



PONTIFICIA **UNIVERSIDAD CATÓLICA** DEL PERÚ

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons
Reconocimiento-No comercial-Compartir bajo la misma licencia 2.5 Perú.

Para ver una copia de dicha licencia, visite
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



Pontificia Universidad Católica del Perú
Escuela de Graduados



Estudio fitoquímico del líquen
Psiloparmelia distincta (Nyl.) Hale

Presentado por:

OLIVIO NINO CASTRO MANDUJANO

Tesis para optar el grado de:

Magíster en Química

LIMA PERÚ

2 004

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el aislamiento y estudio de sustancias líquénicas del líquen: *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale, Familia *parmeliaceae*, recolectado en la provincia de Jauja, de departamento de Junín (Perú), el cual es usado popularmente para las enfermedades bronquiales.

Se hicieron dos extracciones sucesivas con acetona a temperatura ambiente, a partir de un kg de material limpio y seco, el marco fue sometido a dos extracciones sucesivas con metanol. Se separaron cuatro compuestos de los extractos acetónico y metanólico, para ello se usaron solventes y mezclas de solventes de polaridad variable entre ellas hexano, cloroformo, acetona, acetato de etilo y etanol. Se aislaron y purificaron diversos compuestos mediante técnicas cromatográficas y recristalizaciones.

Se elucidaron y se determinaron las estructuras de los compuestos obtenidos, analizando sus espectros de IR, RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT y EM; estos compuestos son: H (ácido 2-hidroxi-3-formil-4-etoxi-6-metil-benzoico), D (atranorina), A (ácido fumarprotocetrárico) y F (ácido úsnico).

Además, se realizaron análisis por HPLC a diferentes sólidos obtenidos denominados: S1, S2, S3, A1, B1 y N1, analizando los cromatogramas de respectivos, se logró identificar a nueve compuestos en base a sus tiempos de retención, estos son: ácido úsnico, atranorina, cloroatranorina, ácido fumárico, ácido salizínico, ácido guaesítico, ácido protocetrárico, ácido fumarprotocetrárico y el ácido succinprotocetrárico.

Por otro lado, se logró identificar a seis ácidos grasos mediante el análisis por Cromatografía de Gases, estos ácidos son: Ácido araquídico, ácido lignocérico, ácido behémico, ácido láurico, ácido esteárico y ácido palmítico. Finalmente, se desarrolló un método de análisis cuantitativo del ácido úsnico en líquenes empleando la espectroscopia ultravioleta visible.

AGRADECIMIENTO

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

A La Dra. Mónica T. Adler, de la Universidad de Buenos Aires (Argentina), por la identificación de la planta liquénica.

A Dr. Ángel Gutiérrez Ravelo, de la Universidad de La Laguna (España), por los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C y Masas.

A la Dra. María Caramantín Soriano, de la Universidade Estadual de Campinas (Brasil), por los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT y los espectros de masas.

Al Dr. John A. Elix de la Universidad Nacional de Australia (Australia), por los cromatogramas de HPLC, los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C y los espectros de masas; además por las informaciones bibliográficas proporcionadas.

A la Dra. Marissa Piovano, de la Universidad Técnica Federico Santa María (Chile), por los espectros patrones de IR y RMN-¹H de los compuestos: ácido fumarprotocetrárico y atranorina.

A los profesores y al personal no docente de la Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, por su apoyo en este trabajo. A todos mis amigos mi aprecio y agradecimiento.

Dedicatoria



*Para mis
dos grandes amores:
Rosa y
Rosario*

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	i
Índice de tablas	iii
Índice de anexos.....	iv
Relación de instrumentos utilizados	v
1. PARTE TEÓRICA	1
1.1. Líquenes	1
1.2. Biosíntesis.....	1
1.3. Compuestos liquénicos	4
1.4. Usos y aplicaciones de los líquenes	9
1.5. Psiloparmelia distincta (Nyl.) Hale	9
1.5.1. Características Botánicas	9
1.5.2. Taxonomía	10
1.5.3. Características químicas	10
2. PARTE EXPERIMENTAL	11
2.1. Muestra	11
2.2. Análisis preliminar	11
2.2.1. Marcha fitoquímica	11
2.2.2. Reacciones de coloración	11
2.3. Aislamiento: extracción, separación y purificación	14
2.4. Análisis de ácidos grasos por CG	22
2.5. Análisis de las fracciones por HPLC	24
2.6. Análisis cuantitativo del ácido úsnico	25
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
3.1. Resultados del análisis preliminar	27
3.2. Resultados de los extractos acetónicos EA y metanólicos EB	28

3.3. Elucidación estructural del compuesto H	29
3.4. Elucidación estructural del compuesto A	38
3.5. Elucidación estructural del compuesto D	49
3.6. Elucidación estructural del compuesto F	62
3.7. Resultados del análisis de ácidos grasos por CG	75
3.8. Resultados del análisis por HPLC	78
3.9. Resultados del análisis cuantitativo del ácido úsnico.....	87
4. CONCLUSIONES	92
5. RECOMENDACIONES	94
6. BIBLIOGRAFÍA	95
7. ANEXOS	98



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Líquenes que crecen sobre rocas	2
Figura 2: Biosíntesis de derivados fenólicos	3
Figura 3: Estructuras de dépsidos	5
Figura 4: Estructuras de depsidonas	6
Figura 5: Estructuras de dibenzofuranos	7
Figura 6: Estructura de la depsona	8
Figura 7: Estructuras de ácidos úsnicos	8
Figura 8: <i>Psiloparmelia distincta</i> (Nyl) Hale.....	12
Figura 9: Marcha fitoquímica ejecutado	13
Figura 10: Obtención del extracto acetónico EA y metanólico EB	15
Figura 11: Esquema de separación del extracto acetónico EA	16
Figura 12: Esquema de separación del extracto metanólico EB	21
Figura 13: Espectro IR del compuesto H	32
Figura 14: Composición elemental del espectro de masas del compuesto H	33
Figura 15: Espectro de masas del compuesto H	34
Figura 16: Espectro RMN- ¹³ C del compuesto H	35
Figura 17: Espectro RMN- ¹³ C - DEPT del compuesto H	36
Figura 18: Espectro RMN- ¹ H del compuesto H	37
Figura 19: Espectro UV-V del compuesto A	42
Figura 20: Espectro IR del compuesto A	43
Figura 21: Espectro RMN- ¹ H del compuesto A	44
Figura 22: Espectro RMN- ¹³ C del compuesto A	45
Figura 23: Espectro de masas del compuesto A	46
Figura 24: Espectro IR del ácido fumarprotocetrárico	47
Figura 25: Cromatograma HPLC del compuesto A	48
Figura 26: Espectro UV-V del compuesto D	54
Figura 27: Espectro IR del compuesto D	55
Figura 28: Espectro RMN- ¹ H del compuesto D	56

Figura 29: Espectro RMN- ¹³ C del compuesto D	57
Figura 30: Espectro RMN- ¹³ C - DEPT del compuesto D	58
Figura 31: Cromatograma HPLC del compuesto D	59
Figura 32: Espectro IR del compuesto atranorina	60
Figura 33: Propuesta de la fragmentación del compuesto D	61
Figura 34: Cromatograma HPLC del compuesto F	67
Figura 35: Espectro UV-V del compuesto F	68
Figura 36: Espectro IR del compuesto F	69
Figura 37: Espectro RMN- ¹ H del compuesto F	70
Figura 38: Espectro RMN- ¹³ C del compuesto F	71
Figura 39: Espectro de masas del compuesto F	72
Figura 40: Composición elemental del espectro de masas del compuesto F	73
Figura 41: Fragmentación del compuesto F	74
Figura 42: Cromatograma CG de los ácidos grasos metilados estándares	76
Figura 43: Cromatograma CG de los ácidos grasos metilados de la muestra	77
Figura 44: Cromatograma HPLC del sólido S1	79
Figura 45: Cromatograma HPLC del sólido S2	80
Figura 46: Cromatograma HPLC del sólido S3	81
Figura 47: Cromatograma HPLC del sólido N1	82
Figura 48: Cromatograma HPLC del sólido A1	83
Figura 49: Cromatograma HPLC del sólido B1	84
Figura 50: Estructuras químicas identificadas por HPLC	85
Figura 51: Estructuras químicas identificadas por HPLC (Continuación)	86
Figura 52: Espectro UV-V del ácido úsnico	89
Figura 53: Curva de calibración del ácido úsnico entre 0-1000 ppm	90
Figura 54: Curva de calibración del ácido úsnico entre 0-10 ppm	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fase móvil para la CC del sólido amarillo EAH1	18
Tabla 2: Resultados del análisis cualitativo del extracto inicial	27
Tabla 3: Sólidos obtenidos del extracto acetónico EA	28
Tabla 4: Sólidos obtenidos del extracto metanólico EB	28
Tabla 5: Datos del espectro IR del compuesto H	29
Tabla 6: Datos del espectro RMN-- ¹³ C del compuesto H	30
Tabla 7: Datos del espectro RMN- ¹ H del compuesto H	31
Tabla 8: Datos de las absorciones IR del compuesto A y el ácido fumarprotocetrárico	40
Tabla 9: Datos de los espectros RMN- ¹³ C del compuesto A y el ácido fumarprotocetrárico	41
Tabla 10: Datos del espectro IR del compuesto D y la atranorina.....	50
Tabla 11: Datos del espectro RMN- ¹ H del compuesto D	51
Tabla 12: Datos de los espectros RMN- ¹³ C del compuesto D y de la atranorina	53
Tabla 13: Comparación de las absorciones máximas de los espectros UV-V del compuesto F y del ácido úsnico	63
Tabla 14: Datos del espectro IR del compuesto F y del ácido úsnico	64
Tabla 15: Datos del espectro RMN- ¹ H del compuesto F	65
Tabla 16: Datos del espectro RMN- ¹³ C del compuesto F	66
Tabla 17: Ácidos grasos de la <i>Psiloparmelia distincta</i> identificados por CG	75
Tabla 18: Compuestos identificados por HPLC	78
Tabla 19: Absorbancia en el rango de 0 – 1000 ppm del ácido úsnico	87
Tabla 20: Absorbancia en el rango de 0 –10 ppm del ácido úsnico	87

