis; dando como resultado un ser vivo sorprendente por su naturaleza dual (26,27).

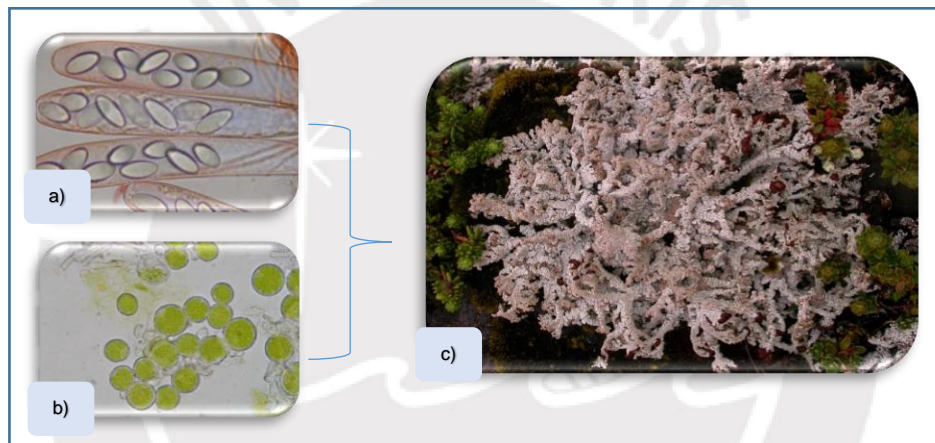


Figura 1. Esquema de la formación de un líquen.

a) Hongo (micobionte). b) Alga (ficobionte). c) Producto de la simbiosis de un hongo y un alga (Líquen) (28).

En la actualidad se han identificado alrededor de 18900 especies de líquenes que muestran una distribución cosmopolita, desde regiones desérticas, trópicos, bosques, zonas polares e incluso en el mar. Además de la asombrosa adaptación a los distintos climas y hábitats, pareciera que pueden crecer sobre casi cualquier sustrato; así hay líquenes cortícolas, que se desarrollan sobre la corteza de los árboles; los lignícolas, que se desarrollan sobre madera; los saxícolas, que se encuentran sobre rocas o minerales y, finalmente, los terrícolas, cuyo sustrato es el suelo (6,29,30), como se muestra en la Figura 2.

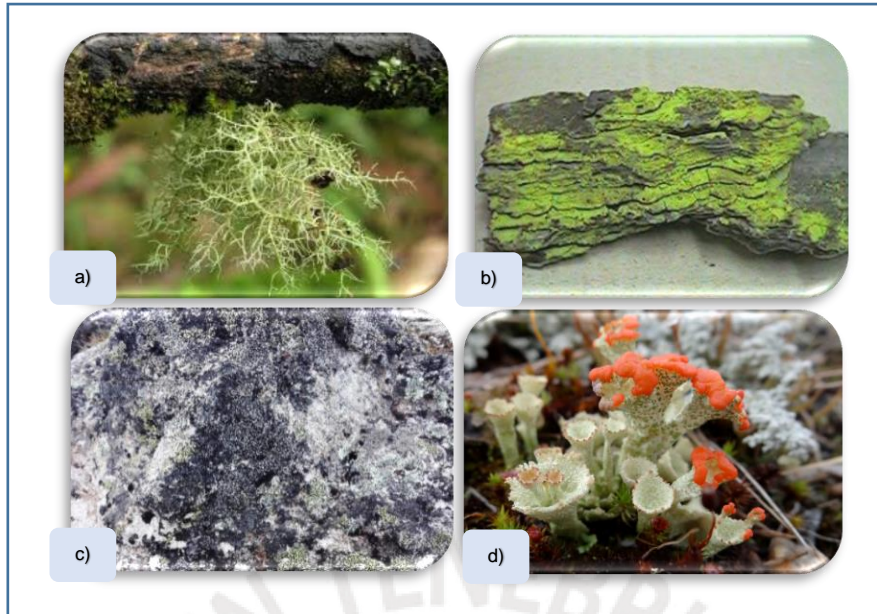


Figura 2. Clasificación de líquenes de acuerdo a su sustrato.

a) Líquen cortícola. b) Líquen lignícola. c) Líquen saxícola. d) Líquen terrícola (31).

Los líquenes se organizan en estructuras complejas llamados talos, la mayor parte está compuesta por el hongo y sus hifas, mientras que las células algales y las cianobacterias constituyen una proporción menor (alrededor del 10 %).

Los talos se pueden clasificar de acuerdo a su morfología, según su aspecto externo y forma de crecimiento; dentro de estos se distinguen los talos fruticulosos, los cuales están unidos al sustrato por una superficie de fijación reducida y con forma de pequeños arbustos; foliosos, que se extienden sobre el sustrato, fijándose a él mediante un conjunto de ricinas o por un solo punto, con formas semejantes a hojas; crustáceos, los cuales están fuertemente adheridos al sustrato, con formas de costra; escamosos, que se caracterizan por estar formados por un conjunto de escamas cercanas entre sí y por presentar un borde no adherido al sustrato; gelatinosos, los cuales adquieren una textura flexible y pulposa al encontrarse húmedos, en este estado pueden llegar a ser traslúcidos y, finalmente, los compuestos, talos dimórficos, constituidos por talo primario crustáceo, escamoso o foliáceo y otro secundario de tipo fruticuloso (1,29), en la Figura 3 se aprecia ejemplos de la clasificación morfológica.

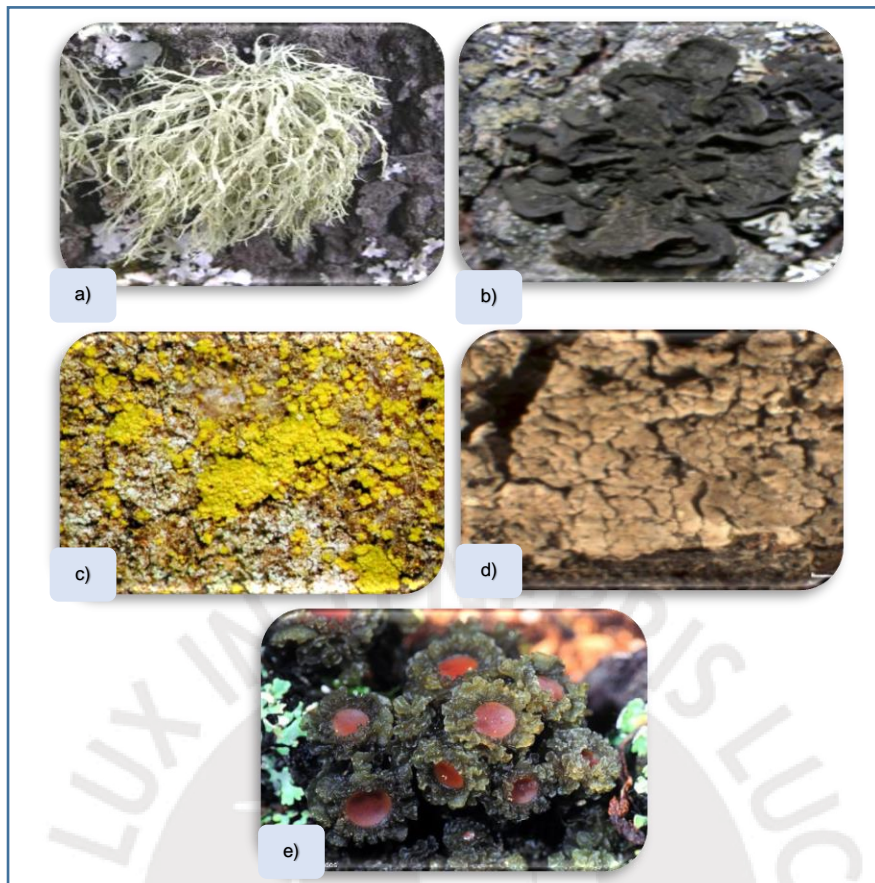


Figura 3. Clasificación de líquenes según su morfología.

a) Líquen fruticuloso (*Ramalina farinácea*). b) Líquen folioso (*Collema furfuraceum*). c) Líquen crustáceo (*Chrysothrix chlorina*). d) Líquen escamoso (*Catapyrenium psoromoides*). e) Líquen gelatinoso (*Leptogium phylloclarpum*) (31).

2.1.1. Importancia de los líquenes

Aunque en apariencia los líquenes parecen inertes, estos organismos simbióticos tienen importantes funciones en los ecosistemas, como se describen a continuación.

2.1.1.1. Función ecológica

Los líquenes juegan un papel importante en los ecosistemas terrestres como la degradación superficial de las rocas y la formación de suelos, es así que tienen la capacidad de establecerse como pioneros durante la colonización de sitios rocosos carentes de vegetación y con el tiempo preparan el sustrato para el desarrollo sucesivo de distintas plantas. A su vez muchos de los líquenes que tienen cianobacterias fijan el nitrógeno atmosférico elemental, lo que enriquece los suelos, principalmente en las regiones boreales y en bosques templados (7,29).

2.1.1.2. Uso comestible

Los líquenes han sido utilizados con frecuencia como alimento para las personas, sea como un manjar (como *Umbilicaria esculenta* en Japón) o un postre (como *Cetraria islandica* en Escandinavia), también constituyen un albergue eficaz y fuente de alimento de gusanos, insectos, arácnidos, ácaros y moluscos, esto se debe a que la mayoría de los líquenes son ricos en carbohidratos.

En varios países nórdicos los líquenes son empleados como forraje para el ganado, ya que las especies que ahí crecen contienen un polisacárido parecido al almidón, la liquenina, que incluso sirve para la elaboración de pan. Un ejemplo representativo de lo antes mencionado es la dieta de los renos o caribues, el cual está conformada por el 50 % de especies líquénicas como *Lobaria* y *Peltigera* (7,29).

2.1.1.3. Uso industrial

Los líquenes son especialmente usados en la industria de la perfumería como fijadores de las esencias aromáticas como *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfurácea*. Asimismo, son usados en la elaboración de cosméticos como *Pseudevernia furfuracea*, *Evernia prunastri* y *Lobaria pulmonaria* y para el teñido de lanas y algodón como *Usnea*, *Ramalina* y *Thamnolia*, los cuales se usan para la obtención de colores amarillo, naranja y marrón (4,9,29).

2.1.1.4. Uso medicinal

Se debe a la presencia de metabolitos secundarios propios de ellos, los cuales inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, tal es el caso de ácido úsnico que se utiliza en la elaboración de pomadas, que ha mostrado ser más efectivo que los antibióticos convencionales para el tratamiento de lesiones provocadas por quemaduras (7).

Culturas en diferentes regiones del mundo han utilizado desde la antigüedad, diferentes géneros de líquenes en sus medicinas tradicionales, para tratar heridas, trastornos de la piel, problemas respiratorios, digestivos, obstétricos y ginecológicos. Especies como *Evernia*, *Peltigera*, *Parmelia*, *Cladonia*, *Rocella* y *Pertusaria*, se utilizaron para controlar la fiebre, diarrea, infecciones, enfermedades de la piel,

epilepsia, convulsiones y como purgante. En algunos lugares de la India se vende “Chharila”, que consiste en la mezcla de dos o más especies de *Parmelia*, *Usnea longissima*, *Ramalina subcomplanata* y *Heterodermia tremulans* y que tiene propiedades astringentes, resolutive, laxante, carminativas y afrodisíacas (32,33). Asimismo, en China los líquenes *Lobaria pulmonaria* y *Parmelia sulcata* se han utilizado en el tratamiento de enfermedades pulmonares y craneales, respectivamente (34).

2.1.1.5. Bioindicadores de contaminación ambiental

Una de las aplicaciones recientes de los líquenes es el de bioindicadores y monitores de ciertos contaminantes (urbanos o industriales), esto debido a que tienen mecanismos muy eficientes para absorber el agua y los nutrientes de la atmósfera a través de toda su superficie. Si el medio está contaminado junto con los nutrientes absorben los contaminantes y los acumulan en su interior. También, se ha demostrado que algunas especies de líquenes pueden servir como indicadores del nivel de metales radioactivos (4,7).

2.1.2. Biosíntesis

Existen más de 800 metabolitos secundarios exclusivos de líquenes, denominados habitualmente como sustancias líquénicas o compuestos líquénicos, los cuales en su mayoría se biosintetizan a partir de la ruta del acetato polimalonato, otros a partir de la ruta del ácido mevalónico y la ruta del ácido shikímico. Ver Figura 4 (3–6).

2.1.2.1. Ruta del acetato polimalonato

La mayor parte de los metabolitos secundarios producidos por los líquenes son sintetizados por esta ruta, que da la formación de ácidos alifáticos de cadenas largas, como los ácidos grasos y compuestos aromáticos derivados del ácido orselínico y otros como cromonas, xantonas y derivados de antraquinonas. Ver Tabla 1 (35).

i. Ácido alifático

Se pueden dividir en tres grupos, γ -lactonas (por ejemplo, ácido isomurónico), diácidos grasos (por ejemplo, ácido rocélico) y triácidos

grasos (por ejemplo, ácido caperático). Los ácidos grasos (FA) son ácidos carboxílicos de cadena alifática o ramificada, entre 4 - 28 átomos de carbono, con o sin dobles enlaces. Se llaman ácidos grasos saturados cuando no tienen doble enlace y son insaturados cuando tienen al menos un doble enlace en la cadena de carbono (35).

En los líquenes del genero *Parmelia*, *Lecanorales* y *Stereocaulon* se identificaron ácidos grasos a través de un análisis por cromatografía de gases (GC), por ejemplo los ácidos saturados como el palmítico, esteárico, laúrico y los ácidos insaturados como el palmitoleico, oleico, linoleico, linolénico, araquídico y 11,14-eicosadienoico (30,36).

ii. Compuestos aromáticos

Los producidos por los líquenes correspondientes a derivados del ácido orselínico, se forman por la unión de dos o tres unidades fenólicas de tipo orcinol o β -orcinol, a través de enlaces éster (dépsidos, tridépsidos), éter (difeníléter, depsidona, dibenzofurano, ácido úsnico) y carbono-carbono (depsona) (5,37). Asimismo, existen otros compuestos aromáticos producidos por los líquenes como cromonas, xantonas, naftaquinonas, antronas y antraquinonas, pero no son exclusivos de estos organismos (30).

2.1.2.2. Ruta del ácido mevalónico

Los metabolitos que se biosintetizan por esta ruta son terpenos, terpenoides, esteroides y carotenoides, como por ejemplo ergosterol, fitoesterol, zeorina, β -caroteno y luteína (30). Ver Tabla 1 (35).

2.1.2.3. Ruta del ácido shikímico

Los metabolitos que se biosintetizan por esta ruta son el ácido pulvínico y sus derivados, únicos para líquenes; micosporinas y aminoácidos tipo micosporina (MAAs) y escitonemina, que también se produce en algas o cianobacterias.

i. Derivados del ácido pulvínico

Poseen una unidad cromófora oxolano-carbonilo, estos compuestos son pigmentos amarillos o naranjas, por ejemplo, la calicina,

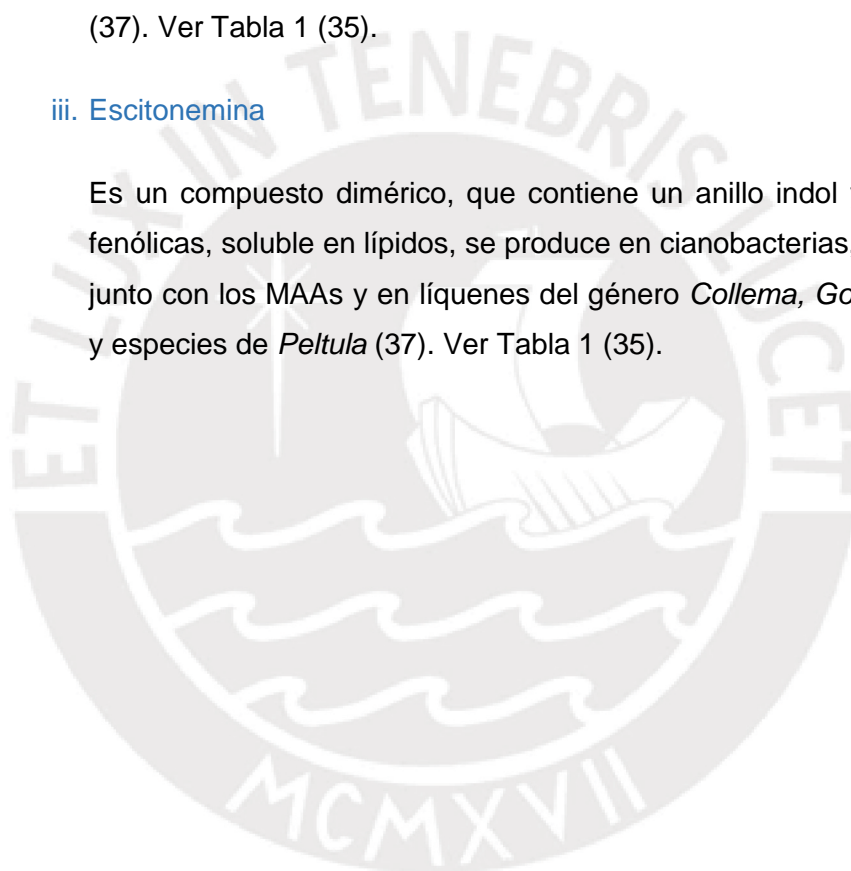
epanorina, ácido leprapínico, ácido vulpínico, entre otros (30,37). Ver Tabla 1 (35).

ii. Micosporinas y MAAs

Son compuestos polares, solubles en agua y de bajo peso molecular, juegan un papel importante para la protección del organismo contra la radiación UV, se han encontrado en muchos líquenes marinos y en sus simbiontes (en algas o cianobacterias). Estos compuestos poseen una unidad cromófora de ciclohexenona, y conjugado al anillo, tienen sustituyentes nitrogenados (amino), aminoácidos y amino-alcoholes (37). Ver Tabla 1 (35).

iii. Escitonemina

Es un compuesto dimérico, que contiene un anillo indol y unidades fenólicas, soluble en lípidos, se produce en cianobacterias, a menudo junto con los MAAs y en líquenes del género *Collema*, *Gonohymenia* y especies de *Peltula* (37). Ver Tabla 1 (35).



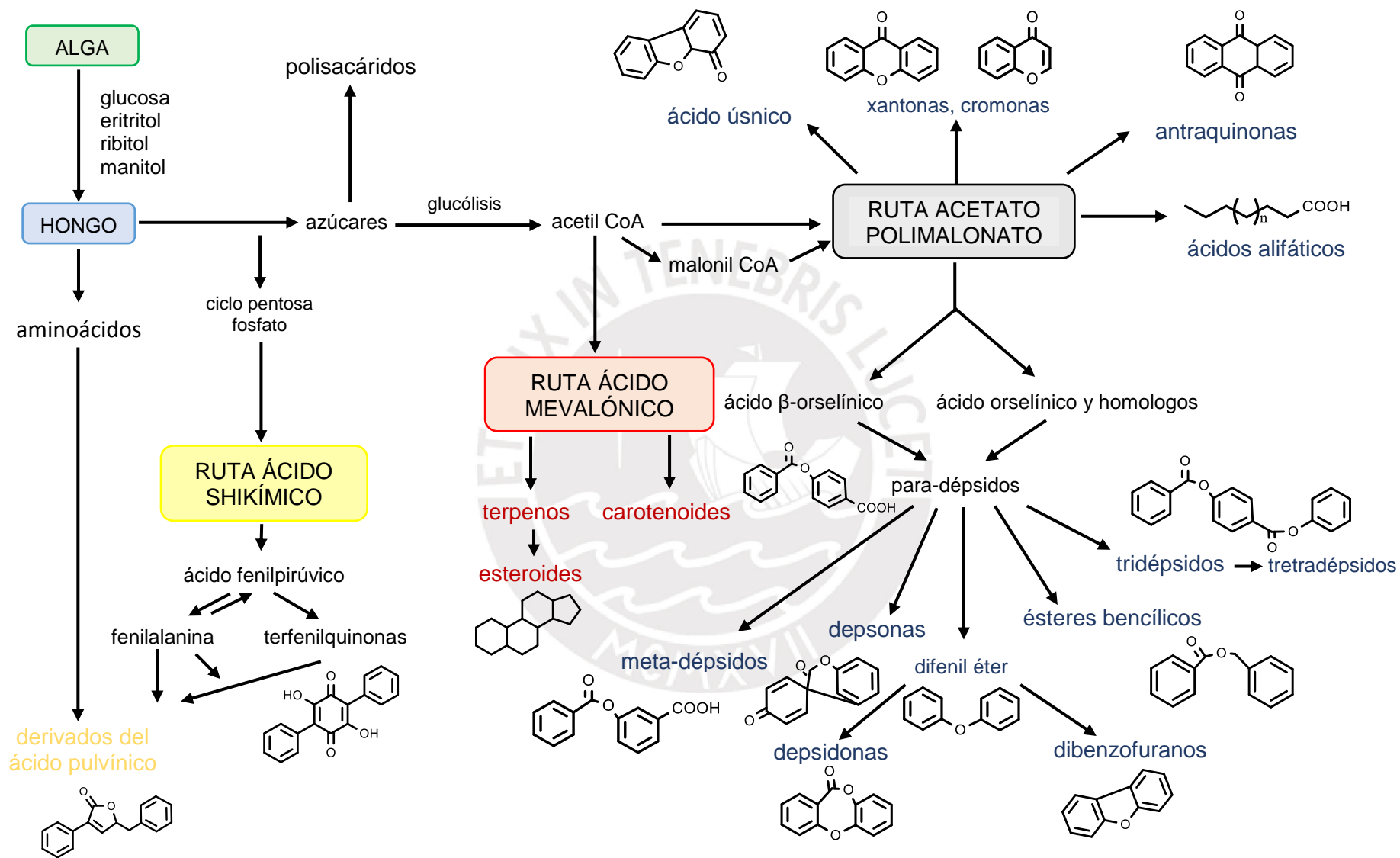


Figura 4. Rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios presentes en los líquenes (6).

Tabla 1. Clasificación de compuestos liquénicos de acuerdo a la ruta biosintética.

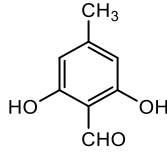
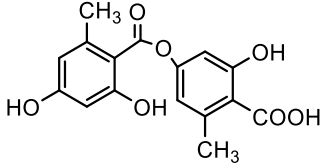
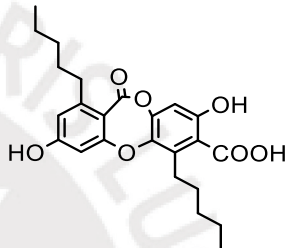
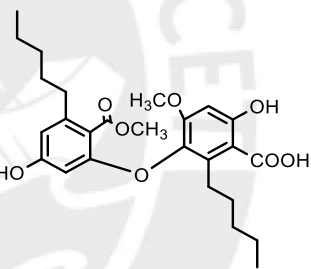
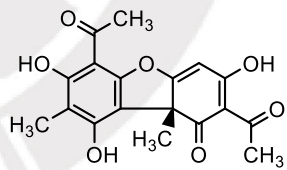
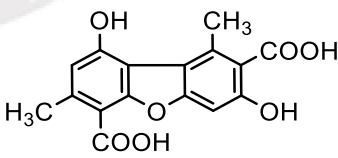
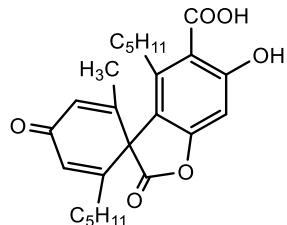
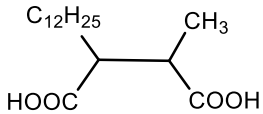
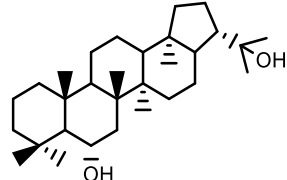
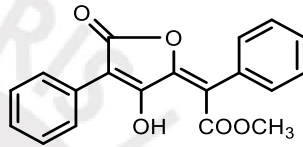
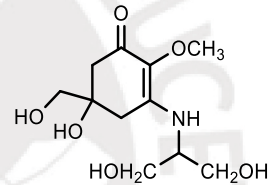
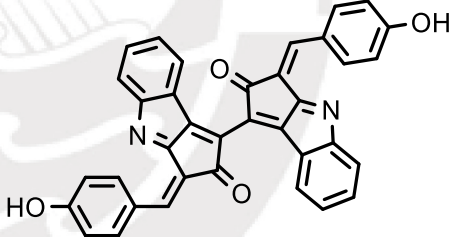
Clase de metabolito	Ejemplo
Ruta del acetato polimalonato	
Derivado del ácido orselínico	atranol 
Dépsido	ácido lecanórico 
Depsidona	ácido norcolensoico 
Difenileter	ácido epiforelico I 
Ácido úsnico	(+) - ácido úsnico 
Dibenzofurano	ácido panárico 
Depsona	ácido picroliquénico 

Tabla 1. Continua

Clase de metabolito	Ejemplo	
Ácido alifático	ácido rocélico	
Ruta del ácido mevalónico		
Triterpeno	zeorin	
Ruta del ácido shikímico		
Ácido pulvínico	ácido vulpínico	
Micosporina	micosporina serinol	
Escitonemina	escitonemina	

2.1.3. Identificación de compuestos liquénicos

Los compuestos liquénicos se pueden encontrar en diferentes partes del líquen, como en su medula, córtex o raramente en ambas. Los compuestos más comunes son el ácido úsnico y la atranorina, pero también pueden aparecer antraquinonas, derivados del ácido pulvínico y xantonas. Asimismo, se pueden encontrar en los apotecios, como la hemaventosina o el ácido norstíctico; en el talo como la atranorina, el ácido vulpínico o ácido tamnólico (6,29,30).

Muchos de estos compuestos liquénicos pueden ser detectados macroscópicamente gracias a los colores que adquieren al ser puestos en contacto con diversos reactivos químicos, tales como hidróxido de potasio (K), hipoclorito de sodio (C) y parafenilendiamina (PD). En la Tabla 2 (29) se muestra las reacciones características de algunos compuestos liquénicos.

Tabla 2. Reacciones de coloración de algunos compuestos liquénicos.

Compuesto	Reactivo			
	K	C	KC	PD
<i>Depsidona</i>				
Ácido salizínico	R – oscuro	-	-	N
Ácido stictico	A	-	-	N
Ácido lobárico	-	-	R - violeta	A – palido
<i>Dépsido</i>				
Ácido lecanórico	-	R	-	-
Atranorina	A – palido	-	-	-
Ácido girofórico	-	RS	-	-
<i>Dibenzofurano</i>				
Strepsilin	-	V	V	-
Ácido úsnico	-	-	A	-
<i>Antraquinona</i>				
Nefromina	R – púrpura	-	-	-
Parietina	R – púrpura	-	-	-

* A: amarillo, R: rojo, RS: rosa, N: naranja, V: verde

2.2. Liquenología del género *Stereocaulon*

2.2.1. Distribución y hábitat

Dentro de la diversidad de los líquenes podemos mencionar al género *Stereocaulon*, el cual está distribuido alrededor del mundo, como en Perú (8), Chile, Bolivia (23,38), Colombia (23), Ecuador (23,38,39), Venezuela (9), México (23,38), Indonesia (10), Japón (11), Antártica (12), entre otros, ver Figura 5; y se cuenta con aproximadamente 130 especies (10). Estos líquenes en su mayoría incluyen especies con talo dimórfico, compuestos por un talo primario escamoso y un talo secundario fruticuloso, con gran plasticidad en sus estructuras

morfológicas y anatómicas. En su mayoría estos líquenes crecen en regiones montañosas, sobre rocas silíceas ricas en metales, en el suelo o en conjunto con el musgo (10,23,25).



Figura 5. Distribución del género *Stereocaulon*.

2.2.2. Etnoliquenología

Los líquenes se utilizan en medicina tradicional por culturas de todo el mundo, especialmente en las regiones templadas y árticas, siendo el género *Stereocaulon* utilizado como antihemorrágico, antihipertensivo, antidiabético y antiulceroso, entre otros. Ver Tabla 3 (32,33).

Tabla 3. Uso del género *Stereocaulon* en medicina tradicional.

Liquen	Cultura	Uso tradicional
<i>Stereocaulon himalayense</i>	Lepchas, India	Infección urinaria
	Indio- tibetano, Himalaya	
<i>Stereocaulon foliolosum</i>	Lepchas, India	Ampollas en la lengua
	Lepchas, India	Cálculos renales
<i>Stereocaulon paschale</i>	Mistissini-Cree, Quebec	Tratamiento de reumatismo, artritis y diabetes
	<i>Shi-jisheng</i> , China	Hemorragia y mareos
<i>Stereocaulon exutum</i>	<i>Shi-jisheng</i> , China	Hemorragia y mareos
<i>Stereocaulon vulcani</i>	Réunion, Francia	Tratamiento de úlceras, aftas, heridas, infecciones vaginales y sífilis

2.2.3. Liquenoquímica

Como se ha mencionado previamente no se ha reportado en la bibliografía ningún estudio químico realizado a la especie liquénica *Stereocaulon glareosum*. Sin embargo, existe un estudio botánico en Colombia que indicaría que esta especie contiene atranorina y ácido stíctico (23).

En base a los estudios químicos realizados a otras especies de este género, podemos proponer cuatro quimiotipos (compuestos que caracterizan a este género), los cuales son haematomato de metilo, atranorina, β -orcinol carboxilato de metilo y ácido lobárico.

En la Tabla 4 se hace un resumen de los compuestos liquénicos aislados de diversas especies del género *Stereocaulon*.

Tabla 4. Compuestos reportados del genero *Stereocaulon*.

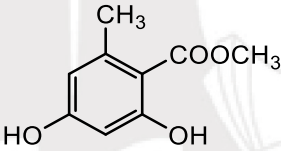
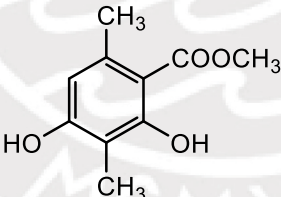
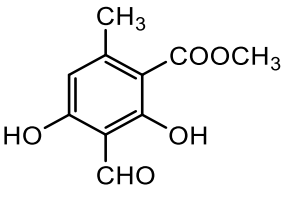
Clase de metabolito	Metabolito	Especie liquénica	Referencia
Derivado del ácido orselínico	 orselinato de metilo	<i>S. alpinum</i>	(40)
		<i>S. evolutum</i>	(41)
	 β -orcinol carboxilato de metilo	<i>S. halei</i>	(10)
		<i>S. foliolosum</i>	(42)
		<i>S. azureum</i>	(43)
		<i>S. vesuvianum</i>	(15)
		<i>S. alpinum</i>	(40,44)
		<i>S. montagneanum</i>	(45)
		<i>S. evolutum</i>	(41)
		<i>S. paschale</i>	(46)
<i>S. ramulosum</i>	(47)		
haematomato de metilo		<i>S. halei</i>	(10)
		<i>S. alpinum</i>	(40)
		<i>S. montagneanum</i>	(45)
		<i>S. evolutum</i>	(41)
		<i>S. paschale</i>	(46)

Tabla 4. Continua

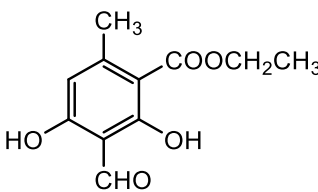
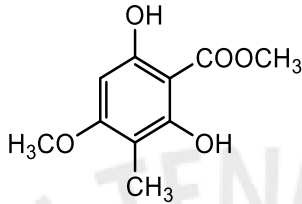
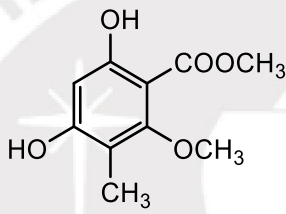
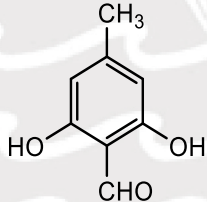
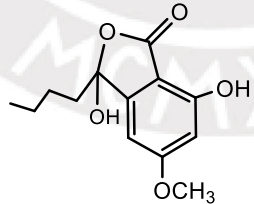
Clase de metabolito	Metabolito	Especie líquénica	Referencia
	 <p>haematomato de etilo</p>	<i>S. halei</i> <i>S. foliolosum</i> <i>S. alpinum</i> <i>S. montagneanum</i>	(10) (42) (44) (45)
	 <p>2,6-dihidroxi-4-metoxi-3-metilacetofenona</p>	<i>S. alpinum</i>	(40,44)
	 <p>4,6-dihidroxi-2-metoxi-3-metilacetofenona</p>	<i>S. alpinum</i> <i>S. vesuvianum</i>	(44) (48)
	 <p>atranol</p>	<i>S. azoreum</i> <i>S. vesuvianum</i> <i>S. montagneanum</i> <i>S. evolutum</i>	(43) (15) (45) (41)
	 <p>3-butil-3,7-dihidroxi-5-metoxi-1 (3h)-isobenzofurano o ácido lobaritónico</p>	<i>S. evolutum</i>	(41)

Tabla 4. Continua

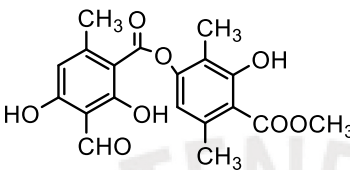
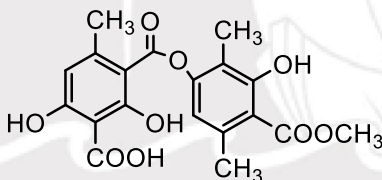
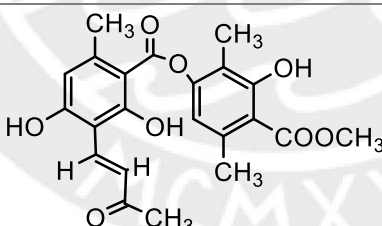
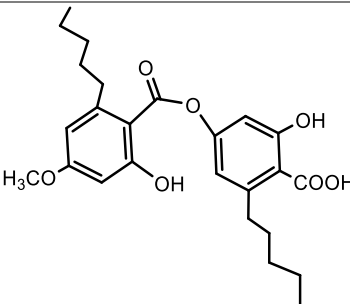
Clase de metabolito	Metabolito	Especie líquénica	Referencia
		<i>S. halei</i>	(10)
		<i>S. alpinum</i>	(17,40,44,49,50)
		<i>S. sp.</i>	(51)
		<i>S. japonicum</i>	(52)
		<i>S. argus</i>	(53)
		<i>S. myriocarpum</i>	(53)
		<i>S. strictum</i>	(53)
		<i>S. subcoralloides</i>	(53)
		<i>S. tomentosum</i>	(53)
		<i>S. vesuvianum</i>	(48)
		<i>S. sterile</i>	(54)
		<i>S. spathuliferum</i>	(54)
		<i>S. implexum</i>	(54)
		<i>S. colensoi</i>	(55)
		<i>S. ramulosum</i>	(47,56)
		<i>S. cornutum</i>	(56)
		<i>S. corticatutum</i>	(56)
		<i>S. montagneanum</i>	(45)
		<i>S. evolutum</i>	(41)
			
	atranorina		
Dépsido		<i>S. evolutum</i>	(41)
	cladonioidesina		
		<i>S. evolutum</i>	(41)
	(E)-3-(3-oxobut-1-en-yl)-atranorina		
		<i>S. alpinum</i>	(12)
		<i>S. sp.</i>	(51)
		<i>S. ramulosum</i>	(47)
	ácido perlatólico		

Tabla 4. Continua

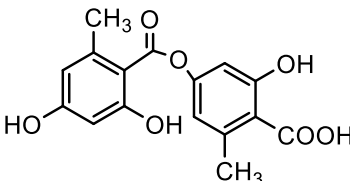
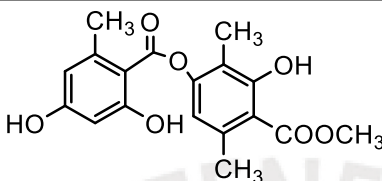
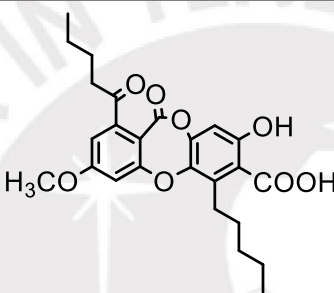
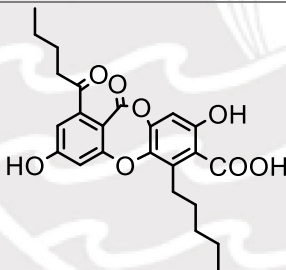
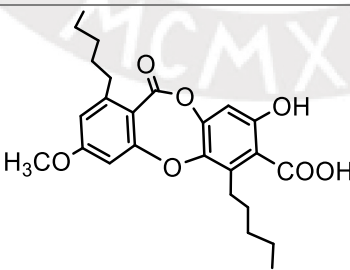
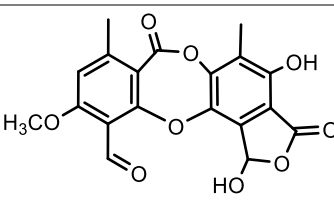
Clase de metabolito	Metabolito	Especie líquénica	Referencia
	 <p>ácido lecanórico</p>	<i>S. curtatum</i>	(57)
	 <p>metil 3'-metillecanorato</p>	<i>S. evolutum</i>	(41)
	 <p>ácido lobárico</p>	<i>S. alpinum</i> <i>S. halei</i> <i>S. sasakii</i> <i>S. alpinum</i> <i>S. azoreum</i> <i>S. sterile</i> <i>S. implexum</i> <i>S. evolutum</i> <i>S. paschale</i>	(12,19) (10) (11) (40,50) (43) (54) (54) (41) (46)
Depsidona	 <p>ácido norlobárico</p>	<i>S. evolutum</i> <i>S. paschale</i>	(41) (46)
	 <p>ácido colensoico</p>	<i>S. colensoi</i>	(55)
	 <p>ácido stíctico</p>	<i>S. japonicum</i> <i>S. azoreum</i> <i>S. alpinum</i> <i>S. montagneanum</i> <i>S. evolutum</i>	(52) (43) (58) (45) (41)

Tabla 4. Continua

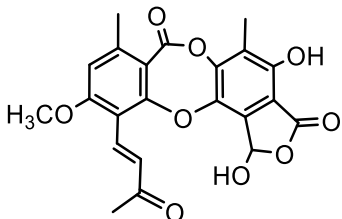
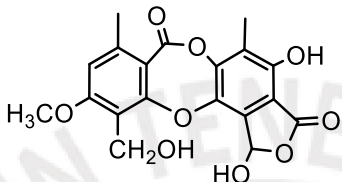
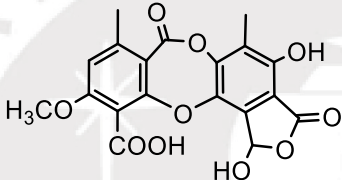
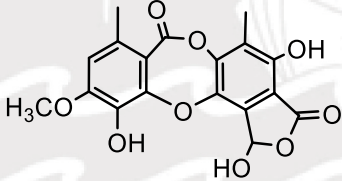
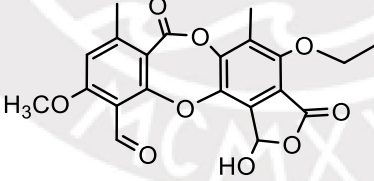
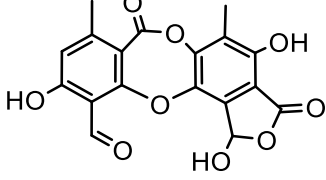
Clase de metabolito	Metabolito	Especie líquénica	Referencia
	 <p>derivado de ácido stictico (isidioforina)</p>	<p><i>S. azureum</i> <i>S. evolutum</i></p>	<p>(43) (41)</p>
	 <p>ácido criptostictico</p>	<p><i>S. azureum</i> <i>S. montagneanum</i></p>	<p>(43) (45)</p>
	 <p>ácido peristictico</p>	<p><i>S. montagneanum</i></p>	<p>(45)</p>
	 <p>ácido menegazziaico</p>	<p><i>S. montagneanum</i></p>	<p>(45)</p>
	 <p>ácido vesuviánico</p>	<p><i>S. vesuvianum</i> <i>S. alpinum</i></p>	<p>(58)</p>
	 <p>ácido norstictico</p>	<p><i>S. spathuliferum</i> <i>S. montagneanum</i></p>	<p>(54) (45)</p>

Tabla 4. Continua

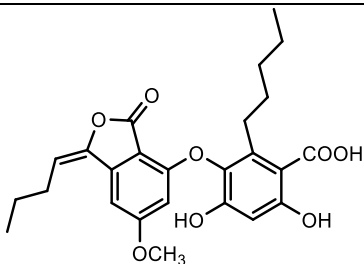
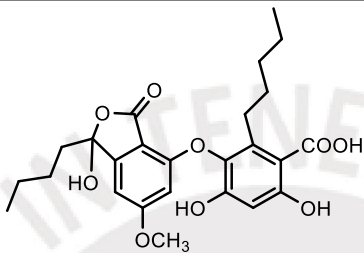
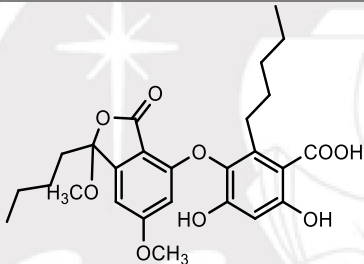
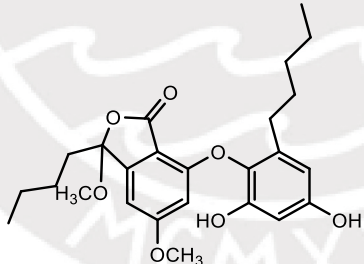
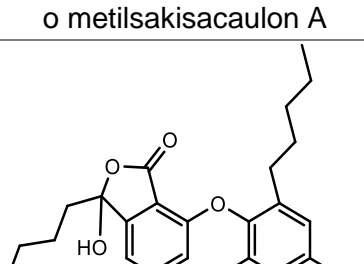
Clase de metabolito	Metabolito	Especie líquénica	Referencia
	 <p>lobarstina</p>	<i>S. alpinum</i>	(59)
	 <p>lobarina</p>	<i>S. halei</i> <i>S. evolutum</i>	(10) (41)
Difenileter	 <p>pseudopsidona 1 o metillobarina</p>	<i>S. alpinum</i> <i>S. paschale</i>	(40) (46)
	 <p>pseudopsidona 2 o metilsakisacaulon A</p>	<i>S. alpinum</i> <i>S. paschale</i>	(40) (46)
	 <p>sakisacaulon A</p>	<i>S. sasakii</i> <i>S. evolutum</i> <i>S. paschale</i>	(11) (41) (46)

Tabla 4. Continua

Clase de metabolito	Metabolito	Especie liquénica	Referencia
		<i>S. evolutum</i> <i>S. paschale</i>	(41) (46)
	anhidro-sakisacaulon A		
		<i>S. evolutum</i>	(41)
	metil-8-sakisacaulon A		
		<i>S. sasakii</i>	(11)
	fenoxibenzofurano		
		<i>S. evolutum</i> <i>S. paschale</i>	(41) (46)
	sakisacaulon A esterificado		
		<i>S. paschale</i>	(46)
	lobarina esterificada		

Tabla 4. Continua

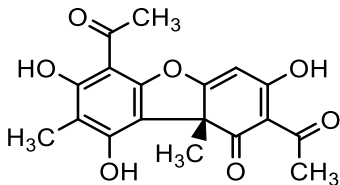
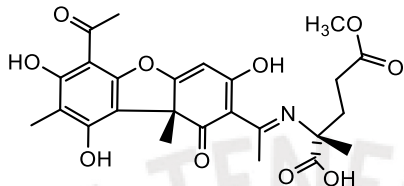
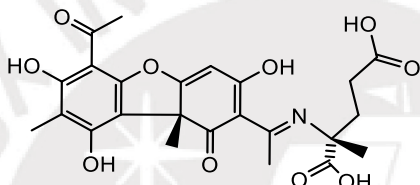
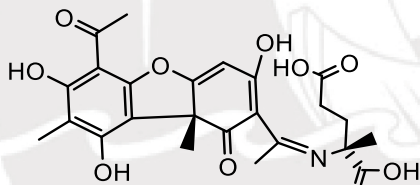
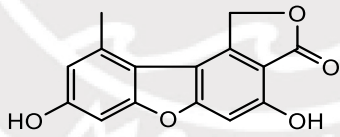
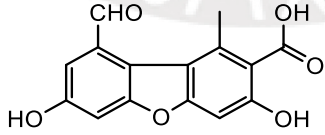
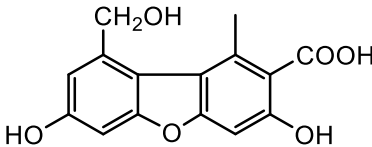
Clase de metabolito	Metabolito	Especie líquénica	Referencia
	 <p>(+) - ácido úsnico</p>	<i>S. sp.</i> <i>S. alpinum</i>	(51) (16)
Ácido úsnico	 <p>usimina A</p>	<i>S. alpinum</i>	(16)
	 <p>usimina B</p>	<i>S. alpinum</i>	(16)
	 <p>usimina C</p>	<i>S. alpinum</i>	(16)
	 <p>estrepasilina</p>	<i>S. azureum</i> <i>S. japonicum</i> <i>S. evolutum</i>	(43) (52) (41)
Dibenzofurano	 <p>ácido hipostrepasilico</p>	<i>S. japonicum</i>	(52)
	 <p>ácido isotrepasilico</p>	<i>S. paschale</i>	(46)

Tabla 4. Continua

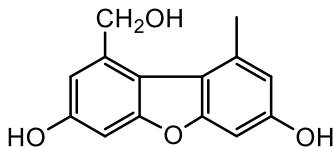
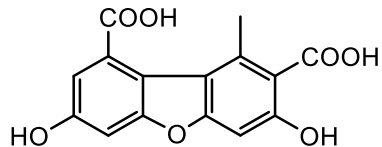
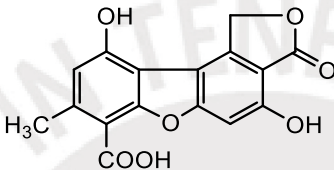
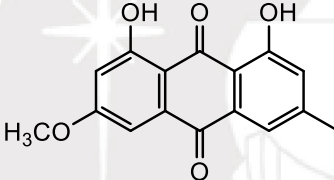
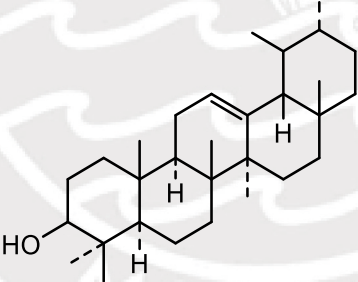
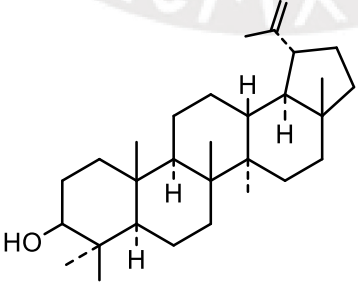
Clase de metabolito	Metabolito	Especie líquénica	Referencia
	 <p>derivado de ácido isotrepsílico 1</p>	<i>S. paschale</i>	(46)
	 <p>derivado de ácido isotrepsílico 2</p>	<i>S. paschale</i>	(46)
	 <p>ácido porfirílico</p>	<i>S. azureum</i>	(43)
Antraquinona	 <p>parietina</p>	<i>S. corticatutum</i>	(60)
Triterpeno	 <p>α - amirina</p>	<i>S. azureum</i>	(43)
	 <p>lupeol</p>	<i>S. azureum</i>	(43)

Tabla 4. Continua

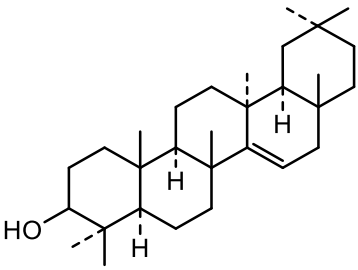
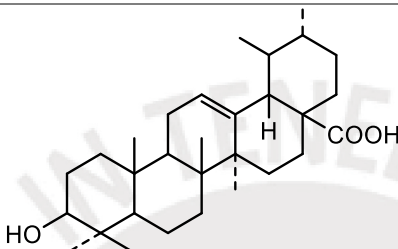
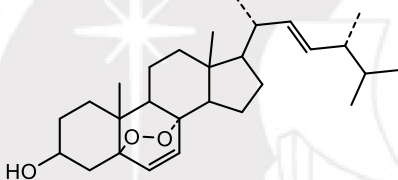
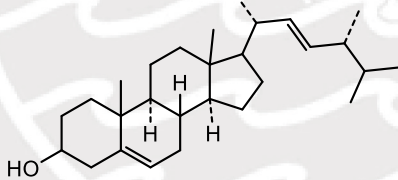
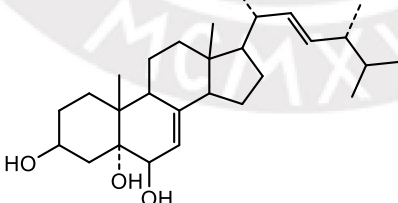
Clase de metabolito	Metabolito	Especie liquénica	Referencia
	 taraxerol	<i>S. azureum</i>	(43)
	 ácido ursólico	<i>S. azureum</i> <i>S. evolutum</i>	(43) (41)
	 peróxido de ergosterol	<i>S. azureum</i> <i>S. evolutum</i>	(43) (41)
Esteroides	 brassicasterol	<i>S. azureum</i> <i>S. evolutum</i>	(43) (41)
	 cerevisterol	<i>S. azureum</i>	(43)
Ácido alifático	ácido graso tetrahidroxilado	<i>S. colensoi</i>	(55)

Tabla 4. Continua

Clase de metabolito	Metabolito	Especie líquénica	Referencia
	micosporina- glicina (MG)		
	micosporina-aurina (MT)		
	gadásol (G)		
Micosporina		<i>S. foliolosum</i>	(61)
	deoxigadásol (DG)		
	shinorina (SH)		
	palitina (PI)		

Tabla 4. Continua

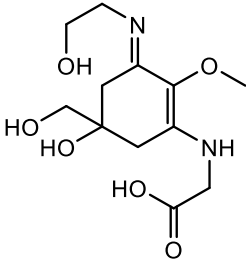
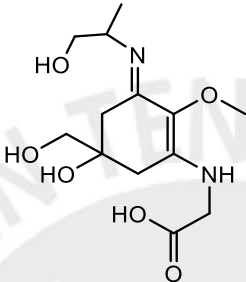
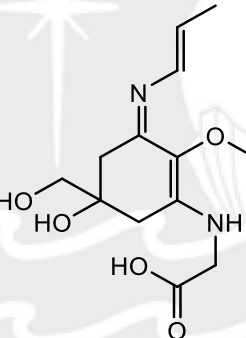
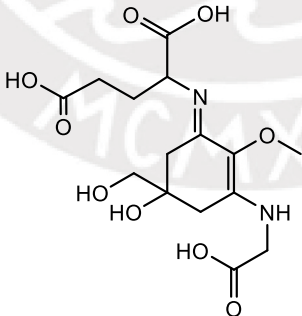
Clase de metabolito	Metabolito	Especie liquénica	Referencia
			
	asterina (AS)		
			
	palitinol (PO)		
			
	palitene (PE)		
			
	micosporina-ácido glutámico-glicina (MGG)		

Tabla 4. Continua

Clase de metabolito	Metabolito	Especie líquénica	Referencia
	<p>micosporina-glicina-valina (MGV)</p>		
	$C_{11}H_{19}N_2O_5$ compuesto 2	<i>S. philippinense</i>	(62)
	$C_{13}H_{22}NO_7$ compuesto 3	<i>S. philippinense</i> <i>S. dactylophyllum</i>	(62)
	$C_{16}H_{22}N_5O_3$ compuesto 8	<i>S. dactylophyllum</i>	(62)
	<p>1,3,7-trimetilguanina</p>	<i>S. ramulosum</i>	(47)
Compuesto nitrogenado	<p>estereocalpina A</p>	<i>S. alpinum</i>	(63)
	<p>9-<i>cis</i>-octadecenamide</p>	<i>S. alpinum</i>	(64)
	aminoácidos	<i>S. paschale</i>	(65)
Poliol, polisacárido	galactitol	<i>S. ramulosum</i>	(47)
	galactomannan	<i>S. azoreum</i>	(66)

Tabla 4. Continua

Clase de metabolito	Metabolito	Especie líquénica	Referencia
	glucomannan		
	galactomannan A	<i>S. ramulosum</i>	(67)
	galactomannan B		
	manitol	<i>S. ramulosum</i>	(39,68)
		<i>S. colensoi</i>	(55)
		<i>S. montagneanum</i>	(45)
	arabitol o arabinitol	<i>S. ramulosum</i>	(39,68)
		<i>S. colensoi</i>	(55)
		<i>S. montagneanum</i>	(45)
	(1→3)-β-D-glucopirranano		
	α-D-glucan		
	2-O-p-β-galactofuranosil-D-arabinitol	<i>S. ramulosum</i>	(68)
	α,α-trehalose		
	<i>myo</i> -inositol		
	ribitol	<i>S. ramulosum</i>	(39)
	D-galacto-D-mannan	<i>S. paschale</i>	(65)
	acroscefano	<i>S. sp.</i>	(69)
	SJ-2-I-glucan	<i>S. sp.</i>	(69)
		<i>S. japonicum</i>	(70)
	β-criptoxantina	<i>S. alpinum</i>	
	zeaxantina	<i>S. arenarium</i>	
	epóxido de luteína	<i>S. paschale</i>	
		<i>S. vesuvianum</i>	
Carotenoide	β-caroteno	<i>S. alpinum</i>	(71)
	adonixantina		
	neoxantina		
	mutatoxantina		
	α-criptoxantina	<i>S. arenarium</i>	
	α-caroteno	<i>S. paschale</i>	
	luteína		
	α-doradexantina		
astaxantina			
	cantaxantina	<i>S. vesuvianum</i>	
	criptoflavina		

Por otro lado, en muchos trabajos se reporta el contenido de ácido úsnico debido a que es un constituyente abundante de varias especies de líquenes como *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia*, *Parmelia*, entre otras (72).

El ácido úsnico está constituido por dos unidades fenólicas, unidas por enlace éter y carbono-carbono. Este compuesto se caracteriza por tener 2 bandas de absorción máxima como se muestra en la Tabla 5, estas lecturas fueron medidas en cloroformo (8).

Tabla 5. Absorbancias máximas del espectro UV-vis del ácido úsnico (8).

Reportado por	Banda 1	Banda 2
Morales	234,4 nm	284,2 nm
Culberson	233,3 nm	283,2 nm
Castro	239,6 nm	283,1 nm

En el género *Stereocaulon* se reporta el contenido de ácido úsnico para dos especies distintas, como se observa en la Tabla 6. Asimismo, en otras especies como *Flavoparmelia*, *Xanthoparmelia*, *Psiloparmelia*, *Thamnolia*, *Flavopunctelia*, entre otras, el contenido de ácido úsnico varía entre 0,06 - 1,2 %.

Tabla 6. Contenido de ácido úsnico en dos especies del género *Stereocaulon*.

Liquen	% Ácido úsnico	Enantiómero extraído
<i>Stereocaulon vesuvianum</i> (8)	0,12	(+)-ácido úsnico
<i>Stereocaulon alpinum</i> (16)	3,83	(+)-ácido úsnico

2.2.4. Actividad biológica

Los líquenes constituyen una fuente potencial de moléculas bioactivas, tales como antibacterianas, antimicóticas, antivirales, antitumorales, analgésicas, antipiréticas, antiinflamatorias, antioxidantes, antiproliferativas, gastroprotectoras, entre otras. Por tal razón, es importante continuar la investigación química con la finalidad de aislar nuevos compuestos liquénicos, que presenten actividad biológica y así ayudar al crecimiento de la industria farmacéutica con la obtención de moléculas farmacológicamente activas (33).

En la Tabla 7 se presenta diversas actividades biológicas de compuestos liquénicos aislados en especies del género *Stereocaulon*. Asimismo, en la Tabla

8 se muestra actividades biológicas de los extractos en especies del género *Stereocaulon*.

Tabla 7. Compuestos liquénicos bioactivos presentes en especies del género *Stereocaulon*.

Actividad biológica	Compuesto	Referencia
Gastroprotectora	ácido lobárico	(12)
	ácido perlatólico atranorina	
Antioxidante	ácido lobárico	(10,73)
	atranorina	(10)
	lobarstina	(73)
	haematomato de metilo	(13)
Antimitótica	ácido lobárico	(11)
Inhibidora frente a la proteína tirofosfata 1B (PTP1B)	ácido lobárico	(40)
	pseudepsidona 1 pseudepsidona 2	
	usimina A	(16)
	usimina B	
usimina C		
Efecto citoprotector	ácido úsnico	(63)
	estereocalpina A	(13)
	haematomato de metilo	(13,14)
Fotoprotectora	atranorina	(17)
Antiproliferativa	ácido lobárico	(49)
	ácido úsnico	(18)
Antiinflamatoria	alkamida	(64)
Inhibidora en el metabolismo araquidonato	ácido lobárico	(19)
Antimicrobial	β -orcinol carboxilato de metilo atranol	(15)
Neuroprotector	haematomato de metilo	(13,14)
Antibacterial	ácido lobárico lobarstina	(73)
Anticargenogénica	ácido lobárico	(74)

Tabla 8. Actividades biológicas de diferentes extractos en especies del género *Stereocaulon*.

Actividad	Extracto	Referencia
Antioxidante	clorofórmico	(75)
	acetato de etilo	
Antibacteriana	metanólico	(9)
	clorofórmico	
	acetato de etilo	
	acetónico	
Antioxidante	metanólico	(76)
	etanólico	
Antimicrobial	metanólico	(77)
Anticancerígena		
Antifúngico	acuoso	(78)
	etanólico	
	diclorometano	

2.2.5. *Stereocaulon glareosum* (Sav.) H. Magn.

2.2.5.1. Taxonomía

La muestra líquénica fue identificada por el Blgo. Ángel Ramírez (Anexo 1), la cual presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Lecanoromycetes
Orden	Lecanorales
Familia	Stereocaulaceae
Género	<i>Stereocaulon</i>
Especie	<i>Stereocaulon glareosum</i> (Sav.) H. Magn.

2.2.5.2. Características botánicas

S. glareosum se desarrolla sobre sustrato saxícola, es del tipo dimórfico, compuesto por un talo primario escamoso, el cual desprende gránulos denominados filocladios y un talo secundario fruticuloso, denominado

pseudopodecio (Figura 6). Los filocladios cubren gran parte del pseudopodecio, son granulos de coloración grisácea con un tono rosado a marrón. Los pseudopodecios logran alcanzar una altura de 5 cm. Los apotecios están ubicados en las partes terminales de las ramas, se caracterizan por estar constituidos externamente por un disco marrón rojizo con apariencia convexa.

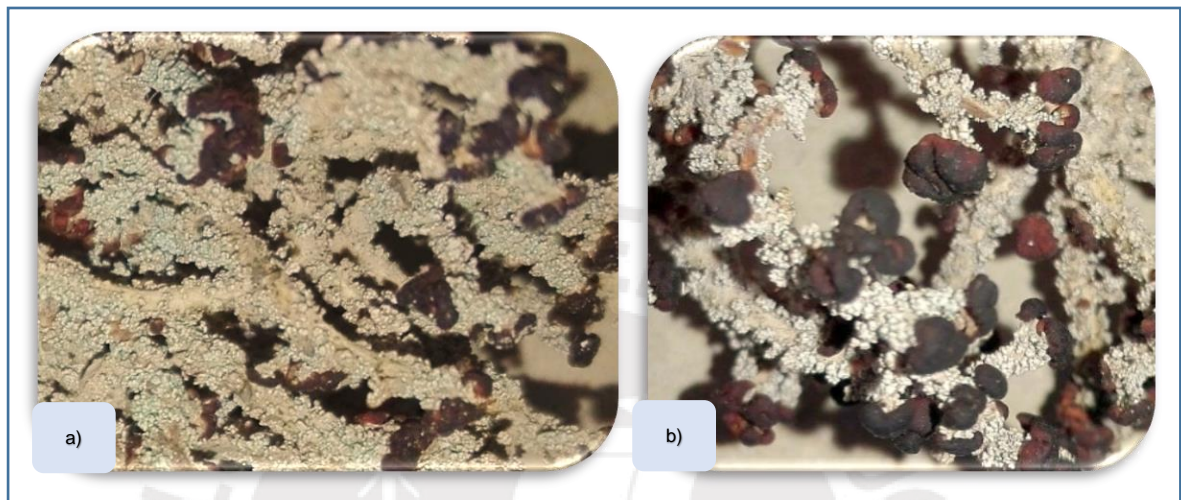


Figura 6. Características morfológicas del liquen *S. glareosum*.

a). Filocladios granulares. b). Apotecios convexos.

2.3. Técnicas de separación, identificación y cuantificación

2.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés)

Esta técnica permite obtener información rápida y sencilla sobre la cantidad de compuesto que hay en la muestra y para seleccionar el solvente o la mezcla de solventes, con los cuales se puede separar cada componente de todos los otros. Estos resultados iniciales se utilizan en seguida para ensayar la separación del extracto bruto orgánico por cromatografía en placa preparativa o por cromatografía en columna (1).

2.3.2. Cromatografía en columna (CC)

Esta técnica es la más utilizada cuando se requiere separar y purificar mezclas de compuestos en cantidades apreciables de extracto. De acuerdo a la naturaleza del analito se puede emplear distintas fases estacionarias, de los cuales podemos mencionar los más usados:

- i. Silica gel: permite separar componentes de acuerdo a su polaridad en mezclas complejas.

La fase estacionaria es sílica gel, ésta se empaca uniformemente sobre una columna de vidrio, luego se adiciona una solución concentrada de la mezcla a ser separada. El “desarrollo” se produce cuando la fase móvil fluye lentamente a través de ella. Los componentes apolares son débilmente retenidos por el adsorbente y son fácilmente eluidos con solventes apolares. Por el contrario, los compuestos polares son fuertemente adsorbidos y solo pueden ser eluidos con solventes relativamente polares (1).

- ii. Sephadex: permite separar componentes de acuerdo a su tamaño.

La fase estacionaria es un gel de dextrano (sephadex) con poros de un tamaño dado. Las moléculas de igual o menor tamaño que el poro ingresan en los espacios libres del sephadex, mientras que las moléculas más grandes eluyen rápidamente por la columna. Por consiguiente, las moléculas eluyen de acuerdo a su tamaño, siendo las más grandes primero y las más pequeñas después (79).

2.3.3. Cromatotrón

Es un cromatógrafo de capa fina radial, preparativo y centrífugamente acelerado. Sustituye a las placas TLC preparativas y columnas cromatográficas debido a que esta técnica proporciona una rápida separación de los componentes respecto a las otras.

La muestra a separar se aplica como solución, en el área central del disco giratorio, revestido con una fina capa de adsorbente (sílica gel o alumina) y la fase móvil se aplica a un caudal constante (ver Figura 7b). A medida que eluye la fase móvil, transporta la muestra junto con ella creando bandas circulares de los componentes, los cuales se separan por turbulencia desde el borde del rotor junto con la fase móvil (80).

La ventaja de esta técnica es que permite una separación rápida de los componentes apolares o medianamente polares. Además, al realizar la separación se puede usar una lámpara UV, lo que permite separar componentes que absorban al UV de onda corta (254 nm) u onda larga (366 nm).



Figura 7. Cromatotrón

a) Partes del cromatotrón. b) Esquema de separación (80).

2.3.4. Cromatografía de gases (GC)

Es una técnica cromatográfica sensible y permite la separación e identificación de compuestos volátiles. La fase móvil es un gas inerte (nitrógeno o helio), que transporta la muestra volatilizada en el inyector, a través de la columna cromatográfica. La fase estacionaria generalmente está constituida por una columna de metil polisiloxano, o derivados de éste. Los diferentes compuestos se separan en función de su grado de volatilidad (punto de ebullición, peso molecular) y su afinidad por la fase estacionaria. Entre los detectores más utilizados cabe mencionar el detector FID (ionización de llama) que, por su alta versatilidad, hace posible la detección de un elevado tipo de compuestos (81).

Cuando se trabaja con líquenes la aplicación de GC es limitada, ya que los lípidos intactos que contienen ácidos grasos unidos y libres, no son lo suficientemente volátiles como para inyectarse en el GC y, por lo tanto, generalmente se derivatizan primero por saponificación, seguido de metilación para aumentar la volatilidad de los compuestos, antes del análisis. Después de la derivatización, se obtiene el esqueleto del lípido y los ésteres metílicos de ácidos grasos volátiles (FAMES) (36).

2.3.5. Ultra cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un espectrofotómetro ESI- MS/MS (UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS)

Esta técnica permite un análisis del perfil metabolómico del extracto crudo orgánico de una especie. El UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS, cuyo equipo se muestra en la Figura 8, es una técnica robusta, debido que combina la detección de arreglo de diodos (PDA o DAD) y la espectrometría de masas con ionización por electroespray de alta resolución (ESI-MS-MS o HRMS-MS), acoplada a

cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa C-18, lo que proporciona un método preciso para la identificación y elucidación de metabolitos en el extracto crudo de un líquen (82–84). El Q-Exactive Focus es un espectrómetro de masas de alta resolución (HRAM) que permite detectar y cuantificar compuestos orgánicos pequeños, este instrumento combina el UHPLC-PDA con un Orbitrap, un cuadrupolo (Q) y una celda de disociación por colisión de alta energía (HCD), lo que proporciona fragmentos de MS de alta resolución (85,86).

La metabolómica es una tecnología que se basa en el análisis no dirigido de productos intermedios o productos metabólicos de tamaño pequeño, en fluidos biológicos complejos o extractos crudos, que utiliza la espectroscopía de forma cuantitativa como el GC-MS, HPLC-MS, RMN- H^1 , entre otros (39). Por consiguiente, estas técnicas metabolómicas también benefician el análisis de líquenes sobre la base de su composición metabólica única. Efectivamente, hay un incremento en el análisis metabolómico de compuestos líquénicos desde el 2013 hasta la fecha, mediante la técnica metabolómica HPLC-MS-MS (82–84).



Figura 8. UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate RSLC 3000.

Laboratorio de Productos Naturales, Universidad de Antofagasta, Chile

En la Figura 9 se describe de forma general los componentes instrumentales del HPLC-MS-MS, esto incluye un sistema de introducción de muestra; una fuente de ionización (interfase) como por ejemplo el ESI, MALDI, entre otros; un acelerador de iones mediante un campo eléctrico; un analizador de masas donde se produce la discriminación entre los iones de diferente m/z , al ser sometidos a campos eléctricos o magnéticos constantes como por ejemplo cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), orbitrap (OT), entre otros y, un detector junto con un procesador adecuado de la señal. Una vez que en la interfase se ha llevado a

cabo, la transferencia de los iones desde la fase líquida a gaseosa, los iones son dirigidos hacia el analizador de masas, el cual permite la separación, fragmentación, detección y cuantificación de los analitos en estudio con un grado de sensibilidad y selectividad muy elevado, lo que proporciona información sobre su masa molecular (81,87).

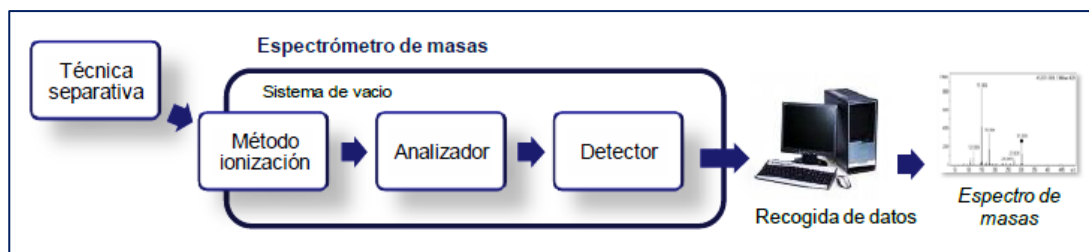


Figura 9. Esquema de acoplamiento de HPLC-MS-MS (87).

2.3.6. Espectrometría por absorción molecular UV-Visible

Como se mencionó anteriormente, los líquenes pueden sobrevivir en condiciones extremas (temperatura, desecación, radiación ultravioleta, entre otros). De esta manera, estos organismos resistentes al estrés, desarrollaron mecanismos adaptativos para hacer frente a una alta exposición solar, como son la detección de radiación, la disipación térmica, la activación de la defensa antioxidante y de las macromoléculas, la reparación de la membrana, etc., además biosintetizaron metabolitos protectores a los rayos UV. Como la mayoría de sus metabolitos secundarios específicos (compuestos liquénicos) tienen cromóforos, la espectrometría UV es útil para la detección e identificación de estos compuestos (6).

La espectrometría por absorción molecular UV-Visible es útil para la identificación y cuantificación de una gran cantidad de especies inorgánicas, orgánicas y bioinorgánicas. Por lo general, la absorción de radiación visible es resultado de la excitación de los electrones de enlace. Debido a esto, las longitudes de onda de las bandas de absorción se pueden correlacionar con los tipos de enlaces de la especie en estudio. Por tanto, la espectroscopía de absorción molecular es valiosa para identificar grupos funcionales en una molécula. Pero lo más importante son sus aplicaciones para la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes.

Todos los compuestos orgánicos son capaces de absorber radiación electromagnética, porque contienen electrones de valencia que pueden ser

excitados para llegar a niveles de energía superiores. La mayoría de las aplicaciones de espectroscopía de absorción en compuestos orgánicos, se basan en transiciones de los electrones n y π al estado excitado π^* , porque la energía requerida para estos procesos lleva las bandas de absorción hacia la región ultravioleta-visible (200 – 700 nm). Ambas transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$, requieren la presencia de un grupo funcional no saturado que aporte los orbitales π . A las moléculas que contienen dichos grupos funcionales y que son capaces de absorber la radiación UV-visible se les denomina cromóforos (37,81).

En la Figura 10 se muestra los rangos de absorción UV de clases de compuestos liquénicos (para las quinonas, se observan absorciones adicionales en el rango visible con un λ_{\max} medio de 458 y 529 nm) (6).

En la Tabla 9 se muestran las absorciones de algunos compuestos liquénicos, para dichas mediciones los solventes utilizados fueron metanol y etanol (88).

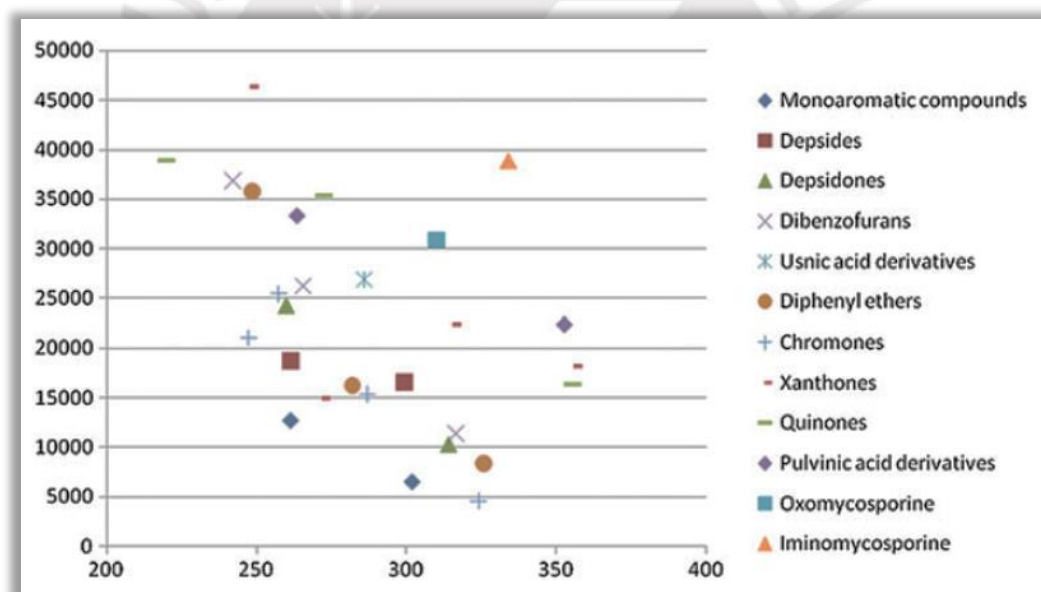


Figura 10. Rangos de absorción UV de clases de compuestos liquénicos (6).

Tabla 9. Absorciones de algunos compuestos liquénicos (88).

Compuesto liquénico	λ_{\max} (nm)
<i>Monoaromáticos</i>	245 – 278 299 – 305
<i>Dépsidos</i>	
Atranorina	251; 277
Ácido lecanórico	270; 307
<i>Depsidonas</i>	
Ácido protocetrárico	238; 312
Ácido virénsico	240; 308
<i>Dibenzofurano</i>	
Ácido porfirílico	248; 282
Ácido úsnico	232; 282
<i>Depsona</i>	
Ácido picrolíquénico	225; 250; 280



3. METODOLOGÍA

3.1. Reactivos, materiales y equipos

3.1.1. Reactivos

Los reactivos empleados se listan a continuación:

- n-hexano, Hex
- Diclorometano
- Cloroformo
- Acetato de etilo, AcOEt
- Acetona, Me₂CO
- Metanol, MeOH
- Ácido sulfúrico
- Hidróxido de potasio
- FAMES NLEA 2806 Mix (28 componentes) 99,8 %, Restek
- (+) - Ácido úsnico 99,8 %, Aldrich
- Cloroformo (CDCl₃) 99,8 atm % D, Merck
- DMSO-d₆ 99,9 atm % D, Merck

3.1.2. Equipos

- Rotavapor Buchi 236
- Baño con ultrasonido
- Lámpara UV 254 / 366 nm
- Cromatógrafo de Gas Agilent, Laboratorio Instrumentación, Sección Química, PUCP
- Espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 850, Laboratorio Instrumentación, Sección Química, PUCP
- Espectrómetro Infrarrojo, FT - IR, serie 1600, Perkin Elmer, Laboratorio Instrumentación, Sección Química, PUCP
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker ASCEND 500 MHz, Laboratorio Instrumentación, Sección Química, PUCP
- Cromatrotón Harrinson-Research Model 7924 T con disco de 4mm de sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck), Universidad de Chile, Chile
- Lámpara UV 254 / 366 nm, Universidad de Chile, Chile

- Rotavapor Buchi - PC 3001 VARIO^{PRO}, Universidad de Chile, Chile
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance III HD-400, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile
- Ultra cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un espectrofotómetro ESI-MS/MS Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate RSLC 3000, Universidad de Antofagasta, Chile

3.2. Recolecta e identificación del material liquénico

El líquen con el cual se trabajó en esta investigación fue recolectado por la autora del trabajo, en el Departamento de Junín, Provincia de Huancayo, Distrito de Huancayo, camino al Nevado de Huaytapallana, cuya coordenada geográfica es 11° 57' 15,50" S 75° 2' 33,77" W, WGS 84; a una altitud entre los 4900 a 5100 msnm, el 9 de enero de 2017. Las Figuras 11 y 12 presentan fotografías de la zona de recolección y del líquen en su hábitat respectivamente. La muestra fue identificada por el Blgo. Ángel Ramírez. y un ejemplar de referencia fue depositado en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con la clave USM 278427 (ver Anexo 2).

3.3. Secado y molienda del material liquénico

El líquen se limpió cuidadosamente y se secó en una estufa a la temperatura de 40 °C, por 24 horas. Esta muestra se pulverizó a grano fino en un molino eléctrico y luego se pasó por un tamiz de 850 µm.

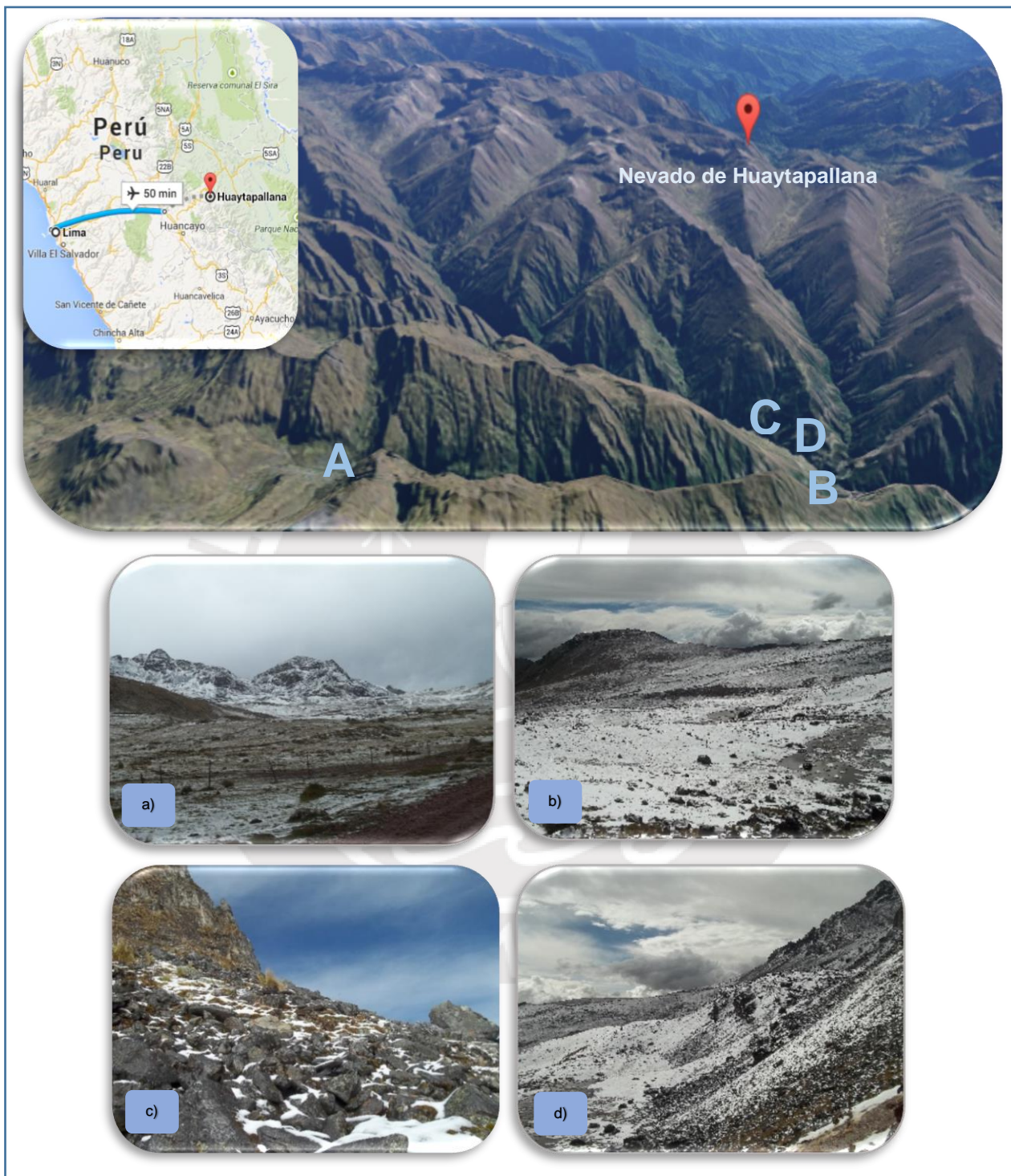


Figura 11. Lugar de recolección.
a) - d) Camino al Nevado de Huaytapallana, Prov. Huancayo, Dpto. Junín.

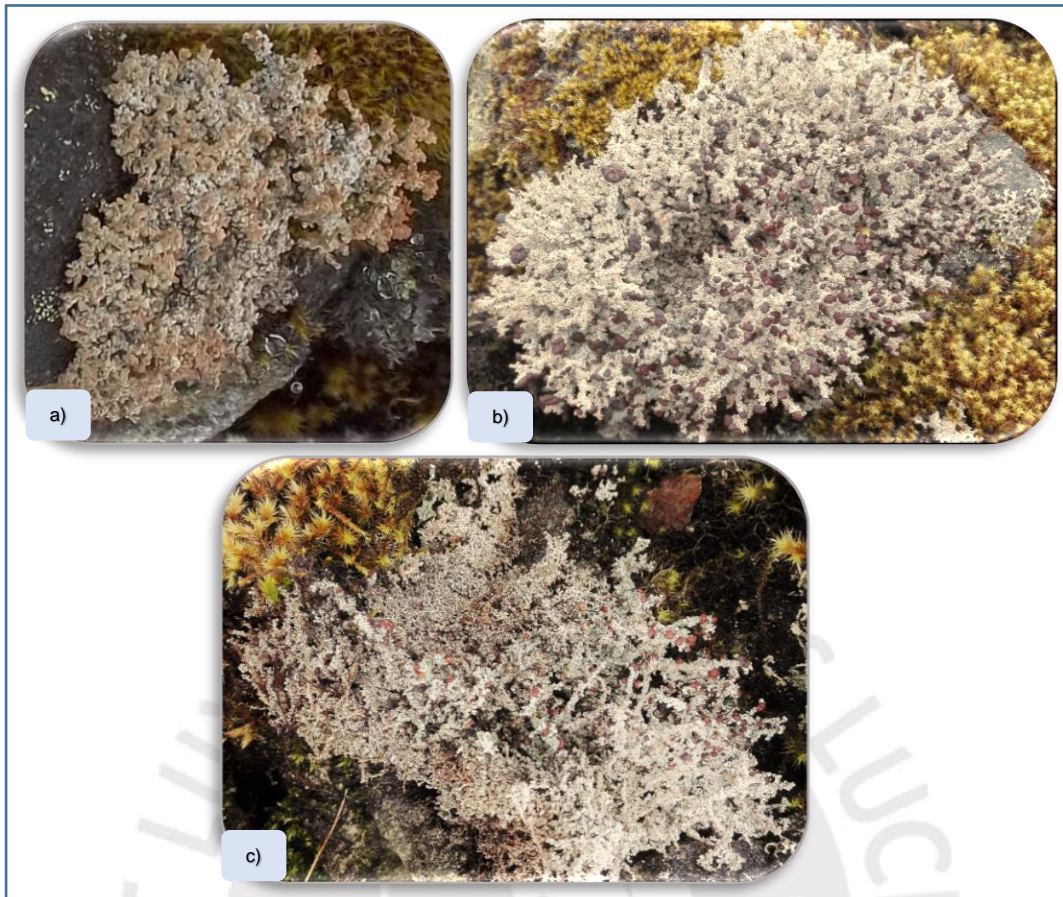


Figura 12. Liqen *Stereocaulon glareosum*.

a) - c) Fotografías del líquen en el lugar de recolecta.

3.4. Análisis cualitativo

3.4.1. Análisis preliminar

3.4.1.1. Reacciones de coloración

Se realizaron reacciones de coloración específicos para compuestos líquénicos, a un extracto de la muestra, según los procedimientos de Brodo (29) y White (89), ver Anexo 3, como se detalla en la Figura 13.

3.4.1.2. Marcha fitoquímica

Se realizó para determinar los metabolitos presentes en la muestra líquénica siguiendo el procedimiento adaptado por Reyna (90), de acuerdo a Rondina & Coussio (91), ver Anexo 4. En la Figura 14 se expone el diagrama de proceso de dicho análisis.

3.4.2. Perfil metabolómico del líquen *S. glareosum* usando UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS

3.4.2.1. Procedimiento

La identificación de los metabolitos presentes en el líquen mediante UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS es en base al procedimiento descrito por Castro et. al. (82).

3.4.2.2. Preparación de la muestra líquénica

Se extrajo 0,5 g de muestra líquénica seca y molida, con metanol durante 30 min, con ayuda de un ultrasonido a temperatura ambiente (por triplicado). Luego se filtró y se concentró en rotavapor.