ÍNDICE DE ANEXOS

7.1. ANEXO I: Identificación botánica del líquen	98
7.2. ANEXO II: Búsqueda en base de datos	99
a. Base de datos Medline	99
b. Base de datos SCI-EXPANDED.....	100



INSTRUMENTOS UTILIZADOS

1. Rotavapor Buchi r 110, PUCP - Perú
2. Lámpara UV 254 / 366 nm, PUCP - Perú
3. Punto de fusión: melting poing , Fisher – Johns, PUCP – Perú.
4. Espectrómetro Infrarrojo, FT - IR, serie 1600, Perkin Elmer, PUCP - Perú
5. Espectrofotómetro Ultravioleta – Visible, Lambda 2, L A, Perkin Elmer, PUCP - Perú.
6. Polarímetro de circulo con lámpara espectral de sodio Carl Zeiss-Jena. Modelo 32-G-58 – oa-1, PUCP - Perú.
7. Cromatógrafo de Gases, Hewlett Packard, 5890 Serie II, PUCP - Perú
8. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, nmrsun, INOVA – 500, 300 MHz, Brasil.
9. Cromatógrafo, Kontron HPLC System, Universidad Nacional de Australia, Australia.
10. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, APARELHO BRUCKER, 300 MHz, Universidad Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil.

1. PARTE TEÓRICA

1.1. LÍQUENES

El líquen es un organismo simbiótico conformado por un hongo (Micobionte) y un alga (Ficobionte). Mientras el hongo se encarga del abastecimiento del agua y sales minerales, el alga provee los productos fotosintéticos como los glúcidos. Se calcula que existen aproximadamente 13 500 especies dentro de 600 géneros.

Los líquenes son consorcios biológicos de amplia difusión que se encuentran en gran variedad de *hábitat*, desde la región Ártica hasta la región Antártica. Los líquenes son encontrados desde el nivel del mar hasta en las altas montañas; también se encuentran en los desiertos donde la temperatura es variable o en regiones polares donde las temperaturas son extremadamente bajas. Crecen sobre rocas, corteza, hojas de árboles, suelos, etc. Figura 1 [1, 2].

1.2. BIOSINTESIS

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



Figura 1: Líquenes que crecen sobre rocas.

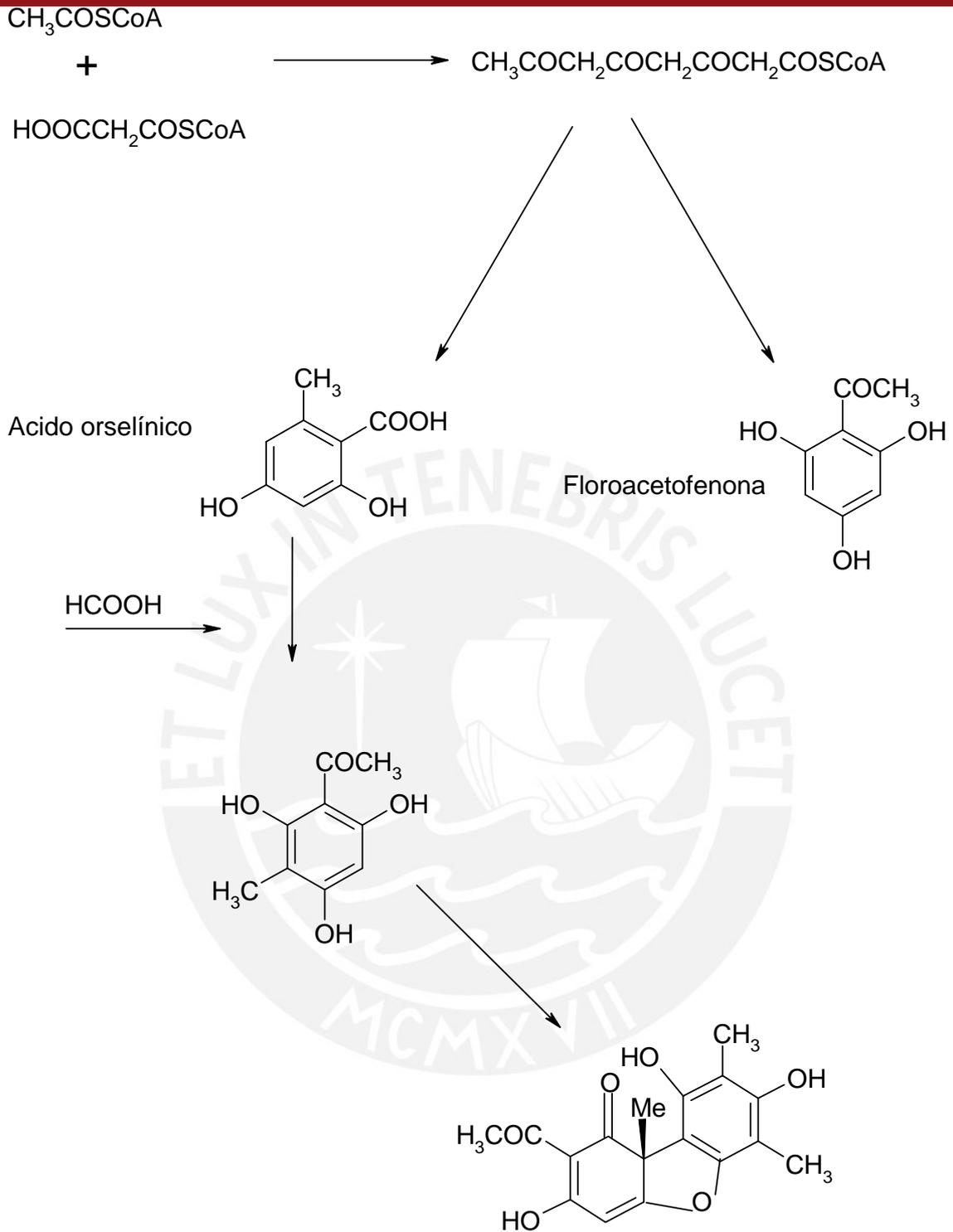


Figura 2: Biosíntesis de derivados fenólicos

1.3. COMPUESTOS LIQUÉNICOS

Se aplica el término de “compuestos liquénicos” a todos los compuestos sintetizados exclusivamente por líquenes [2,3]. Los compuestos liquénicos se agrupan en los siguientes tipos, clasificados de acuerdo a su estructura, ver Figuras 3-7.

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

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

Ácidos lactónicos y derivados	Ácidos grasos
Diterpenos	Triterpenos
Esteroides	Carotenoides
Alcoholes polihídricos	Carbohidratos
Orcinol y derivados	Dépsidos
Depsidonas	Depsona
Cromanona y derivados	Quinonas
Ácido púlvico y derivados	Dibenzofurano y derivados
Compuestos azufrados	Compuestos nitrogenados
Aminoácidos	Vitaminas
Enzimas	

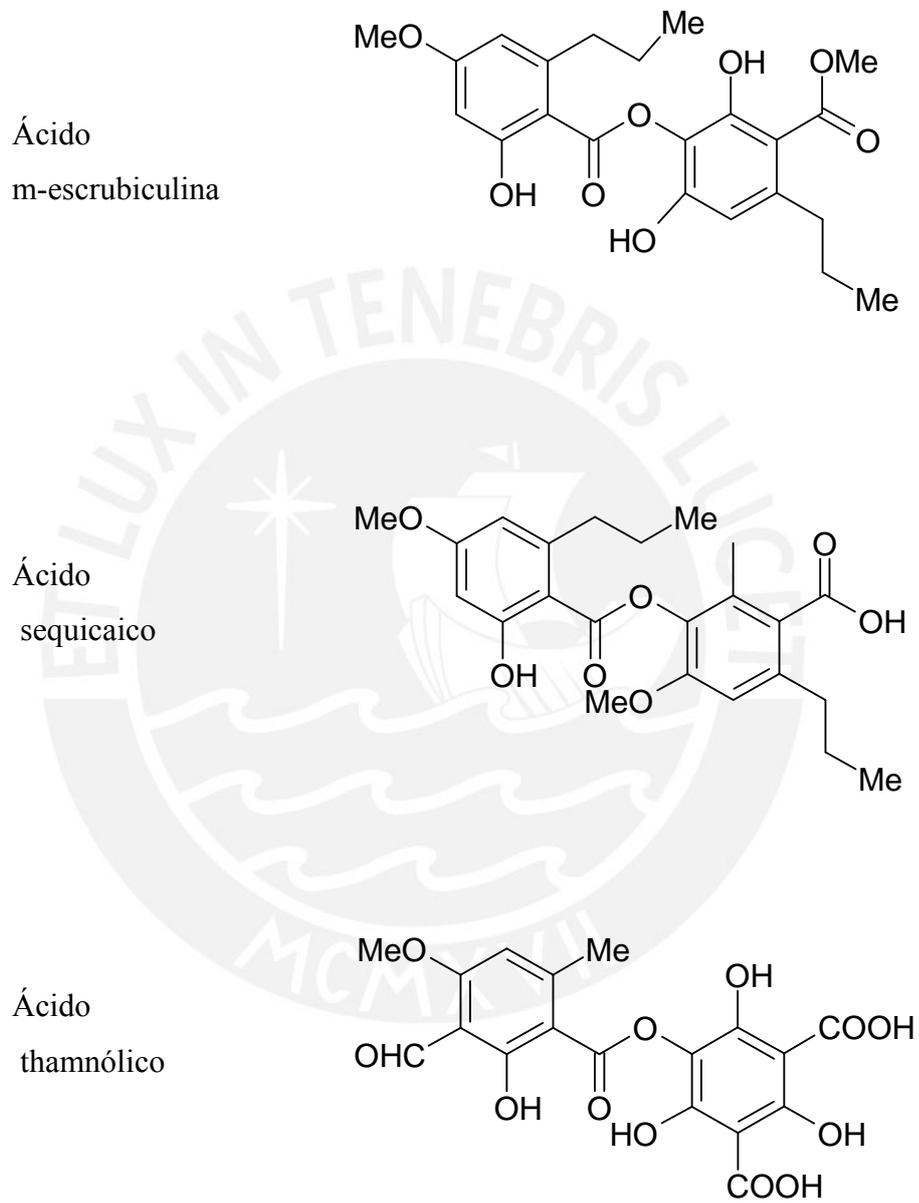


Figura 3: Estructuras de dépsidos

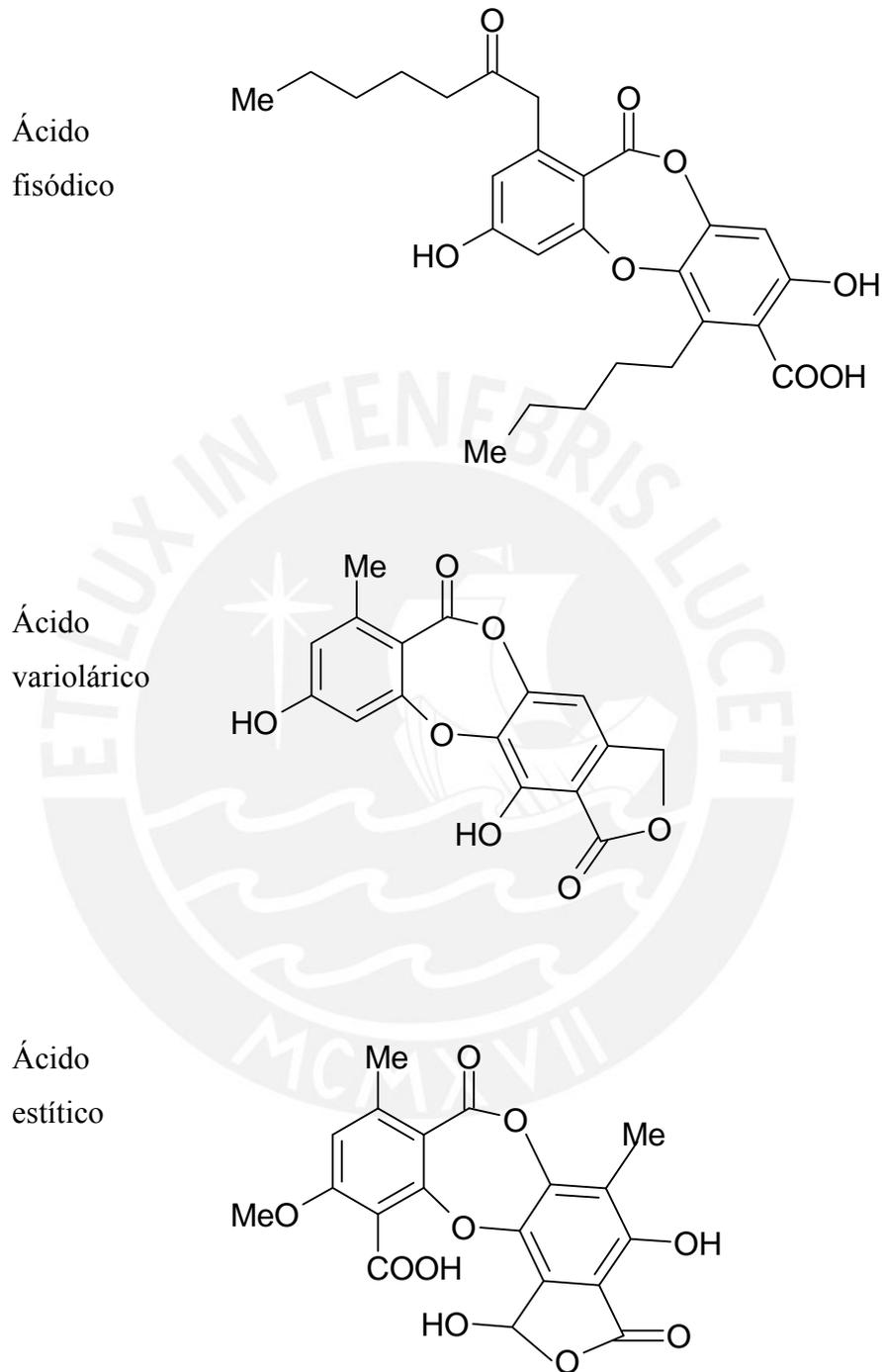
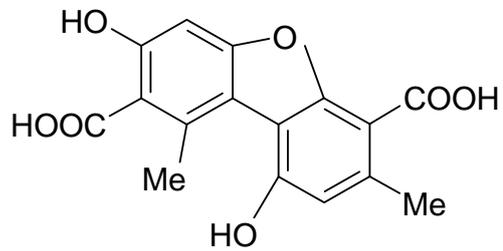
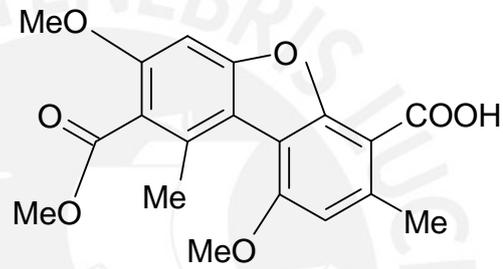


Figura. 4: Estructuras de Depsidonas

Ácido
panárico



Ácido
chizopético



Ácido
didímico

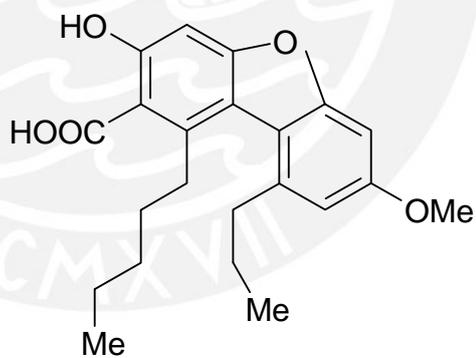


Figura 5: Estructuras de Dibenzofuranos

Ácido
picroliquénico

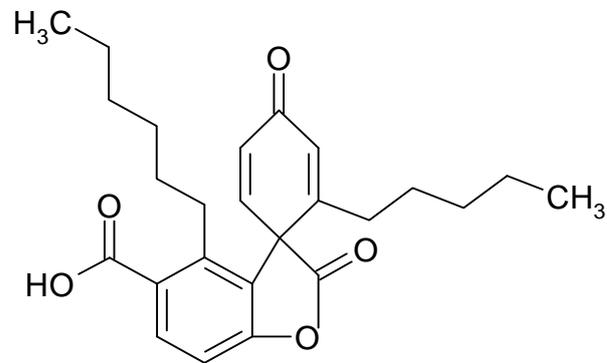
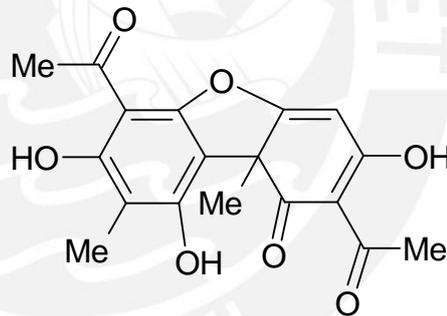


Figura 6: Estructura de la Depsona

(+) - (R) - Ácido
úsnicico



(+) - (R) - Ácido
isoúsnicico

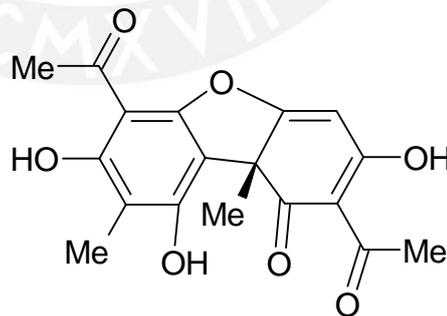


Figura 7: Estructuras de los ácidos úsnicos

1.4. USOS Y APLICACIONES DE LOS LÍQUENES

En el mundo moderno, uno de los papeles más importantes que desempeñan los líquenes con relación a los seres humanos, es el de indicadores de la contaminación del ambiente; además, se les puede utilizar en base a sus:

- Propiedades farmacológicas
- Capacidad quelante.
- Reacciones fotoquímicas ligadas a cationes
- Capacidad pigmentante

El compuesto liquénico más estudiado es el ácido úsnico, los isómeros ópticos de este ácido muestran un amplio espectro de actividad farmacológica. Son activos frente a *neumococos*, *estreptococos* y *estafilococos*. Además presentan actividad antibiótica frente a los diferentes tipos de *Mycobacterium*. Asimismo, se ha conseguido ampliar considerablemente el espectro de antibiosis de estos compuestos dada la obtención de nuevos derivados de los ácidos úsnicos [2, 5].