Se pesó 5 mg del extracto metanólico y se disolvió con 2 mL de metanol HPLC, se sonicó durante 15 min a temperatura ambiente, luego se filtró a través de una membrana microporosa de 0,45 μm (PTFE filter), finalmente se tomó una alícuota para inyectar al equipo. Las condiciones instrumentales se detallan en la Tabla 10. El software usado para la recopilación y análisis de datos fue el XCalibur 2.3 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

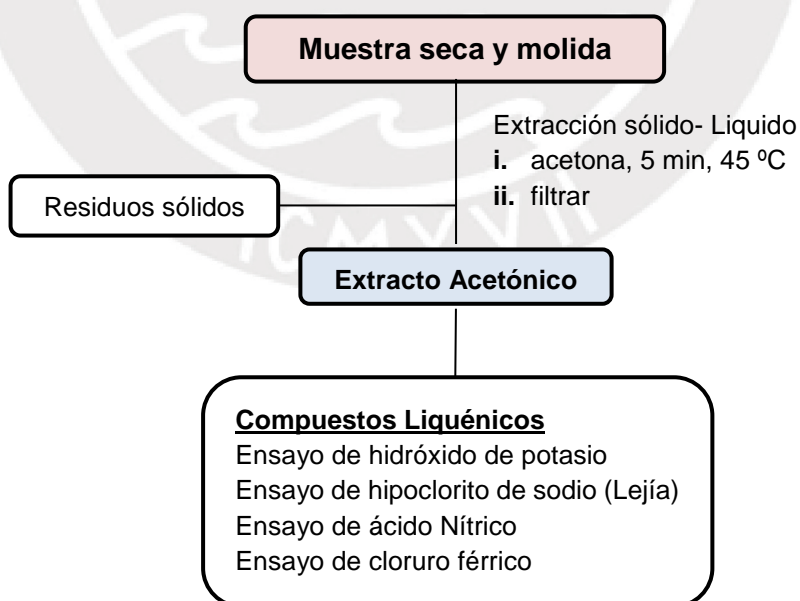


Figura 13. Proceso de reacciones de coloración para compuestos líquénicos

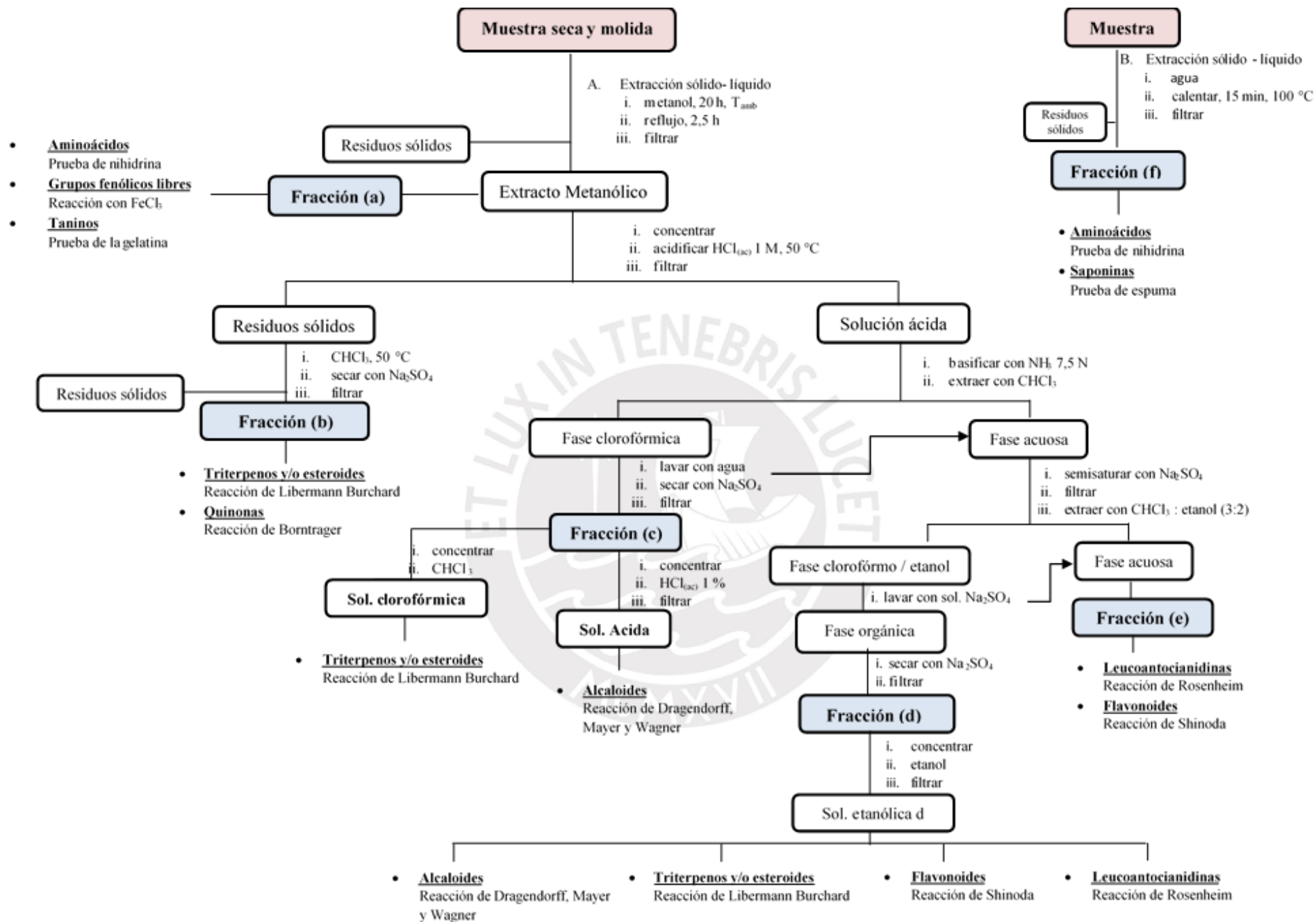


Figura 14. Diagrama de proceso de la marcha fitoquímica.

Tabla 10. Condiciones instrumentales del UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS.

UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS	Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate RSLC 3000
Detector	PDA (200 – 800 nm)
Columna	UHPLC C18 (Acclaim, 150 mm x 4,6 mm ID, 5 m, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania)
Estándares internos del espectrómetro de masas	Clorhidrato de buspirona, dodecil sulfato de sodio y sal sódica del ácido taurocólico (Sigma Aldrich)
Fase móvil	A: Solución acuosa al 1% de ácido fórmico B: Acetonitrilo Programa de gradiente [tiempo (min),% B]: (0, 5); (5, 5); (10, 30); (15, 30); (20, 70); (25, 70); (35, 5) y 12 min para equilibrar la columna antes de cada inyección.
Flujo	1,00 mL/min
Volumen de inyección	10 µl
Longitud de onda	254, 280, 320 y 440 nm
Rango de escaneo	100 – 1000 m/z
Energía de colisión (HCD)	30 kV

3.4.3. Análisis de ácidos grasos mediante cromatógrafo de gases (GC-FID)

3.4.3.1. Procedimiento

La identificación de ácidos grasos presentes en el líquen mediante GC-FID es en base al procedimiento descrito por Orozco et al. (92) con algunas modificaciones.

3.4.3.2. Preparación de la muestra líquénica

Para este análisis se emplearon 10 g de muestra líquénica seca y molida, se realizaron 3 extracciones sucesivas con metanol por 30 min con ayuda de un ultrasonido a temperatura ambiente. Luego se filtró y se concentró en un rotavapor, se obtuvo 1,4 g de extracto metanólico.

Para la identificación de FAMES en el extracto metanólico se procede con la transesterificación de la siguiente manera:

- i. Se pesó 200 mg de extracto metanólico, se añadió 2 mL KOH 2 N y se sonicó durante 1 hora a 50 °C.

- ii. La parte insaponificable se extrajo con 2 mL de hexano durante 15 min con ayuda de ultrasonido, luego se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm para la separación de las dos fases orgánicas.
- iii. La fase hexánica se llevó a 250 μ L en un inserto, quedando listo para el análisis por GC-FID. Las condiciones instrumentales se detallan en la Tabla 11.

3.4.3.3. Identificación de ácidos grasos

Se utilizó una muestra patrón de 28 FAMEs para la identificación de metilésteres de los ácidos grasos presentes en la muestra liquénica. Para esto se procedió a realizar 6 diluciones del patrón, a fin de obtener un tiempo de retención (t_r) promedio de cada estándar y así comparar los t_r de los estándares con los obtenidos para la muestra liquénica y, en base a ello identificar los FAMEs presentes. Las condiciones instrumentales con las cuales se trabajó en el GC-FID se describen en la Tabla 11.

Tabla 11 . Condiciones instrumentales del GC-FID.

GC-FID	Cromatógrafo de gases Agilent
Detector	FID
Columna	DB-26 (Cianopropilo al 50 %, dimetilpolisiloxino al 50 %)
Temperatura de columna	12 min / 50 - 100 °C a 5 °/min; 5 min / 100 - 150 °C a 10 °/min; 18 min / 150 - 230 °C a 20 °/min.
Temperatura de inyector	250 °C
Temperatura de detector	300 °C
Gas portador	He
Flujo de H ₂	30 mL/min
Volumen de inyección	1 μ L
Split	1:100

3.5. Aislamiento: extracción, separación y purificación

3.5.1. Extracción

La muestra liquénica seca y molida (300 g) se sometió a tres extracciones sucesivas por maceración con 3 L de metanol a temperatura ambiente, con

agitación periódica durante 1 semana. El extracto resultante se filtró y concentró en un rotavapor y se obtuvo 44,8 g de extracto metanólico, EM, de color ámbar-rojizo, ver Figura 15.

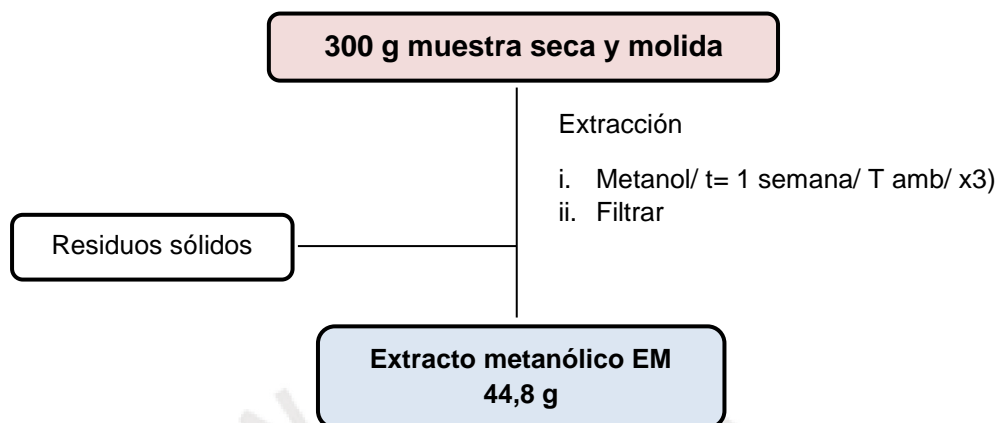


Figura 15. Obtención del extracto metanólico.

3.5.2. Análisis preliminar por cromatografía en capa fina (TLC)

Para el análisis preliminar se trabajó con:

- i. Muestra: Extracto metanólico, EM
- ii. Referencia: Se dispuso de patrones de ácido úsnico, atranorina y ácido lobárico
- iii. Eluyentes: Hex:AcOEt (7:3); Hex:AcOEt (9:1); CH₂Cl₂:MeOH (9:1); CH₂Cl₂:MeOH (3:1).
- iv. Placa: Cromatofolio de aluminio Kieselgel 60 F254, 0,25 mm
- v. Revelador: Lámpara UV (254 y 366 nm) y H₂SO₄ 10 %, 110 °C

3.5.3. Separación y purificación

El extracto EM se dividió en 3 partes y se sometió a separación y purificación como se esquematiza en la Figura 16.

La primera parte de EM (300 mg) se sometió a fraccionamiento en base a la solubilidad de sus componentes, con mezcla de solventes [CHCl₃:MeOH (1:1) y MeOH:Me₂CO (1:1)].

De la fracción CHCl₃:MeOH precipitó el compuesto S1 (100 mg) en forma de agujas de color blanco, soluble en acetona y cloroformo. Al analizar este

compuesto mediante TLC (Hex:AcOEt (7:3)), revelado con UV (366 nm) presentó una sola mancha de color naranja oscuro. Asimismo, al ser revelado con solución de H₂SO₄ 10 % en metanol, se observó una mancha de color amarillo (R_f = 0,70) lo que indica la presencia de un compuesto con aparente pureza.

El residuo 1 se extrajo con MeOH:Me₂CO, del que quedó el compuesto S2 (7,7 mg), polvo de color blanco, soluble en DMSO. Este compuesto no pudo ser revelado mediante TLC.

Al concentrar la fracción MeOH:Me₂CO se obtuvo un compuesto S3 (9,3 mg) de color blanco, soluble en cloroformo y ligeramente soluble en metanol caliente. Al analizar este compuesto mediante TLC (CH₂Cl₂:MeOH (9:1)), revelado con UV (254 nm) presentó una sola mancha de color negro. Asimismo, al ser revelado con solución de H₂SO₄ 10 % en metanol, se observó una mancha de color amarillo (R_f = 0,22) lo que sugiere la presencia de un solo compuesto.

La segunda parte de EM (26,4 g) se sometió a fraccionamiento primario por CC. Se usó como fase estacionaria sílica gel 60 (0,063 - 0,200 mm) en una columna de 6 cm de diámetro x 30 cm de relleno, se eluyó por gradiente de polaridad creciente, como se indica en la Tabla 12. Se obtuvieron 23 fracciones primarias, que se reagruparon en 8 fracciones combinadas (A - H), según su similitud cromatográfica en TLC. En la Figura 16 se esquematiza las fracciones que se obtuvieron.

Tabla 12. Fraccionamiento primario de EM.

Fase móvil	Proporción %	Fracciones	Fracciones combinadas
Hex	100	1 – 4	A
Hex - CHCl ₃	75:25	5 – 7	
Hex - CHCl ₃	50:50	8 – 11	B
Hex - CHCl ₃	25:75	12 – 14	C
CHCl ₃	100	15 – 16	
CHCl ₃ - Me ₂ CO	25:75	17	D
CHCl ₃ - Me ₂ CO	50:50	18 – 19	E
CHCl ₃ - Me ₂ CO	25:75	20	F
Me ₂ CO	100	21	G
MeOH	100	22 – 23	H

La fracción A (420 mg) se sometió a fraccionamiento secundario por CC. Se usó como fase estacionaria sephadex LH-20 (25 - 100 μ m) en una columna de 3,5 cm de diámetro x 29,4 cm de relleno, se eluyó con una fase móvil isocrática [Hex:CH₂Cl₂:MeOH (3:2:1)]. Se obtuvieron 45 fracciones, que se reagruparon en 5 fracciones combinadas (A1 - A5) según su similitud cromatográfica en TLC.

Al concentrar la fracción A5 se obtuvo un compuesto 1 (10 mg), cristales en forma de aguja de color blanco, soluble en hexano y cloroformo. Al analizar este compuesto mediante TLC (Hex:AcOEt (7:3)), revelado con UV (254 nm) presentó una sola mancha de color violtea ($R_f = 0,76$), lo que sugiere la presencia de un solo compuesto.

Las fracciones A3 y A4 se sometieron a purificación con cromatotrón, eluyendo con una fase móvil [Hex:AcOEt (98:2)]. Se obtuvieron 25 fracciones, que se reagruparon en 5 fracciones combinadas (A'1 - A'5) según su similitud cromatográfica en TLC. Las fracciones A'1, A'2 y A'3 dieron los compuestos 2 (1,6 mg), 3 (2 mg) y 4 (1,5 mg) respectivamente, de apariencia oleosa, de color amarillo, solubles en cloroformo. Al analizar estos compuestos mediante TLC (Hex:AcOEt (9:1)), revelado con solución de H₂SO₄ 10 % en metanol presentó una sola mancha de color ámbar para cada uno. Bajo esas condiciones los compuestos 2, 3 y 4 tienen un R_f 0,56; 0,54 y 0,51 respectivamente. La fracción A'4 dio el compuesto 5 (11 mg) en forma de agujas, de color blanco, soluble en cloroformo y acetona. Este compuesto presentó una sola mancha ($R_f = 0,70$) mediante TLC eluida con Hex:AcOEt (7:3), lo cual nos sugiere un solo compuesto.

La fracción B (3 g) se sometió a fraccionamiento secundario por CC. Se usó como fase estacionaria sephadex LH-20 (25 - 100 μ m) en una columna de 6,2 cm de diámetro x 36,2 cm de relleno, se eluyó con una fase móvil isocrática [Hex:CH₂Cl₂:MeOH (4,5:1:3)]. Se obtuvieron 80 fracciones, que se reagruparon en 11 fracciones combinadas (B1 - B11) según su similitud cromatográfica en TLC.

Al concentrarse la fracción B8 se obtuvo el compuesto 6 (100 mg), cristales en forma de aguja de color naranja, soluble en cloroformo y acetona. Al analizar este compuesto mediante TLC (Hex:AcOEt (7:3)), revelado con UV (254 nm) presentó una sola mancha de color negro. Asimismo, al ser revelado con

solución de H₂SO₄ 10 % en metanol, se observó una mancha de color amarillo intenso ($R_f = 0,56$) lo que sugiere la presencia de un solo compuesto.

Las fracciones B9 y B10 se juntaron (77 mg) y se sometió a purificación con cromatotron, eluyendo con una fase móvil [Hex:AcOEt (98:2)]. Se obtuvieron 60 fracciones, que se reagruparon en 5 fracciones combinadas (B'1 - B'5) según su similitud cromatográfica en TLC. Al concentrarse la fracción B'1 se obtuvo un compuesto 7 (2 mg), cristales en forma de aguja de color naranja, soluble en cloroformo y acetona. Este compuesto mostró una sola mancha en TLC eluida con Hex:AcOEt (7:3). Bajo esas condiciones el compuesto tiene un R_f 0,56. Al concentrarse la fracción B'3 se obtuvo el compuesto 8 (2 mg), cristales en forma de aguja de color blanco, soluble en cloroformo y acetona. Al analizar este compuesto por TLC (Hex:AcOEt (7:3)) revelado con solución de H₂SO₄ 10 % en metanol, se observó una mancha de color amarillo tenue. Bajo esas condiciones el compuesto tiene un R_f 0,51.

La tercera parte de EM (5,54 g) se sometió a fraccionamiento por CC. Se usó como fase estacionaria sephadex LH-20 (25 - 100 μ m) en una columna de 6,7 cm de diámetro x 36,5 cm de relleno, se eluyó con una fase móvil isocrática [Hex:CH₂Cl₂:MeOH (2:1:3)]. Se obtuvieron 150 fracciones, que se reagruparon en 15 fracciones combinadas (F1 - F15), según su similitud cromatográfica en TLC. En la Figura 16 se esquematiza las fracciones que se obtuvieron.

De la fracción F4 precipitó un sólido amarillo (compuesto 9, 10 mg), soluble en cloroformo y acetona. Al analizar este compuesto por TLC (CH₂Cl₂:MeOH (9:1)) revelado con solución de H₂SO₄ 10 % en metanol, se observó una mancha de color ámbar ($R_f = 0,70$) lo que sugiere la presencia de un solo compuesto.

De las fracciones F5 al F9 precipitaron unos cristales blancos, los cuales se agruparon como compuesto 10 (251 mg) por su similitud cromatográfica en TLC. Estos cristales son solubles en cloroformo. Este compuesto mostró una sola mancha en TLC eluida con CH₂Cl₂:MeOH (9:1). Bajo esas condiciones el compuesto tiene un R_f 0,22.

Realizada la separación y purificación de los metabolitos en las tres etapas, se procedió con la elucidación estructural mediante las técnicas espectroscópicas IR, RMN-¹H, RMN-¹³C.



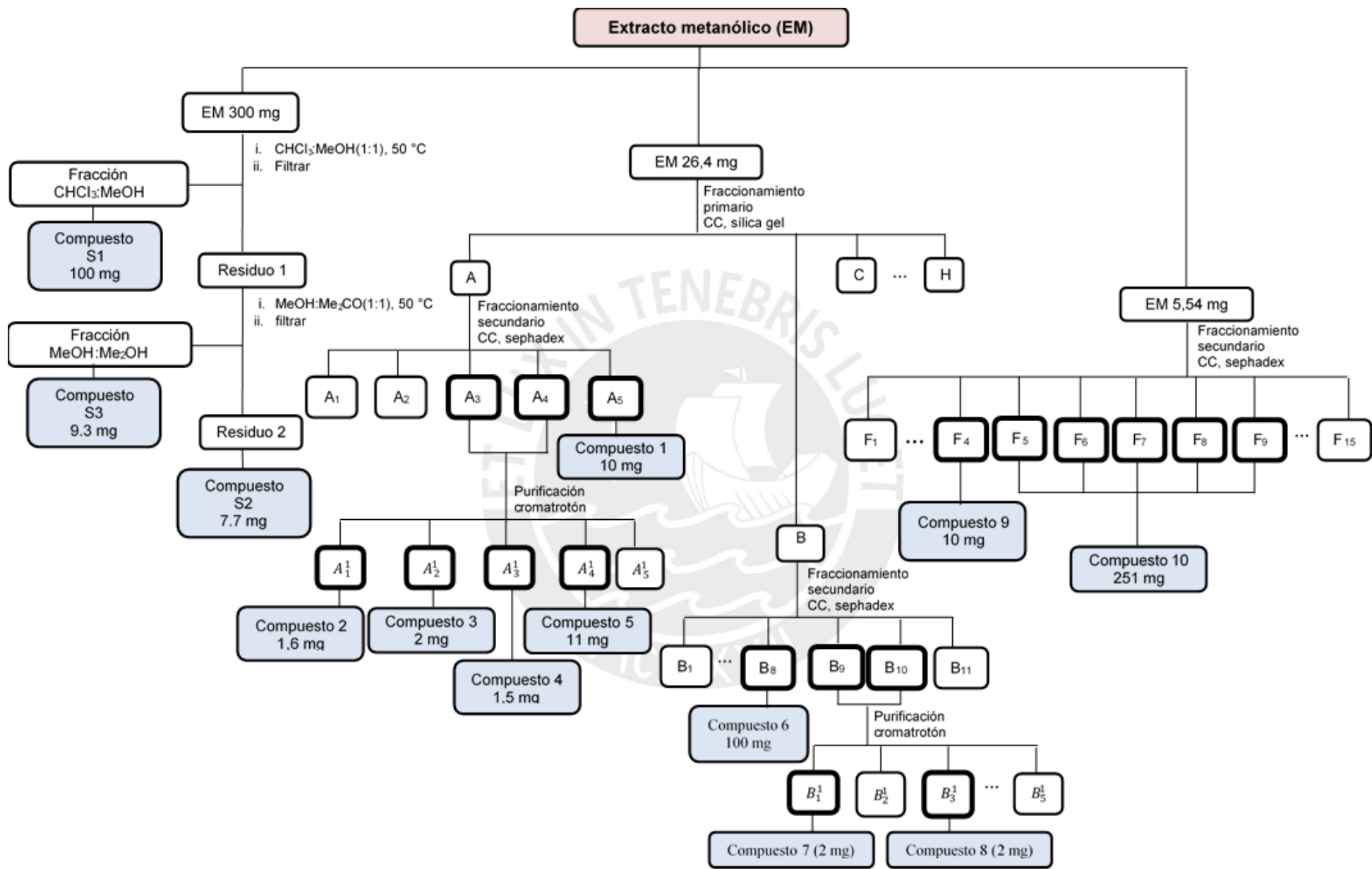


Figura 16. Proceso de separación y purificación del extracto metanólico EM.

3.6. Análisis cuantitativo de ácido úsnico

3.6.1. Procedimiento

La determinación cuantitativa de ácido úsnico presente en el líquen mediante espectrofotometría UV-Visible, es en base al procedimiento descrito por Castro (8).

3.6.2. Preparación de la muestra líquénica

- i. Se pesó 1 g de muestra, por triplicado, para cada una se realizaron tres extracciones por maceración con cloroformo a temperatura ambiente, durante una semana y finalmente, extracción en un equipo de soxhlet por cuatro horas.
- ii. Para cada muestra se concentraron los extractos hasta un volumen de 100 mL, dando las muestras M1, M2 y M3.
- iii. De las muestras ya preparadas, se procedió a realizar diluciones de 1,5/25 y 0,6/10.
- iv. Se midieron las absorbancias máximas de las diluciones obtenidas para cada muestra.

3.6.3. Curva de calibración

- i. La muestra patrón de ácido úsnico se secó en una estufa a una temperatura de 40 °C, por 30 min.
- ii. Luego se pesó 0,0020 g de ácido úsnico seco y se preparó una solución de 40 ppm de ácido úsnico en una fiola de 50 mL, utilizando como solvente cloroformo.
- iii. De la muestra patrón ya preparada, se procedió a realizar 9 diluciones en fiolas de 25 mL, para así obtener muestras estándares desde 1 a 5 ppm de ácido úsnico.
- iv. Se midieron las absorbancias máximas de las soluciones.
- v. Se graficó concentración versus absorbancia para obtener la curva de calibración.

3.6.4. Determinación cuantitativa de ácido úsnico en la muestra líquénica

Se realizó el cálculo del contenido de ácido úsnico expresado en porcentaje en masa de ácido úsnico por gramo de muestra líquénica, a partir de los datos obtenidos en las secciones 3.6.2 y 3.6.3.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Análisis cualitativo

Los resultados de las reacciones de coloración para compuestos líquénicos fueron positivos, evidenciando la presencia de atranorina y ácido estíctico. Ver Tabla 32 en Anexo 3.

Asimismo, la marcha fitoquímica para determinar metabolitos presentes en el líquen *S. glareosum* evidenciaron la presencia de aminogrupos primarios o secundarios (+++), grupos fenólicos (+++), triterpenos y/o esteroides (+++) y quinonas (+). Ver Tabla 33 en Anexo 4.

4.2. Perfil metabolómico del líquen *S. glareosum* usando UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS

En base al perfil metabolómico del extracto metanólico de líquen *S. glareosum* se identificó por primera vez 48 compuestos (Figura 34, ver Anexo 5), con la ayuda de sus espectros característicos UV-vis y de los patrones de fragmentación del ESI-MS-MS (83,84,86,92–95). Todos los compuestos se detectaron en modo negativo mediante el uso de UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS (ver Figura 17), de tal modo que se identificó 36 compuestos, entre aromáticos, depépsidos, depépsidonas, difeniléteres, dibenzofuranos, lípidos y polioles y otros 12 compuestos que se proponen en base a sus espectros característicos UV-vis y ESI-MS-MS, así como la relación que guardan con ciertos compuestos líquénicos. En la Tabla 13 se muestra la identificación tentativa de los compuestos detectados en orden, según su tiempo de retención (tr, min), asimismo su composición elemental $[M - H]^-$, su masa teórica (m/z), su masa medida (m/z), el % error (ppm), el tipo de metabolito y la masa de los iones fragmentos (MS^2 , ppm).

Tabla 13. Identificación de metabolitos en *Stereocaluon glareosum* mediante la técnica UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS.

Pico	Identificación tentativa	Composición elemental [M – H] ⁻	Tiempo de retención tr (min)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	% error (ppm)	Tipo de metabolito	Masa del ión MS ² (ppm)	Referencia
1	Manitol	C ₆ H ₁₃ O ₆ ⁻	1,34	181,07176	181,07140	1,99	P	151,06055	-
2	Ácido glucónico ^a	C ₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	1,39	195,05103	195,05058	2,31	P	177,03969	(94)
								159,02914	
								151,06044	
								129,01837	
3	Acido arábico	C ₅ H ₉ O ₆ ⁻	1,39	165,04046	165,03990	3,39	P	129,01851	-
4	Arahitol	C ₅ H ₁₁ O ₅ ⁻	1,48	151,06120	151,06053	4,44	P	133,04996	-
5	Ácido 2,5-didehidro-D-glucónico	C ₆ H ₇ O ₇ ⁻	1,57	191,01973	191,01964	0,47	P	147,02940	-
								129,01871	
6	Ácido isostrepsílico	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁻	11,7	287,05611	287,05600	0,38	DBF	257,04532	(46)
								243,06596	
								213,05544	
7	Ácido 4,5-dihidroxi-2-nonenoico	C ₉ H ₁₅ O ₄ ⁻	12,26	187,09760	187,09711	2,62	L	145,04997	(82)
								101,02350	
8	Atranol	C ₈ H ₇ O ₃ ⁻	13,25	151,04007	151,03940	4,44	A	123,04434	(82,83)
9	Estrepsilina	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	14,74	269,04555	269,04538	0,63	DBF	149,02365	(95)
								123,04414	
10	Acido estíctico	C ₁₉ H ₁₃ O ₉ ⁻	17,82	385,05651	385,05637	0,36	D	357,06094	(84,93)
								341,06625	
11	Ácido tetrahidroxieicosanoico	C ₂₀ H ₃₉ O ₆ ⁻	17,84	375,27521	375,27530	0,24	L	313,20209	(86,96)
12	Ácido 6-O-metilnorascomático	C ₁₆ H ₁₃ O ₅ ⁻	18,18	285,07685	285,07669	0,56	DBF	226,06325	-
								255,06601	
13	Ácido pentahidroxidocosanoico	C ₂₂ H ₄₃ O ₇ ⁻	18,19	419,30143	419,30139	0,10	L	401,29105	(82,96)
								375,31186	

Tabla 13. Continua

Pico	Identificación tentativa	Composición elemental [M - H] ⁻	Tiempo de retención tr (min)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	% error (ppm)	Tipo de metabolito	Masa del ión MS ² (ppm)	Referencia
14	Derivado del ácido elatínico	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	18,30	431,09837	431,09836	0,02	D	387,10745 343,11810	(86,97)
15	Ácido hexahidroxiohexacosanoico	C ₂₆ H ₄₉ O ₉ ⁻	18,62	505,33821	505,33801	0,40	L	487,32770 461,34842	-
16	Ácido tetrahidroxiheneicosanoico	C ₂₁ H ₄₁ O ₆ ⁻	18,73	389,29086	389,29099	0,33	L	345,22864	(96)
17	Ácido pentahidroxopentacosanoico	C ₂₅ H ₄₇ O ₈ ⁻	19,13	475,32764	475,32773	0,19	L	431,33783	-
18	Ácido tetrahidroxidocosanoico	C ₂₂ H ₄₃ O ₆ ⁻	19,16	403,30651	403,30676	0,62	L	385,29532	(82,86,95,96)
19	Ácido pentahidroxiohexacosanoico	C ₂₆ H ₄₉ O ₈ ⁻	19,61	489,34329	489,34341	0,25	L	471,33228 445,35260	-
20	Ácido tetrahidroxitricosanoico	C ₂₃ H ₄₅ O ₆ ⁻	19,94	417,32216	417,32239	0,55	L	399,31128 173,11749	(82,86,96)
21	Ácido 2-pentilbenzoico	C ₁₂ H ₁₅ O ₂ ⁻	20,15	191,10775	191,10733	2,20	A	121,02874	-
22	Lobarina	C ₂₅ H ₂₉ O ₉ ⁻	20,27	473,18171	473,18185	0,30	DE	411,18140 251,09221 239,09277 223,09680	(93)
23	Haematomato de metilo ^a	C ₁₀ H ₉ O ₅ ⁻	20,59	209,04517	209,04517	0,00	A	177,01845 149,02324 133,02922	(46)
24	Ácido pentahidroxioheptacosanoico	C ₂₇ H ₅₁ O ₈ ⁻	20,60	503,35894	503,35873	0,42	L	485,34647 459,36902	-
25	Pentahidroxioheptacosanoato de metilo	C ₂₈ H ₅₃ O ₈ ⁻	20,62	517,37459	517,37451	0,15	L	499,36310 459,36902 487,36423	-
26	Ácido dehidroxiglomelónico	C ₂₅ H ₂₅ O ₈ ⁻	20,82	453,15549	453,15543	0,13	D	409,16586	-

Tabla 13. Continua

Pico	Identificación tentativa	Composición elemental [M - H] ⁻	Tiempo de retención tr (min)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	% error (ppm)	Tipo de metabolito	Masa del ión MS ² (ppm)	Referencia
27	Sakisacaulon A	C ₂₄ H ₂₉ O ₇ ⁻	20,99	429,19188	429,19193	0,12	DE	385,20181 179,10736 251,09203	(46,93)
28	Ácido epiforélico II	C ₂₆ H ₃₁ O ₉ ⁻	21,35	487,19736	487,19733	0,06	DE	251,09233 237,11296 167,03433	-
29	Ácido norlobárico	C ₂₄ H ₂₅ O ₈ ⁻	21,63	441,15549	441,15521	0,63	D	397,16562 353,17508	-
30	Lobarstina	C ₂₅ H ₂₇ O ₈ ⁻	22,15	455,17114	455,17105	0,20	DE	223,09720	-
31	Derivado del ácido glomeliferónico	C ₂₅ H ₂₇ O ₈ ⁻	22,39	455,17114	455,17120	0,13	D	411,18161 379,15601	-
32	Conloxodina	C ₂₃ H ₂₃ O ₈ ⁻	22,45	427,13984	427,14011	0,63	D	383,14957 281,08167	-
33	Ácido glomeliferónico	C ₂₅ H ₂₇ O ₈ ⁻	22,81	455,17114	455,17136	0,48	D	411,18195 367,19080 251,09244 235,10062 223,09726 207,10260	-
34	Ácido anziaico	C ₂₄ H ₂₉ O ₇ ⁻	22,93	429,19188	429,19244	1,30	d	223,09732 205,08653 179,10733	-
35	Ácido esquemático	C ₁₉ H ₁₇ O ₉ ⁻	23,17	389,08781	389,08798	0,44	d	211,02434 181,05000 165,05530 137,06007	(86,95)

Tabla 13. Continua

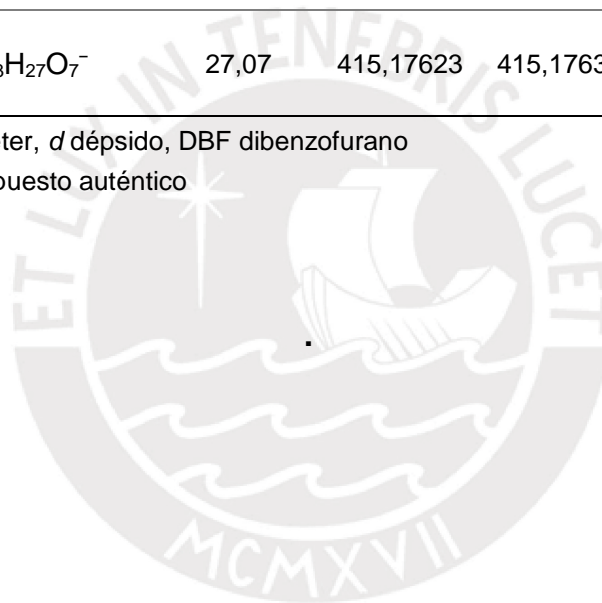
Pico	Identificación tentativa	Composición elemental [M - H] ⁻	Tiempo de retención tr (min)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	% error (ppm)	Tipo de metabolito	Masa del ión MS ² (ppm)	Referencia
36	Derivado del ácido lobárico	C ₂₅ H ₂₅ O ₈ ⁻	23,26	453,15549	453,15558	0,20	D	409,16595 365,17670	-
37	Derivado de loxodina	C ₂₅ H ₂₅ O ₈ ⁻	23,34	453,15549	453,15570	0,46	D	409,16602 379,15619	-
38	Ácido 2-heptil-4-metilbenzoico	C ₁₅ H ₂₁ O ₂ ⁻	23,39	233,15470	233,15442	1,20	A	135,04430 121,02870	-
39	Sakisacaulon esterificado	C ₂₅ H ₃₁ O ₇ ⁻	23,52	443,20753	443,20776	0,52	DE	265,10806 207,10217 179,10701 109,03033	(46)
40	Loxodina	C ₂₅ H ₂₇ O ₈ ⁻	23,76	455,17114	455,17114	0,00	D	411,18173 379,15619 309,11307	-
41	Ácido lobárico ^a	C ₂₅ H ₂₇ O ₈ ⁻	24,35	455,17114	455,17114	0,00	D	411,17941 367,19205 352,16806 296,10342	(82,83,93,96)
42	Ácido úsnico	C ₁₈ H ₁₅ O ₇ ⁻	25,49	343,08233	343,08246	0,38	DBF	328,05978 259,06116 231,06638	(82,83,93,96)
43	Derivado del ácido haematómico	C ₉ H ₅ O ₄ ⁻	25,55	177,01933	177,01901	1,81	A	133,02864 119,04935 105,03372	-
44	Atranorina ^a	C ₁₉ H ₁₇ O ₈ ⁻	25,79	373,09289	373,09296	0,19	d	177,01866 163,03946	(82,83,93)
45	4-O-metilolivetolcarboxilato de etilo	C ₁₅ H ₂₁ O ₄ ⁻	26,23	265,14453	265,14786	12,56	A	205,08665 163,03943	-

Tabla 13. Continua

Pico	Identificación tentativa	Composición elemental [M - H] ⁻	Tiempo de retención tr (min)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	% error (ppm)	Tipo de metabolito	Masa del ión MS ² (ppm)	Referencia
46	Ácido perlatólico	C ₂₅ H ₃₁ O ₇ ⁻	26,90	443,20753	443,20764	0,25	d	223,09663 205,08656 161,09698	(93)
47	Derivado del ácido protoconstipático	C ₂₁ H ₂₉ O ₅ ⁻	26,96	361,20205	361,20218	0,36	L	317,21213 299,20255	-
48	Norlobariol	C ₂₃ H ₂₇ O ₇ ⁻	27,07	415,17623	415,17639	0,39	DE	237,07675 219,06627 179,10716	-

P poliol, *L* lípido, *A* aromático, *D* depsidona, DE difeniléter, *d* dépsido, DBF dibenzofurano

^a Identificado por experimentos de adición con un compuesto auténtico



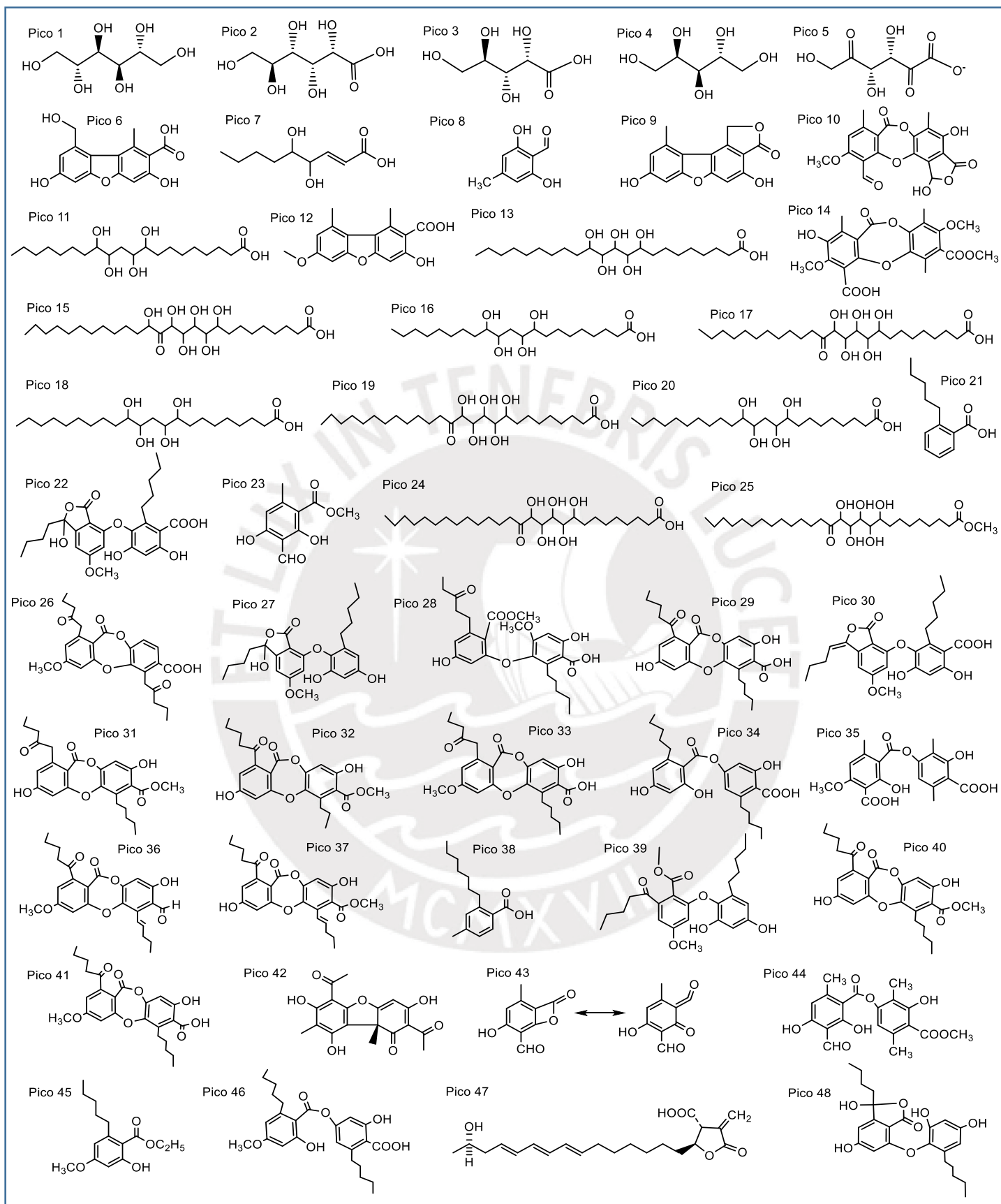


Figura 17. Estructuras químicas de los compuestos identificados mediante el UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS

4.2.1. Compuestos aromáticos

Se identificó 6 compuestos aromáticos correspondientes a los picos 8, 21, 23, 38, 43 y 45 mediante el análisis UHPLC-PDA y HRMS-MS. El pico 8 fue identificado como atranol (82,83), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 151,03940; cuya fragmentación produjo un ion MS^2 m/z 123,04434 $[M - H - CO]^-$; ver Figura 18. El pico 21 fue asignado al ácido 2-pentilbenzoico, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 191,10733; su fragmentación produjo un ión de m/z 121,02874 $[C_7H_5O_2]^-$. El pico 23 fue identificado como haematomato de metilo (46), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 209,04517; cuya fragmentación produjo los iones MS^2 m/z 177,01845 $[M - H - CH_3OH]^-$; 149,02324 $[M - H - CO]^-$ y 133,02922 $[M - H - CO_2]^-$. El pico 38 fue asignado al ácido 2-heptil-4-metilbenzoico, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 233,15442; su fragmentación produjo los iones m/z 135,04430 $[C_8H_7O_2]^-$ y 121,02870 $[C_7H_5O_2]^-$. El pico 43 con un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 177,01901; fue tentativamente identificado como derivado del ácido haematómico, según sus patrones de fragmentación.

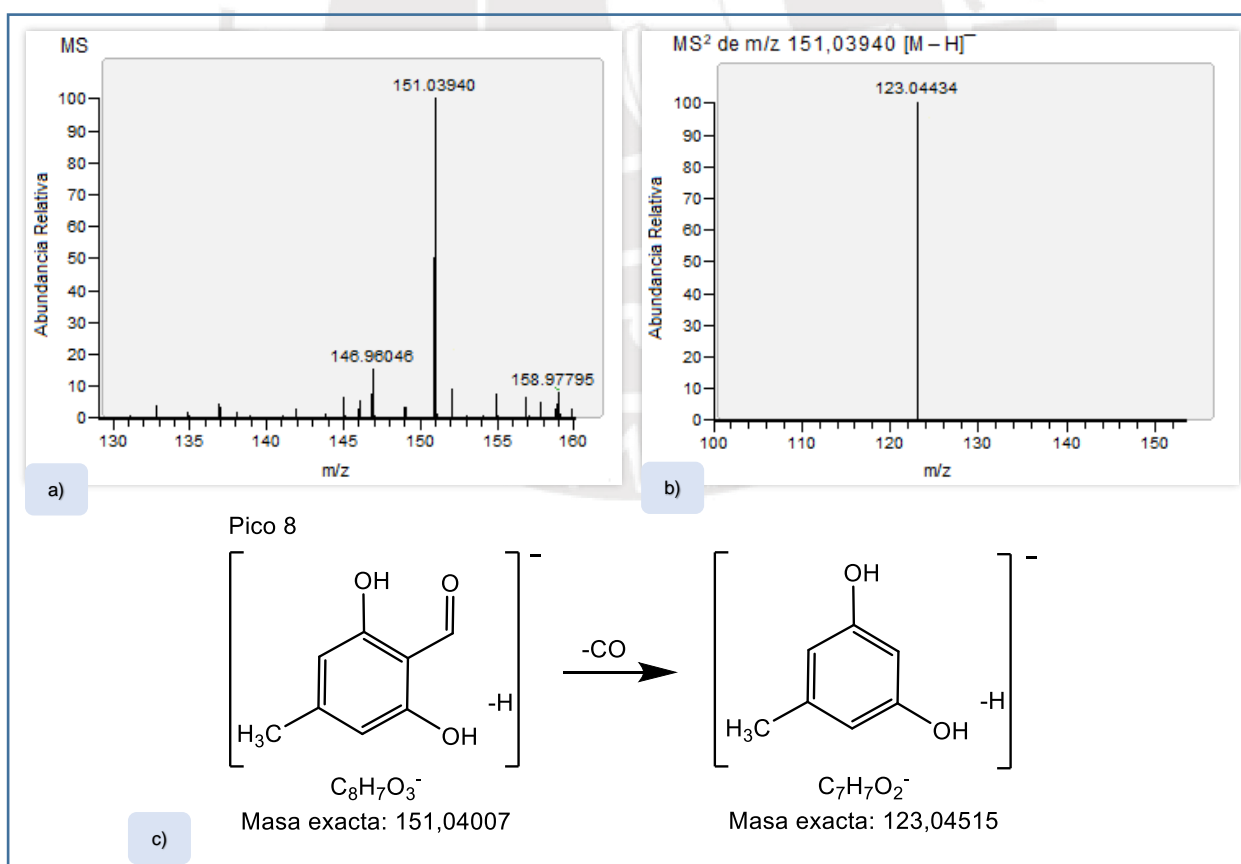


Figura 18. a) Espectro MS del ión molecular $[M - H]^-$ de atranol. b) MS^2 . c) Propuesta de fragmentación.