Para la especie liquénica en estudio, según encuesta a los lugareños de la zona de recolección, se reportó su uso medicinal en dolencias como tos, bronquitis, etc.

1.5. *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale

1.5.1. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

Tiene un talo adnato a laxamente adnato, coriáceo de hasta 10 cm de diámetro, color amarillo verdoso. Lóbulos sub-irregulares a sub-lineares, de 0,8 – 3 mm de ancho, ramificación irregular, sin isidios ni soredios, médula blanca, envés negro aterciopelado sin ricines. Apotecios abundantes, ascosporas elipsoides de 6-9 x 10-12 micrones. Picnidios con conidios bifusiformes de 5 - 6 micrones [6].

1.5.2. TAXONOMÍA.

La clasificación taxonómica fue realizada por la Dra. Magdalena Pavlich de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Anexo I) así como también por la Dra. Mónica T. Adler de la Universidad de Buenos Aires – Argentina, ambas coincidieron con la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	Vegetal
Tipo	<i>Criptógamas</i>
Phyllum	<i>Euthallophytas</i>
División	<i>Thallophytas</i>
Clase	<i>Ascolichenes</i>
Orden	<i>Lecanorales</i>
Suborden	<i>Lecanoríneas</i>
Familia	<i>parmeliaceae</i>
Género	<i>Psiloparmelia</i>
Especie	<i>Distincta</i>
Nombre científico	<i>Psiloparmelia distincta</i> (Nyl.) Hale
Sinonimia	<i>Parmelia distincta</i> Nyl. <i>Parmelia subcongruens</i> Mull. Arg. <i>Parmelia bouly de Lesdainii</i> Gyel

1.5.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.

En la bibliografía [6] se reportan estudios botánicos y quimiotaxonómicos de ésta especie, indicando que contiene: ácido úsnico, dépsidos y depsidonas, además de ácidos grasos y otros compuestos. Estos datos fueron obtenidos como resultado de los análisis realizados por CCD y por HPLC. Al ejecutar la búsqueda a través de dos bases de datos MEDLINE de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y SCI-EXPANDED de la Universidad Estadual de Campinas Brasil, se confirmó la ausencia de estudios fitoquímicos para esta especie liquénica (Anexo II).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MUESTRA

La muestra en estudio constituye el líquen completo, el cual ha sido recolectado por el tesista, en el Departamento de Junín, Provincia de Jauja, en el pueblo Cachi-Cachi a una altitud de 4000 a 4200 msnm, en marzo de 1998 (primera recolección para la identificación y estudios preliminares) y mayo de 2000 (segunda recolección para el aislamiento de compuestos liquénicos). La Figura 8 presenta una fotografía del líquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale.

2.2. ANÁLISIS PRELIMINAR

2.2.1. MARCHA FITOQUÍMICA

Se han desarrollado diferentes métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos en la planta, basados en la extracción de éstos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración y precipitación [7, 8, 9]. Para la *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale se realizó una marcha fitoquímica según el proceso que se expone en la Figura 9.

2.2.2. REACCIONES DE COLORACIÓN PARA COMPUESTOS LIQUENICOS

- El cloruro férrico en disolución acuosa al 1%, o en disolución etanólica permite reconocer los ácidos fenólicos en general.
- La disolución acuosa saturada de hipoclorito de calcio nos permite identificar a las sustancias liquénicas que posean en uno de sus anillos, dos grupos hidroxilos en posición meta (2-4 ó 2-6).



Figura 8: *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale



- Con una disolución acuosa de KOH al 5% se detecta a las depsidonas. Su acción se basa en la ruptura del éster mediante hidrólisis alcalina, conduciendo a la formación de un compuesto difenólico con un enlace éster.
- Se puede emplear sucesivamente KOH y $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ en este caso se observa color rojo para las depsidonas [2, 3].

2.3. AISLAMIENTO: EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN

Un kilogramo de muestra limpia, seca y molida, se sometió a dos extracciones sucesivas por maceración con 2 L de acetona. Obteniendo aproximadamente 3 L de extracto, luego, el marco obtenido se extrajo por dos veces con 1,8 L de metanol dando 3 L de extracto metanólico, se concentraron los extractos independientemente en un rotavapor, y se obtuvo 65,2 g de extracto acetónico EA y 11,2 g de extracto metanólico EB, ver Figura 10.

Los extractos EA y EB se fraccionaron en base a la solubilidad de sus diferentes componentes en diversos solventes. Se usaron solventes de polaridad creciente como por ejemplo hexano, cloroformo, acetona, etanol.

En la Figura 11 se esquematiza la obtención de las fracciones hexánica (EA1), bencénica (EA2), clorofórmica-bencénica (EA3), acetato de etilo (EA4), cloroformo-etanol 3:1 (EA5), cloroformo-etanol 1:1 (EA6), y etanólica (EA7).

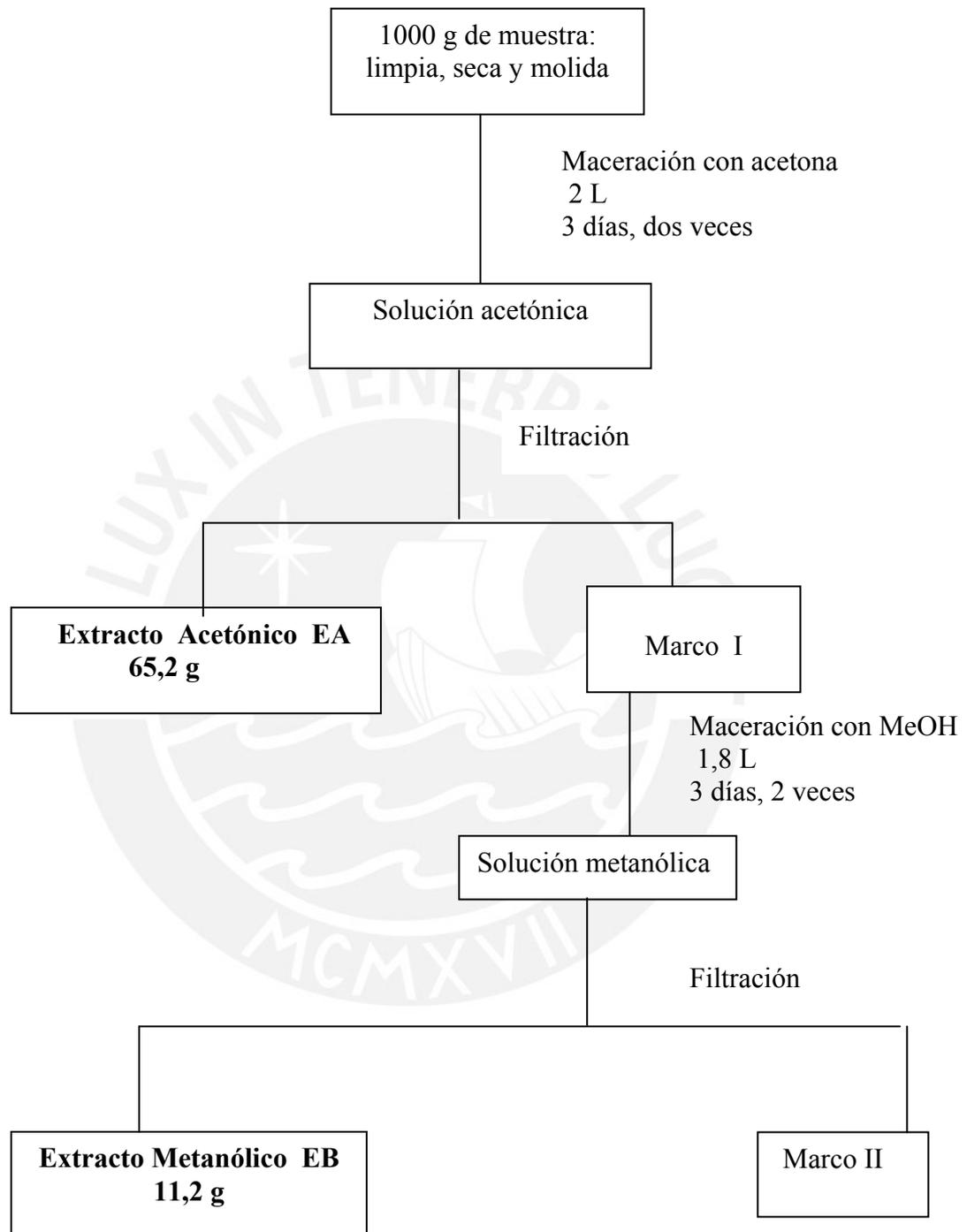


Figura 10: Obtención de los extractos acetónico EA y metanólico EB

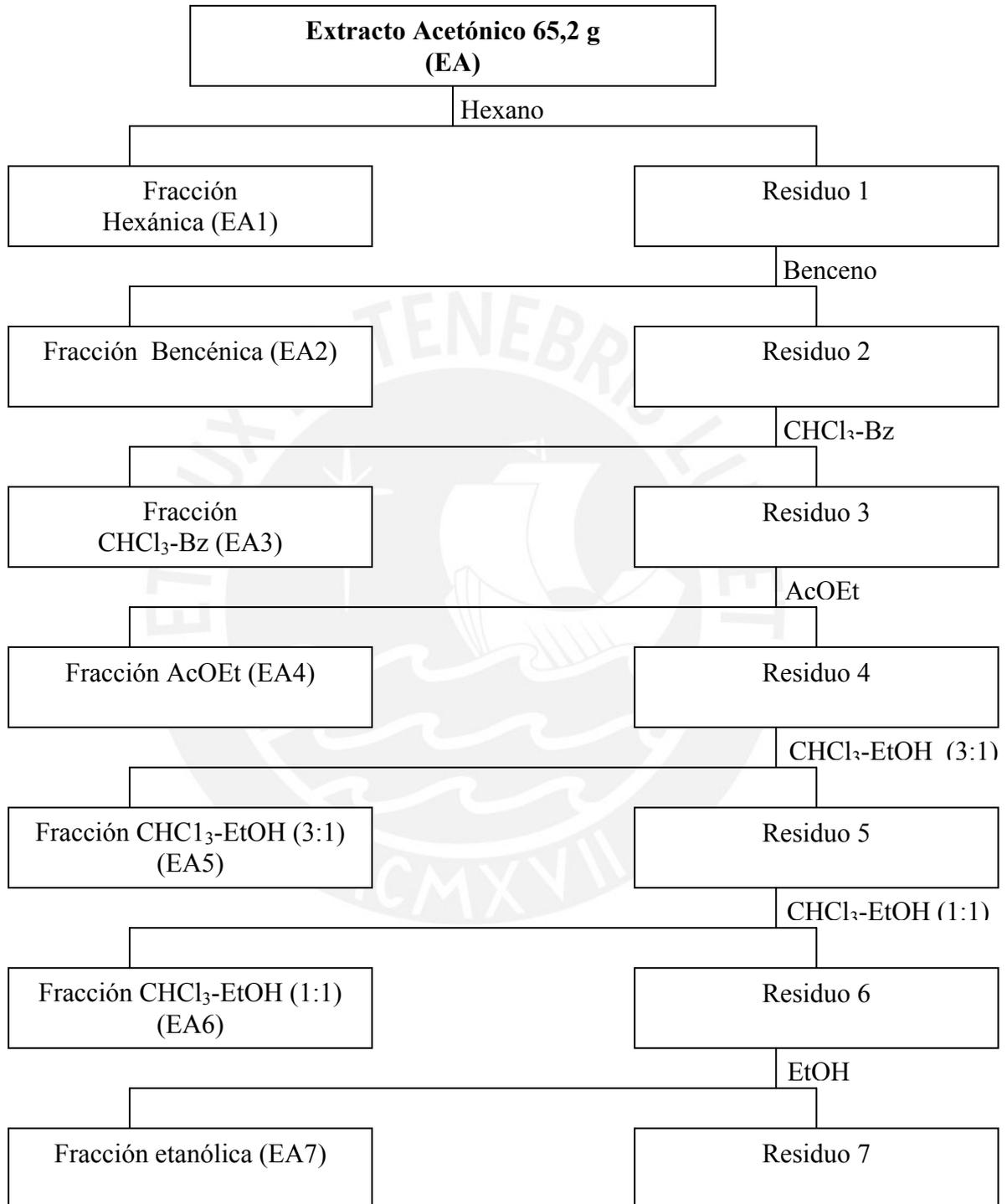


Figura 11: Separación del extracto acetónico EA

A continuación se reporta el rendimiento en cada uno de los extractos obtenidos en el fraccionamiento de EA:

Fracción	Código	Peso (g)
Hexánica	EA1	2,65
Bencénica	EA2	12,50
Cloroformo-benceno 1:1	EA3	4,53
Acetato de etilo	EA4	2,80
Cloroformo-etanol 3:1	EA5	3,10
Cloroformo-etanol 1:1	EA6	5,50
Etanólica	EA7	9,10

La fracción hexánica EA1, dio un residuo cremoso el que se purificó por recristalización en MeOH-acetona 1:1 hasta obtener 65 mg del compuesto H como cristales blancos, los cuales tienen la forma de agujas muy finas, solubles en cloroformo y ligeramente solubles en metanol, con punto de fusión de 103-104 °C. Tienen reacción positiva con KOH (5% acuoso) dando una coloración amarilla.

Al ensayarse la solubilidad de las fracciones EA2 hasta EA7 se observó que todas ellas se disolvían parcialmente en cloroformo. Las soluciones así logradas presentaron un color amarillo intenso, se juntaron y se concentraron a sequedad dando un sólido de color anaranjado oscuro EAH, el cual se lavó sucesivamente con acetona dando la solución EAH1, y el sólido EAH2, de color amarillo pudiéndose visualizar dos manchas al ejecutar CCD eludía con CHCl_3 : MeOH 1:1. El sólido se sometió a procesos de purificación usando diferentes solventes, las soluciones obtenidas se reunieron con EAH1 por tener comportamiento cromatográfico similar. El sólido F, es cristalino, de color amarillo, soluble en cloroformo, poco soluble en acetona y acetato de etilo, insoluble en metanol, su punto de fusión es 204 °C. Reacciona con KOH y FeCl_3 dando coloraciones amarilla y rojo oscuro respectivamente.

La solución EAH1 se analizó por CCD dando varias manchas, por lo que se decidió separarlas por CC. Se usó como fase estacionaria silica gel malla 110 – 230 mesh en una columna de 2,2 cm de diámetro x 25 cm de relleno, empleando elusión por etapas con solventes de polaridad creciente. La tabla 1 presenta la composición de la fase móvil usada

Tabla 1: Relación de fracciones recolectadas y fase móvil para la CC de EAH

Sistema de Disolvente	Proporción (v / v)	Volumen (mL)	# de fracción
Hexano	1	20	1
			2
Hexano – CHCl ₃	3 / 1	20	3
			4
	2 / 2	20	5
			6
	1 / 3	20	7
			8
CHCl ₃	1	20	9
			10
CHCl ₃ - MeOH	3 / 1	20	11
			12
	2 / 2	20	13
			14
	1 / 3	20	15
			16
MeOH	1	20	17
			18

Al analizar las fracciones por CCD se observó que las fracciones 6-9 mostraban el mismo comportamiento cromatográfico al dar una sola mancha de R_f 0,51. Las fracciones se reunieron, concentraron y recrystalizaron en CHCl_3 -MeOH 1:1, obteniéndose 55 mg del sólido D en forma de cristales blancos, los cuales dieron coloración amarilla con KOH, roja con FeCl_3 sugiriéndonos de que se trata de un compuesto liquénico (dépsido o depsidona).

Las fracciones 10-12, mostraron una sola mancha en la CCD eluida con EtOH acetona 1:1. Bajo esas condiciones el compuesto tiene un R_f 0,63. Las fracciones reunidas se concentraron y recrystalizaron en CHCl_3 -MeOH 1:1. Se obtuvieron cristales amarillos con punto de fusión 203-204 °C con propiedades idénticas al compuesto F.

El residuo sólido de la fracción bencénica EA2 de color marrón oscuro, fue parcialmente soluble en etanol caliente. La parte soluble EA21, se concentró hasta sequedad dando un sólido de color crema. Se disolvió en 10 mL de AcOEt, se filtró en caliente, se llevó a sequedad obteniéndose el sólido blanco M-2.