Finalmente, el pico 45 fue asignado al 4-O-metilolivetolcarboxilato de etilo, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 265,14786; su fragmentación produjo los iones m/z 205,08665 $[M - H - C_3H_8O]^-$ y 163,03943 $[M - H - C_6H_{14}O]^-$.

4.2.2. Dépsidos

Huneck (35) describió por primera vez la principal ruta de fragmentación de los dépsidos, que consiste en la escisión del enlace éster que une los anillos aromáticos, para dar lugar a partes fenólicas de la molécula, ver Figura 19. Esta fragmentación puede ser seguida por la pérdida de grupos funcionales como H_2O , CO_2 u otros (1,83,84,93).

Se identificó 4 dépsidos correspondientes a los picos 34, 35, 44 y 46, utilizando UHPLC-PDA y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y análisis de MS^2 . El pico 34 fue identificado como ácido anziaico, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 429,19244; cuya fragmentación produjo los iones MS^2 m/z 223,09732 $[M - H - C_{12}H_{14}O_3]^-$; 205,08653 $[M - H - C_{12}H_{16}O_4]^-$ y 179,10733 $[M - H - C_{13}H_{14}O_5]^-$. El pico 35 fue asignado al ácido escuemático (86,95), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 389,08798; su fragmentación produjo los iones m/z 211,02434 $[M - H - C_{10}H_{10}O_3]^-$; 181,05000 $[M - H - C_{10}H_8O_5]^-$; 165,05530 $[M - H - C_{10}H_8O_6]^-$ y 137,06007 $[M - H - C_{11}H_8O_7]^-$. El pico 44 fue identificado como atranorina (82,83,93), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 373,09296; cuya fragmentación produjo los iones MS^2 m/z 177,01866 $[M - H - C_{10}H_{12}O_4]^-$ y 163,03946 $[M - H - C_{10}H_{10}O_5]^-$; ver Figura 19. Finalmente, el pico 46 fue asignado al ácido perlatólico (93), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 443,20764; su fragmentación produjo los iones m/z 223,09663 $[M - H - C_{13}H_{17}O_3]^-$; 205,08656 $[M - H - C_{13}H_{19}O_4]^-$ y 161,09698 $[M - H - C_{14}H_{19}O_6]^-$.

4.2.3. Depsidonas

En general la ruta de fragmentación de las depsidonas es mediante la pérdida de CO_2 del anillo lactónico, para dar lugar a la estructura de un dibenzofurano, ver Figura 20. Esta fragmentación puede ser seguida por la pérdida de grupos

funcionales como H₂O, CO₂ u otros, dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes (6,83,84).

Se identificó 11 depsidonas correspondientes a los picos 10, 14, 26, 29, 31, 32, 33, 36, 37, 40 y 41, con el uso de UHPLC con PDA y análisis de HRMS-MS. El pico 10 fue identificado como ácido estíctico (84,93), el cual exhibió un ión molecular [M – H]⁻ de m/z 385,05637; cuya fragmentación produjo los iones MS² m/z 357,06094 [M – H – CO]⁻ y 341,06625 [M – H – CO₂]⁻.

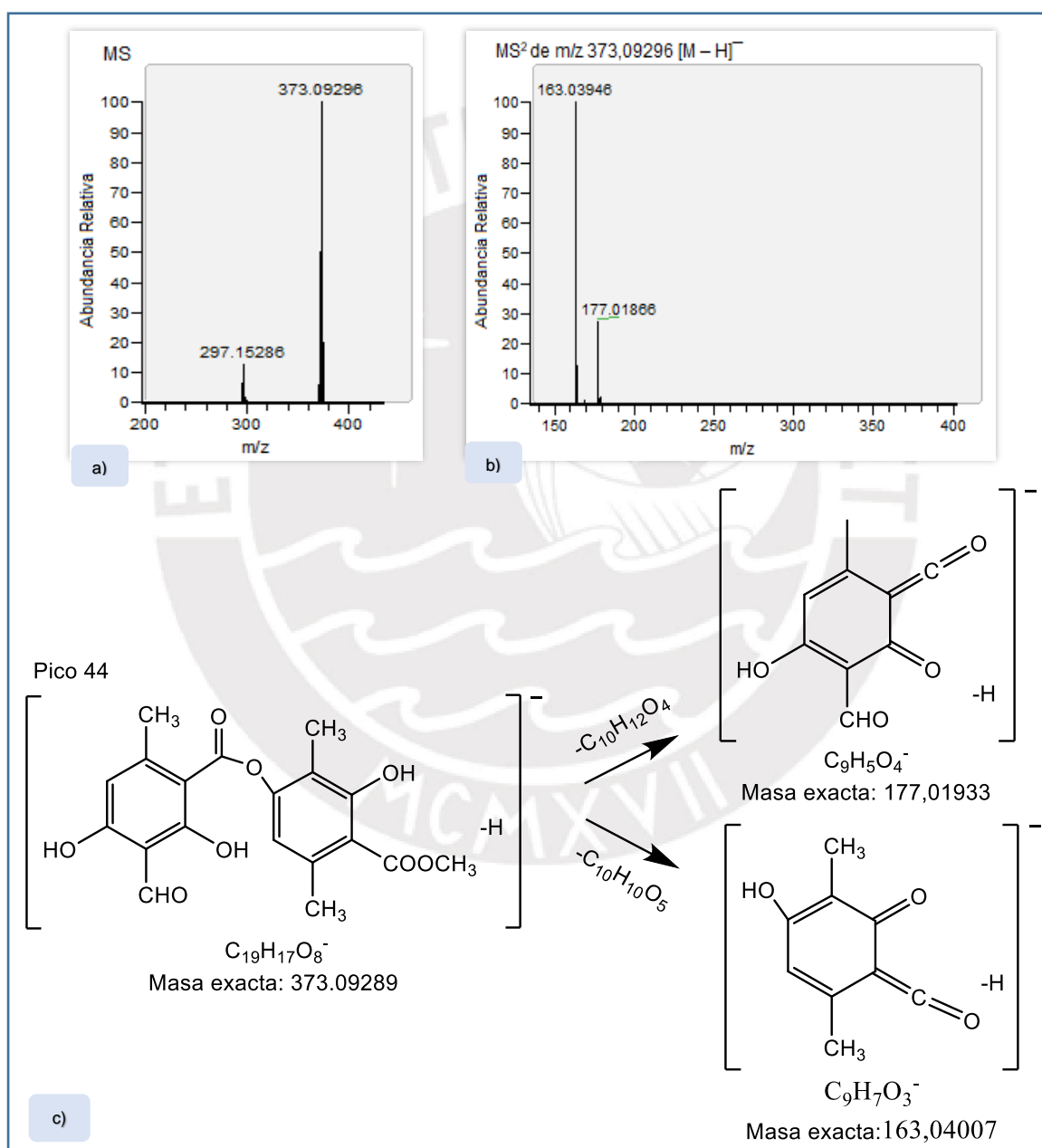


Figura 19. a) Espectro MS del ión molecular [M – H]⁻ de atranorina. b) MS². c) Propuesta de fragmentación.

El pico 14 con un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 431,09836 fue tentativamente asignado como derivado del ácido elatínico (86,97), según sus patrones de fragmentación. El pico 26 con un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 453,15543 fue tentativamente identificado como ácido dehidroxiglomelónico, según sus patrones de fragmentación. El pico 29 fue asignado al ácido norlobárico, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 441,15521; su fragmentación produjo los iones m/z 397,16562 $[M - H - CO_2]^-$ y 353,17508 $[M - H - 2CO_2]^-$. El pico 31 con un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 455,17120 fue tentativamente identificado como derivado del ácido glomeliferónico, según sus patrones de fragmentación. El pico 32 fue asignado a conloxodina, la cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 427,14011; su fragmentación produjo los iones m/z 383,14957 $[M - H - CO_2]^-$ y 281,08167 $[M - H - C_6H_{10}O_4]^-$. El pico 33 fue identificado como ácido glomeliferónico, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 455,17136, cuya fragmentación produjo los iones MS^2 m/z 411,18195 $[M - H - CO_2]^-$; 367,19080 $[M - H - 2CO_2]^-$; 251,09244 $[M - H - C_{12}H_{12}O_3]^-$; 235,10062 $[M - H - C_{12}H_{12}O_4]^-$; 223,09726 $[M - H - C_{13}H_{12}O_4]^-$ y 207,10260 $[M - H - C_{13}H_{12}O_5]^-$. El pico 36 con un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 453,15558 fue tentativamente asignado como derivado del ácido lobárico, según sus patrones de fragmentación. El pico 37 con un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 453,15570 fue tentativamente identificado como derivado de loxodina, según sus patrones de fragmentación. El pico 40 fue asignado a loxodina, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 455,17114; su fragmentación produjo los iones m/z 411,18173 $[M - H - CO_2]^-$; 379,15619 $[M - H - CO_2 - CH_3OH]^-$ y 309,11307 $[M - H - C_7H_{14}O_3]^-$. Finalmente, el pico 41 fue identificado como ácido lobárico (82,83,93,96), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 455,17114; su fragmentación produjo los iones m/z 367,19205 $[M - H - 2CO_2]^-$; 352,16806 $[M - H - 2CO_2 - CH_3]^-$ y 296,10342 $[M - H - 2CO_2 - C_5H_{11}]^-$; ver Figura 20.

4.2.4. Difeniléteres

Le Pogam (93) describió la principal ruta de fragmentación de los difeniléteres, el cual consiste en la escisión del enlace éter que une los anillos aromáticos, para dar lugar a partes fenólicas de la molécula, ver Figura 21. Esta fragmentación puede ser seguida por la pérdida de grupos funcionales como H_2O , CO_2 u otros.

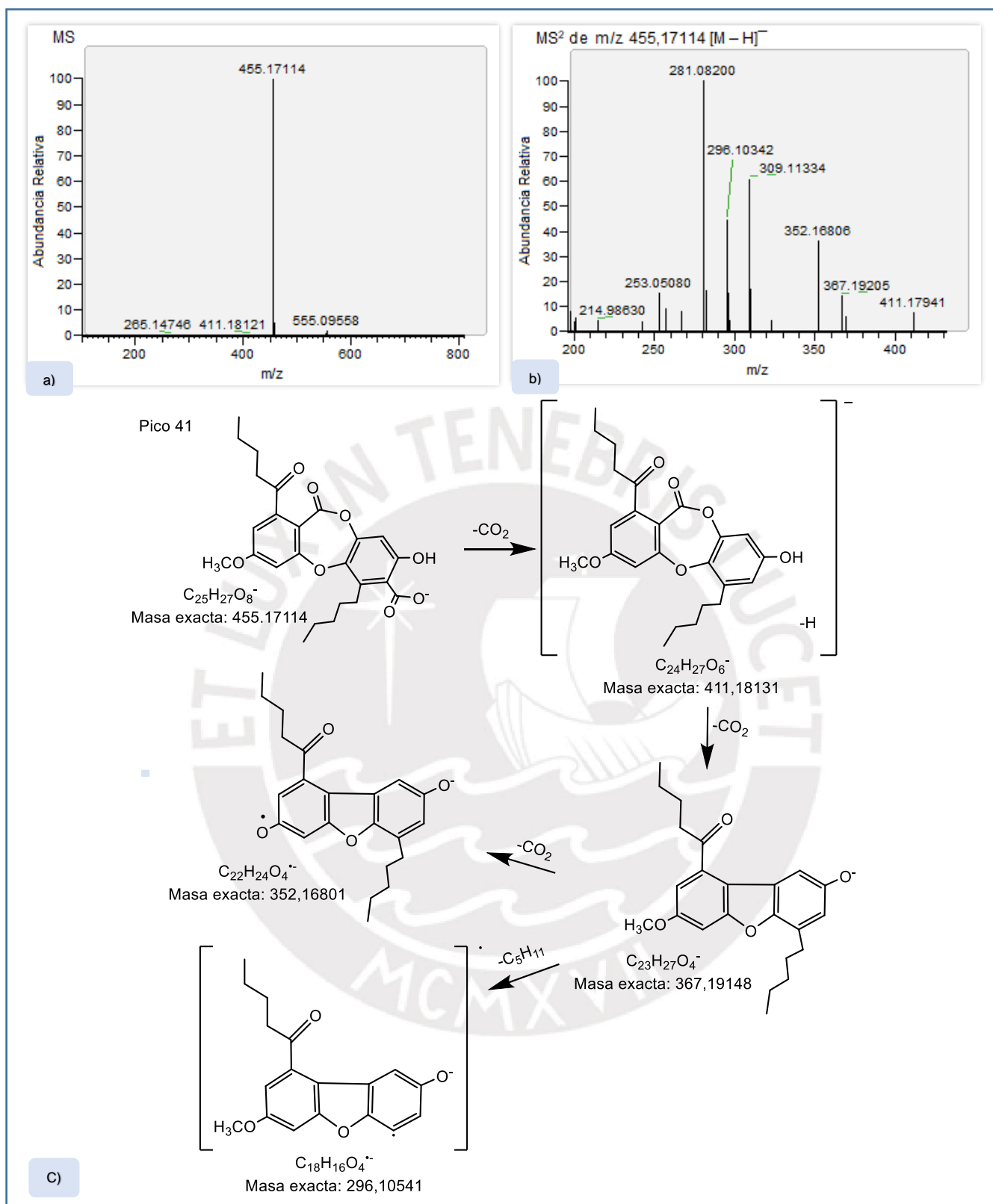


Figura 20. a) Espectro MS del ión molecular [M – H]⁻ de ácido lobárico. b) MS². c) Propuesta de fragmentación.

Se identificó 6 difeniléteres correspondientes a los picos 22, 27, 28, 30, 39 y 48 en el extracto metanólico utilizando el análisis UHPLC-DAD-MS-MS. El

pico 22 fue identificado como lobarina (93), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 473,18185, cuya fragmentación produjo los iones MS m/z 411,18140 $[M - H - CO_2 - H_2O]^-$; 251,09221 $[M - H - C_{12}H_{14}O_4]^-$; 239,09277 $[M - H - C_{13}H_{14}O_4]^-$ y 223,09680 $[M - H - C_{13}H_{14}O_5]^-$. El pico 27 fue asignado al sakisacaulon A (46,93), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 429,19193; su fragmentación produjo los iones m/z 385,20181 $[M - H - CO_2]^-$; 251,09203 $[M - H - C_{11}H_{14}O_2]^-$ y 179,10736 $[M - H - C_{13}H_{14}O_5]^-$. El pico 28 fue identificado como ácido epiforético II, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 487,19733; cuya fragmentación produjo los iones MS m/z 251,09233 $[M - H - C_{13}H_{16}O_4]^-$; 237,11296 $[M - H - C_{13}H_{14}O_5]^-$ y 167,03433 $[C_8H_7O_4]^-$. El pico 30 fue asignado a lobarstina, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 455,17105; su fragmentación produjo el ión m/z 223,09720 $[M - H - C_{13}H_{12}O_4]^-$. El pico 39 fue identificado como sakisacaulon esterificado (46), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 443,20776; cuya fragmentación produjo los iones MS² m/z 265,10806 $[M - H - C_{11}H_{14}O_2]^-$; 207,10217 $[M - H - C_{13}H_{16}O_4]^-$; 179,10701 $[M - H - C_{14}H_{16}O_5]^-$ y 109,03033 $[C_6H_5O_2]^-$; ver Figura 21. Finalmente, el pico 48 fue asignado a norlobariol, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 415,17639; su fragmentación produjo los iones m/z 237,07675 $[M - H - C_{11}H_{14}O_2]^-$; 219,06627 $[M - H - C_{11}H_{16}O_3]^-$ y 179,10716 $[M - H - C_{12}H_{12}O_5]^-$.

4.2.5. Dibenzofuranos

Por lo general, la ruta de fragmentación de los dibenzofuranos es mediante la pérdida de radicales metilo o grupos funcionales como CO_2 u otros (1,83), ver Figura 22.

Se identificó 4 dibenzofuranos correspondientes a los picos 6, 9, 12 y 42, usando el análisis UHPLC-DAD-MS-MS. El pico 6 fue identificado como ácido isostrepílico (46), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 287,05600; cuya fragmentación produjo los iones MS² m/z 257,04532 $[M - H - OCH_2]^-$; 243,06596 $[M - H - CO_2]^-$ y 213,05544 $[M - H - CO_2 - OCH_2]^-$. El pico 9 fue asignado a estrepisilina (95), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 269,04538; su fragmentación produjo los iones m/z 149,02365 $[C_8H_5O_3]^-$ y 123,04414 $[C_7H_7O_2]^-$. El pico 12 fue identificado como ácido 6-O-metilnorascomático, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de

m/z 285,07669; cuya fragmentación produjo los iones MS² m/z 255,06601 [M – H – OCH₂]⁻ y 226,06325 [M – H – CO₂ – CH₃]⁻. Finalmente, el pico 42 fue asignado al ácido úsnico (82,83,93,96), el cual exhibió un ión molecular [M – H]⁻ de m/z 343,08246; su fragmentación produjo los iones m/z 328,05978 [M – H – CH₃]⁻; 259,06116 [M – H – C₄H₃O₂]⁻ y 231,06638 [M – H – C₅H₃O₃]⁻; ver Figura 22.

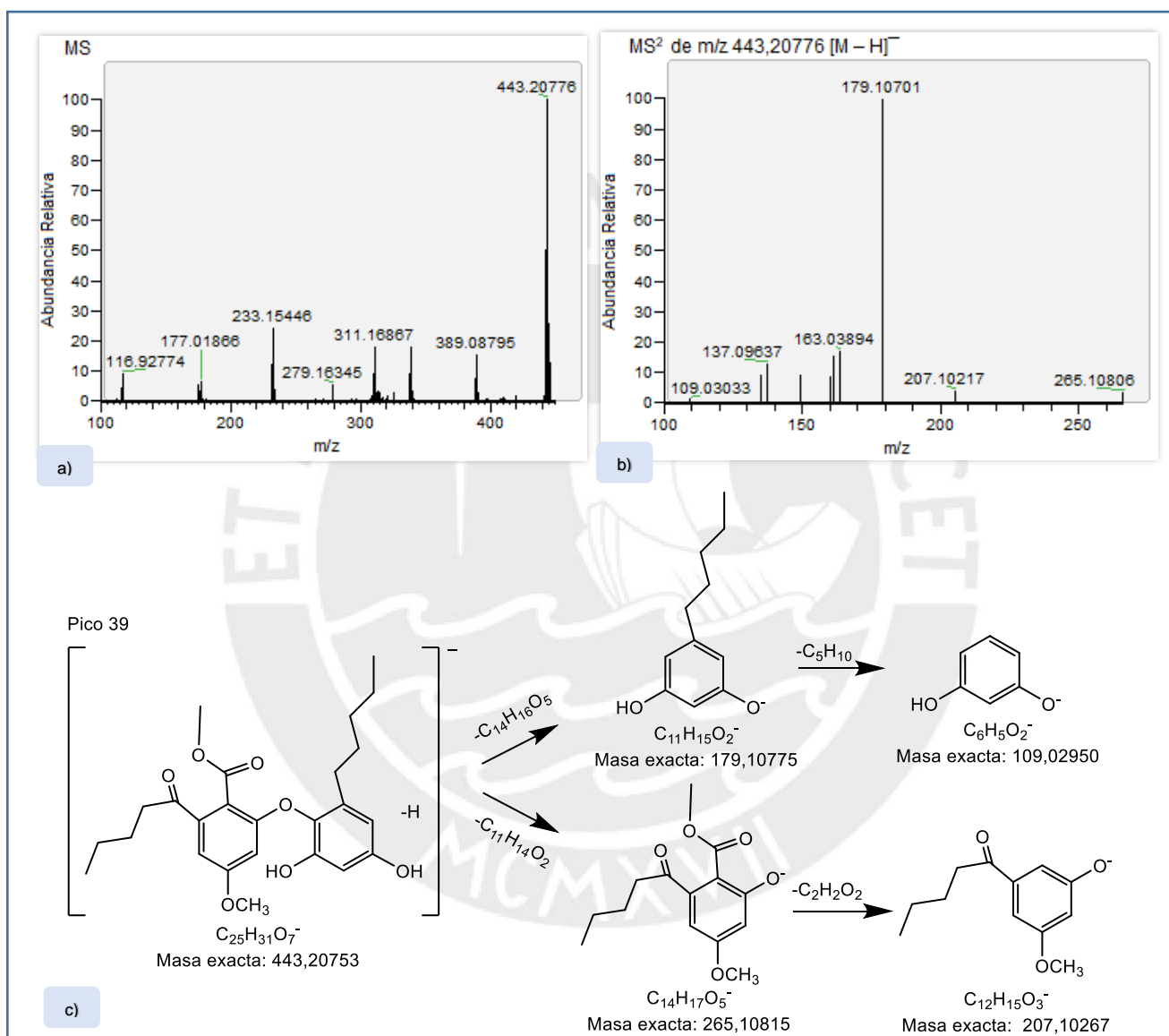


Figura 21. a) Espectro MS del ión molecular [M – H]⁻ de sakisacaulon esterificado. b) MS². c) Propuesta de fragmentación.

4.2.6. Lípidos

Se identificó 12 lípidos correspondientes a los picos 7, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 25 y 47, utilizando el análisis UHPLC-ESI-MS-MS. El pico 7

fue identificado como ácido 4,5-dihidroxi-2-nonenoico (82), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 187,09711; cuya fragmentación produjo los iones MS m/z 145,04997 $[M - H - C_3H_6]^-$ y 101,02350 $[C_4H_5O_3]^-$. El pico 11 fue asignado al ácido tetrahydroxieicosanoico (86,96), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 375,27530; su fragmentación produjo el ión m/z 313,20209 $[M - H - C_3H_{10}O]^-$. El pico 13 fue identificado como ácido pentahidroxidocosanoico (82,96), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 419,30139; cuya fragmentación produjo los iones MS² m/z 401,29105 $[M - H - H_2O]^-$ y 375,31186 $[M - H - CO_2]^-$; ver Figura 23.

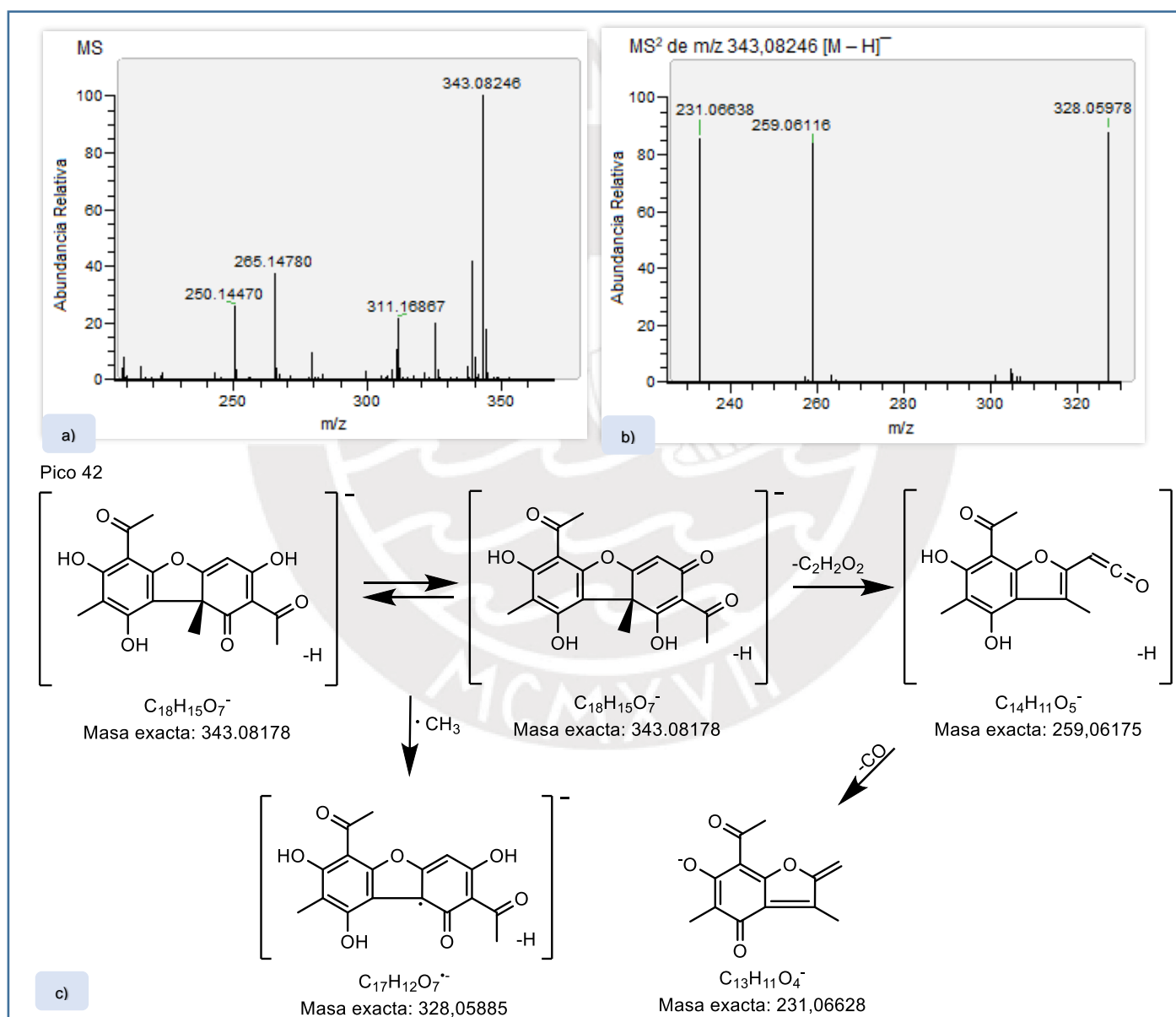


Figura 22. a) Espectro MS del ión molecular $[M - H]^-$ de ácido úsnico. b) MS². c) Propuesta de fragmentación.

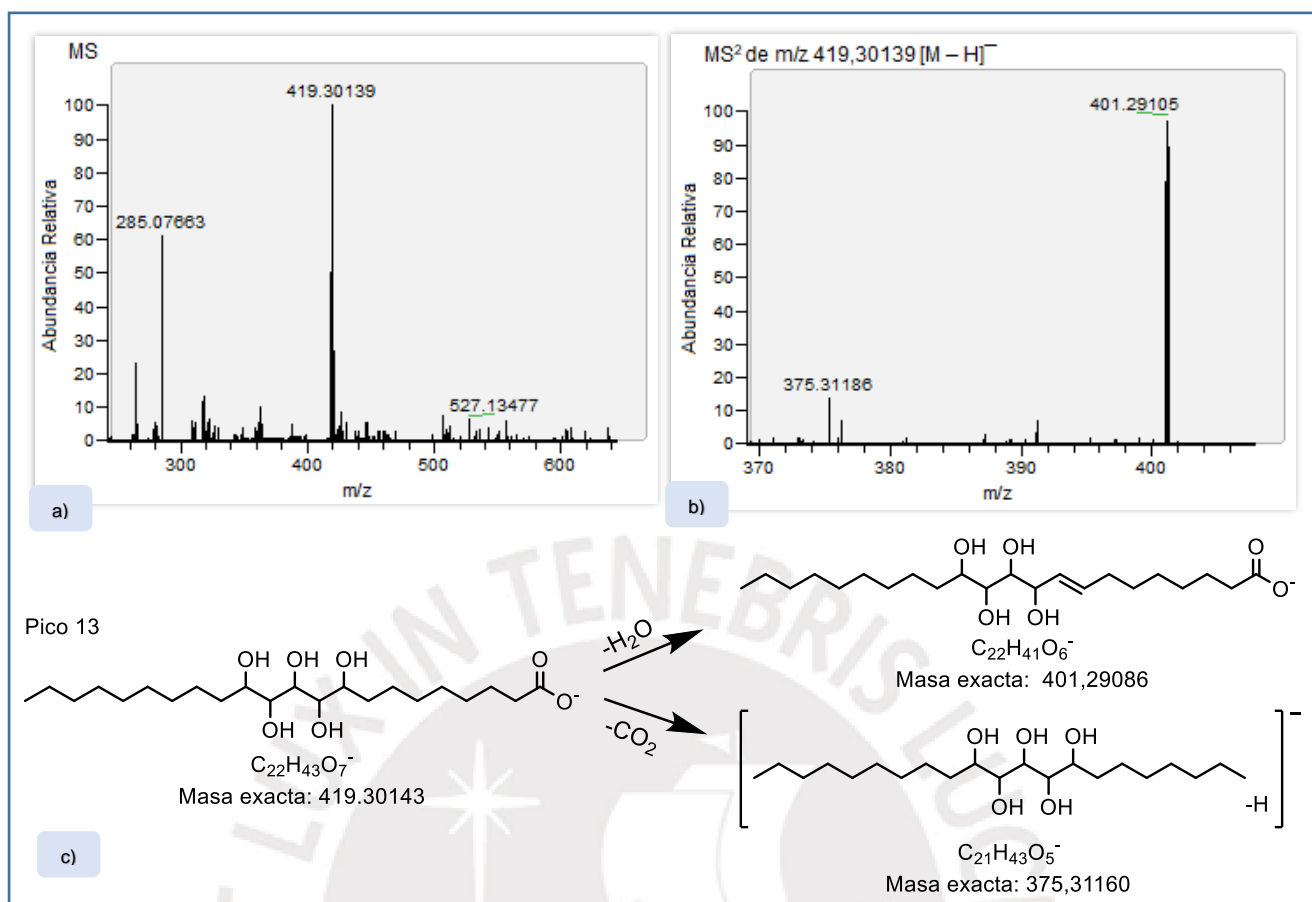


Figura 23. a) Espectro MS del ión molecular [M - H]⁻ de ácido pentahidroxicosanoico. b) MS². c) Propuesta de fragmentación.

El pico 15 con un ión molecular [M - H]⁻ de m/z 505,33801 fue tentativamente asignado al ácido hexahidroxiohexacosanoico, según sus patrones de fragmentación. El pico 16 fue identificado como ácido tetrahidroxiheneicosanoico (96), el cual exhibió un ión molecular [M - H]⁻ de m/z 389,29099; cuya fragmentación produjo el ión MS² m/z 345,22864 [M - H - C₃H₈]⁻. El pico 17 con un ión molecular [M - H]⁻ de m/z 475,32773 fue tentativamente asignado al ácido pentahidroxiohexacosanoico, según sus patrones de fragmentación. El pico 18 fue identificado como ácido tetrahidroxicosanoico (82,86,95,96), el cual exhibió un ión molecular [M - H]⁻ de m/z 403,30676; cuya fragmentación produjo el ión MS² m/z 385,29532 [M - H - H₂O]⁻. El pico 19 con un ión molecular [M - H]⁻ de m/z 489,34341 fue tentativamente asignado al ácido pentahidroxiohexacosanoico, según sus patrones de fragmentación. El pico 20 fue identificado como ácido tetrahidroxitricosanoico (82,86,96), el cual exhibió un ión molecular [M - H]⁻ de m/z 417,32239; cuya fragmentación produjo el ión MS m/z 399,31128 [M - H - H₂O]⁻ y 173,11749 [C₉H₁₇O₃]⁻.

El pico 24 con un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 503,35873 fue tentativamente asignado al ácido pentahidroxioheptacosanoico, según sus patrones de fragmentación. El pico 25 con un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 517,37451 fue tentativamente identificado como pentahidroxioheptacosanoato de metilo, según sus patrones de fragmentación. Finalmente, el pico 47 con un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 361,20218 fue tentativamente asignado como derivado del ácido protoconstipático, según sus patrones de fragmentación.

4.2.7. Polioles

Se identificó 5 polioles correspondientes a los picos 1, 2, 3, 4 y 5 en el extracto metanólico, utilizando una combinación de técnicas. El pico 1 fue identificado como manitol, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 181,07140; cuya fragmentación produjo el ión MS^2 m/z 151,06055 $[M - H - OCH_2]^-$. El pico 2 fue asignado al ácido glucónico (94), el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 195,05058; su fragmentación produjo los iones m/z 177,03969 $[M - H - H_2O]^-$; 159,02914 $[M - H - 2H_2O]^-$; 151,06044 $[M - H - CO_2]^-$ y 129,01837 $[C_5H_5O_4]^-$. El pico 3 fue identificado como ácido arábico, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 165,03990; cuya fragmentación produjo el ión MS^2 m/z 129,01851 $[M - H - 2H_2O]^-$. El pico 4 fue asignado al arabitol, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 151,06053; su fragmentación produjo el ión m/z 133,04996 $[M - H - H_2O]^-$; ver Figura 24. Finalmente, el pico 5 fue identificado como ácido 2,5-didehidro-D-glucónico, el cual exhibió un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 191,01964; cuya fragmentación produjo los iones MS m/z 147,02940 $[M - H - CO_2]^-$ y 129,01871 $[M - H - CO_2 - H_2O]^-$.

En base a los compuestos identificados mediante el análisis UHPLC-ESI-MS-MS se proponen las rutas biosintéticas de los compuestos aromáticos (Figura 35, Anexo 5), depsidonas (Figura 36, Anexo 5), dépsidos, depsidonas y difeniéteres (Figura 37, Anexo 5), dibenzofuranos (Figura 38, Anexo 5) y lípidos (Figura 39, Anexo 5), de acuerdo a la similitud de sus estructuras químicas, pérdida de grupos funcionales y lo señalado por otros autores (1,46,83,84,93).

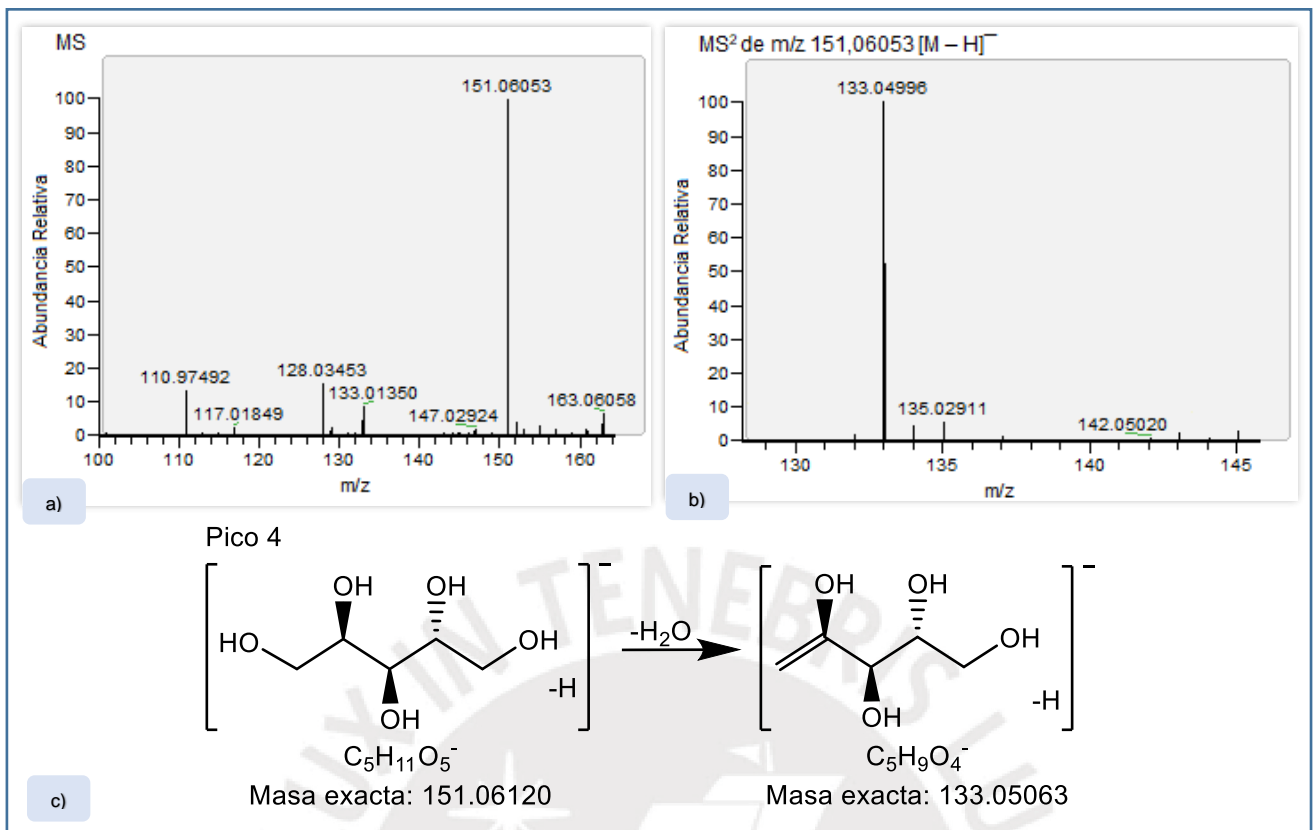


Figura 24. a) Espectro MS del i3n molecular $[M - H]^-$ de arabinol. b) MS². c) Propuesta de fragmentaci3n.

4.3. An3lisis de 3cidos grasos mediante cromatograf3a de gases (GC-FID)

El m3todo comprende 3 etapas, en la primera se realiza la extracci3n de 3cidos grasos con MeOH, la segunda comprende la transesterificaci3n para la metilaci3n de los 3cidos grasos y, finalmente, los metil3steres (FAMES) obtenidos se analizan por GC-FID.

4.3.1. Preparaci3n de la muestra liqu3nica

El extracto metan3lico, EM, se pes3 por triplicado, tal como se indica en la Tabla 14, despu3s de la transesterificaci3n se calcul3 el porcentaje de 3cidos grasos transesterificados, %trans, tal como se muestra a continuaci3n.

Tabla 14. Masas de los extractos metan3licos y porcentajes de transesterificaci3n.

Muestra	m_{EM} (g)	m_{trans} (g)	% trans	%trans _{prom}	S.D.
M1	0,1656	0,0107	6,4595		
M2	0,1932	0,0124	6,4182	6,4590	0,0406
M3	0,1754	0,0114	6,4994		

4.3.2. Identificación de ácidos grasos

Se obtuvo el cromatograma de la mezcla estándar de FAMES (Figura 40, Anexo 6), el cual está compuesto por 28 metilésteres de ácidos grasos y se determinó el cromatograma de los metilésteres de ácidos grasos de la muestra líquénica (Figura 41, Anexo 6).

En la Tabla 15, se observa los metilésteres de los 16 ácidos grasos identificados en la muestra líquénica, después de comparar los tiempos de retención obtenidos de los estándares. Asimismo, se muestra los porcentajes relativos correspondiente a cada FAME identificado en el extracto con respecto al total de FAMES detectados.

Tabla 15. Metilésteres de ácidos grasos identificados en la muestra líquénica.

N°	N° C	Metilester	t _r (FAMES)	t _r (muestra)	% relativo
1	C11:0	Undecanoato de metilo	13,932	13,930	1,98
2	C12:0	Laurato de metilo	15,900	15,864	2,07
3	C15:0	Pentadecanoato de metilo	21,263	21,194	0,78
4	C16:0	Palmitato de metilo	22,878	22,877	0,25
5	C16:1	(cis-9) Palmitoleato de metilo	23,374	23,437	4,74
6	C18:0	Estearato de metilo	25,879	25,878	0,55
7	C18:1	(trans-9) Elaidato de metilo	26,109	26,171	2,58
8	C18:1	(cis-9) Oleato de metilo	26,265	26,259	0,46
9	C18:2	(cis-9,12) Linoleato de metilo	26,992	26,992	1,44
10	C20:0	Araquidato de metilo	27,879	27,821	11,97
11	C20:1	(cis-11) Eicosenoato de metilo	28,619	28,343	3,03
12	C18:3	(cis-9,12,15) Linolenato de metilo	29,002	29,099	0,17
13	C22:0	Behenato de metilo	31,142	31,155	0,22
14	C22:1	(cis-13) Erucato de metilo	31,227	31,272	2,24
15	C23:0	Tricosanoato de metilo	31,531	31,505	0,81
16	C24:0	Lignocerato de metilo	32,336	32,346	0,41

Los tiempos de retención de los estándares se verificaron mediante la inyección del patrón de FAMES a 6 concentraciones distintas (ver Tabla 34 en Anexo 6). Con los datos obtenidos se graficaron las curvas de calibración para cada metilester obtenido, y así ver la linealidad de los componentes al aumentar la concentración (ver Figuras 42 y 43 en Anexo 6).

Los líquenes contienen muchos ácidos grasos comúnmente encontrados en plantas superiores, los más comunes son los ácidos linoleico y oleico, los cuales se han reportado en especies como *Ramalina yasudae*, *Usnea difracta* y *Usnea durietzii*, entre otros (98,99). De estos dos ácidos grasos, comúnmente se reporta un mayor contenido de ácido linoleico que de ácido oleico en una misma especie líquénica (99,100), lo cual se puede corroborar para esta especie en estudio (ver Tabla 15).

En la Tabla 16 se muestra los ácidos grasos saturados e insaturados presentes en algunas de las especies del género *Stereocaulon*, donde se aprecia que los ácidos grasos presentes en mayor proporción son el ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0), mientras que nuestra especie en estudio, *S. glareosum* presenta un porcentaje relativo menor al promedio. Por otro lado, se reportó menor proporción de ácidos grasos de cadena corta (C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C17:0) y cadena larga (C20:0, C22:0 y C24:0), lo cual concuerda con lo hallado para la especie en estudio, con la diferencia que se encontró un mayor contenido de ácido araquídico (C20:0) (11,97 %) en comparación con el contenido total de FAMES detectados.

En base a nuestro resultado, en comparación con lo ya identificado en otras especies de *Stereocaulon*, podemos mencionar que el contenido de lípidos varía según la especie y familia, debido a los factores ecológicos a los cuales están expuestos como el clima, temperatura, radiación UV, la altitud, entre otros. Por lo tanto, para realizar un estudio más completo y preciso, se tendría que comparar especies del mismo y/o distinto género, del mismo lugar de recolecta.

Tabla 16. Composición de ácidos grasos como metilésteres en diferentes especies de *Stereocaulon*.

N° C	Metilester	S. <i>tomentosum</i> (100)	S. vesuvianum S. graminosum S. vulcani S. dactylophyllum S. evolutum S. halei S. montagneanum S. pileatum S. alpinum S. scutelligerum (36)	
C10:0	Decanoato de metilo	x	✓	
C12:0	Laurato de metilo	x	✓	
C14:0	Miristato de metilo	x	✓	
C14:1	(cis-9) Miristolato de metilo	x	✓	
C15:0	Pentadecanoato de metilo	x	✓	
C16:0	Palmitato de metilo	x	✓	
C16:1	(cis-9) Palmitoleato de metilo	x	✓	
C17:0	Heptadecanoato de metilo	x	✓	
C18:0	Estearato de metilo	x	✓	
C18:1	(trans-9) Elaidato de metilo	x	✓	
C18:1	(cis-9) Oleato de metilo	✓	✓	
C18:2	(cis-9,12) Linoleato de metilo	x	✓	
C20:0	Araquidato de metilo	✓	✓	
C20:1	(cis-11) Eicosenoato de metilo	✓	✓	
C20:2	(cis-11,14) Eicosadienoato de metilo	✓	x	
C18:3	(cis-9,12,15) Linolenato de metilo	x	✓	
C22:0	Behenato de metilo	✓	✓	
C22:1	(cis-13) Erucato de metilo	x	✓	
C24:0	Lignocerato de metilo	x	✓	
C20:5	(cis-5,8,11,14,17) Eicosapentaenoato de metilo	x	✓	
C24:1	(cis-15) Nervonato de metilo	x	✓	
C22:6	(cis-4,7,10,13,16,19) Docosahexaenoato de metilo	x	✓	

✓ : Contiene, x: No contiene

4.4. Elucidación estructural de los compuestos aislados

Las fracciones primarias y secundarias se sometieron a procesos de separación y purificación por cromatografía en columna y/o cristalización, conduciendo a la obtención de 9 compuestos (Tabla 17), cuya estructura se determinó a través del análisis de sus datos espectroscópicos en comparación con referencias citadas.

Tabla 17. Compuestos obtenidos del líquen *S. glareosum*.

Compuesto	Metabolito	Rendimiento
1	Haematomato de metilo	2,38 %
2	Ácido 2,4-dimetoxi-6-pentilbenzoico	0,38 %
4	Ácido 2,4-dimetoxi-6-propilbenzoico	0,36 %
6 y 7	β -orcinol carboxilato de metilo (Atrarato de metilo)	3,33 %
8	Orselinato de metilo	2,60 %
S1 y 5	Atranorina	33,3 %
S3 y 10	Ácido lobárico	4,53 %
9	Brasicasterol	0,18 %
S2	Ácido glucónico	2,57 %

4.4.1. Compuestos aromáticos

El análisis del espectro RMN-¹H (CDCl₃) para el compuesto 1 (Tabla 18), permitió evidenciar que es un compuesto aromático de tipo β -orcinol (35). Su espectro (Figura 44, Anexo 7) presentó seis señales simples que integran para un total de diez hidrógenos, las cuales se asignaron de la siguiente manera, en $\delta = 2,53$ ppm presenta un grupo metilo singulete sobre anillo aromático; en 3,96 ppm corresponde a los hidrógenos de un grupo metoxilo singulete; en 6,29 ppm es característico de un hidrógeno aromático así como la de 10,37 ppm lo es para un hidrógeno de tipo aldehídico; finalmente las señales en 12,41 y 12,87 ppm corresponden a dos hidroxilos que se encuentran formando puentes de hidrógeno intramoleculares con grupos carbonilo.

Tabla 18. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN-¹H del compuesto 1.

Posición	(400 MHz, CDCl ₃)
	δ (mult.)
1	3,96 (3H, s)
2	12,87 (1H, s)
3	10,34 (1H, s)
4	12,41 (1H, s)
5	6,29 (1H, s)
6	2,53 (3H, s)

El espectro ESI-MS-MS (Sec. 4.2.1.) mostró un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 209,04517; concordante para una fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_5$, cuya fragmentación produjo los iones MS m/z 177,01845 $[M - H - CH_3OH]^-$; 149,02324 $[C_8H_5O_3]^-$ y 133,02922 $[C_8H_5O_2]^-$, que corresponde con la referencia (35,46).

Al analizar el espectro RMN- 1H y ESI-MS-MS, y compararlo con lo reportado por Huneck & Yoshimura (35) y Vu (41) se propone que el compuesto 1 es el haematomato de metilo, cuya estructura se muestra en la Figura 25.

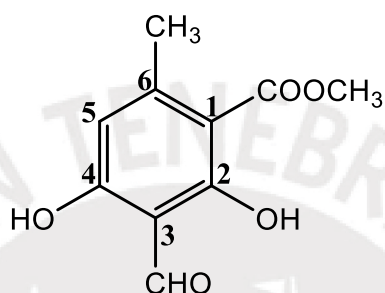


Figura 25. Estructura del compuesto 1.

El análisis de los espectros RMN- 1H ($CDCl_3$) para los compuestos 2, 3 y 4 (Tablas 19 y 20), permitió evidenciar que son derivados del ácido benzoico del tipo β -orcinol (35).

El espectro del compuesto 2 (Figura 45, Anexo 7) presentó ocho señales que integran para un total de veinte hidrógenos, la señal en 0,90 ppm corresponde a tres protones triplete; en 1,26 ppm se ubican dos protones multiplete; en 1,33 ppm se observa cuatro protones multiplete; la señal en 2,84 ppm corresponde a dos protones multiplete; en 3,80 y 3,92 ppm se ubican los hidrógenos de dos grupos metoxilo singulete; las señales en 6,29 y 6,33 ppm son características de un hidrógeno aromático; finalmente la señal en 11,71 ppm corresponde a un hidrógeno de tipo carboxílico.

El espectro del compuesto 4 (Figura 47, Anexo 7) presentó siete señales que integran para un total de dieciseis hidrógenos, la señal en 0,96 ppm corresponde a tres protones triplete; en 1,26 ppm se ubican dos protones multiplete; en 2,83 ppm se observan dos protones multiplete; en 3,80 y 3,92 ppm se presentan los hidrógenos de dos grupos metoxilos singuletes; las señales en 6,29 y 6,34 ppm

son características de hidrógenos aromáticos; finalmente la señal en 11,71 ppm corresponde a un hidrógeno de tipo carboxílico.

Tabla 19. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN-¹H del compuesto 2.

Posición	(400 MHz, CDCl ₃) δ (mult., J en Hz)
1	11,71 (1H, s)
2	3,92 (3H, s)
3	6,29 (2H, d)
5	6,33 (2H, m)
4	3,80 (3H, s)
1'	2,84 (2H, m)
2'	1,26 (2H, m)
3', 4'	1,33 (4H, m)
5'	0,90 (3H, t, J = 6,1)

Tabla 20. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN-¹H del compuesto 4.

Posición	(400 MHz, CDCl ₃) δ (mult., J en Hz)
1	11,71 (1H, s)
2	3,92 (3H, s)
3	6,29 (2H, d)
5	6,34 (2H, m)
4	3,80 (3H, s)
1'	2,83 (2H, t)
2'	1,26 (2H, m)
3'	0,96 (3H, t J = 7,3)

Al analizar los espectros RMN-¹H de los compuestos 2 y 4, y comparando con lo reportado por Huneck & Yoshimura (35) se propone que el compuesto 2 sería ácido 2,4-dimetoxi-6-pentilbenzoico y el compuesto 4 sería ácido 2,4-dimetoxi-6-propilbenzoico, cuyas estructuras se muestran en la Figura 26.

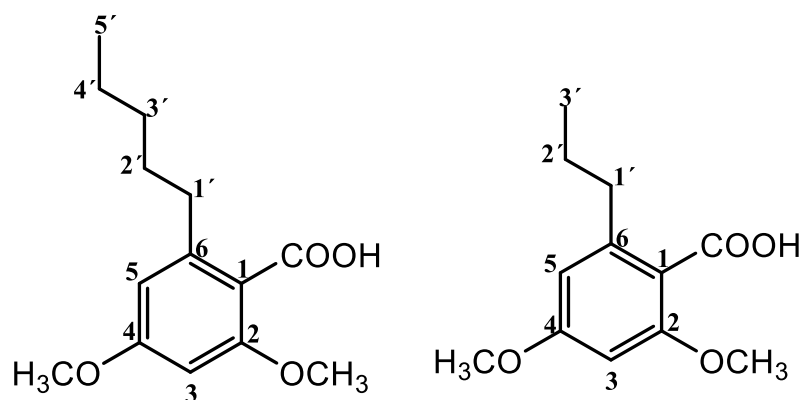


Figura 26 .Estructura de los compuestos 2 (izquierda) y 4 (derecha).

El compuesto 3 (Figura 46, Anexo 7) resultó ser una mezcla de los compuestos 2 y 4, ya que al superponer los espectros de ambos se evidencia una diferencia solo en la zona alifática, debido que el compuesto 2 presenta una cadena más larga que el compuesto 4.

Los compuestos 6 y 7 se juntaron según su similitud cromatográfica en TLC. El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear para el compuesto 6 (Tabla 21), permitió evidenciar que es un compuesto aromático de tipo β -orcinol (35).

El espectro RMN- ^1H (CDCl_3) (Figura 48, Anexo 7) presentó seis señales simples que integran para un total de doce hidrógenos, las que se presentan en 2,10 y 2,45 ppm corresponden a dos grupos metilo singuletes sobre el anillo aromático; en 3,92 ppm se ubican los hidrógenos de un grupo metoxilo singulete; en 5,36 ppm se observa un hidroxilo sobre el anillo aromático; la señal en 6,20 ppm es característica de un hidrógeno aromático; finalmente la señal en 12,03 ppm corresponde a un hidroxilo que se encuentra formando puente de hidrógeno intramolecular con un grupo carbonilo.

El espectro RMN- ^{13}C (CDCl_3) (Figura 49, Anexo 7) presentó diez señales correspondientes a diez átomos de carbono, la señal en 172,77 ppm corresponde a un grupo carbonilo de éster y las de δ 7,8; 24,22 y 51,97 ppm se asignaron a los dos metilos y el metoxilo respectivamente.

Tabla 21. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN-¹H y RMN-¹³C del compuesto 6.

Posición	(400 MHz, CDCl ₃)	(126 MHz, CDCl ₃)
	δ _H (mult.)	δ _C
1	-	105,31
2	12,03 (1H, s)	158,25
3	-	108,71
4	5,36 (1H, s)	163,24
5	6,20 (1H, s)	110,72
6	-	140,28
7	3,92 (3H, s)	172,77
8	2,10 (3H, s)	7,80
9	2,45 (3H, s)	24,22
-COOCH ₃	-	51,97

Al analizar el espectro RMN-¹H y RMN-¹³C, y compararlo con lo reportado por Huneck & Yoshimura (35) y Vu (41) se propone que el compuesto 6 sería el β-orcinol carboxilato de metilo (atrarato de metilo), cuya estructura se muestra en la Figura 27.

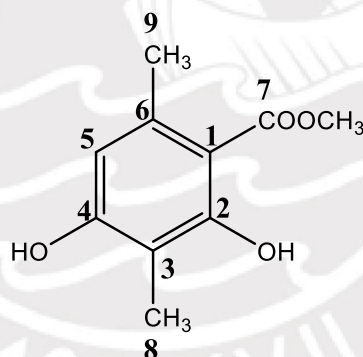


Figura 27. Estructura del compuesto 6.

El análisis del espectro RMN-¹H (CDCl₃) para el compuesto 8 (Tabla 22), permitió evidenciar que se trata de un aromático de tipo β-orcinol (35). Su espectro (Figura 50, Anexo 7) presentó seis señales simples que integran para un total de diez hidrógenos, la de 2,49 ppm corresponde a un grupo metilo singulete sobre anillo aromático; en 3,92 ppm se ubican los hidrógenos de un grupo metoxilo singulete; en 5,25 ppm se observa un hidroxilo; las señales en 6,22 y 6,27 ppm son características de hidrógenos aromáticos; finalmente la señal en 11,77 ppm

corresponde a un hidroxilo que se encuentra formando puente de hidrógeno intramolecular con un grupo carbonilo.

Tabla 22. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN-¹H del compuesto 8.

Posición	(400 MHz, CDCl ₃)
	δ (mult.)
1	3,92 (3H, s)
2	11,71 (1H, s)
3	6,22 (1H, s)
4	5,25 (1H, s)
5	6,27 (1H, s)
6	2,49 (3H, s)

Al analizar el espectro RMN-¹H y compararlo con lo reportado por Huneck & Yoshimura (35) y Vu (41) se propone que el compuesto 8 sería orselinato de metilo, cuya estructura se muestra en la Figura 28.

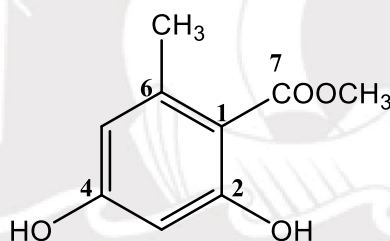


Figura 28. Estructura del compuesto 8.

4.4.2. Dépsido

Los compuestos S1 y 5 se juntaron según su similitud cromatográfica en TLC. El análisis del espectro RMN-¹H (CDCl₃) para el compuesto S1 (Tabla 23), permitió evidenciar que es un dépsido (35). Su espectro (Figura 51, Anexo 7) presentó diez señales simples que integran para un total de dieciocho hidrógenos, las que se presentan en 2,09; 2,55 y 2,69 ppm corresponden a tres grupo metilo singuletes sobre el anillo aromático; en 3,99 ppm se ubican los hidrógenos de un grupo metoxilo singulete; las de 6,40 y 6,51 ppm son características de hidrógenos aromáticos; en 10,36 ppm se observa un hidrógeno de tipo aldehídico; finalmente las señales 11,94; 12,50 y 12,55 ppm corresponden a tres hidroxilos sobre el anillo aromático.

Tabla 23. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN-¹H del compuesto S1.

Posición	(400 MHz, CDCl ₃)
	δ (mult.)
2	12,50 (1H, s)
4	12,55 (1H, s)
5	6,40 (1H, s)
8	10,36 (1H, s)
9	2,69 (3H, s)
2'	11,94 (1H, s)
5'	6,51 (1H, s)
7'	3,99 (3H, s)
8'	2,55 (3H, s)
9'	2,09 (3H, s)

Se ha determinado la presencia de los compuestos 1, haematomato de metilo, y 6, β-oricinol carboxilato de metilo, que según lo reportado (1,41) al esterificarse forman un dépsido que corresponde a la atranorina, que se evidencia por su espectro RMN-¹H.

El espectro ESI-MS-MS (Figura 19, sec. 4.2.2.) mostró un ión molecular [M – H][–] de m/z 373,09296 concordante para una fórmula molecular C₁₉H₁₈O₈, cuya fragmentación produjo los iones MS m/z 163,03946 [M – H – C₁₀H₁₀O₅][–] y 177,01866 [M – H – C₁₀H₁₂O₄][–] que corresponde con la referencia (82,83,93).

Al analizar el espectro RMN-¹H, ESI-MS-MS y compararlo con lo reportado por Huneck & Yoshimura (35) y Perico (13) se propone que el compuesto 1 sería atranorina, cuya estructura se muestra en la Figura 29.

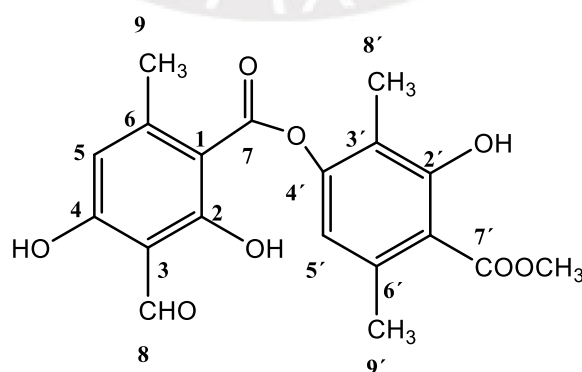


Figura 29. Estructura del compuesto S1.

4.4.3. Depsidona

Los compuestos S3 y 10 se juntaron según su similitud cromatográfica en TLC. El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear para el compuesto S3 (Tabla 24), permitió evidenciar que es una depsidona (35).

El espectro RMN-¹H (DMSO-d₆) (Figura 52, Anexo 7) presentó nueve señales que integran para un total de veintiséis hidrógenos, entre 0,86 y 0,90 ppm corresponden a seis protones triplete de dobletes; en 1,32 ppm se ubican cuatro protones multiplete; en 1,40 ppm se observa dos protones multiplete; la señal en 1,53 ppm corresponde a dos protones triplete; en 2,79 y 2,85 ppm se ubican dos protones triplete cada una; en 3,90 ppm se observa los hidrógenos de un grupo metoxilo singulete; finalmente la señales a 6,98 y 7,10 ppm son características de hidrógenos aromáticos.

El espectro RMN-¹³C (CDCl₃) (Figura 53, Anexo 7) presentó veinticinco señales correspondientes a veinticinco átomos de carbono, las de δ 13,79 y 13,99 ppm corresponden a dos metilos; entre 22 y 33 ppm se encuentran el metileno; en 42,13 ppm se ubica un metileno unido a un carbonilo; en 55,98 ppm se observa un metoxilo; las señales en 161,55; 171,99 y 204,23 ppm son características de grupos carbonilo en forma de éster, ácido y cetona respectivamente. Al encontrarse doce señales entre 106 y 165 ppm se presume que la estructura presenta dos anillos aromáticos multisustituídos.

El espectro ESI-MS-MS (Figura 20, sec. 4.2.3.) mostró un ión molecular [M - H]⁻ de m/z 455,17114 concordante para una fórmula molecular C₂₅H₂₈O₈, cuya fragmentación produjo los iones MS m/z 296,10342 [M - H - 2CO₂ - C₅H₁₁]⁻; 352,16806 [M - H - 2CO₂ - CH₃]⁻; 367,19205 [M - H - 2CO₂]⁻ y 411,17941 [M - H - CO₂]⁻ que corresponde con las referencias (82,83,86,93).

Al analizar los espectros RMN-¹H, RMN-¹³C, ESI-MS-MS y compararlos con lo reportado por Huneck & Yoshimura (35) y Vu (41) se propone que el compuesto S3 sería ácido lobárico, cuya estructura se muestra en la Figura 30.

Tabla 24. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN-¹H y RMN-¹³C del compuesto S3.

Posición	(500 MHz, DMSO-d ₆)	(126 MHz, DMSO-d ₆)
	δ_H (mult., <i>J</i> en Hz)	δ_C
1	-	111,85
2	-	162,80
3	7,10 (1H, d, <i>J</i> = 2,4)	106,28
4	-	164,53
5	6,98 (1H, d, <i>J</i> = 2,4)	111,01
6	-	149,63
7	-	161,80
1''	-	204,49
2''	2,79 (2H, t, <i>J</i> = 8,0)	42,38
3''	1,53 (2H, m)	26,14
4''	1,32 (2H, m)	22,63
5''	0,87 (3H, t, <i>J</i> = 7,2)	14,24
1'	-	111,20
2'	-	160,69
3'	6,70 (1H, s)	108,40
4'	-	149,57
5'	-	141,71
6'	-	140,07
7'	-	172,25
1'''	2,85 (2H, t, <i>J</i> = 7,2)	28,46
2'''	1,53 (2H, m)	31,17
3'''	1,40 (2H, m)	32,60
4'''	1,32 (2H, m)	22,33
5'''	0,88 (3H, t, <i>J</i> = 7,3)	14,04
OCH ₃ -4	3,90 (3H, s)	56,24

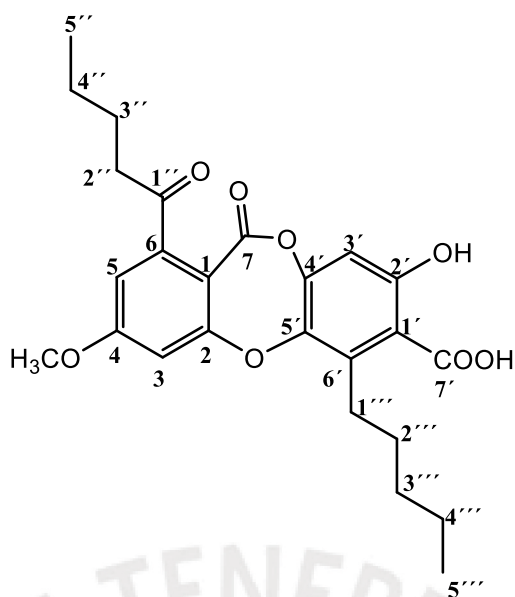


Figura 30. Estructura del compuesto S3.

4.4.4. Esteroide

El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear para el compuesto 9 (Tabla 25), permitió evidenciar que es un esteroide (35). El espectro RMN-¹H (CDCl₃) (Figura 54, Anexo 7) presentó doce señales que integran para un total de cuarenta y seis hidrógenos, las de 0,69 y 1,04 ppm corresponden a tres protones singuletes; en 0,81; 0,83; 0,92 y 1,01 ppm se ubican tres protones duplete; en 3,52 ppm se observa un protón multiplete; la señal en 5,35 ppm corresponde a un protón multiplete olefínico; finalmente en la señal a 5,18 ppm se ubican dos protones multiplete olefínico.

El espectro RMN-¹³C (CDCl₃) (Figura 55, Anexo 7) presentó veintiocho señales correspondientes a veintiocho átomos de carbono, las señales entre 12 y 22 ppm corresponden a seis metilos; en 71,97 ppm se ubica un carbono terciario unido a un hidroxilo; entre 21 y 57 ppm se observan carbonos secundarios, terciarios y cuaternarios; finalmente las señales entre 121 y 141 ppm son características de cuatro carbonos olefínicos.

Al analizar los espectros RMN-¹H y RMN-¹³C y compararlo con lo reportado por Vu (41), González et al. (43) y Queiroz (101) se propone que el compuesto 9 sería brasicasterol, cuya estructura se muestra en la Figura 31.

Tabla 25. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN-¹H y RMN-¹³C del compuesto 9.

Posición	(400 MHz, CDCl ₃)	(126 MHz, CDCl ₃)
	δ _H (mult.)	δ _C
1	-	37,41
2	-	30,25
3	3,52 (1H, m)	71,97
4	-	39,83
5	-	140,89
6	5,35 (1H, m)	121,86
7	-	31,81
8	-	32,05
9	-	50,31
10	-	36,67
11	-	21,11
12	-	40,31
13	-	42,39
14	-	56,99
15	-	24,44
16	-	28,69
17	-	56,17
18	0,69 (3H, s)	12,23
19	1,04 (3H, s)	19,55
20	-	42,44
21	1,01 (3H, d)	21,26
22	5,18 (1H, m)	135,98
23	5,18 (1H, m)	131,87
24	-	42,96
25	-	33,25
26	0,81 (3H, d)	20,11
27	0,83 (3H, d)	19,80
28	0,92 (3H, d)	17,77

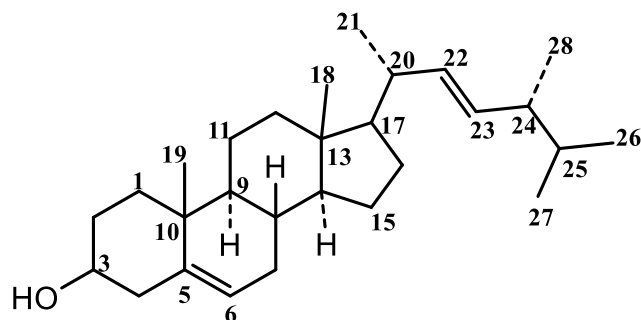


Figura 31. Estructura del compuesto 9.

4.4.1. Polioliol

El análisis del espectro RMN-¹H (DMSO-d₆) para el compuesto S2 (Tabla 26), permitió evidenciar que es un polioliol (35). Su espectro (Figura 56, Anexo 7) presentó seis señales que integran para un total de seis hidrógenos, todas ellas corresponden a un hidrógeno del tipo -CH₂-O- o -CH-O-, de las cuales, entre 3 y 4,3 ppm se ubican hidrógenos beta; en 4,39 ppm se observa un hidrogeno alfa; finalmente las señales 3,54 y 4,11 ppm corresponden a los hidrógenos de un grupo metileno duplete.

El espectro IR (Figura 57, Anexo 5) presenta un perfil característico de un polioliol, del cual se observa una banda ancha entre 3290 y 3388 cm⁻¹ debido a la absorción de los grupos OH; la de 2939 cm⁻¹ correspondiente a estiramientos C-H saturadas, una señal débil a 1627 cm⁻¹ debido al carbonilo del ácido carboxílico; una absorción a 1458 cm⁻¹ correspondiente a flexiones del metileno; la señal a 1020 y 1082 cm⁻¹ debido a estiramientos primarios y secundarios del C-OH.

Tabla 26. Desplazamiento (ppm) del espectro RMN-¹H del compuesto S2.

Posición	(400 MHz, DMSO-d ₆)
	δ (mult., J en Hz)
2	4,39 (1H, d, J = 5,1)
3	4,30 (1H, t, J = 5,2)
4	3,46 (1H, m)
5	3,39 (1H, m)
6	4,12 (1H, d, J = 6,9)
6'	3,54 (1H, d, J = 7,4)

El espectro ESI-MS-MS (Sec. 4.2.7.) mostró un ión molecular $[M - H]^-$ de m/z 195,05058, concordante para una fórmula molecular $C_6H_{12}O_7$, cuya fragmentación produjo los iones MS m/z 177,03969 $[M - H - H_2O]^-$; 159,02914 $[M - H - 2H_2O]^-$; 151,06044 $[M - H - CO_2]^-$ y 129,01837 $[M - H - 2H_2O - CH_2O]^-$ que corresponde con la referencia (94).

Al analizar los espectros RMN- 1H , IR y ESI-MS-MS y compararlo con lo reportado por Cádiz-Gurrea et al. (94) y Wishart et al. (102) se propone que el compuesto S2 sería ácido glucónico, cuya estructura se muestra en la Figura 32.

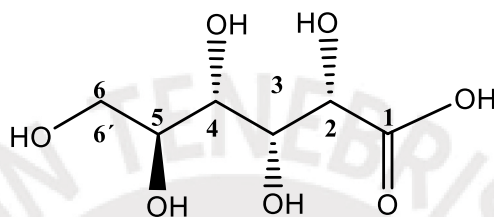


Figura 32. Estructura del compuesto S2.

4.5. Análisis cuantitativo de ácido úsnico

4.5.1. Preparación de la muestra liquénica

Se trabajó por triplicado como se indica en la Tabla 27.

Tabla 27. Masas de la muestra liquénica.

Muestra	Masa (g)
M1	1,0004
M2	1,0007
M3	1,0003

4.5.2. Curva de calibración

Se determinó la absorbancia máxima, ver Tabla 28, del espectro UV-Vis entre 200 y 400 nm, de una solución de ácido úsnico de 5 ppm, obteniéndose como $\lambda_{max} = 283,8$ nm, confirmando que a esa longitud de onda no interfiere el solvente, ver Figura 53 (Anexo 8). Se aprecia que los valores de absorbancia máxima son bastantes cercanos con los reportados por Castro (8) (Tabla 5).

Tabla 28. Absorbancias máximas del espectro UV-Visible del ácido úsnico.

Compuesto	Banda 1	Banda 2
Ácido úsnico	234,4 nm	283,8 nm

Luego se midió la absorbancia de cada estándar preparado a dicha λ_{\max} , los cuales se indican en la Tabla 29. Con los datos obtenidos se graficó la curva de calibración, la cual se muestra en la Figura 33.

Tabla 29. Datos de absorbancias obtenidas para cada estándar.

Estándar N°	Concentración (ppm)	Absorbancia
1	1,0	0,29161
2	1,5	0,38357
3	2,0	0,46649
4	2,5	0,55835
5	3,0	0,64220
6	3,5	0,73617
7	4,0	0,83220
8	4,5	0,92708
9	5,0	1,00620

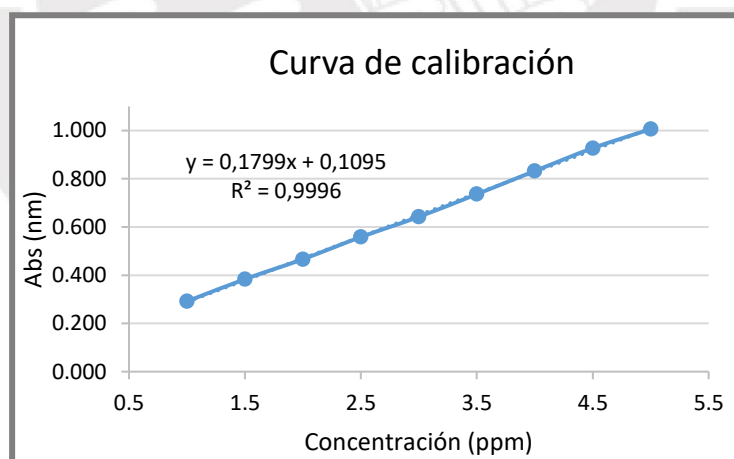


Figura 33. Curva de calibración de la muestra patrón de ácido úsnico.

4.5.3. Determinación cuantitativa de ácido úsnico en la muestra líquénica

La Tabla 30 presenta las concentraciones de cada muestra líquénica a diferentes diluciones, obtenidas en base a la curva de calibración. Para esto se utilizó la ecuación de la curva de calibración de la muestra patrón:

$$y = 0,17994x + 0,10951$$

y: absorbancia (Abs.) x: concentración de la muestra problema (ppm)

Tabla 30. Datos de absorbancias obtenidas a diferentes diluciones para cada muestra.

Muestra	Dilución ($V_{alícuota}/V_{fiola}$)	Absorbancia (Abs.)	Concentración (ppm)
M1	0,6/10	0,66300	3,0767
	0,6/10	0,66344	3,0792
	0,6/10	0,66398	3,0822
M2	0,6/10	0,68667	3,2083
	0,6/10	0,68587	3,2038
	0,6/10	0,68453	3,1964
M3	1,5/25	0,65739	3,0455
	1,5/25	0,65543	3,0346
	1,5/25	0,65798	3,0488

Para determinar el porcentaje de ác. úsnico en las muestras M1, M2 y M3 se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Ác. úsnico}_{\text{muestra}} = [\text{Conc.}_{\text{fiola}}] \times \frac{V_{\text{fiola}}}{V_{\text{alícuota}}} \times \frac{100 \text{ mL}}{\text{masa}_{\text{muestra}}} \times 100\%$$

Al aplicar la ecuación anterior, se tiene los resultados que se pueden observar en la Tabla 31, cuyo tratamiento de datos se explica en el Anexo 8.

Tabla 31. Porcentaje de ácido úsnico en la muestra líquénica.

Muestra	Abs _{prom.}	Conc _{prom.} (ppm)	%Ác. úsnico _{prom.} (g/g)	%Ác. úsnico _{muestra} (g/g)
M1	0,66349	3,08 ± 0,04	0,51 ± 0,01	0,52 ± 0,03
M2	0,68560	3,21 ± 0,04	0,53 ± 0,01	
M3	0,65693	3,05 ± 0,04	0,51 ± 0,01	

El porcentaje de ácido úsnico obtenido para el *S. glareosum* (0,52 %), al compararlo con lo reportado en otras dos especies de *Stereocaulon* (ver Tabla 6) podemos observar que el líquen en estudio contiene un mayor porcentaje de ácido úsnico que el *S. vesuvianum* (0,12 %), lo cual se puede explicar por la diferencia de la zona a la cual fueron recolectados estas dos especies

(procedentes de distintos distritos de la provincia de Junín), por un lado, la especie en estudio fue recolectado a una altura 4900 - 5100 msnm, en cambio el *S. vesuvianum* a una altura 4100 msnm (8). Dicho esto, se puede deducir que, al encontrarse la especie en estudio a una mayor altura, soporta una mayor radiación ultravioleta, por lo que el líquen a manera de respuesta tiende a biosintetizar mayores compuestos fotoprotectores. Uno de estos es el ácido úsnico, el cual presenta dicha actividad fotoprotectora, por lo tanto, se puede hacer una correlación entre la cantidad de radiación ultravioleta y la cantidad de compuestos fotoprotectores (ácido úsnico) que biosintetiza el líquen.



5. CONCLUSIONES

- i. Cualitativamente se evidenció la presencia de aminogrupos primarios y secundarios, grupos fenólicos, triterpenos, esteroides y quinonas. Asimismo, se determinó la presencia de compuestos liquénicos, en particular de atranorina y ácido estictico.
- ii. En base al perfil metabolómico del extracto metanólico del liquen *S. glareosum* se identificó por primera vez 48 compuestos, los cuales se detectaron en modo negativo mediante el uso de UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS. De los compuestos identificados entre aromáticos, dépsidos, depsidonas, difeniléteres, dibenzofuranos, lípidos y polioles conforman 36 y otros 12 se proponen en base a sus espectros característicos UV-vis y ESI-MS-MS, así como la relación que guardan con ciertos compuestos liquénicos.

A partir de los compuestos identificados se proponen las rutas biosintéticas de los compuestos aromáticos, dépsidos, depsidonas, difeniléteres, dibenzofuranos y lípidos, en base a la similitud de sus estructuras químicas y la pérdida de sus grupos funcionales.

Este estudio demostró que esta técnica es robusta, rápida y precisa para la identificación de los compuestos liquénicos, de tal modo que los datos obtenidos podrían ser útiles para estudios de quimiotaxonomía.

- iii. El análisis de ácidos grasos como metilésteres demostró la presencia de 16 ácidos grasos mediante el uso de GC-FID, después de comparar los tiempos de retención obtenidos de los estándares.

En base a este resultado, en comparación con lo ya identificado en otras especies de *Stereocaulon*, podemos mencionar que el contenido de lípidos varía según la especie y familia, debido a los factores ecológicos a los cuales están expuestos como el clima, temperatura, radiación UV, la altitud, entre otros.

- iv. El estudio químico del liquen *S. glareosum* nos permitió aislar 9 compuestos, a partir de las fracciones primarias y secundarias que se sometieron a procesos de separación y purificación por cromatografía en columna y/o cristalización. Se evidenciaron cuatro compuestos aromáticos entre haematomato de metilo, ácido 2,4-dimetoxi-6-pentilbenzoico, ácido 2,4-dimetoxi-6-propilbenzoico, β -orcinol carboxilato de metilo (atrarato de metilo) y orselinato de metilo; un dépsido,

atranorina; una depsidona, ácido lobárico; un esteroide, brasicasterol y un poliol ácido glucónico; cuyas estructuras se determinaron en base a análisis espectroscópicos en comparación con referencias citadas.

Tres de los compuestos aislados son mayoritarios, de acuerdo al porcentaje de rendimiento como la atranorina con 33,3 %, el ácido lobárico con 4,53 % y el β -orcinol carboxilato de metilo con 3,33 %.

- v. Se determinó un contenido de 0,52 % de (+)-ácido úsnico mediante el espectrofotómetro UV-Visible.

En base a este resultado, en comparación con lo ya identificado en otras especies de *Stereocaulon*, podemos mencionar que el contenido de ácido úsnico puede variar dependiendo de la cantidad de radiación ultravioleta al que esté expuesto.



6. RECOMENDACIONES

- i. En base al estudio realizado del perfil metabolómico del extracto metanólico del líquen *S. glareosum* se sugiere aislar los 12 compuestos propuestos, para así corroborar lo predicho.
- ii. Para consolidar los estudios de quimiotaxonomía se recomienda realizar el perfil metabolómico del extracto metanólico del líquen *S. glareosum* en modo positivo mediante el uso de UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS, de esta manera poder identificar compuestos como antraquinonas, micosporinas, entre otros.
- iii. Se recomienda realizar un estudio completo y preciso del contenido de lípidos como ácidos grasos, acilglicéridos, esteroides, glicolípidos, fosfolípidos entre otros, al contrastar especies del mismo y/o distinto género, del mismo lugar de recolecta y verificando los factores ecológicos a los cuales están expuestos, para así poder explicar la relación que guardan los lípidos en estudio con los factores analizados y evaluar alguna diferencia entre especies del mismo y/o distinto género.
- vi. Luego de realizar el estudio químico del líquen *S. glareosum*, se recomienda evaluar la actividad biológica de los metabolitos aislados, para aplicaciones potenciales en el área de medicina y farmacología.
- v. En base al estudio cuantitativo del ácido úsnico se recomienda evaluar el contenido de compuestos fotoprotectores entre ellos el ácido úsnico, comparar especies del mismo y/o distinto género, del mismo y/o distinto lugar de recolecta y evaluar los factores ecológicos a los cuales están expuestos como la radiación ultravioleta, nubosidad, entre otros, para así poder explicar la variación del contenido de compuestos liquénicos y encontrar alguna relación, si la hubiera, con los factores ecológicos a los cuales están expuestos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro Mandujano ON. Investigación fitoquímica de los líquenes. Química de los líquenes. Saarbrücken: Académica Española; 2016.
2. Viteri Espinoza RA. Estudio fitoquímico del extracto etanólico del líquen usnea antártica, procedente de la Antártida. [Tesis de Maestría] San Antonio de los Altos: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas; 2015.
3. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Nikolić M, Tošić S, Stojičić D. Lichens as source of versatile bioactive compounds. Biol Nyssana. 2011;2(1):1-6.
4. Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. Naturwissenschaften. 1999;86(12):559-70.
5. Nash TH. Lichen Biology. 2nd. ed. Cambridge University Press: Arizona State University; 2008.
6. Upreti DK, Divakar PK, Shukla V, Bajpai R, editores. Recent Advances in Lichenology. Vol 1, Modern Methods and Approaches in Biomonitoring and Bioprospection. New Delhi: Springer India; 2015. 265p.
7. Coutiño B, Montañez AL. Los líquenes. Ciencias. 2000;59:64-5.
8. Castro Mandujano ON. Aislamiento del ácido úsnico de *Flavoparmelia caperata* y su determinación cuantitativa por espectroscopía UV, en diez líquenes. Rev Soc Quím Perú. 2010;76(4):389–99.
9. Peña J, Robayo P, Valencia-Islas N, Rojas J, Dávila R. Actividad Antioxidante de los Líquenes *Stereocaulon novogranatense*, *S. pomiferum* y *Dictyonema glabratum*. GLALIA. 2012;4(4):95.
10. Ismed F, Lohézic-Le Dévéhat F, Delalande O, Sinbandhit S, Bakhtiar A, Boustie J. Lobarin from the Sumatran lichen, *Stereocaulon halei*. Fitoterapia. 2012;83(8):1693-8.
11. Morita H, Tsuchiya T, Kishibe K, Noya S, Shiro M, Hirasawa Y. Antimitotic activity of lobaric acid and a new benzofuran, sakisacaulon A from *Stereocaulon sasakii*. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19(13):3679-81.
12. Sepulveda B, Chamy MC, Piovano M, Areche C. Lichens: might be considered as a source of gastroprotective molecules? J Chil Chem Soc. 2013;58(2):1750-2.
13. Perico Franco LS. Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (Stereocaulaceae) y *Lobariella pallida* (Lobariaceae) y determinación de su potencial citotoxicidad [Tesis Doctoral]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
14. Perico Franco J, Valencia-Islas N, Rojas J, Cerbón M, González I. Efecto Protector Celular y del ADN frente a Daño Oxidativo y Citotoxicidad de Extractos y Metabolitos Secundarios de *Stereocaulon strictum* y *Lobariella pallida*. GLALIA. 2012;4(4):93.

15. Caccamese S, Compagnini A, Toscano RM, Cascio O. Methyl β -Orcinolcarboxylate and Atranol from the Lichen *Stereocaulon vesuvianum*. J Nat Prod. 1986;49(6):1159-60.
16. Seo C, Sohn JH, Park SM, Yim JH, Lee HK, Oh H. Usimines A-C, Bioactive Usnic Acid Derivatives from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum*. J Nat Prod. 2008;71(4):710-2.
17. Hidalgo ME, Bascuñan L, Quilhot W, Fernandez E, Rubio C. Spectroscopic and Photochemical Properties of the Lichen Compound Lobaric Acid. Photochem Photobiol. 2005;81(6):1447-9.
18. Bucar F, Schneider I, Ögmundsdóttir H, Ingólfssdóttir K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. Phytomedicine. 2004;11(7-8):602-6.
19. Ingólfssdóttir K, Gissurarson SR, Müller-Jakic B, Breu W, Wagner H. Inhibitory effects of the lichen metabolite lobaric acid on arachidonate metabolism in vitro. Phytomedicine. 1996;2(3):243-6.
20. Checklists of Lichens - Index [Internet]. 2015 [citado 25 de junio de 2017]. Disponible en: http://www.lichens.uni-hamburg.de/lichens/portalpages/index_index.htm#P
21. Ramírez Á, Cano A. Líquenes de Pueblo Libre, una localidad andina en la Cordillera Negra (Huaylas, Ancash, Perú). Rev Peru Biol. 2005;12(3):383–96.
22. Nuñez-Zapata J, Divakar PK, Huallparimachi G, Holgado ME, Vela Clavo Z, Pavlich M, et al. Nuevos registros de la liquenobiota del Santuario Histórico de Machu Picchu, Perú. Rev Peru Biol. 2015;22(3):323-8.
23. Rincon-Espitia A, Mateus N. Morphological and anatomical characterization of the genus *Stereocaulon hoffmann* (Lichenized ascomycetes) in Colombia. Caldasia. 2013;35(2):241–60.
24. Stepanchikova IS, Andreev MP, Himelbrant DE, Motiejūnaitė J, Schiefelbein U, Konoreva LA, et al. The lichens of Bolshoy Tuters Island (Tytärsaari), Leningrad Region, Russia. Folia Cryptogam Est. 2017;54:95-116.
25. Högnabba F. Molecular phylogeny of the genus *Stereocaulon* (Stereocaulaceae, lichenized ascomycetes). Mycol Res. 2006;110(9):1080-92.
26. Chapman MJ, Margulis L. Morphogenesis by symbiogenesis. Int Microbiol. 1998;1(4):319–26.
27. Spribille T, Tuovinena V, Resl P, Vanderpool D, Wolinski H. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. Science. julio de 2016;353(6298):488-92.
28. Liquenesdecanarias [Internet]. Liquenesdecanarias. [citado 10 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://liquenesdecanarias.wordpress.com/>
29. Brodo IM, Sharnoff SD, Sharnoff S, Nature CM of. Lichens of North America. Yale University Press; 2001.
30. Honda NK, Vilegas W. A química dos liquens. 1998;21(6):110-25.