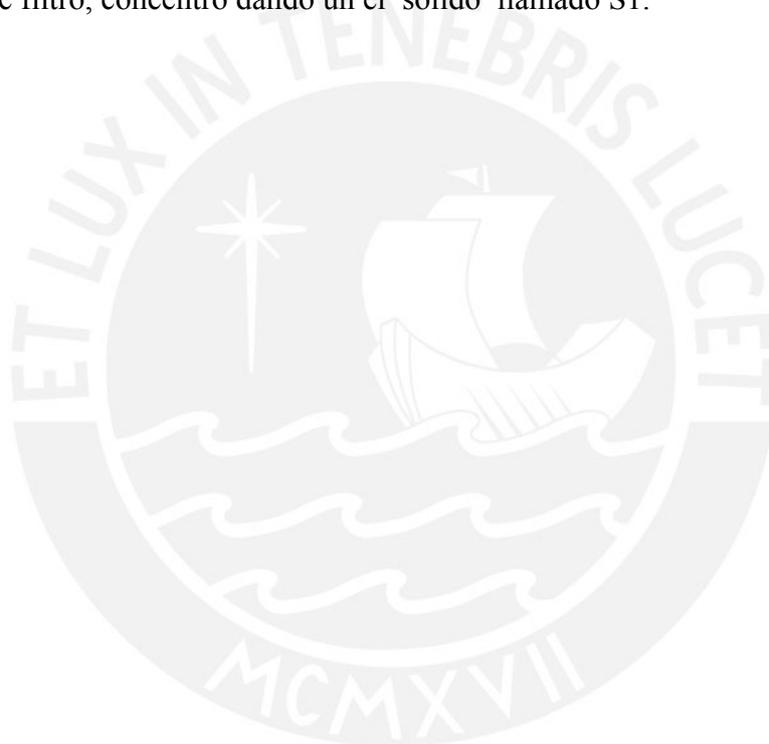
El residuo sólido de la fracción bencénica – clorofórmica EA3, se disolvió en 10 mL de metanol, se filtró en caliente. La solución obtenida se enfrió a 0 °C observándose en ella la aparición en muy pequeñas cantidades de unos cristales blancos, llamados compuesto T.

El residuo sólido de la fracción AcOEt EA4, se extrajo varias veces con acetona, las soluciones reunidas se concentraron a sequedad, el residuo se purificó en diversos sistemas de solventes. Se obtuvo el sólido U.

El residuo sólido de la fracción EA6, se disolvió en 20 mL de MeOH-acetona (1:1), se filtró, concentró y recrystalizó dando un residuo crema, llamado N2. El residuo sólido de la fracción EA5 se lavó sucesivamente con hexano y cloroformo, descartándose esas soluciones. El residuo sólido se disolvió en acetona y se filtró. La solución acetónica se concentró a sequedad dando un sólido marrón claro que se recrystalizó en MeOH-acetona 1:1, obteniéndose los cristales blancos G1.

El residuo de la fracción EA7, se lavó sucesivamente con hexano, cloroformo y acetona, descartándose esas soluciones. El residuo sólido de color marrón se lavó con metanol caliente y frío. El material insoluble corresponde al producto B. La solución metanólica se concentró a sequedad, el residuo se recristalizó en metanol-acetona, dando el sólido B2. La solución madre se concentró dando el sólido B1.

En la Figura 12 se esquematiza la separación del extracto metanólico EB. Del cual se obtienen las fracciones acetónica EB1, etanólica EB2 y metanólica EB3. El residuo sólido de la fracción EB1 de color marrón oscuro, se disolvió en CHCl_3 -MeOH 1:1, se filtró, concentró dando un el sólido llamado S1.



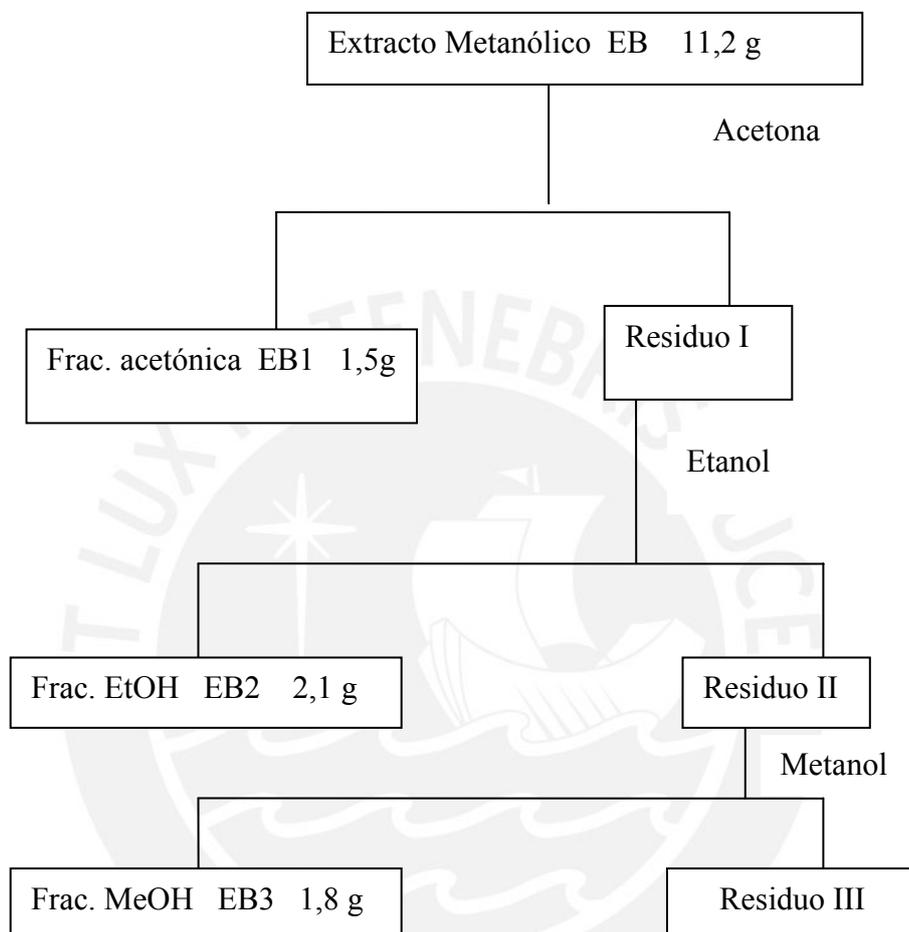


Figura 12: Esquema de la separación del extracto metanólico EB

El residuo sólido de la fracción EB2, se disolvió en CHCl_3 -MeOH 1:1, se filtró dando el sólido S3. La solución orgánica se concentró parcialmente, se enfrió a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y de ella se obtuvieron cristales amarillos S2.

El residuo de la fracción EB3, se disolvió con MeOH-acetona 1:1, se calentó y al enfriarse a $0\text{ }^\circ\text{C}$ se precipitó un sólido el cual fue recristalizado en el mismo sistema dando los cristales A, la solución del filtrado se concentró a sequedad, se disolvió en acetona caliente, se filtró, el sólido A1 y de la solución acetónica después de concentrarla, se obtuvo el sólido A2.

Los metabolitos aislados de los extractos metanólico y acetónico, se sometieron a análisis por HPLC, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y EM en laboratorios extranjeros por no contar con esa instrumentación en el medio, mientras que los análisis de solubilidad, punto de fusión, índice de refracción UV-V e IR, se realizaron en los laboratorios de la PUCP. Los datos bibliográficos utilizados en la etapa de separación fueron tomados de las referencias [3, 7-12].

2.4. ANÁLISIS DE ACIDOS GRASOS

Sobre 100 g de muestra del líquen, se realizaron 3 extracciones sucesivas por maceración con CHCl_3 -MeOH 1:1, [13, 14], completándose a 600 mL de extracto el cual se concentró a presión reducida, obteniéndose un sólido M de color verde oscuro (6,3 g), que contiene los ácidos grasos, los cuales se esterificaron procediéndose de la siguiente manera:

- Se pesó 200 mg de la muestra M, se saponificó con KOH 0,5 N, en baño de agua, a $55\text{ }^\circ\text{C}$, por 20 min.
- La saponificación liberó los ácidos grasos de la muestra, los que se neutralizaron por adición de 5 mL de HCl diluido 1:1. Los ácidos se extrajeron con 10 mL de éter de petróleo concentrándose a vacío.

- La solución etérea se lavó con agitación con 10 mL de agua, la fase etérea se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó a sequedad bajo corriente de N_2 .
- El residuo se disolvió en 10 mL de éter de petróleo; se tomó una alícuota de 1 mL la que se evaporó a sequedad en presencia de nitrógeno, se le agregó 10 mL de $HClO_4$ al 5% en metanol y se calentó a $55^\circ C$ por 5 min.
- Los ésteres se extrajeron de la solución de $HClO_4$ con éter, esta fase se lavó y secó como en la etapa anterior, quedando lista para el análisis por CG.
- El análisis por cromatografía de gases de los estándares palmítico, esteárico, láurico previamente esterificados, así como de la muestra problema, se realizó bajo las siguientes condiciones:

Equipo	Cromatógrafo Hewlett Packard-HP-5890, serie II
Detector	FID
Columna	HP-5 (5% Fenilmetil silicona) 25 m x 0,32 x 0,52 μm
Temperatura de la Columna	1' / $160^\circ C$ / 10' / $300^\circ C$ / 10'
Temperatura de Inyector	$280^\circ C$
Temperatura del Detector	$300^\circ C$
Gas portador	He
Flujo del H_2	1 mL / min
Volumen Inyectado	1 μL
Split	1: 100

Se compararon los tiempos de retención de los estándares con los obtenidos para la muestra y en base a ello se definió la composición de la misma.