31. Gregorio Aragon R. Guía para identificar macrolíquenes epífitos en el centro de España. Universidad Rey Juan Carlos; 2010.
32. Nayaka S, Upreti DK, Khare R. Medicinal lichens of India. En: In Drugs from plants. P. C. Trivedi. India: Avishkar Publishers; 2010.
33. Ranković B, editor. Lichen Secondary Metabolites. Cham: Springer International Publishing; 2015.
34. Rai MK, Cordell GA, Martinez JL, Marinoff M, Rastrelli L. Medicinal Plants: Biodiversity and Drugs. CRC Press; 2012.
35. Huneck S, Yoshimura I. Identification of Lichen Substances. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996.
36. Vu TH, Catheline D, Delmail D, Boustie J, Legrand P, LohéZic-Le DéVéHat F. Gas chromatographic analysis to compare the fatty acid composition of fifteen lichen species, with a focus on *Stereocaulon*. *The Lichenologist*. 2016;48(4):323-37.
37. Nguyen K-H, Chollet-Krugler M, Gouault N, Tomasi S. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat Prod Rep*. 2013;30:1490-508.
38. Sipman H. Key to the *Stereocaulon* species in the Neotropics [Internet]. 2002 [citado 13 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.bgbm.org/sipman/keys/Neostereo.htm>
39. Mittermeier V, Schmitt N, Volk L, Suárez J, Beck A, Eisenreich W. Metabolic Profiling of Alpine and Ecuadorian Lichens. *Molecules*. 2015;20:18047-65.
40. Seo C, Sohn JH, Ahn JS, Yim JH, Lee HK, Oh H. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory effects of depsidone and pseudodepsidone metabolites from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(10):2801-3.
41. Vu TH. Etude des acides gras du genre *Stereocaulon* et étude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe [Tesis Doctoral]. Rennes 1; 2014.
42. Gupta VK, Darokar MP, Shanker K, Negi AS, Srivastava SK, Gupta MM, Khanuja SP. Rapid and Sensitive HPLC Method for the Determination of Polyphenols in Various Lichen Species of Himalayan Origin. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2007;30(1):97-111.
43. González AG, Rodríguez PEM, Hernández PCE, Barrera JB. Chemical Constituents of the Lichen *Stereocaulon azureum*. *Z Für Naturforschung C*. 1992;47(7-8):503–7.
44. Hylands PJ, Ingoldsdottir K. The isolation of methyl β -orsellinate from *Stereocaulon alpinum* and comments on the isolation of 4,6-dihydroxy-2-methoxy-3-methylacetophenone from *stereocaulon* species. *Phytochemistry*. 1985;24(1):127-9.
45. Ismed F, Dévéhat FL-L, Rouaud I, Ferron S, Bakhtiar A, Boustie J. NMR reassignment of stictic acid isolated from a Sumatran lichen *Stereocaulon montagneanum* (Stereocaulaceae) with superoxide anion scavenging activities. *Z Für Naturforschung C*. 2017;72(1-2):55-62.

46. Carpentier C, Queiroz EF, Marcourt L, Wolfender J-L, Azelmat J, Grenier D, et al. Dibenzofurans and Pseudodepsidones from the Lichen *Stereocaulon paschale* Collected in Northern Quebec. *J Nat Prod.* 2017;80(1):210-4.
47. Vila J, Mollinedo P, Flores Y, Sterner O. 1, 3, 7-Trimethylguanaine from the lichen *Stereocaulon Ramulosum*. *Rev Boliv Quím.* 2008;25(1):1-3.
48. Bolognese A, Chioccare F, Scherillo G. Isolation and characterization of atranorin and 4, 6 dihydroxy-2-methoxy-3-methylacetophenone from *Stereocaulon vesuvianum*. *Phytochemistry.* 1974;13(9):1989-90.
49. Kristmundsdóttir T, Jónsdóttir E, Ögmundsdóttir HM, Ingólfssdóttir K. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24:539-43.
50. Ingólfssdóttir K, Chung GA, Skúlason VG, Gissurarson SR, Vilhelmsdóttir M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. *Eur J Pharm Sci.* 1998;6(2):141-4.
51. Falk A, Green TK, Barboza P. Quantitative determination of secondary metabolites in *Cladina stellaris* and other lichens by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A.* 2008;1182:141-4.
52. Miyagawa H, Yamashita M, Ueno T, Hamada N. Hypostrepsilalic acid from a cultured lichen mycobiont of *Stereocaulon japonicum*. *Phytochemistry.* 1997;46(7):1289-91.
53. Huneck S. Sekundärstoffe einiger *Stereocaulon*-arten. *Phytochemistry.* 1974;13:2313-4.
54. Huneck S. Die sekundärstoffe einiger flechten. *Phytochemistry.* 1 de abril de 1972;11(4):1493-5.
55. Fox CH, Klein E, Huneck S. Colensionsäure, ein neues depsidon aus *stereocaulon colensoi*. *Phytochemistry.* 1970;9(12):2567-71.
56. Fox CH, Huneck S. Inhaltsstoffe von einigen *Stereocaulon*-arten. *Phytochemistry.* 1970;9(9):2057.
57. Hamada N, Ueno T. Lecanoric acid from the mycobiont of the lichen *Stereocaulon curtatum*. *Phytochemistry.* 1990;29(2):678-9.
58. Ingólfssdóttir K, Hylands PJ, Solberg Y. Structure of vesuvianic acid from *stereocaulon* species. *Phytochemistry.* 1986;25(2):550-3.
59. Kim S, Jo S, Lee H, Kim TU, Kim I-C, Yim JH, et al. Lobarstin enhances chemosensitivity in human glioblastoma T98G cells. *Anticancer Res.* 2013;33(12):5445-51.
60. Santesson J. Some occurrences of the anthraquinone parietin in lichens. *Phytochemistry.* 1970;9(7):1565-67.
61. Shukla V, Kumari R, Patel DK, Upreti DK. Characterization of the diversity of mycosporine-like amino acids in lichens from high altitude region of Himalaya. *Amino Acids.* 2016;48(1):129-36.

62. Roullier C, Chollet-Krugler M, Pferschy-Wenzig E-M, Maillard A, Rechberger GN, Legouin-Gargadennec B, et al. Characterization and identification of mycosporines-like compounds in cyanolichens. Isolation of mycosporine hydroxyglutamicol from *Nephroma laevigatum* Ach. *Phytochemistry*. 2011;72(11-12):1348-57.
63. Seo C, Yim JH, Lee HK, Park SM, Sohn J-H, Oh H. Stereocalpin A, a bioactive cyclic depsipeptide from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *Tetrahedron Lett*. 2008;49:29-31.
64. Ingólfssdóttir K, Gissurarson SR, Nenninger A, Neszmelyi A, Wiedemann B, Wagner H. Biologically active alkamide from the lichen *Stereocaulon alpinum*. *Phytomedicine*. 1997;4(4):331-4.
65. Gorin PA, Iacomini M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. *Carbohydr Res*. 1985;142(2):253-67.
66. Teixeira AZA, Iacomini M, Gorin PAJ. An unusual glucomannan from *Tornabenia intricata*. *Phytochemistry*. 1992;31(10):3467-70.
67. Baron M, Gorin PAJ, Iacomini M. Structural Studies on a Galactomannan Isolated from the Lichen *Stereocaulon ramulosum*. *Agric Biol Chem*. 1989;53(7):1751-8.
68. Baron M, Gorin PA, Iacomini M. Isolation and identification of a linear (1→3)-linked β-d-glucan and other carbohydrate components of the lichen *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Räsusch. *Carbohydr Res*. 1988;177:235-9.
69. Takahashi K, Kon T, Yokota I, Shibata S. Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. polysaccharides of stereocaulaceous lichens. *Carbohydr Res*. 1981;89(1):166-73.
70. Iwata S, Narui T, Takahashi K, Shibata S. Separation of carbohydrates by I.c. in an aqueous, silica gel column. *Carbohydr Res*. 1984;133(1):157-62.
71. Czczuga B, Alstrup V. The carotenoid content of lichens from Greenland. *Biochem Syst Ecol*. 1987;15(3):297-301.
72. Guo L, Shi Q, Fang J-L, Mei N, Ali AA, Lewis SM, et al. Review of Usnic Acid and Usnea Barbata Toxicity. *J Environ Sci Health Part C*. 2008;26(4):317-38.
73. Bhattarai HD, Kim T, Oh H, Yim JH. A new pseudodepsidone from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum* and its antioxidant, antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 2013;1-3.
74. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, et al. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study. *Phytother Res*. 2012;27(3):431-7.
75. Kim M-K. Antioxidant Properties of Various Microorganisms Isolated from Arctic Lichen *Stereocaulon* spp. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2013;41(3):350-7.
76. Kim M-K. Antibacterial Properties Associated with Microorganisms Isolated from Arctic Lichens. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2012;40(4):380-8.

77. Ranković B, Kosanić M, Stanojković T. Stereocaulon paschale lichen as antioxidant, antimicrobial and anticancer agent. *Farmacia*. 2014;62(2):306-17.
78. Plaza C, Pérez C, Marietta V, Medina G, Morales A, Hernández J, et al. Estudio Antifúngico Preliminar de Extractos de Varios Líquenes Foliosos y Fruticulosos de los Páramos Merideños. *GLALIA*. 2012;4(4):98.
79. Valcárcel Cases M, Gómez Hens A. Técnicas analíticas de separación. España: Reverté; 1998.
80. Hostettmann K, Hostettmann M, Marston A. Preparative Chromatography Techniques. Applications in Natural Product Isolation. New York: Springer- Verlag Berlin Heidelberg; 1986.
81. Skoog DA, Crouch SR, Holler FJ. Principios de análisis instrumental. 6ta ed. México: Cengage Learning; 2008.
82. Castro ON, Benites J, Rodilla J, Santiago JC, Simirgiotis M, Sepulveda B, et al. Metabolomic Analysis of the Lichen Everniopsis trulla Using Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry (UHPLC-Q-OT-MS). *Chromatographia*. junio de 2017;80(6):967-73.
83. Musharraf SG, Kanwal N, Thadhani VM, Choudhary MI. Rapid identification of lichen compounds based on the structure-fragmentation relationship using ESI-MS/MS analysis. *Anal Methods*. 2015;7(15):6066-76.
84. Parrot D, Jan S, Baert N, Guyot S, Tomasi S. Comparative metabolite profiling and chemical study of Ramalina siliquosa complex using LC-ESI-MS/MS approach. *Phytochemistry*. 2013;89:114-24.
85. Simirgiotis MJ, Quispe C, Mocan A, Villatoro JM, Areche C, Bórquez J, et al. UHPLC high resolution orbitrap metabolomic fingerprinting of the unique species Ophryosporus triangularis Meyen from the Atacama Desert, Northern Chile. *Rev Bras Farmacogn*. 2017;27(2):179-87.
86. Salgado F, Albornoz L, Cortéz C, Stashenko E, Urrea-Vallejo K, Nagles E, et al. Secondary Metabolite Profiling of Species of the Genus Usnea by UHPLC-ESI-OT-MS-MS. *Molecules*. 2017;23(1):54.
87. Gómez Romero M. Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales. [Tesis Doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2010.
88. Robles J, Morales P, Pastor de Abram P. Líquenes y sustancias liquénicas segunda parte. *Rev Quím*. 1992;6(2):191-200.
89. White FJ, James PW. A New Guide to Microchemical Techniques for the Identification of Lichen. London: British Lichen Society; 1985.
90. Reyna Pinedo V. Marcha Fitoquímica, Práctica de Laboratorio (Separata), Curso de Química de Productos Naturales-CQ046. Lima: Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería; 1999. 5 p.
91. Rondina R, Coussio J. Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas. *Rev Investig Agropecu-INTA*. 1969;6(33):351-66.

92. Orozco-Solano M, Ruiz-Jiménez J, Luque de Castro MD. Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2010;1217(8):1227-35.
93. Le Pogam P, Schinkovitz A, Legouin B, Le Lamer A-C, Boustie J, Richomme P. Matrix-Free UV-Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry as a Versatile Approach for Accelerating Dereplication Studies on Lichens. *Anal Chem*. 2015;87(20):10421-8.
94. Cádiz-Gurrea M de la L, Fernández-Arroyo S, Joven J, Segura-Carretero A. Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Res Int*. 2013;50(1):197-204.
95. Torres-Benítez A, Rivera-Montalvo M, Sepúlveda B, Castro O, Nagles E, Simirgiotis M, et al. Metabolomic Analysis of Two Parmotrema Lichens: *P. robustum* (Degel.) Hale and *P. andinum* (Mull. Arg.) Hale Using UHPLC-ESI-OT-MS-MS. *Molecules*. 2017;22(11):1861.
96. Cornejo A, Salgado F, Caballero J, Vargas R, Simirgiotis M, Areche C. Secondary Metabolites in *Ramalina terebrata* Detected by UHPLC/ESI/MS/MS and Identification of Parietin as Tau Protein Inhibitor. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8):1303.
97. Ismed F. Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon* : étude pasticiulière de *S. Halei* Lamb et *S. montagneanum*, deux lichens recoltés en Indonésie [Tesis Doctoral]. Rennes 1; 2012.
98. Zelada BR, Pastor de Abram A. Estudio fitoquímico de *Usnea durietzii* mot.(Usneaceae). *Rev Soc Quím Perú*. 2012;78(4):264-76.
99. Yamamoto Y, Watanabe A. Fatty acid composition of lichens and their phyco-and mycobionts. *J Gen Appl Microbiol*. 1974;20(2):83-6.
100. Dembitsky VM. Lipids of lichens. *Prog Lipid Res*. 1992;31(4):373-97.
101. Queiroz GS. Análise de esteróides em extratos vegetais e estudo fitoquímico e biológico preliminar de *Brunfelsia uniflora*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.
102. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res*. 2008;37(suppl_1):D603-10.
103. Ramis R, Álvarez C. Quimiometría. Perú: Síntesis; 2008.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1: Determinación botánica del líquen *Stereocaulon glareosum* (Sav.) H. Magn.

CONSTANCIA DE DETERMINACIÓN

Por la presente, dejo constancia que:

La muestra vegetal (líquen) recibida de la **Srta. ERIKA LIZET MILAGROS CALLA QUISPE** ha sido estudiada y clasificada como: *Stereocaulon glareosum* (Sav.) H. Magn. y tiene la siguiente posición taxonómica:

REINO: Fungi

PHYLUM: Ascomycota

CLASE: Lecanoromycetes

ORDEN: Lecanorales

FAMILIA: Stereocaulaceae

GÉNERO: *Stereocaulon*

ESPECIE: *Stereocaulon glareosum* (Sav.) H. Magn.

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



Lima, 21 de junio del 2014



ANGEL M. RAMÍREZ ORDAZA
BIOLOGO
COLBIOP N° 6632

Blgo. Ángel Manuel Ramírez Ordaza

N° de colegio de biólogos: 6632

8.2. Anexo 2: Ingreso del líquen *Stereocaulon glareosum* (Sav.) H. Magn. a la colección del Herbario San Marcos



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



Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático”

CONSTANCIA N° 32-2014-USM-MHN

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

Erika Lizet Milagros Calla Quispe hizo entrega al Herbario San Marcos (USM), de 1 muestras botánicas herborizadas y montadas, las cuales fue colectada en el Departamento de Junín, Provincia de Huancayo.

La muestra fue numerada,

- *Stereocaulon glareosum* (Sav.): USM 278427.

Dicha muestra fue ingresada a la colección del Herbario San Marcos (USM).

Se expide la presente, a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente

Lima, 10 de noviembre de 2014



Maydeé Montoya Terreros
Dra. **MAYDEE MONTOYA TERREROS**
JEFE JEFA HERBARIO SAN MARCOS (USM)

8.3. Anexo 3: Reacciones de coloración para compuestos liquénicos

Para este análisis se empleó 1 g de muestra liquénica seca y molida, se extrajo con acetona en caliente (45 °C) por 5 minutos. Luego se filtró y se procedió con los siguientes ensayos:

i. Ensayo de Hidróxido de potasio

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del extracto acetónico, luego se adicionó 5 gotas de una solución de NaOH al 10 % (reactivo K).

Observación: Una coloración amarilla hasta el rojo o pardo, nos indica la presencia de compuestos liquénicos. En el caso de coloración amarilla tenue a intensa, indica la presencia de ácido estíctico y atranorina.

ii. Ensayo de hipoclorito de sodio

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del extracto acetónico, luego se adicionó 5 gotas de Hipoclorito de sodio (reactivo C).

Observación: Una coloración fugaz de rosa, roja, naranja o verde, indica la presencia de compuestos liquénicos. En el caso de coloración naranja, indica la presencia de xantonas, una coloración verde, la de dibenzofuranos.

iii. Ensayo de ácido nítrico

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del extracto acetónico, luego se adicionó 5 gotas de ácido nítrico al 50 %.

Observación: Un viraje en la coloración de azul a rojo púrpura, verde esmeralda o verde azulado indica prueba positiva de compuestos liquénicos.

iv. Ensayo de cloruro férrico

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del extracto acetónico, luego se adicionó 5 gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 1 % y se agitó.

Observación: Una coloración de color rojo-vino o verde indica la presencia de grupos fenólicos simples como los derivados de β -orcinol.

Tabla 32. Resultado de las reacciones de coloración del líquen *Stereocaulon glareosum*.

Reacciones de coloración	Resultados (*)	Observaciones
Ensayo de hidróxido de potasio	+	Solución de color amarillo intenso que evidencia la presencia de atranorina y ácido estíctico.
Ensayo de hipoclorito de sodio	+	Solución de color pardo rojizo a la primera gota, anaranjado a la tercera gota, y amarillo intenso a la quinta gota que evidencia la presencia de dibenzofurano.
Ensayo de ácido nítrico	+	Solución de color verde claro indica la presencia de compuestos liquénicos.
Ensayo de cloruro férrico	+	Solución de color vino-violeta indica la presencia de grupos fenólicos simples como los derivados de β -orcíinol.

(*) Convención: (+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa



8.4. Anexo 4: Marcha fitoquímica

La marcha fitoquímica adaptada por Reyna (90) permite la identificación preliminar de metabolitos presentes en una muestra vegetal, de tal manera que orienta la extracción, el fraccionamiento de los extractos y permite elegir los metabolitos secundarios de mayor interés para el investigador.

8.4.1. Obtención de las Fracciones

1. Fracción (a)

- i. Se extrajo 5 g de muestra líquénica seca y molida con 50 mL de metanol, posteriormente se maceró durante 20 horas a temperatura ambiente.
- ii. La muestra macerada, se sometió a reflujo durante 4 horas. Luego se filtró en caliente, se lavó el residuo con 50 mL de metanol.
- iii. Se separó 5 mL del extracto obtenido, lo que constituyó la fracción (a).

2. Fracción (b)

- i. Se llevó a sequedad los 45 mL restantes del extracto metanólico.
- ii. Se hizo una extracción del residuo obtenido con 10 mL de HCl al 1 %, calentando ligeramente (50 °C) y se filtró. Esta operación se repitió una vez más, pero con 5 mL de HCl al 1 %. Las soluciones ácidas obtenidas se guardaron para ser utilizadas posteriormente (Sec. 3.i).
- iii. El residuo sólido se disolvió con 5 mL de cloroformo, con ayuda de calor (50 °C) y agitación vigorosa, luego se filtró. El líquido filtrado se secó con sulfato de sodio anhidro y se obtuvo la fracción (b).

3. Fracción (c)

- i. La solución ácida obtenida en la sección 2.ii, se basificó con NH_3 7,5 N hasta pH 9 - 10.
- ii. Se hizo una extracción con cloroformo (2x25 mL) se guardó la fase acuosa para su posterior utilización (Sec. 4.i).
- iii. La fase clorofórmica se lavó con 10 mL de agua destilada. Reuniéndose el agua del lavado con la fase acuosa obtenida en la etapa anterior (ii).
- iv. La fase clorofórmica obtenida se secó con sulfato de sodio anhidro, luego se filtró, este filtrado constituyó la fracción (c).

4. Fracción (d)

- i. La solución acuosa básica obtenida en la sección 3.ii y 3.iii se semisaturó con sulfato de sodio y se filtró. Luego se realizaron dos extracciones con 25 mL de una mezcla de CHCl_3 :EtOH (3:2) y se guardaron las fases acuosas para su uso posterior (Sec. 5).
- ii. La fase orgánica se lavó con una solución semisaturada de sulfato de sodio, el lavado acuoso se guardó con la obtenida en la etapa anterior.
- iii. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se obtuvo la fracción (d).

5. Fracción (e)

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

6. Fracción (f)

- i. En un tubo de ensayo se colocó 1 g de muestra seca y pulverizada y se adicionó 10 mL de agua destilada, luego se calentó la mezcla durante 15 minutos en “baño maría”.
- ii. La solución obtenida se filtró en caliente, se llevó a 10 mL con agua destilada y se dejó enfriar a temperatura ambiente, esta solución constituyó la fracción (f).

8.4.2. Pruebas de identificación de los principios activos

1. Aminogrupos primarios o secundarios (Prueba de Ninhidrina)

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

- i. Con cuidado de no tocar la parte central con los dedos, se prepararon tres trozos de papel filtro lento de 2x3 cm y cada uno se ubicó sobre una luna de reloj. Luego se colocó, en el centro de cada uno, 1 gota de las siguientes muestras: fracción (a), fracción (f) y agua destilada. Los papeles se dejaron secar a temperatura ambiente.
- ii. Luego se agregó 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. Los tres papeles fueron colocados durante 30 minutos dentro de una estufa a una temperatura de 120 °C.

Observación: Un color azul o violáceo indica prueba positiva.

2. Grupos fenólicos libres (Prueba con el reactivo férrico)

Se realizó sobre la fracción (a)

- i. El resto de la fracción (a) se llevó a sequedad.
- ii. El residuo se disolvió en 0,5 mL de agua destilada y se filtró, esta constituye la solución (a).
- iii. Se colocaron 2 gotas de la solución (a) en una placa de toque y a continuación se agregó 1 gota de solución acuosa de cloruro férrico al 1 % y se agitó.

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

3. Taninos (Prueba de la Gelatina)

Se realizó sobre "la solución a"

- i. Se colocaron 4 gotas de la "solución a" en una luna de reloj y a continuación se adicionaron 2 gotas de solución de gelatina al 0,5 %. La misma operación se realizó con 2 gotas de agua destilada como referencia.

Observación: Un precipitado blanco o turbidez indica prueba positiva.

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

Se realizó sobre las fracciones (d) y (e)

- i. La fracción (d) se llevó a sequedad.
- ii. Sobre el residuo se agregó 2,5 mL de etanol, en "baño maría" a 50 °C. Luego se filtró, esta constituye la "solución d".
- iii. En un tubo de ensayo se colocaron 3 gotas de la "solución d" con 2 mL de agua destilada y en otro tubo, 2 mL de la fracción (e). Luego a cada tubo se les adicionó 1 mL de HCl 12 N y unas limaduras de magnesio, se agitaron ambos tubos y luego se dejaron en reposo durante 5 min.

- iv. Se adicionaron 10 gotas de alcohol amílico a cada tubo, se agitaron y se dejaron en reposo para la separación de las 2 fases.

Observación: Una coloración rosada o rojo de la fase amílica indica prueba positiva.

5. Triterpenoides y esteroides (Reacción de Liberman-Burchard)

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

- i. Se separó 4 mL de la fracción (c) en un tubo esmerilado y se llevó a sequedad. Luego se disolvió el residuo con 0,2 mL de cloroformo, lo que constituye la “solución (c)”.
- ii. Se colocaron 5 gotas de la “solución (d)” en un tubo esmerilado y se llevó a sequedad y el residuo se disolvió con 2 gotas de cloroformo.
- iii. En tres tubos de ensayo se colocaron 2 gotas de, la fracción (b), la “solución (c)” y la “solución (d)” de ii, respectivamente. Luego se agregó 2 gotas de anhídrido acético sobre ellas y se mezclaron bien.
- iv. Finalmente, se agregó sobre cada una de ellas y con cuidado 2 gotas de H_2SO_4 18 M.

Observación: La formación de anillos de color naranja, azul o verde del anillo indica prueba positiva.

6. Naftaquinonas y antraquinonas, antronas o antranoles (Reacción de Börntrager)

Se realizó sobre la fracción (b)

El resto de la fracción (b) se colocó en un tubo de ensayo, se agregaron 5mL de hidróxido de sodio al 5 % y se agitó.

Observación: Fase acuosa rosada o roja indica prueba positiva.

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

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

- i. El resto de la fracción (c) se llevó a sequedad, el residuo se disolvió con 2,5 mL de HCl al 1 %, luego se filtró y se recibieron 5 gotas del filtrado en tres tubos de ensayo por separado.
- ii. Se llevó a sequedad 5 gotas de la solución (d), el residuo se disolvió con 4 gotas de HCl al 1 %, luego se filtró y se recibieron 5 gotas del filtrado en tres tubos de ensayo por separado.
- iii. A cada par de soluciones que se obtuvieron en las secc. 7.i y 7.ii, se adicionaron 2 gotas de los reactivos de Dragendorff, de Mayer y de Wagner, respectivamente.

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

8. Leucoantocianidinas y catequinas (Reacción de Rosenbein)

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

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

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

9. Saponinas (Prueba de la espuma)

Se realizó sobre la fracción (f).

Se colocó 1 mL de la fracción (f) en un tubo de ensayo y se agitó durante 15 s. Luego se dejó reposar durante 15 min, y se midió la altura de la espuma.

Observación: La prueba es positiva si la espuma tiene una altura mayor a 5 mm y persiste por más de 5 min.

Tabla 33. Resultado de la marcha fitoquímica del líquen *Stereocaulon glareosum*.

Metabolito	Pruebas de coloración o precipitación	Fracción	Resultados (*) Marcha Fitoquímica		Observaciones
			1	2	
Aminogrupos primarios o secundarios	Nihidrina	A	+	+	Mancha de color violeta
		F	++	++	Mancha de color violeta
Grupos fenólicos libres Taninos	Cloruro férrico	A	+	+	Color guinda
	Gelatina	A	-	-	Precipitado blanco
Flavonoides excepto chalconas, auronas catequinas e isoflavonas	Reacción de Shinoda	D	-	-	Fase amílica incolora
		E	-	-	Fase amílica incolora
Triterpenos y/o esteroides	Reacción de Lieberman Buchard	B	+++	+++	Anillo de color verde oscuro a marrón
		C	+++	+++	Anillo de color naranja a marrón
		D	+++	+++	Anillo de color naranja a marrón
Quinonas, entronas o antranoles	Reacción de Börntrager	B	+	+	Solución de color rojo intenso
	Reacción de Dragendorff	C	-	-	No hay precipitado
Alcaloides		Reacción de Mayer	D	-	-
	C		-	-	No hay precipitado
	Reacción de Wagner	c	-	-	No hay precipitado
		d	-	-	No hay precipitado
Leucoantocianidinas (rojo), Catequinas (marrón)	Reacción de Rosenheim	d	-	-	Fase amílica Incolora
		e	-	-	Fase amílica Incolora
Saponinas	Prueba de la espuma	f	-	-	Nada de espuma

(*) Convención: (+++) Abundante; (++) Regular; (+) Poco

8.5. Anexo 5: Perfil metabolómico

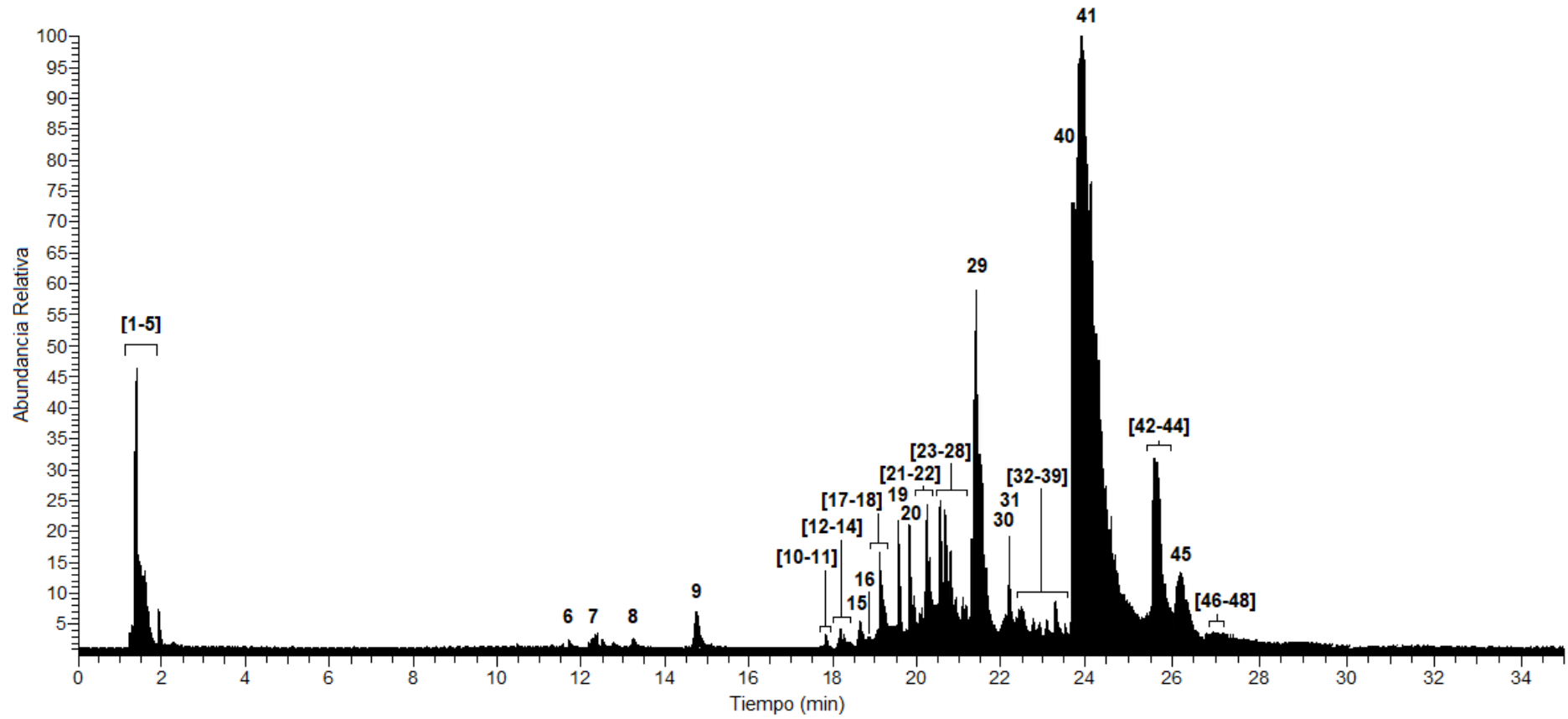


Figura 34. Cromatograma UHPLC-ESI-MS-MS de *S. glareosum* en modo negativo.

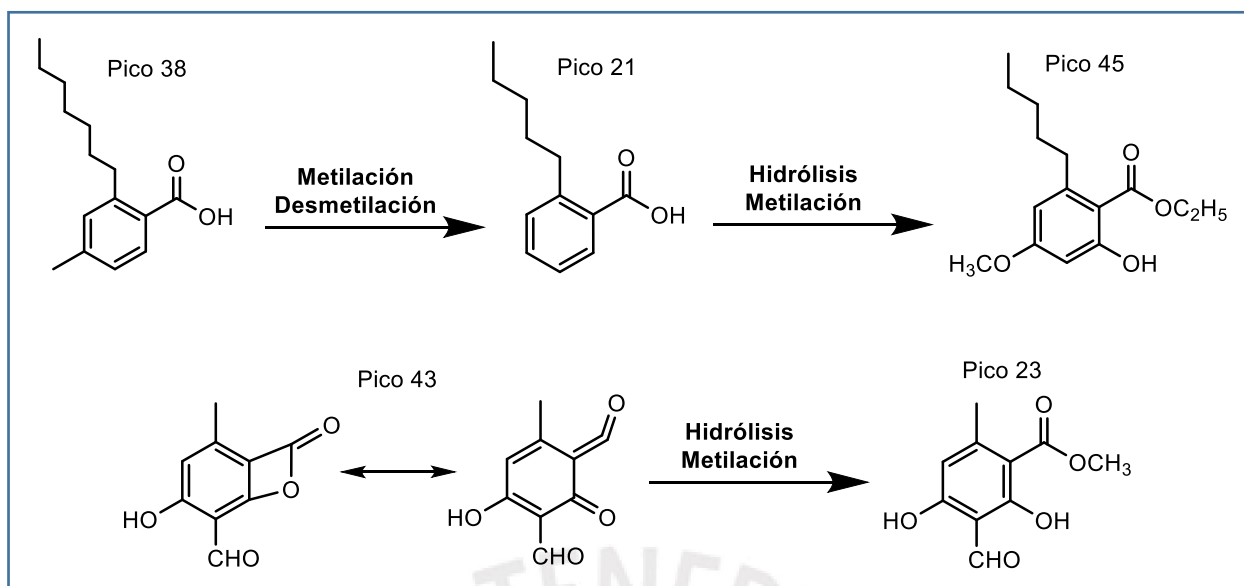


Figura 35. Propuestas de relaciones biosintéticas para los compuestos aromáticos.

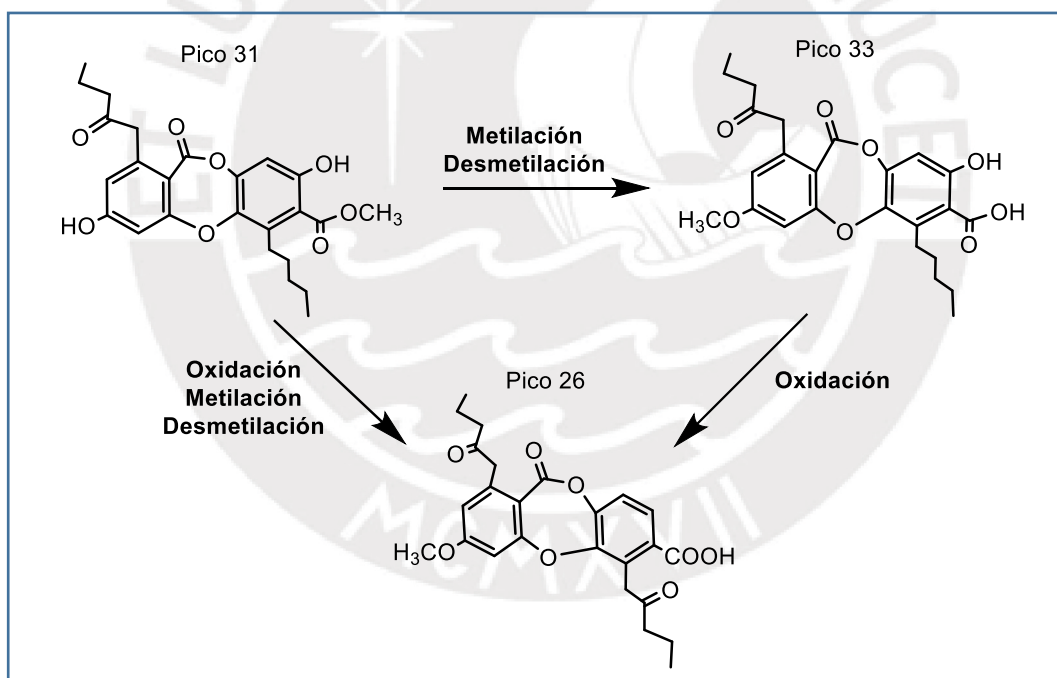


Figura 36. Propuesta de relación biosintética para las depsidonas.

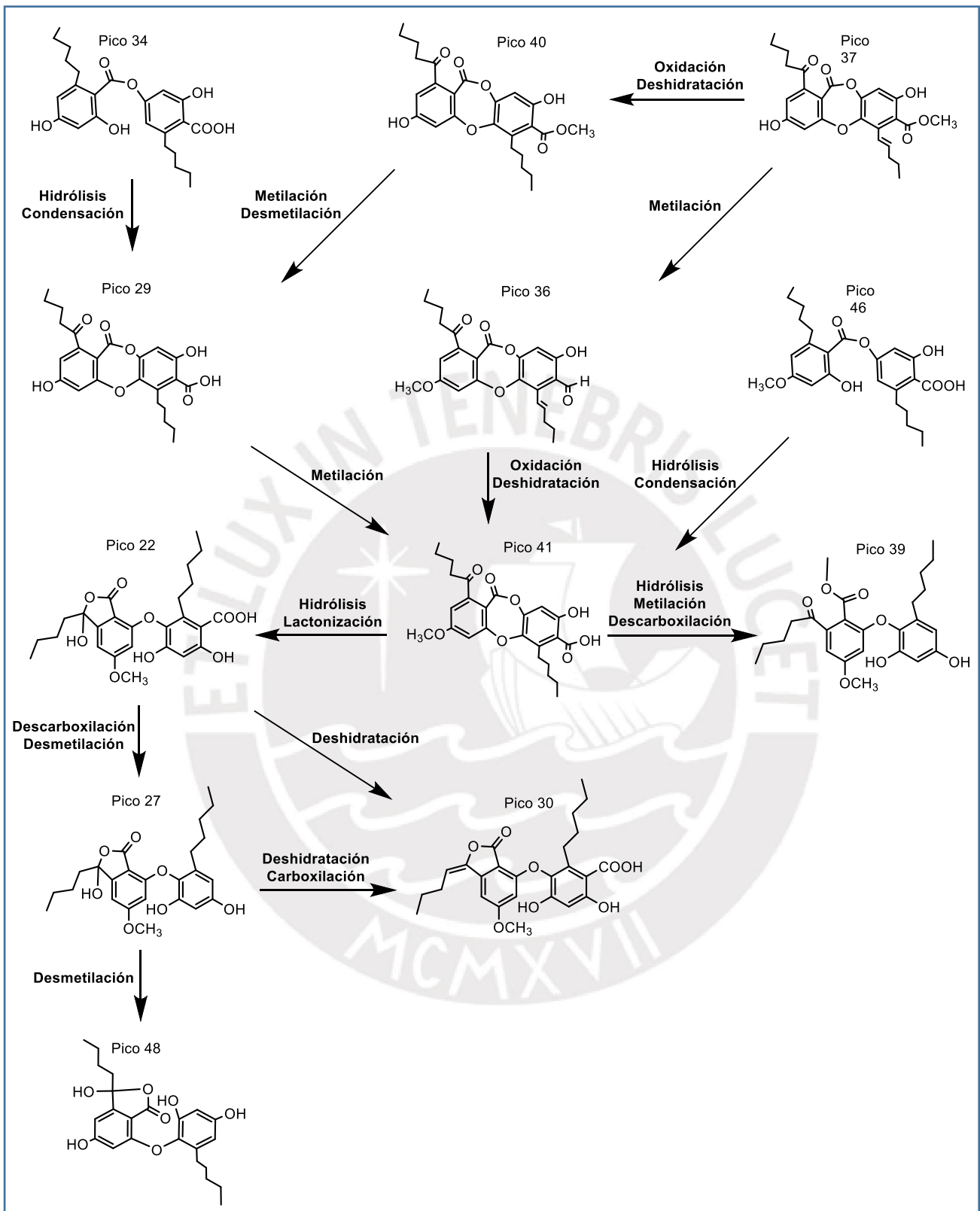


Figura 37. Propuesta de relación biosintética para los dépsidos, depsidonas y difeniéteres.

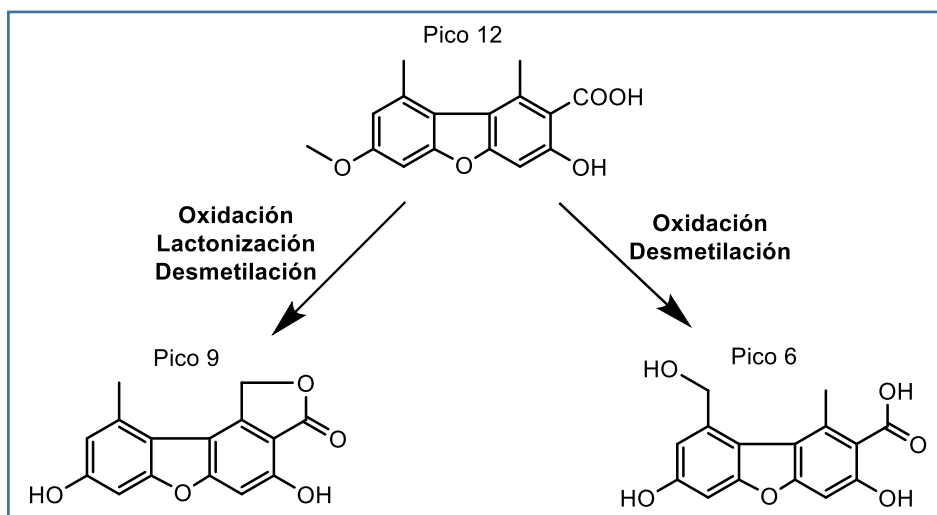


Figura 38. Propuesta de relación biosintética para los dibenzofuranos.

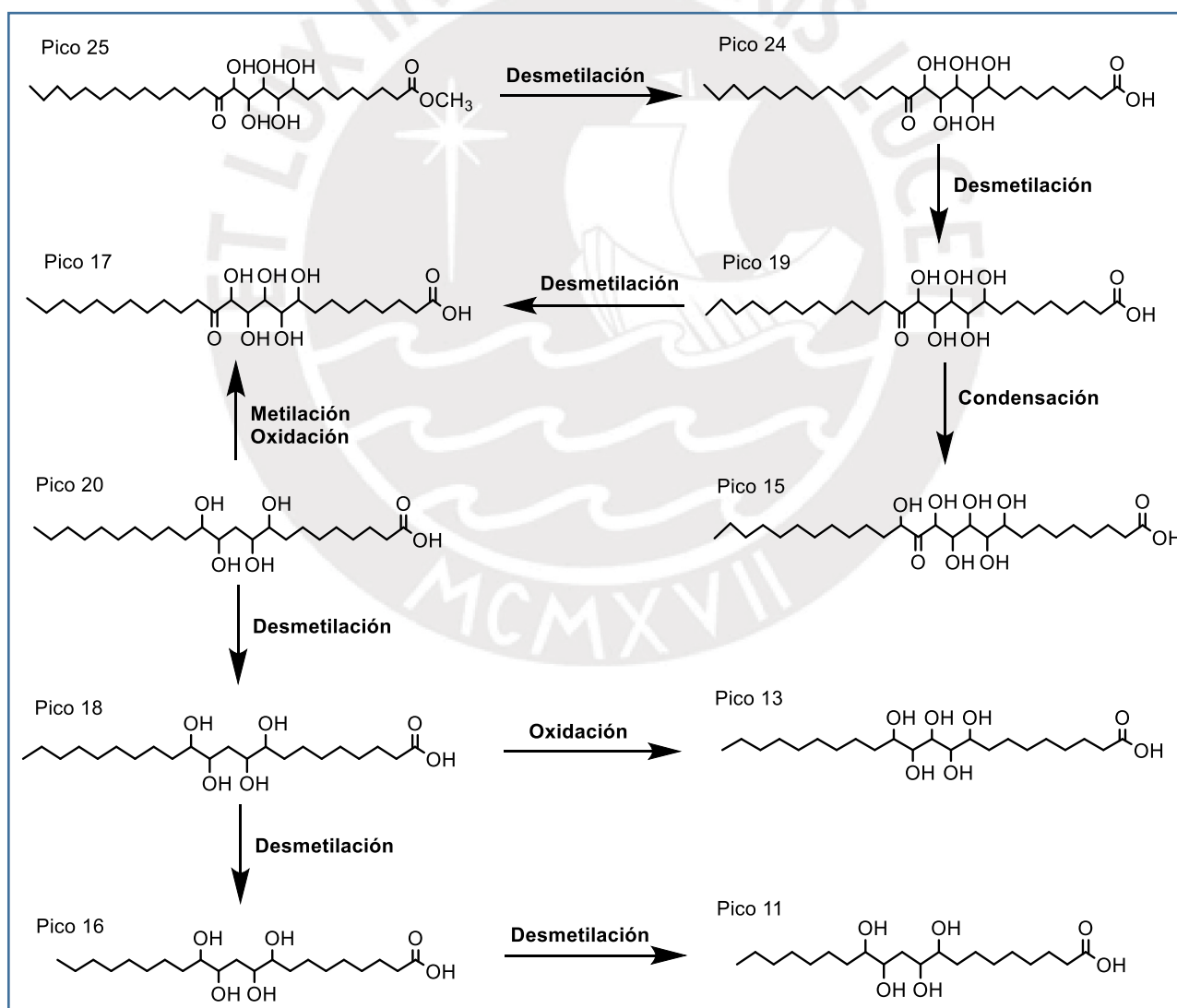


Figura 39. Propuesta de relación biosintética para los lípidos.

8.6. Anexo 6: Análisis de ácidos grasos mediante cromatógrafo de gases (GC-FID)

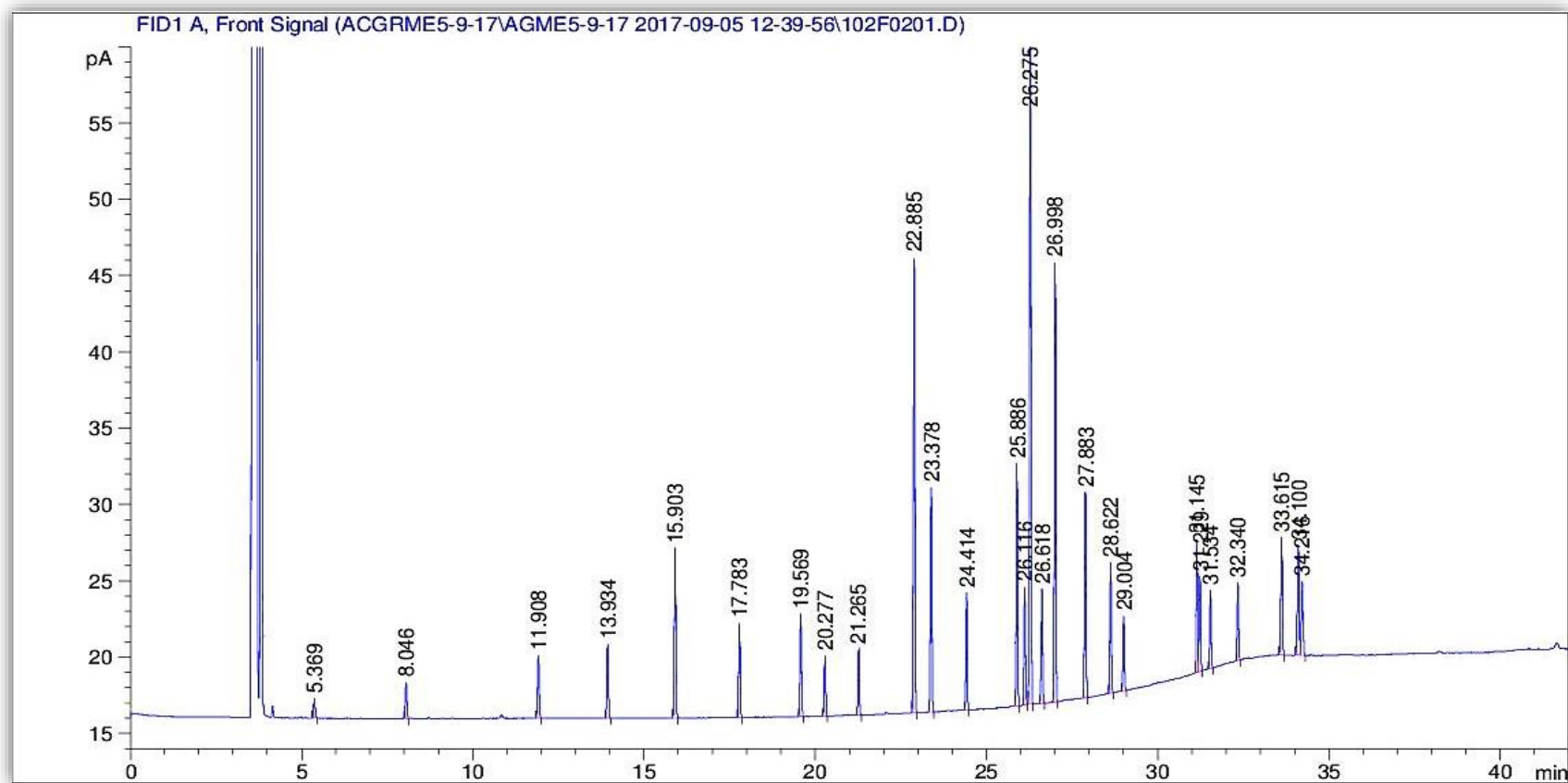


Figura 40. Cromatograma GC-FID del estándar de metilésteres de ácidos grasos - FAMES Mix (28 componentes)

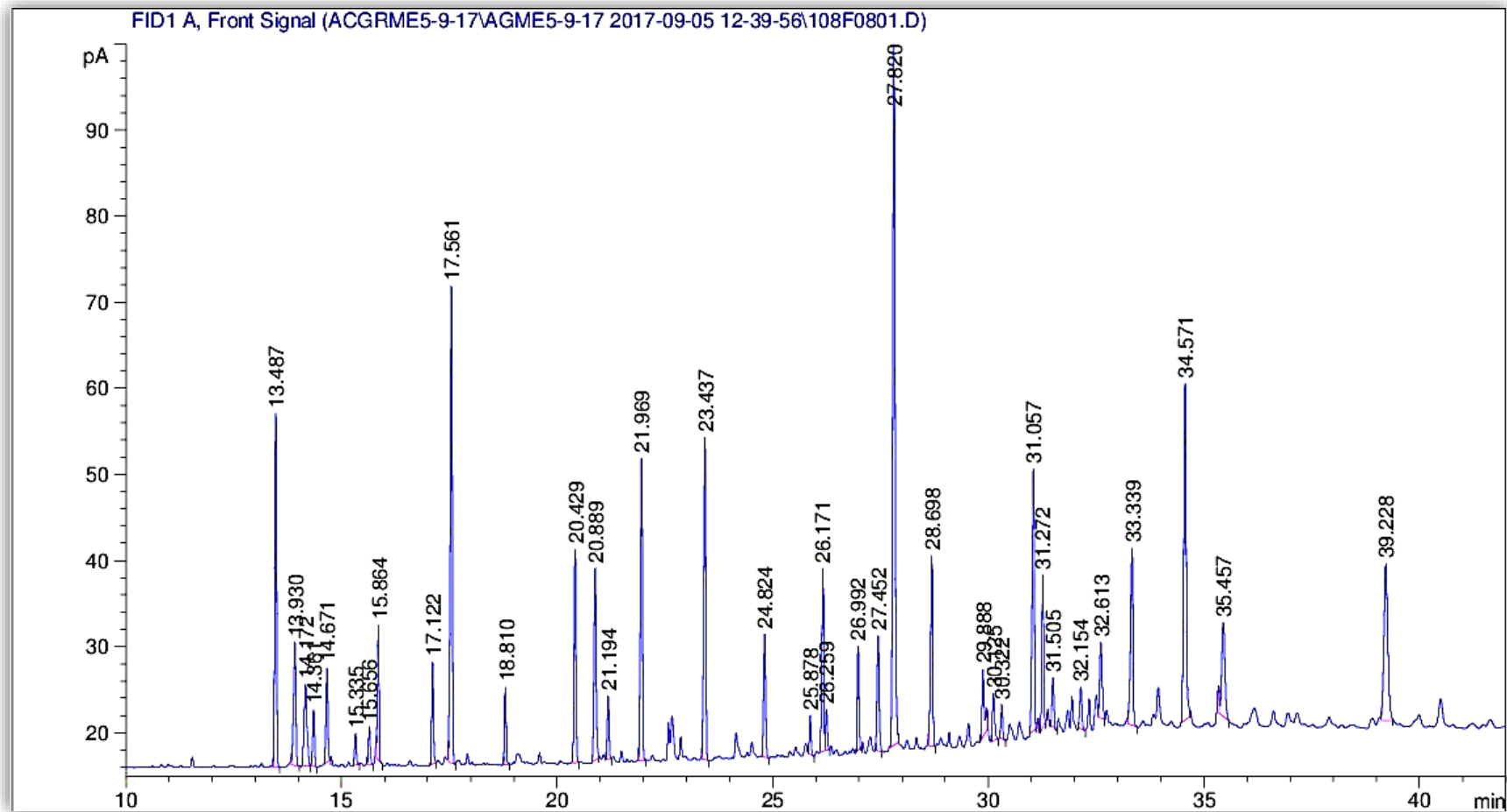


Figura 41. Cromatograma GC-FID del extracto metanólico transesterificado.

Tabla 34. Tiempo de retención de los estándares metilésteres de ácidos grasos - FAMES MIX (28 componentes) a diferentes concentraciones.

N° Pico	Metiléster	N° C	Tiempo de retención						Promedio	S.D
			300 ppm	600 ppm	720 ppm	840 ppm	960 ppm	1200 ppm		
1	Butirato de metilo	C4:0	4,152	4,152	4,152	4,152	4,152	4,152	4,152	0,000
2	Hexanoato de metilo	C6:0	5,369	5,369	5,369	5,369	5,369	5,369	5,369	0,000
3	Octanoato de metilo	C8:0	8,046	8,046	8,046	8,046	8,044	8,046	8,046	0,001
4	Decanoato de metilo	C10:0	11,904	11,904	11,905	11,907	11,907	11,908	11,906	0,002
5	Undecanoato de metilo	C11:0	13,930	13,930	13,931	13,932	13,933	13,934	13,932	0,001
6	Laurato de metilo	C12:0	15,898	15,899	15,899	15,900	15,902	15,903	15,900	0,002
7	Tridecanoato de metilo	C13:0	17,778	17,778	17,779	17,779	17,781	17,783	17,780	0,002
8	Miristato de metilo	C14:0	19,565	19,565	19,566	19,567	19,568	19,569	19,567	0,001
9	(cis-9)Miristolato de metilo	C14:1	20,274	20,274	20,274	20,275	20,276	20,277	20,275	0,001
10	Pentadecanoato de metilo	C15:0	21,261	21,261	21,263	21,262	21,264	21,265	21,263	0,001
11	Palmitato de metilo	C16:0	22,874	22,876	22,876	22,877	22,882	22,885	22,878	0,004
12	(cis-9) Palmitoleato de metilo	C16:1	23,371	23,372	23,372	23,373	23,376	23,378	23,374	0,002
13	Heptadecanoato de metilo	C17:0	24,409	24,409	24,409	24,410	24,412	24,414	24,411	0,002
14	Estearato de metilo	C18:0	25,873	25,876	25,876	25,878	25,883	25,886	25,879	0,004
15	(trans-9) Elaidato de metilo	C18:1	26,106	26,106	26,106	26,109	26,111	26,116	26,109	0,004
16	(cis-9) Oleato de metilo	C18:1	26,257	26,261	26,262	26,265	26,269	26,275	26,265	0,006
17	(trans-9,12) Linoelaidato de metilo	C18:2	26,612	26,612	26,612	26,612	26,616	26,618	26,614	0,002
18	(cis-9,12) Linoleato de metilo	C18:2	26,987	26,989	26,990	26,992	26,996	26,998	26,992	0,004
19	Araquidato de metilo	C20:0	27,876	27,877	27,877	27,879	27,881	27,883	27,879	0,002
20	(cis-11) Eicosenoato de metilo	C20:1	28,618	28,618	28,617	28,619	28,620	28,622	28,619	0,002
21	(cis-9,12,15) Linolenato de metilo	C18:3	29,001	29,001	29,000	29,002	29,003	29,004	29,002	0,001
22	Behenato de metilo	C22:0	31,140	31,140	31,140	31,141	31,143	31,145	31,142	0,002
23	(cis-13) Erucato de metilo	C22:1	31,225	31,225	31,225	31,226	31,229	31,229	31,227	0,002
24	Tricosanoato de metilo	C23:0	31,530	31,530	31,530	31,532	31,532	31,534	31,531	0,001
25	Lignocerato de metilo	C24:0	32,335	32,335	32,335	32,335	32,338	32,340	32,336	0,002
26	(cis-5,8,11,14,17) Eicosapentaenoato de metilo	C20:5	33,607	33,607	33,608	33,609	33,613	33,615	33,610	0,003
27	(cis-15) Nervonato de metilo	C24:1	34,093	34,093	34,093	34,096	34,099	34,100	34,096	0,003
28	(cis-4,7,10,13,16,19) Docosaheptaenoato de metilo	C22:6	34,211	34,211	34,212	34,214	34,214	34,216	34,213	0,002

Tabla 35. Área bajo la curva de los estándares metilésteres de ácidos grasos - FAMES MIX (28 componentes).

Metilester	N° C	Áreas (pA*s) de FAMES (ppm)					
		300 ppm	600 ppm	720 ppm	840 ppm	960 ppm	1200 ppm
Butirato de metilo	C4:0	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Hexanoato de metilo	C6:0	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	3,56998
Octanoato de metilo	C8:0	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	5,20032	7,18072
Decanoato de metilo	C10:0	0,00000	4,00865	6,21038	7,27148	8,96169	12,92145
Undecanoato de metilo	C11:0	0,00000	4,87666	6,91620	8,76605	10,66977	14,98421
Laurato de metilo	C12:0	1,89583	11,99622	16,49546	20,39787	24,68328	33,93094
Tridecanoato de metilo	C13:0	0,00000	5,62770	8,15324	10,63194	12,80222	18,50841
Miristato de metilo	C14:0	0,00000	6,03227	8,63872	11,35131	13,62435	19,80993
(cis-9)Miristolato de metilo	C14:1	0,00000	0,00000	3,73487	4,90123	7,97147	11,64828
Pentadecanoato de metilo	C15:0	0,00000	3,77516	5,53019	7,29677	8,93345	12,35612
Palmitato de metilo	C16:0	9,80743	31,56626	40,07951	50,52343	58,76963	78,09612
(cis-9) Palmitoleato de metilo	C16:1	1,63149	14,60155	20,22186	26,36078	31,23518	42,80973
Heptadecanoato de metilo	C17:0	0,00000	7,13566	9,96279	12,52326	14,96373	21,98154
Estearato de metilo	C18:0	2,28523	14,99867	19,89840	26,20187	30,93928	41,39034
(trans-9) Elaidato de metilo	C18:1	0,00000	7,36877	10,24252	12,96067	15,93507	22,35320
(cis-9) Oleato de metilo	C18:1	6,61089	44,35496	58,62595	75,15440	91,60503	120,53677
(trans-9,12) Linoelaidato de metilo	C18:2	0,00000	7,02175	9,82610	12,17303	14,56346	21,38589
(cis-9,12) Linoleato de metilo	C18:2	5,08849	29,82265	39,78099	51,58020	61,66230	82,70852
Araquidato de metilo	C20:0	4,66722	13,02628	17,03154	23,15520	27,11451	39,84108
(cis-11) Eicosenoato de metilo	C20:1	0,00000	8,08291	11,09949	14,64845	17,39251	24,00369
(cis-9,12,15) Linolenato de metilo	C18:3	0,00000	4,50141	6,30043	7,95034	9,78501	13,66547
Behenato de metilo	C22:0	0,00000	8,16200	11,19440	13,78783	17,40895	23,86603
(cis-13) Erucato de metilo	C22:1	0,00000	6,23818	8,88582	10,77986	13,44269	18,54812
Tricosanoato de metilo	C23:0	0,00000	4,81125	6,53193	8,33923	10,21481	14,18414
Lignocerato de metilo	C24:0	0,00000	4,67837	6,54592	8,32930	10,18865	13,44731
(cis-5,8,11,14,17) Eicosapentaenoato de metilo	C20:5	0,00000	8,46105	11,55326	14,33860	17,03840	24,64730
(cis-15) Nervonato de metilo	C24:1	0,00000	8,20152	11,24182	14,08615	16,74989	24,32498
(cis-4,7,10,13,16,19) Docosahexaenoato de metilo	C22:6	0,00000	5,82579	8,39095	9,90071	11,96653	17,39812

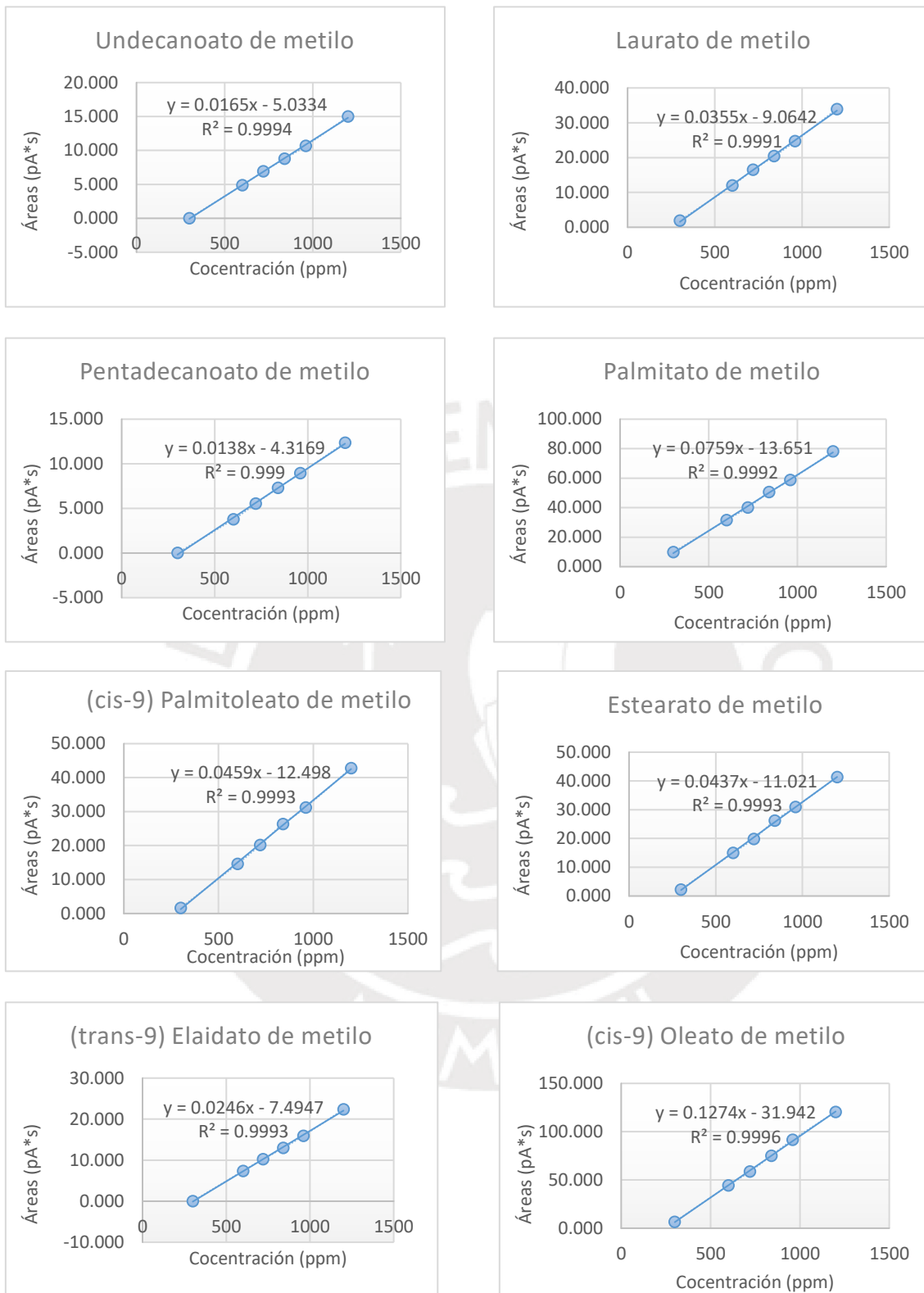


Figura 42. Curvas de calibración de los estándares de metilester- FAMEs MIX

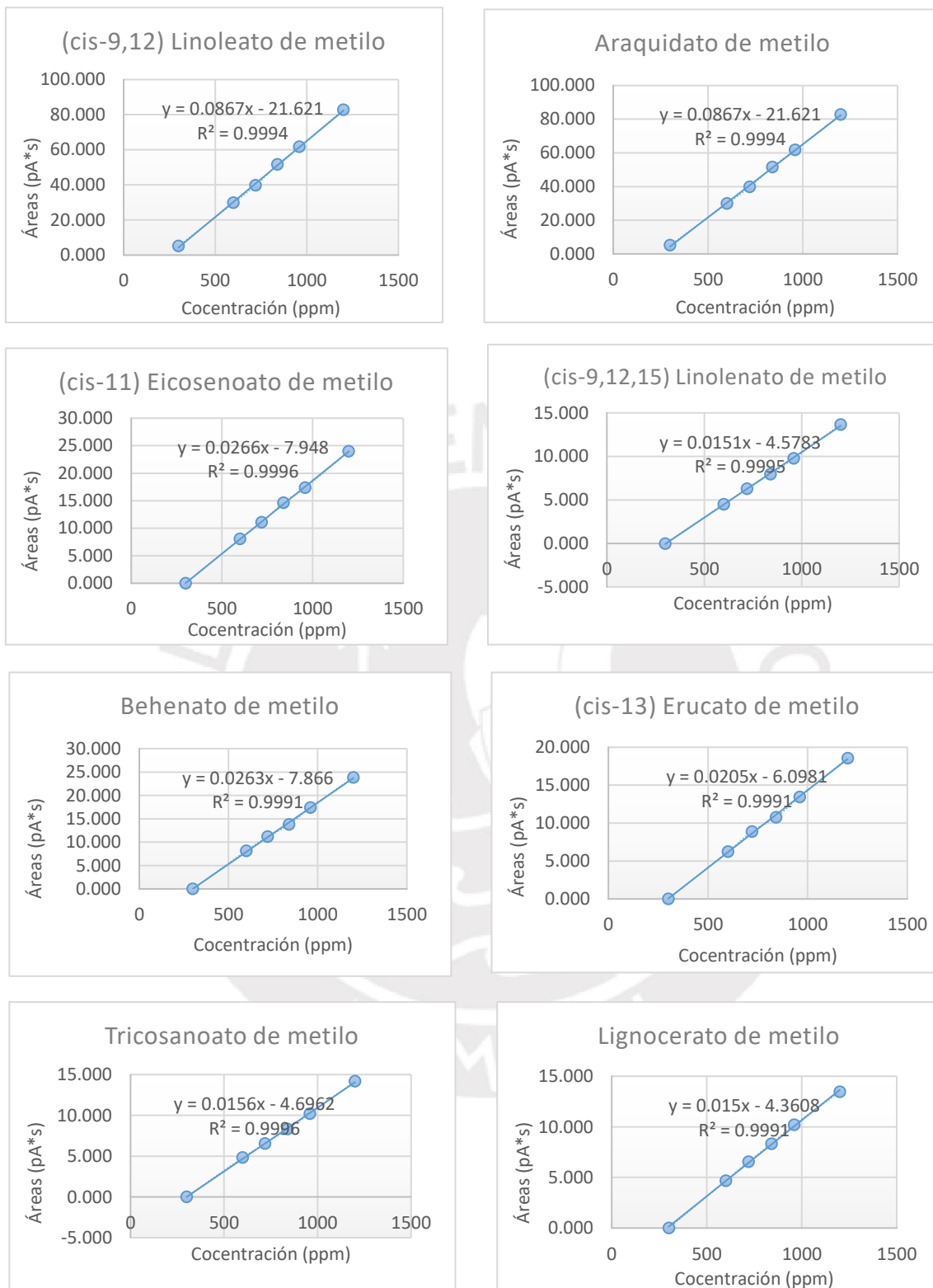


Figura 43. Curvas de calibración de los estándares de metilester- FAMEs MIX

8.7. Anexo 7: Espectros RMN-¹H, RMN-¹³C e IR de los compuestos aislados.

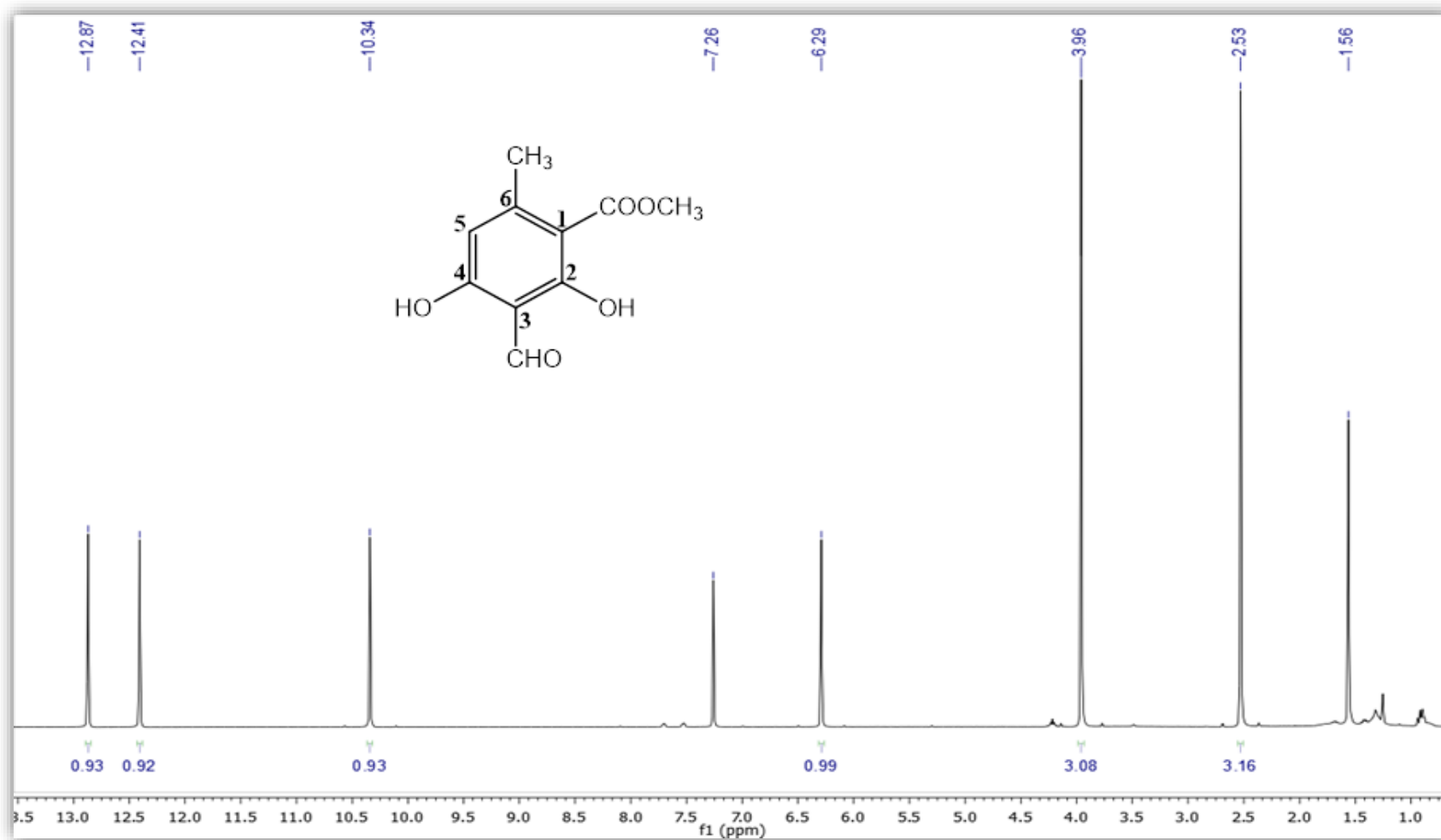


Figura 44. Espectro RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) del compuesto 1.

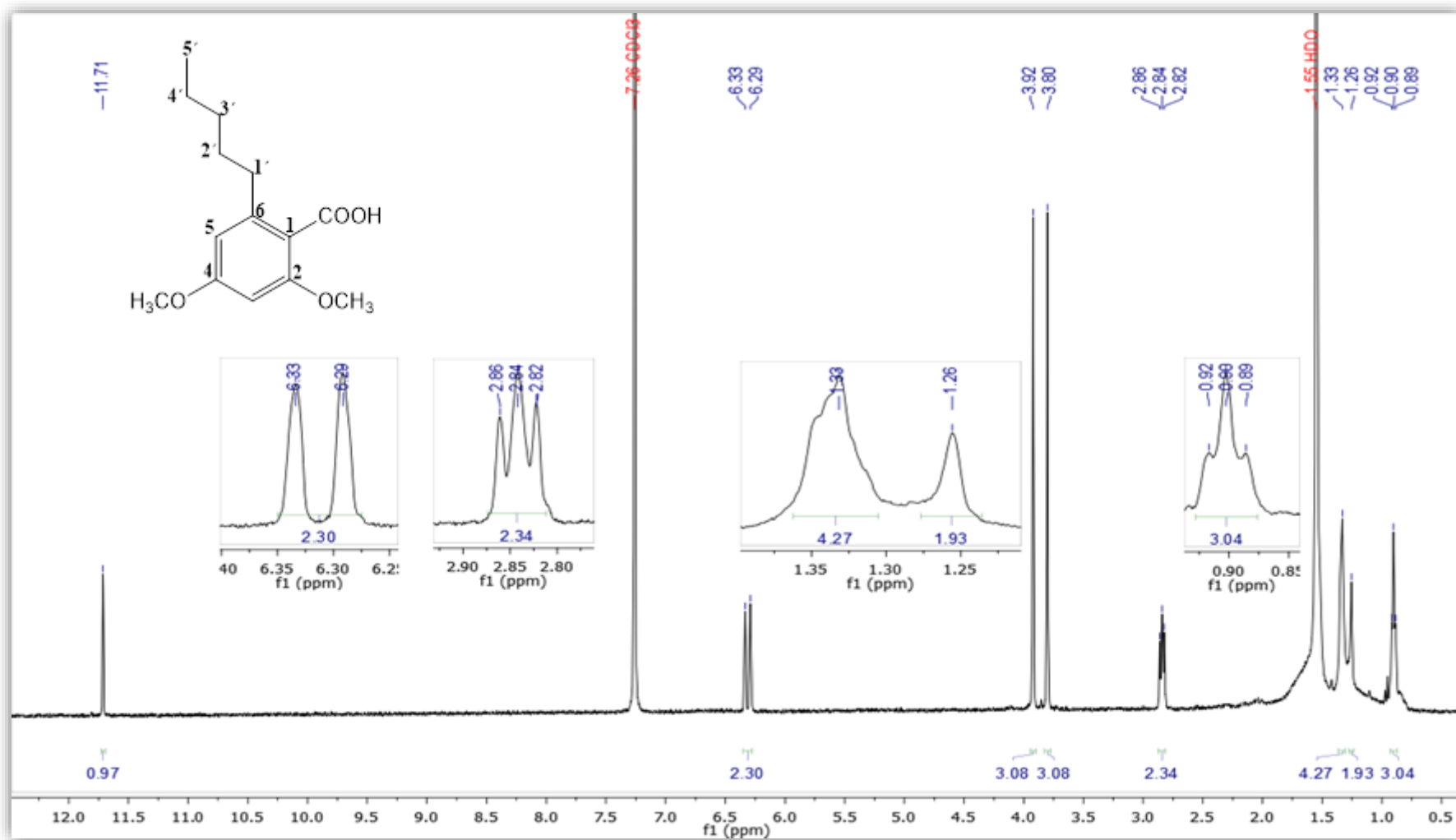


Figura 45. Espectro RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) del compuesto 2.

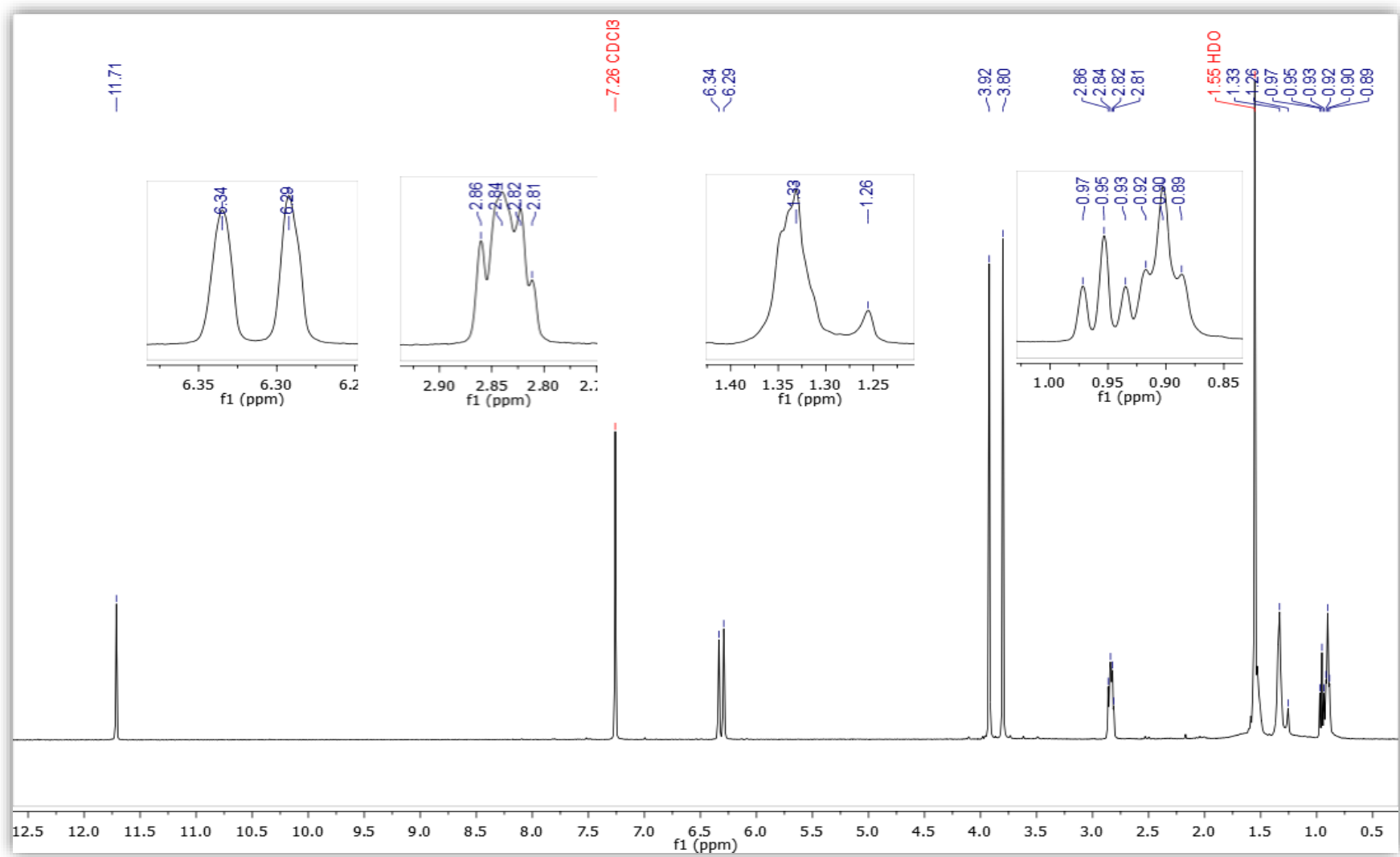


Figura 46. Espectro RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto 3.

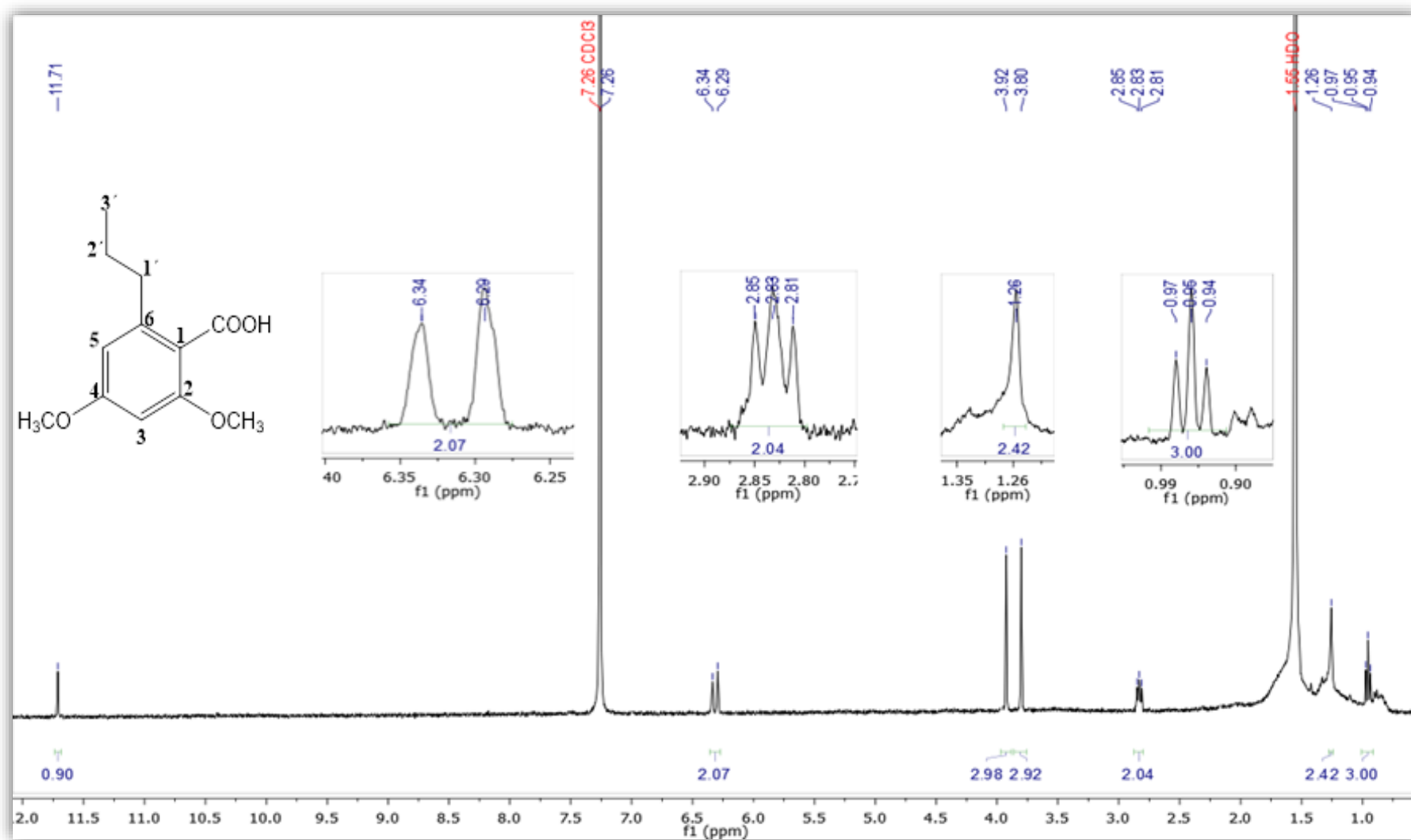


Figura 47 . Espectro RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) del compuesto 4.

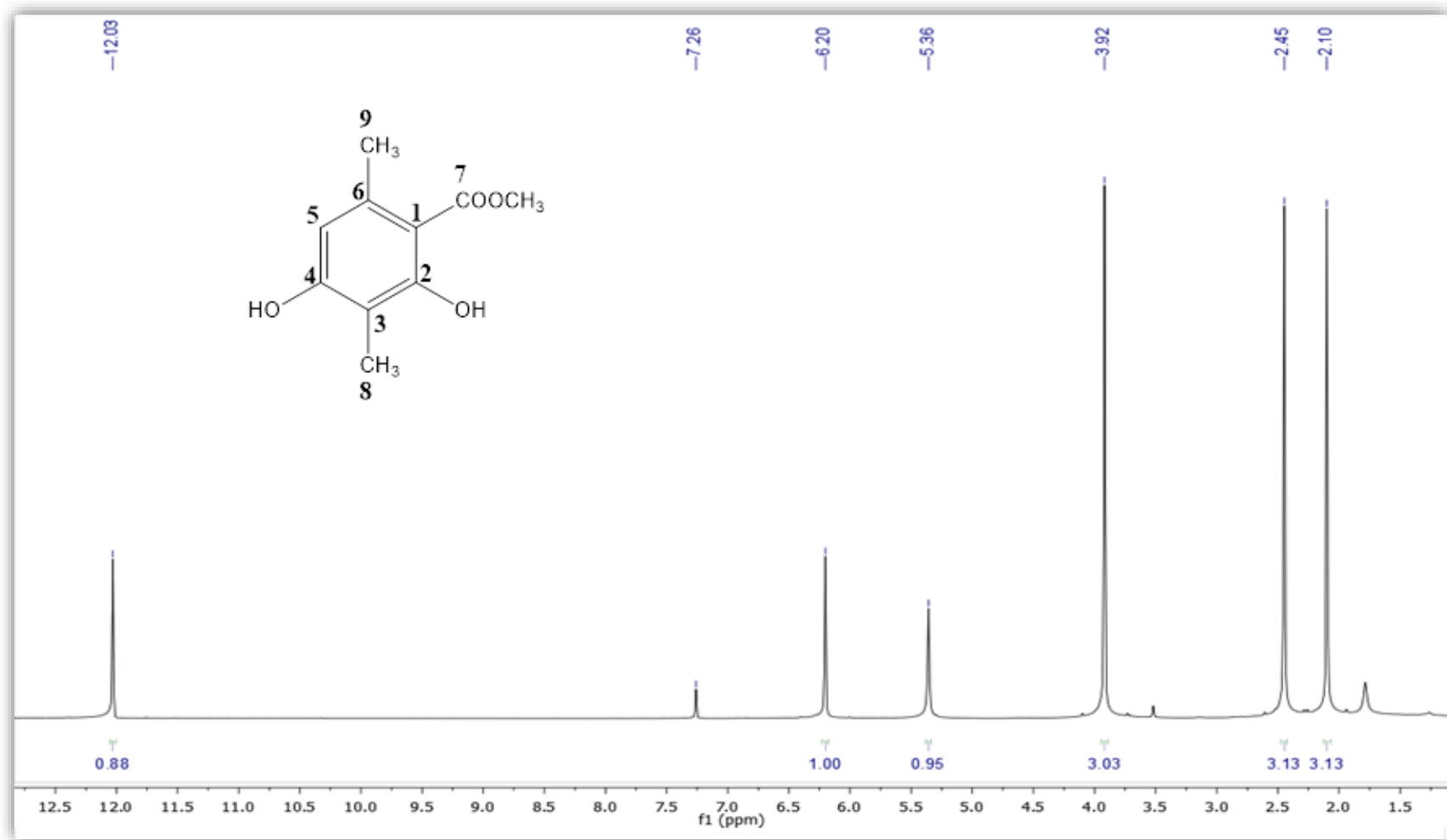


Figura 48. Espectro RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) del compuesto 6.