2.5. ANÁLISIS POR HPLC

Los sólidos obtenidos: S1, S2, S3, A1, N1 y B1 se analizaron en la Universidad Nacional de Australia, por HPLC. Cada muestra fue disuelta en acetona fría, se decantó y se tomó una alícuota para inyectar al cromatógrafo [15]. Las condiciones instrumentales fueron:

Cromatógrafo HPLC	Kontron HPLC, Systems-Data Systems 450
Detector	UV – 430
Columna	Spherisorb 5 ODS-2 Kontron 250 x 4,6 mm
Estándares Internos	20 mg de ácido benzoico y 20 mg de ácido solorínico por 1000 mL de acetona
Fase Móvil	A: Agua bidestilada con 1% de ácido ortofosfórico. B: 100 mL methanol Baker. A y B desgasificado por el Ultrasonic
Flujo	0,7 mL / min
Volumen de Inyección	5 μ L
Longitud de Onda	245 nm

Se compararon los tiempos de retención para cada muestra con la base de datos disponible en la Universidad Nacional de Australia, identificándose por este medio, cada muestra.

2.6. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ACIDO ÚSNICO

El ácido úsnico es un metabolito frecuente en líquenes, presentándose en concentraciones diversas según la especie, en este sentido pensamos que es de interés desarrollar un método que lo cuantifique.

Habiendo aislado y purificado previamente el ácido úsnico, se le usó como patrón para el análisis. Aprovechando su color amarillo se propone un método espectrofotométrico para el cual se verificó la siguiente información:

- a) Obtención de la absorbancia máxima: se registra el espectro UV-V entre 200 y 400 nm de una solución de 0,1 ppm de ácido úsnico, obteniéndose como absorbancia máxima 284 nm confirmándose que a esa longitud de onda no interfiere el solvente.
- b) Rango de linealidad: Se prepararon soluciones de 1000, 100, 10 y 1 ppm de ácido úsnico en cloroformo, se midieron sus absorbancias a 284 nm y a partir de estos valores se determinó la zona de linealidad.

El método propuesto incluye:

- i) Preparación de las soluciones estándares y curva de calibración, se siguieron las siguientes etapas:
 - Pesar entre 1,5 y 2,0 mg de ácido úsnico patrón.
 - Disolver en cloroformo y enrasar a 50 mL (32 ppm).
 - Preparar diluciones dentro del rango de linealidad.
 - Medir las absorbancias máximas de las soluciones.
 - Plotear concentración vs absorbancia obteniendo la curva de calibración, encontrar su ecuación.

ii) Preparación y evaluación de la muestra problema:

- Extraer intensivamente un gramo de muestra problema con 150 mL de cloroformo en un soxhlet.
- Repetir la extracción con 150 mL de cloroformo adicional.
- Unir los extractos, concentrar y enrasar a un volumen de 100 mL, dando la solución 1.
- A partir de la solución 1, se obtuvieron diluciones de 1/10, 1/50, 1/100, 1/500 y 1/1000. Medir sus absorbancias máximas.
- Realizar el cálculo del contenido del ácido úsnico del líquen por gramos de muestra, a partir de la curva de calibración, la ecuación de la curva y los valores de absorbancia de la solución 1 y sus diluciones.

3. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS CUALITATIVO

Los resultados del análisis cualitativo (marcha fitoquímica y reacciones de coloración) para compuestos liquénicos sobre la muestra, se presentan en la Tabla 2, en la cual se indica que el líquen en estudio posiblemente contiene ácidos fenólicos, depsidonas, dépsidos, ácidos úsnicos, fenoles y triterpenos y que no contiene alcaloides, flavonoides ni antraquinonas.

Tabla 2: Resultados del análisis cualitativo de la marcha fitoquímica

Reactivos	Compuestos	Resultados
FeCl ₃	Fenoles y Taninos	+
Ninhidrina	Aminoácidos	+
Shinoda	Flavonoides	-
Borntrager	Antraquinonas	-
Dragendorff	Alcaloides	-
Mayer	Alcaloides	-
Liebermann-Burchard	Esteroides, Triterpenos	+
FeCl ₃	Ácidos fenólicos	+
KOH	Depsidonas	+
Ca (ClO) ₂	Dépsidos	+
KOH + Ca (ClO) ₂	Acido úsnico	+

3.1. EXTRACTOS ACETÓNICO (EA) Y METANÓLICO (EB)

Las fracciones sólidas aisladas del extracto acetónico se presentan en la Tabla 3, los del extracto metanólico se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 3: Sólidos obtenidos del extracto acetónico EA

Fracción	Sólidos Obtenidos (mg)
Hexánica	H (65)
Bencénica	F (500), M2 (2009)
Benceno – Cloroformo	F (800), T (100)
Acetato de Etilo	F (600), U (80)
Cloroformo – Etanol (3:1)	F (400), N2 (80)
Cloroformo – Etanol (1:1)	F (200), B2 (200), G1 (100)
Etanólica	B (250), B1 (100), B2 (100)

Tabla 4: Sólidos obtenidos del extracto metanólico EB

Fracción	Sólidos Obtenidos (mg)
Acetona	S1 (150)
Etanol	S2 (100) S3 (40)
Metanol	A1 (50) A2 (120)

3.2. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPUESTO H

El espectro IR del compuesto H (medido en KBr), Figura 13, mostró las absorciones presentadas en la Tabla 5

Tabla 5: Observaciones del espectro IR del compuesto H

ν (cm^{-1})	Asignación
3478	Alargamiento OH
2997	Alargamiento C-H del CH_3
2848	Alargamiento C-H aldehídico
1738	Alargamiento C=O carboxílico
1700	Flexión C=O aldehídico
1414	Flexión C-O-H en el plano del COOH
1395	Flexión O-H carboxílico

Observando la tabla de la composición elemental, Figura 14 y el espectro de masas Figura 15, se obtuvo la siguiente información:

Fórmula Global	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$
Peso Molecular	224
Pico Padre	150
Índice de Insaturación	6
Fragmentación	$196 = 224 - 28$, presencia del CO $178 = 196 - 18$, presencia de H_2O $150 = 178 - 28$, presencia de CO ó $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ $122 = 150 - 28$, presencia de CO ó $\text{CH}_2=\text{CH}_2$

Analizando los espectros de RMN- ^{13}C y del RMN-DEPT, Figuras 16 y 17, se logró identificar la presencia de los grupos, $=\text{CH}$, CH_2 , CH_3 ; carbonos sp^2 del tipo bencénico, ácido y aldehídico, la información está resumida en la Tabla 6.

Tabla 6: Datos del espectro de RMN- ^{13}C del compuesto H

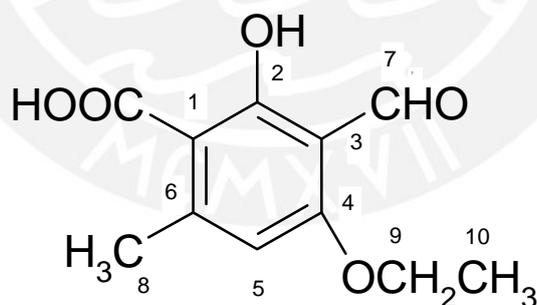
δ (ppm)	Asignación
14	CH_3
25,6	$\text{CH}_3 - \Phi$
61,5	$-\text{CH}_2 - \text{O} - \Phi$
109,6	C aromático, cuaternario
110,1	C aromático, cuaternario
112	$=\text{CH}$
153	C aromático, cuaternario
166	C aromático
168	$=\text{C}-\text{CO}$
171	COOH
193	CHO

Analizando el espectro de RMN- ^1H (Figura 18), y comparando con las tablas espectroscópicas [18], se observa que hay un protón aromático a 6,3 ppm, 3 protones singuletes a 10,3, 12,4 y 12,9 ppm que podrían ser del tipo aldehídico, alcohólico o carboxílico; además, tenemos 2 grupos metílicos a 1,5 y 2,5 ppm, triplete y doblete respectivamente, esto implica que el metil triplete está acoplado con dos protones de un CH_2 el cual a su vez presenta un cuarteto a 4,4 ppm. Toda esta información se resume en la Tabla 7.

Tabla 7: Datos del espectro de RMN-¹H del compuesto H

δ (ppm)	Asignación
1,5	3H, t, -CH ₃
2,5	3H, d, -CH ₃
4,4	2H, c, -CH ₂ -
6,3	1H, s, aromático
10,3	1H, s, -CHO
12,4	1H, s, Ph-OH
12,9	1H, s, -COOH

En base a la información presentada se propone la siguiente estructura para el compuesto H:



El espectro DEPT ayudó a confirmar la propuesta: el DEPT a 90° reconoce las señales del tipo C-H asignadas al carbono que contiene el único H aromático y al carbono aldehídico; el DEPT 135° diferencia los tipos de carbono CH₃, CH₂ y CH confirmando 2 del tipo CH₃ C8 y C10, uno del tipo CH₂ C9 y dos del tipo CH C7 y C5, los cuaternarios C1 C2 C3 C4 C6 no aparecen en este espectro [17-20].













3.4. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPUESTO A

El compuesto A, es un sólido que cristaliza en agujas blancas, reacciona con KOH dando coloración marrón y con FeCl₃ da coloración morada propia de las depsidonas, tiene punto de fusión 260-262 °C con descomposición. Sus longitudes de onda máximas en el espectro UV-V en etanol, son: 240 y 320 nm, ver Figura 19. Se apreció que el espectro UV-V presenta alta coincidencia con el del ácido fumarprotocetrárico patrón.