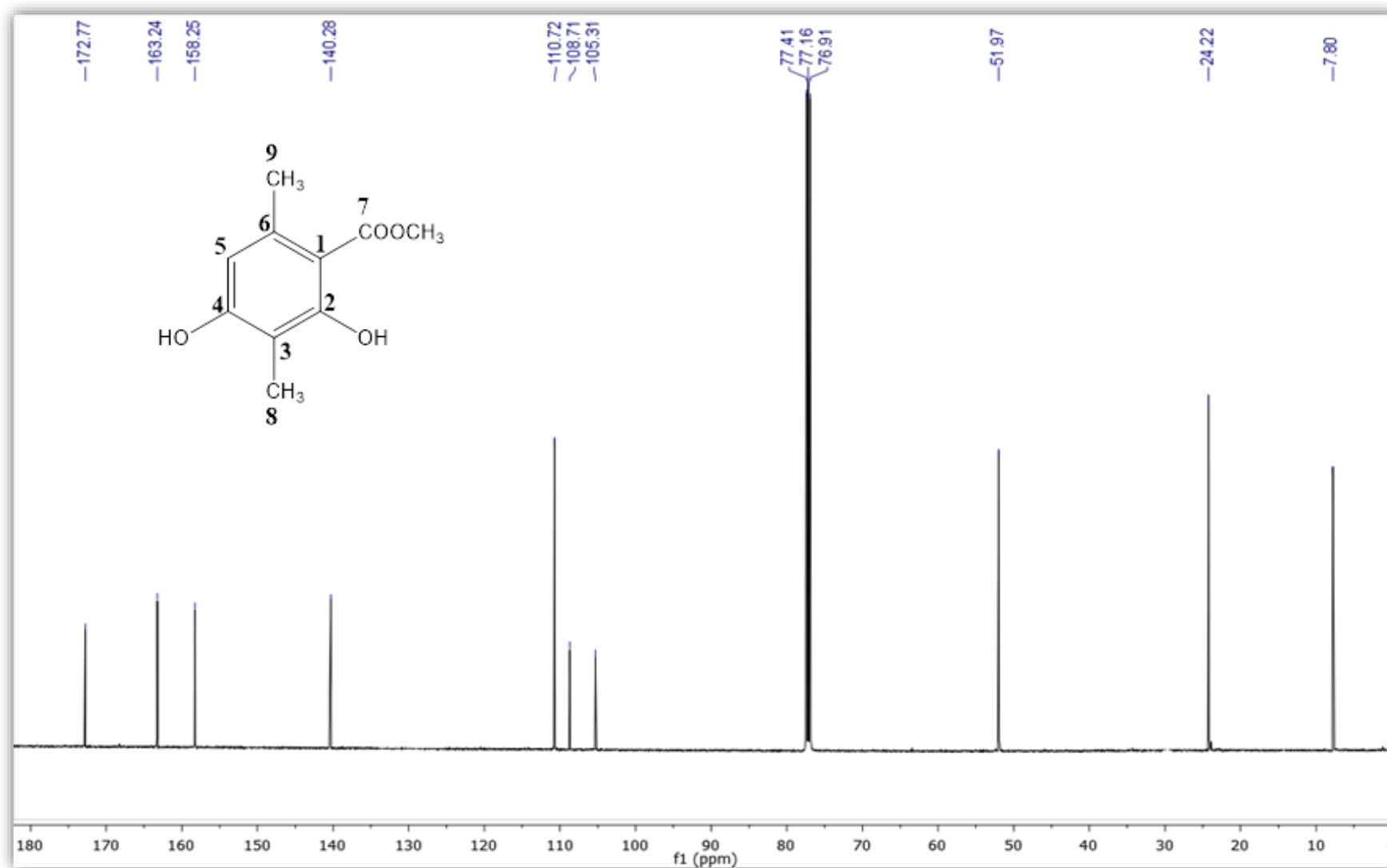


Figura 49. Espectro RMN-¹³C (126 MHz, CDCl₃) del compuesto 6.

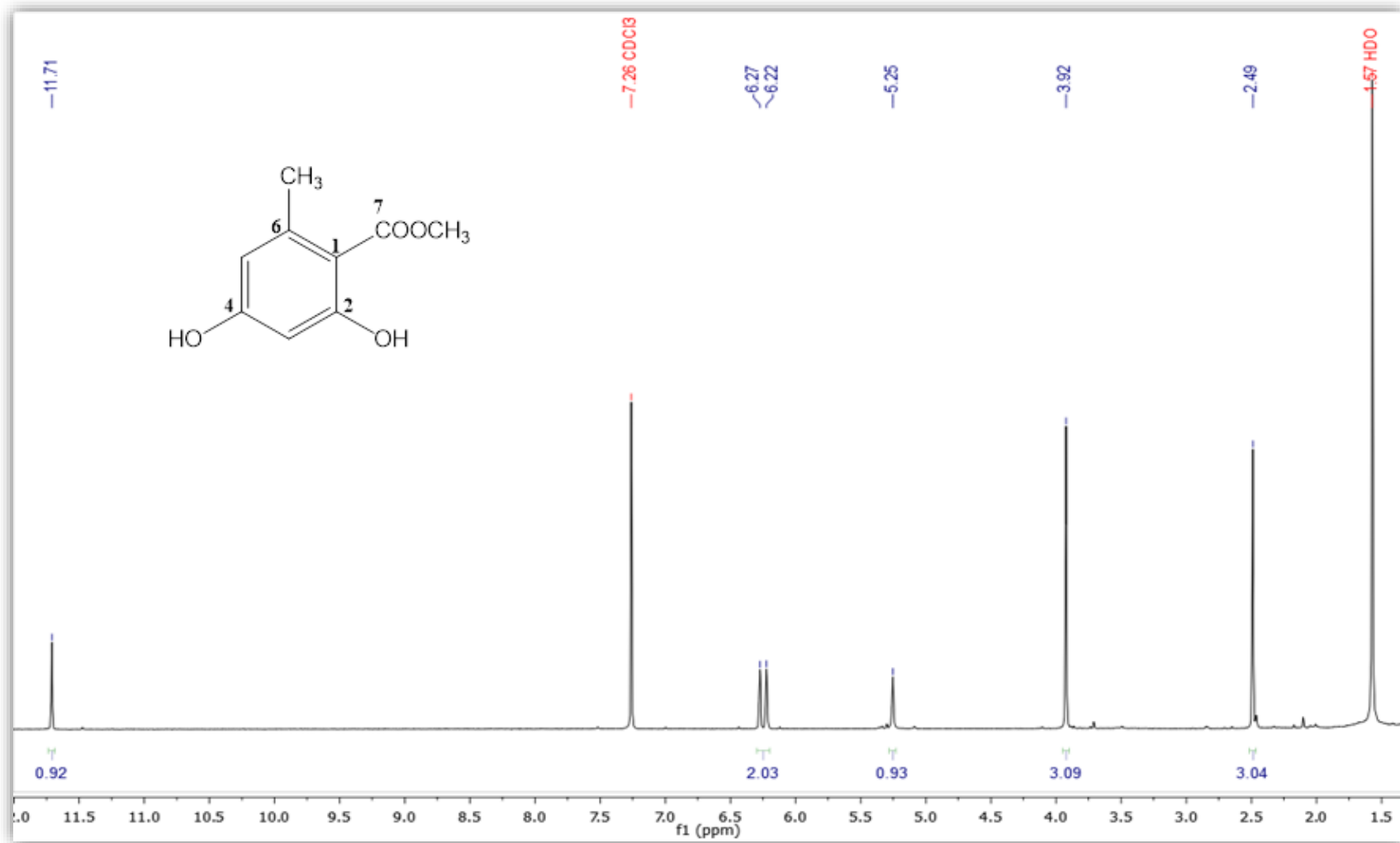


Figura 50. Espectro RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) del compuesto 8.

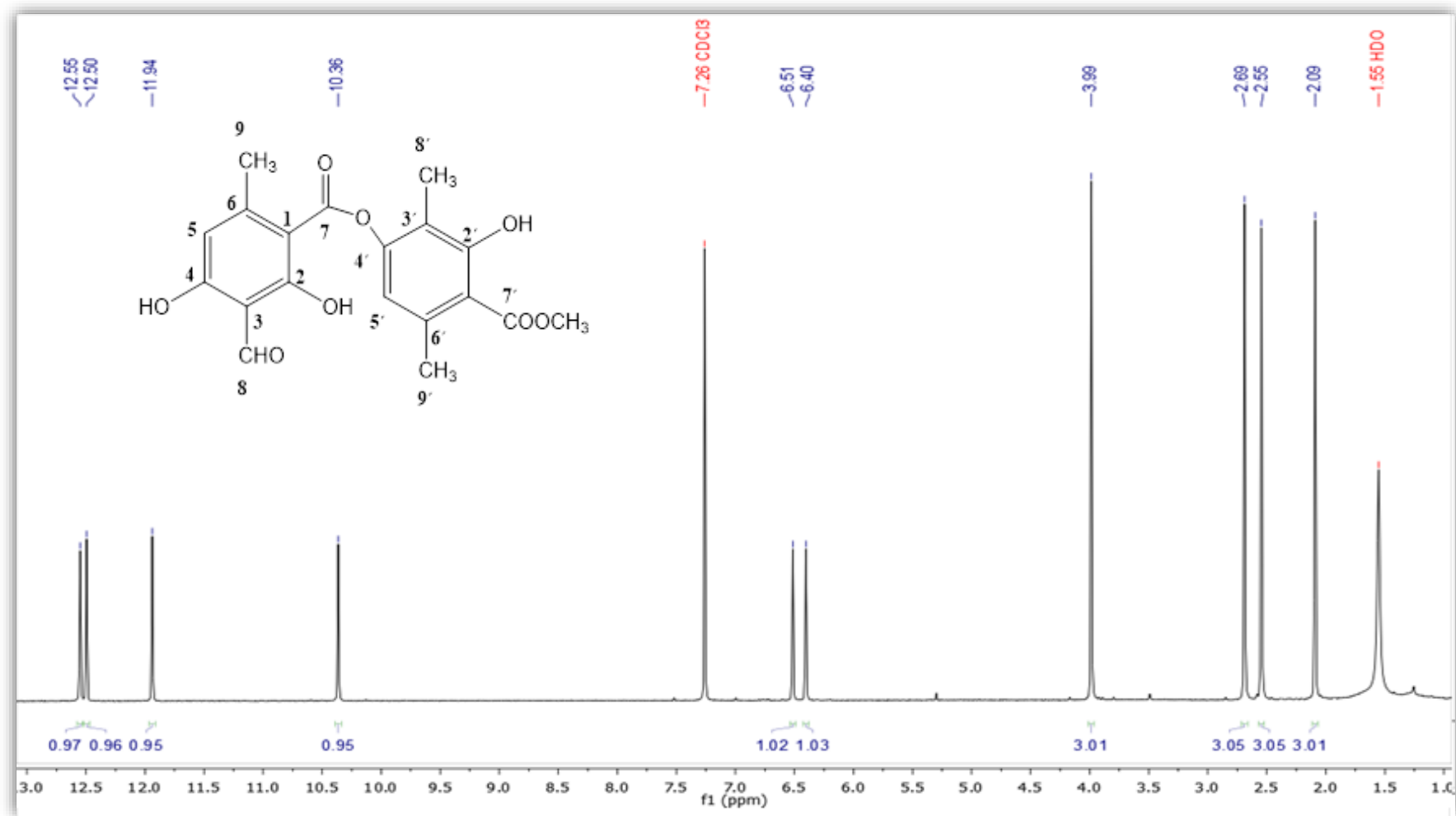


Figura 51. Espectro RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) del compuesto S1.

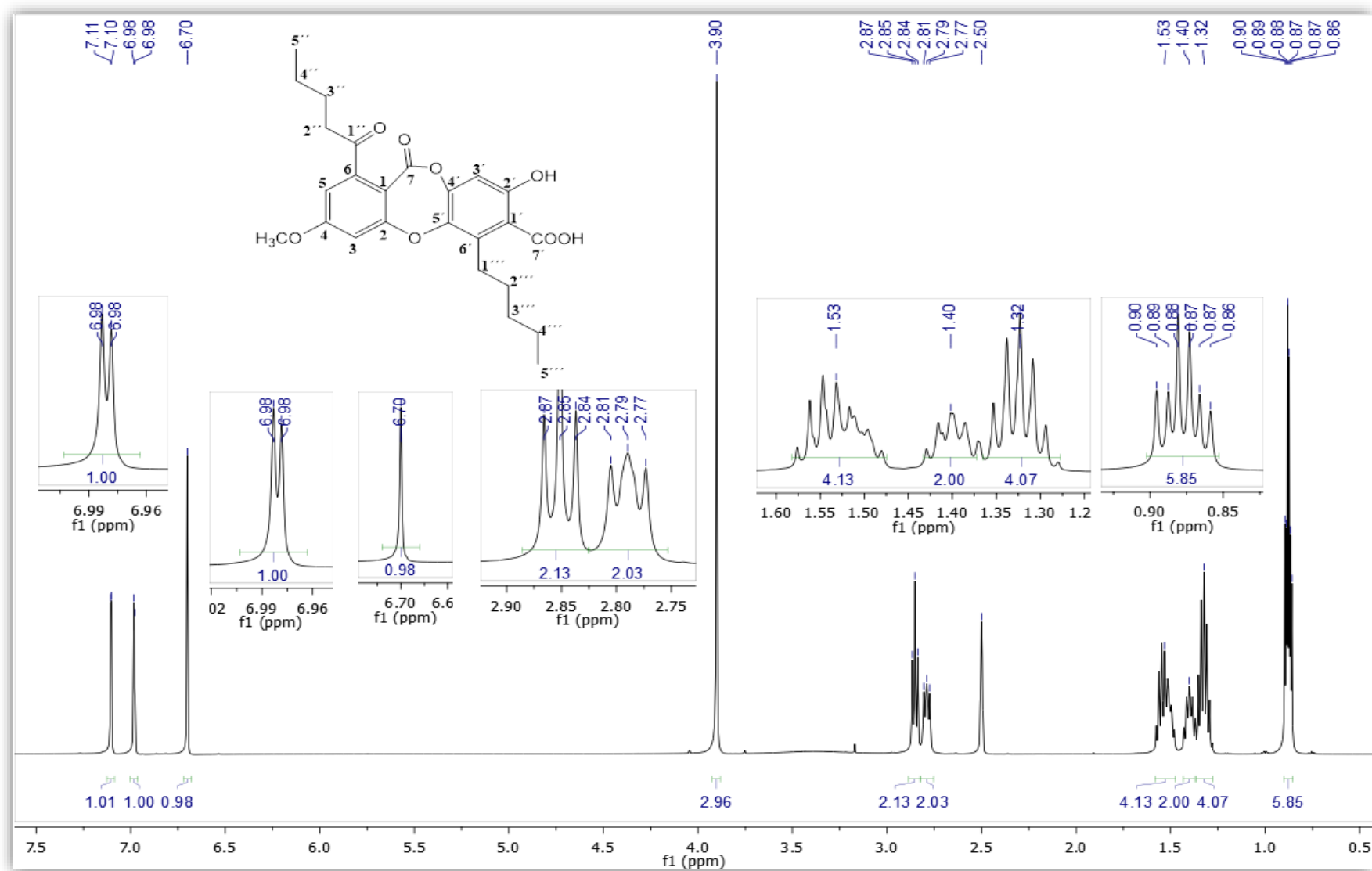


Figura 52. Espectro RMN-¹H (500 MHz, DMSO-d₆) del compuesto S3.

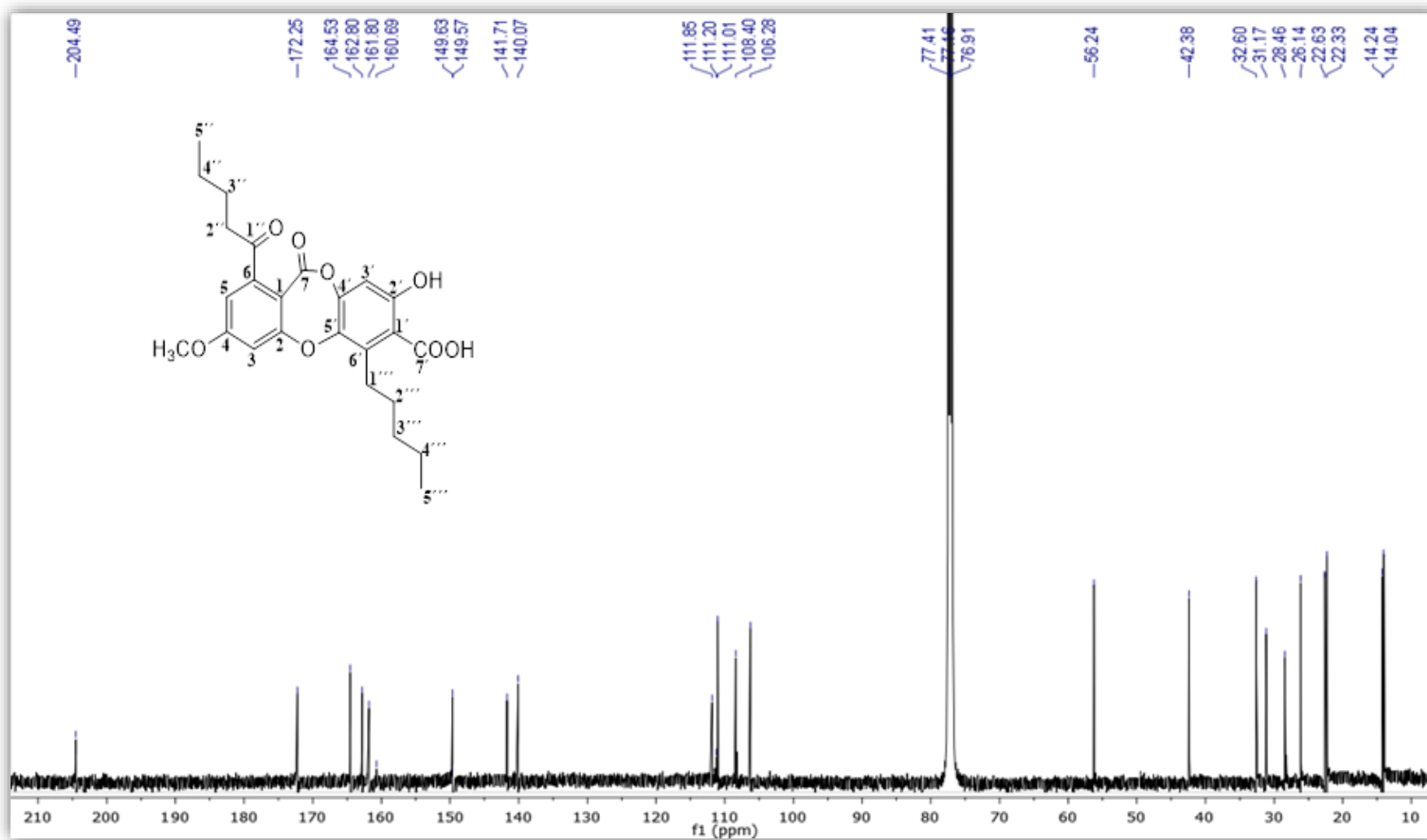


Figura 53. Espectro RMN-¹³C (126 MHz, CDCl₃) del compuesto S3.

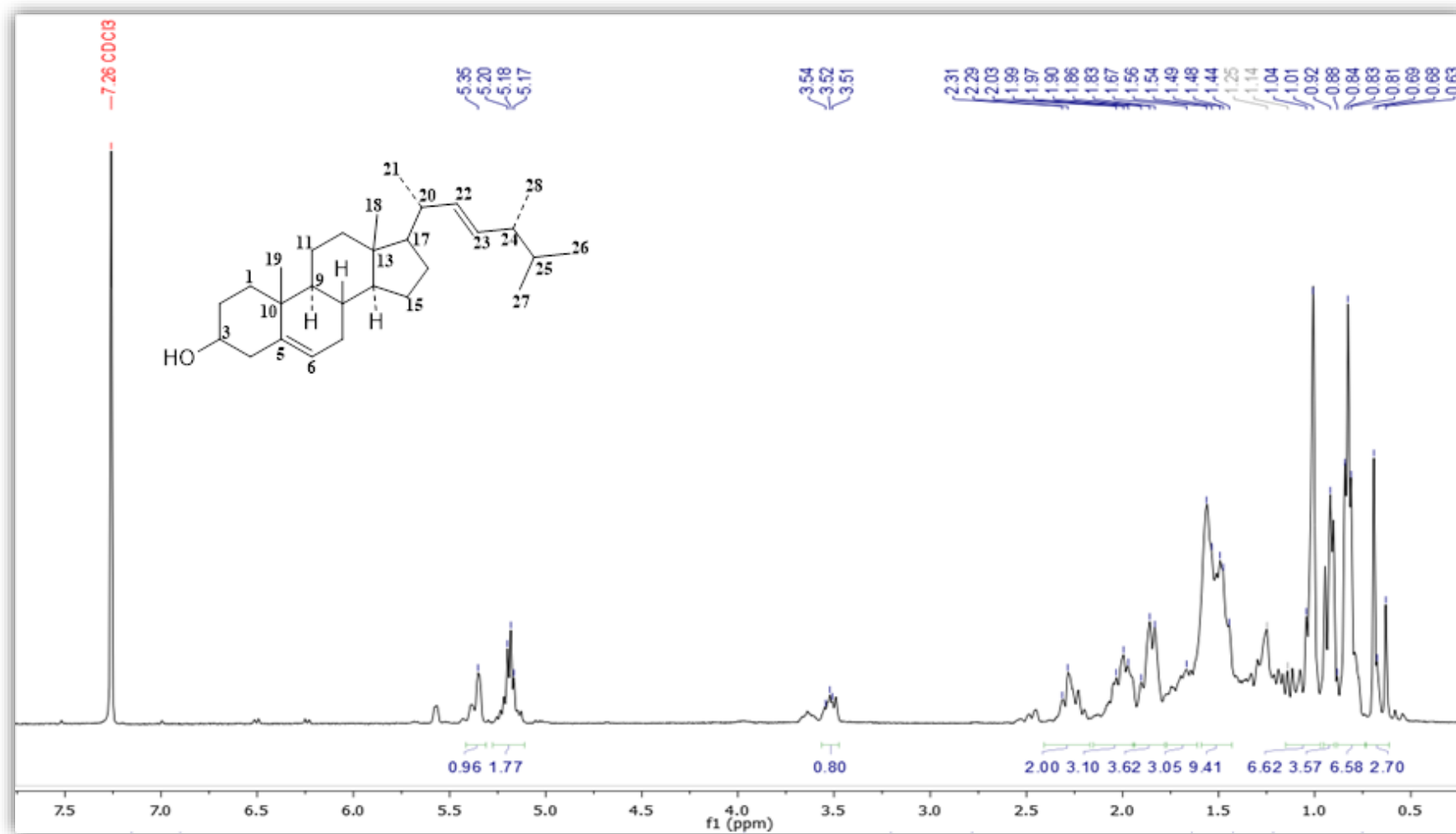


Figura 54. Espectro RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) del compuesto 9.

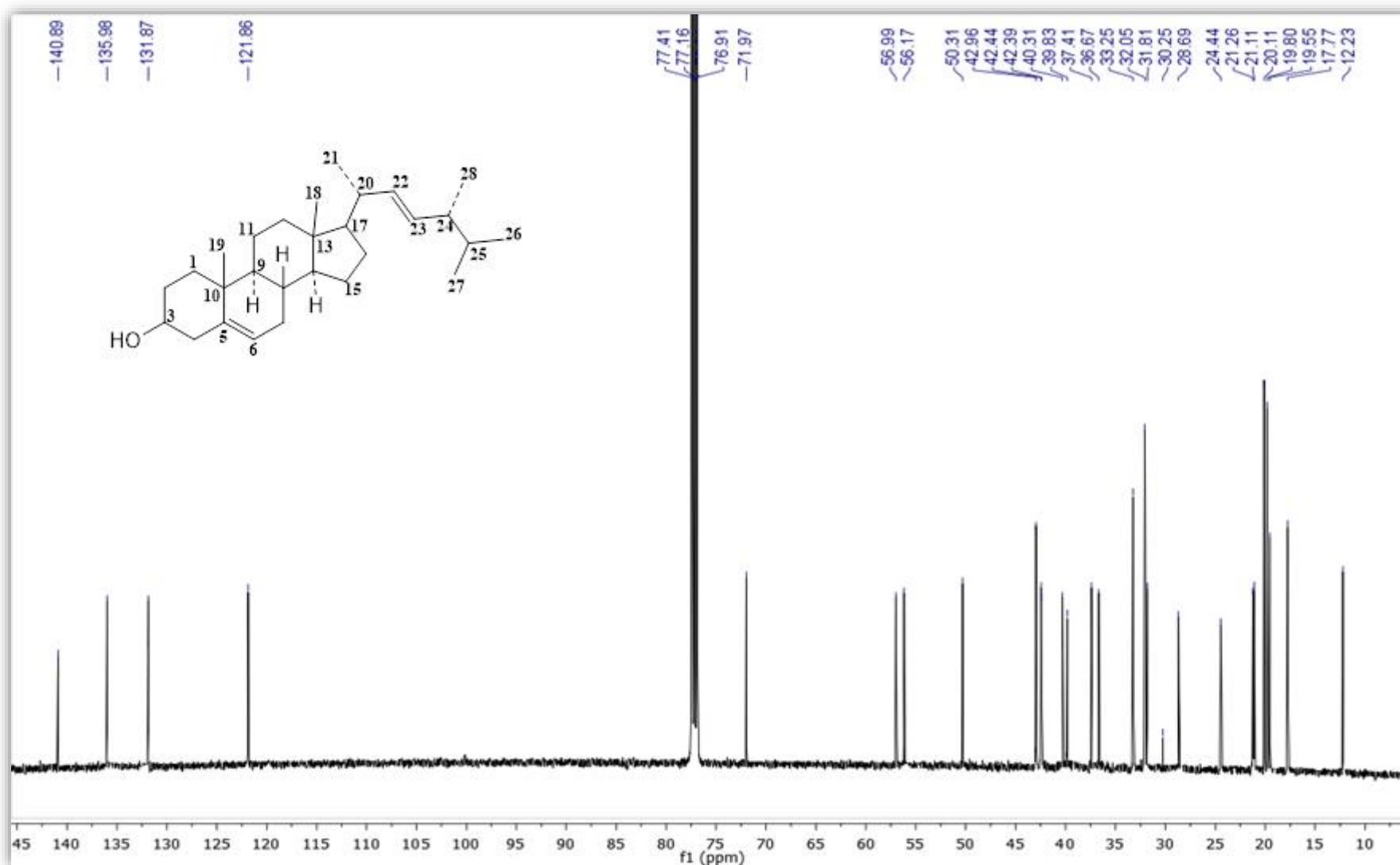


Figura 55. Espectro RMN- ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) del compuesto 9.

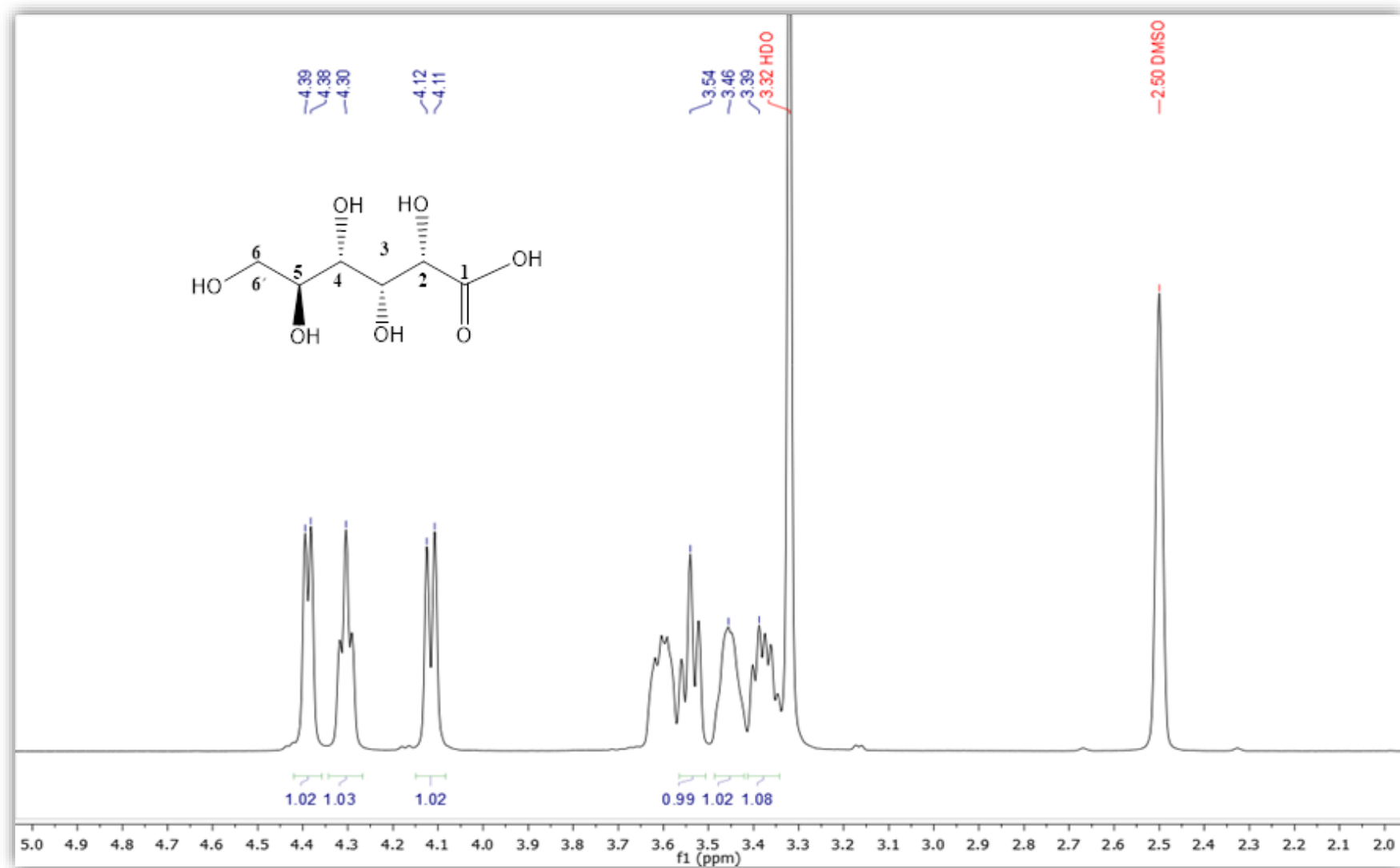


Figura 56. Espectro RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) del compuesto S2.

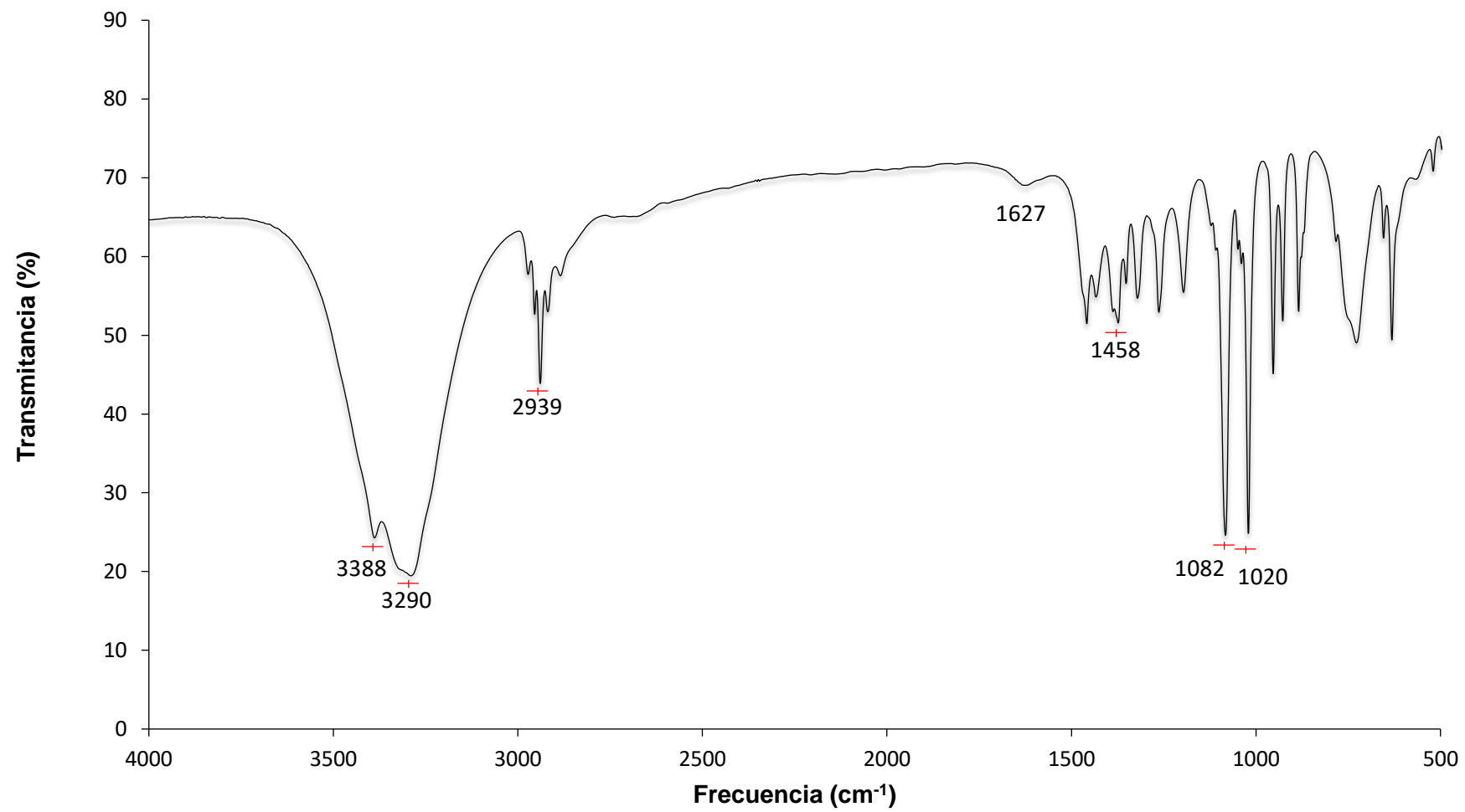


Figura 57. Espectro IR del compuesto S2.

8.8. Anexo 8: Análisis cuantitativo de ácido úsnico

8.8.1. Espectro UV-visible de ácido úsnico

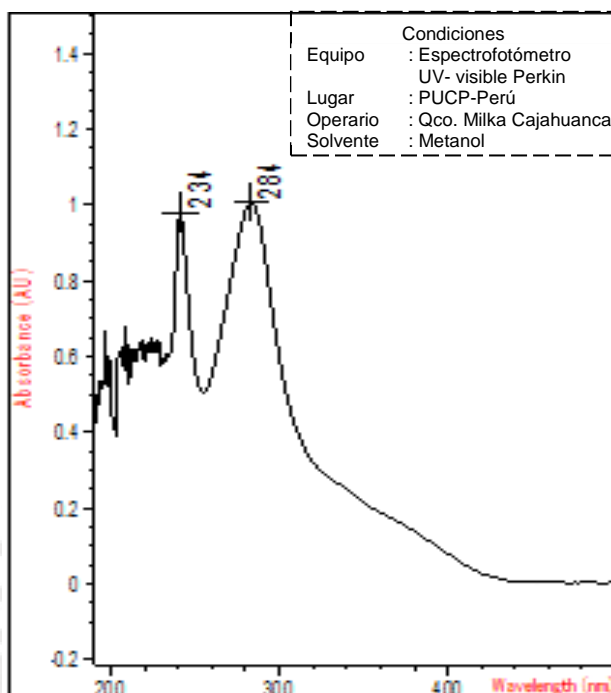


Figura 58.- Espectro UV-Visible de ácido úsnico.

8.8.2. Validación de la curva de calibración (103)

La regresión lineal que se obtuvo en la curva de calibración de la muestra patrón de ácido úsnico es de tipo I¹. Para calcular los límites de confianza de los parámetros del modelo de tipo I, a y b, y de las predicciones de X (concentración de ác. úsnico en la muestra) deben cumplir las siguientes condiciones:

- La relación entre x e y es lineal.
- Los residuos son homocedásticos.

Para comprobar estas condiciones se realiza un análisis del gráfico de residuos, este gráfico se obtiene de graficar e versus x con los datos de la Tabla 36, donde:

x_i : concentración conocida

y_i : absorbancia real observada

¹ En la regresión de Tipo I el experimentador controla una de las dos variables, cuyos valores son conocidos, o bien se pueden seleccionar previamente con mucha precisión.

\hat{y}_i : absorbancia predicha por la ecuación de la curva de calibración

e: residual o residuo

Tabla 36. Absorbancia predicha y residual para los datos de la Tabla 29.

Concentración (ppm)	Absorbancia (y_i)	$\hat{y}_i = 0,17994x + 0,10951$	$e = y_i - \hat{y}_i$
1,0	0,29161	0,28945	0,58106
1,5	0,38357	0,37942	0,76299
2,0	0,46649	0,46939	0,93588
2,5	0,55835	0,55936	1,11771
3,0	0,64220	0,64933	1,29153
3,5	0,73617	0,73930	1,47547
4,0	0,83220	0,82927	1,66147
4,5	0,92708	0,91924	1,84632
5,0	1,00620	1,00921	2,01541
1,0	0,29161	0,28945	0,64932

El análisis del gráfico de residuos (Figura 54), muestra que los valores de residuos (e) siguen una linealidad, ya que sus signos siguen una secuencia aleatoria, además ganan homocedasticidad al acercarse al eje de abscisa.

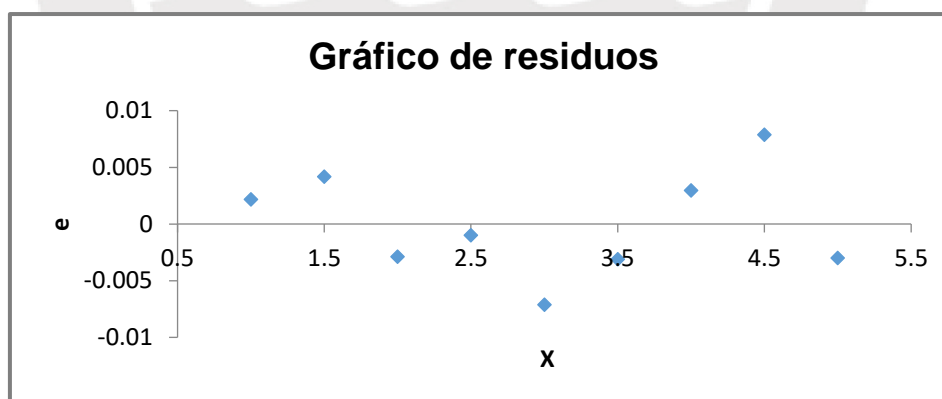


Figura 59. Gráfico de residuos.

8.8.3. Incertidumbres de los coeficientes de regresión (103)

Sea la ecuación de la curva de calibración (Ver Figura 33):

$$y = 0,17994x + 0,10951$$

Dónde:

$$a = 0,10951$$

$$b = 0,17994$$

En la Tabla 37 se muestran los valores de las desviaciones estándar de regresión ($S_{y/x}$), del intercepto (S_a) y de la pendiente (S_b), las cuales se obtuvieron con los datos de la Tabla 36.

Tabla 37. Datos de las desviaciones estándar.

$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y})^2}{n-2} \right\}^{\frac{1}{2}}$	0,00494
$s_a = s_{y/x} \left\{ \frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{\frac{1}{2}}$	0,00417
$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right\}^{\frac{1}{2}}}$	0,00128

A partir de los datos mostrados en la Tabla 37 se calculan los límites de confianza de los coeficientes de regresión para la ordenada LC(a) y para la pendiente LC(b) según las siguientes ecuaciones.

$$LC(a) = a \pm t S_a$$

$$LC(b) = b \pm t S_b$$

Dónde:

$$t (gl = n-2 = 5, 2 \text{ colas}, \alpha = 0,05) = 2,571$$

gl: grados de libertad

n: réplicas de análisis

α : nivel de significación

Al aplicar las ecuaciones anteriores y con los datos obtenidos en la Tabla 37 se tienen los resultados que se pueden observar en la Tabla 38.

Tabla 38. Datos de los límites de confianza de los coeficientes de regresión.

LC(a)	0,110 ± 0,011
LC(b)	0,180 ± 0,003

8.8.4. Incertidumbre de la concentración de ác. úsnico en la muestra líquénica (103)

La desviación estándar asociada a la concentración se calcula mediante la siguiente ecuación.

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right)^{1/2}$$

Dónde:

m (réplicas de análisis) = 3

n (puntos de la curva de calibración) = 9

Al aplicar la ecuación anterior y con los datos mostrados en la Tabla 31 se calcula el límite de confianza al 95 % de la concentración promedio de cada muestra según la siguiente ecuación.

$$LC(x_0) = x_0 \pm \frac{t S_{x_0}}{\sqrt{m}}$$

Donde:

x_0 : concentración de la muestra M_i

t (gl = m+n-3 = 9, 2 colas, $\alpha = 0,05$) = 2,262

S_{x_0} : desviación estándar de la concentración

Así para cada concentración promedio de cada muestra se tiene su respectiva incertidumbre, ver Tabla 39.

Tabla 39. Límites de confianza al 95 % de las concentraciones promedio de cada muestra.

Muestra	Conc _{prom.} (ppm)
M1	3,08 ± 0,04
M2	3,21 ± 0,04
M3	3,05 ± 0,04

8.8.5. Incertidumbre del porcentaje de ác. úsnico en la muestra liquénica (103)

En la Tabla 40 se muestran los errores de los materiales y equipo que se usó para la determinación del porcentaje de ác. úsnico en la muestra liquénica.

Tabla 40. Errores de medidas del equipo y materiales.

Materiales/ Equipo	Error de medida (±)
Matraz aforado de 100 mL	0,080 mL
Matraz aforado de 25 mL	0,04 mL
Matraz aforado de 10 mL	0,025 mL
Micropipeta accumax PRO de 100 - 1000 µL	0,05 µL
Balanza Precisa Gravimetrics	0,0001 g

En la Tabla 41 se muestra el % Ác. úsnico y su respectiva incertidumbre para cada muestra liquénica. Para el cálculo del error se utilizó la siguiente formula:

$$\sigma_{\text{Ác.úsnico}} = \% \text{Ác. úsnico} \times \left(\frac{\sigma_{\text{Conc.}}}{[\text{Conc. prom.}]} + \frac{\sigma_{V_{\text{fioladil}}}}{V_{\text{dil}}} + \frac{\sigma_{V_{\text{fiola100 mL}}}}{100 \text{ mL}} + \frac{\sigma_{V_{\text{alic}}}}{1 \text{ mL}} + \frac{\sigma_{\text{Masa}_{\text{muestra}}}}{\text{Masa}_{\text{muestra}}} \right)$$

Dónde:

$\sigma_{\text{Ác.úsnico}}$: error del % Ác. úsnico en la muestra

$\sigma_{V_{\text{fiola100 mL}}}$: error del matraz aforado de 100 mL

$\sigma_{V_{\text{fioladil}}}$: error del matraz aforado de 10 o 25 mL

$\sigma_{V_{\text{alic}}}$: error de la micropipeta

$\sigma_{\text{Masa}_{\text{muestra}}}$: error de la balanza

Tabla 41. Incertidumbre del porcentaje de ác. úsnico en la muestra líquénica.

Muestra	% Ac. úsnico _{prom.} (g/g)	% Ac. úsnico _{muestra} (g/g)
M1	0,51 ± 0,01	
M2	0,53 ± 0,01	0,52 ± 0,03
M3	0,51 ± 0,01	