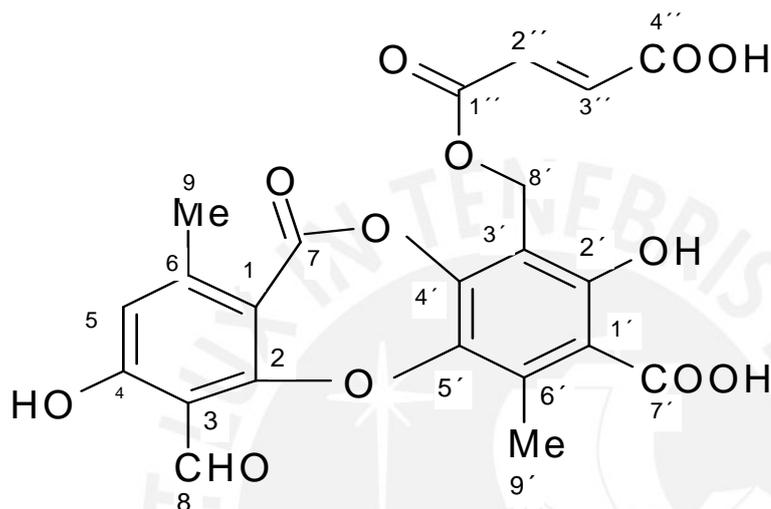
Del espectro IR, Figura 20, se determinó que el compuesto A, presenta absorciones de los grupos: OH a 3400 cm⁻¹, -CH=CH- a 987 y 701 cm⁻¹, -COOH a 1744 cm⁻¹, C=O aldehído a 1700 cm⁻¹ y C-O-C a 1207 cm⁻¹.

Analizando el espectro RMN-¹H del compuesto A, Figura 21, se observó que se pueden identificar protones de: -COOH a 11,95 ppm, y el del grupo CHO a 10,57ppm, un protón aromático a 6,63 ppm, un singulete a 5,28 ppm a los hidrógenos del grupo -CH₂, un Hidrógeno del tipo =CH a 6,84 ppm y dos metilos a 2,49 y 2, 43 ppm. En la Figura 21, no se observa las absorciones de los grupos OH ni COOH ya que estos tienen desplazamientos mayores de 12 ppm.

Observando el espectro RMN-¹³C, Figura 22, se determinó que el compuesto A tiene carbono del tipo aldehído a 191,6 ppm, dos carbonos metílicos a 14,6 y 21,2 ppm, un carbono metileno a 56,8 ppm, tres carbonilos de las formas éster y ácido a 160,9, 163,9 y 170,0 ppm respectivamente; dos carbonos del tipo =CH a 134,9 y 132,2 ppm, Al encontrar 12 señales entre 110 y 165 ppm se presume que la estructura tendría dos anillo aromáticos multisustituídos.

El espectro de masas del compuesto A, Figura 23, presenta picos a m/z: 472, 393, 315, 277, 249, 205, 157, 129, 97; los cuales indican que el peso molecular sería de 472, algunos fragmentos característicos como: 28 y 18 se asignarían a la presencia de C=O y OH [17-20].

Todas estas informaciones espectroscópicas UV-V, IR, RMN-¹³C, RMN-¹H nos permiten proponer la siguiente estructura para el compuesto A:



En efecto, la estructura presenta dos grupos cromóforos importantes; la zona bencénica conjugada con el grupo CHO y el éster, y otra del carbonilo α y β insaturado, ambas justificarían las absorciones a 320 y 260 nm respectivamente.

Analizando el espectro IR, se pueden reconocer estiramientos de C-H saturados e insaturados alrededor de 3000 cm^{-1} , los estiramientos O-H del tipo fenol y ácido se presentan sobrepuestos en una banda ancha a 3400 cm^{-1} . La molécula presenta diferentes grupos carbonilos, de éster, ácido y aldehído a 1574 , 1700 y 1740 cm^{-1} respectivamente; el grupo C-O-C, se presenta en tres formas diferentes: cíclico, acíclico y como éter cíclico para ellas son responsables las siguientes absorciones: 1207 , 1129 , 1231 cm^{-1} respectivamente. Estos datos permiten asignar al compuesto A, la estructura antes mencionada, que corresponde al ácido fumarprotocetrárico, confirmado con datos de la referencia [18] y por comparación del espectro IR Figura 24, tal como se aprecia en la Tabla 8. Las leves desviaciones pueden obedecer a las condiciones experimentales y/o impurezas.

Tabla 8: Datos de las absorciones del compuesto A con el ácido fumarprotocetrárico

v (cm ⁻¹)			
Ácido fumarprotocetrárico (*)	Compuesto A	Ácido fumarprotocetrárico (*)	Compuesto A
708	701	1230	1231
750	746	1260	1260
765	783	1290	1295
790	799	1360	1360
810	842	1380	1379
850	869	1412	1415
880	892	1448	1449
990	987	1568	1574
1010	1005	1640	1653
1020	1019	1690	1700
1090	1088	1720	1744
1125	1129	2600	2566
1150	1154	3000	2937
1200	1207	3400	3412

(*) Ref. 18

Analizando y comparando los desplazamientos del espectro RMN-¹³C del compuesto A y del ácido fumarprotocetrárico [18] se observa alta coincidencia, Tabla 9.

El cromatograma de HPLC, Figura 25, obtenida en la Universidad Nacional de Australia, corroboró en la identificación del compuesto A como el ácido fumarprotocetrárico [21, 22].

Tabla 9: Datos de los espectros de RMN-¹³C del compuesto A
 y del ácido fumarprotocetrárico

No. Carbono	Δ	
	ppm, solvente DMSO-d ₆	
	Ácido (*)	
	Fumarprotocetrárico	Compuesto A
C - 1	112,1	112,1
C - 2	165,6	165,5
C - 3	111,8	111,9
C - 4	164,6	164,6
C - 5	117,3	117,2
C - 6	152,3	152,0
C - 7	160,7	160,9
C - 8	191,7	191,6
C - 9	21,4	21,2
C - 1'	115,4	116,7
C - 2'	156,1	156,0
C - 3'	113,2	113,0
C - 4'	145,8	145,4
C - 5'	142,1	141,9
C - 6'	132,5	132,0
C - 7'	170,7	170,0
C - 8'	56,8	56,8
C - 9'	14,9	14,6
C - 1''	164,1	164,0
C - 2''	135,0	134,9
C - 3''	132,5	132,2
C - 4''	164,0	164,0

(*) Ref. 18















3.5. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPUESTO D

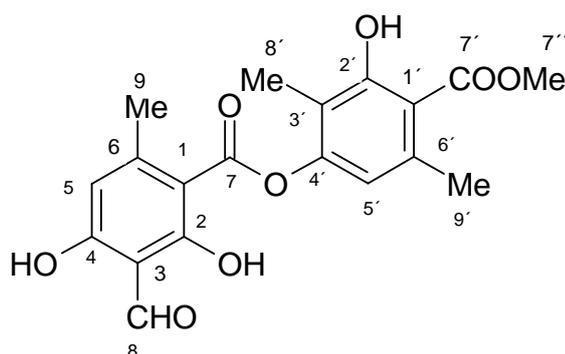
El compuesto D es un sólido blanco, su punto de fusión es de 198 °C, cristaliza en forma de agujas, es soluble en CHCl_3 , poco soluble en MeOH y acetona. Reaccionó con KOH formando una solución amarilla, y con FeCl_3 dió rojo marrón característico de los dépsidos. Su espectro UV-V Figura 26, muestra absorciones máximas a 217,1 y 266,2 nm en etanol, lo que indica que el compuesto D tiene grupos cromóforos de corta conjugación.

El espectro IR, Figura 27, presenta un perfil característico de compuesto aromático con absorciones alrededor de 3000 cm^{-1} correspondientes a estiramientos C-H saturadas e insaturadas, la banda de 3500 cm^{-1} es débil, sin embargo, por la reacción de coloración de dépsidos esperamos que ésta corresponda al OH. La banda más importante es la del carbonilo con dos absorciones del tipo aldehídico y éster. El grupo éster se reconoce además por la absorción a 1107 cm^{-1} debida a las deformación del CO, las absorciones del grupo éter aparecen a 1028 cm^{-1} .

Analizando el espectro de RMN- ^1H Figura 28, se observa que todas las señales son singuletes indicando que no existen sistemas de acoplamiento primarios entre los hidrógenos, se reconocen 3 protones del tipo OH a 11,9 , 12,5 y 12,5 ppm; un aldehído a 10,4 ppm, 2 metilos a 2,6 y 2,7 ppm ambos del tipo aromático ; un metilo del tipo Me-CO a 2,1 ppm y otro metilo del tipo O-Me a 4,0 ppm.

Analizando los espectros de RMN- ^{13}C totalmente desacoplado, Figura 29, se reconocen la presencia de dos anillos aromáticos, dos carbonos cuaternarios, un grupo CHO a 194,0 ppm , tres metilos aromáticos a 9,2 , 23,9 y 25,5 ppm; un metoxi a 52,3 ppm; un grupo carbonilo a 169,8 ppm y otro grupo carbonilo del éster a 172,3 ppm [17-20].

La información espectroscópica del UV-V, IR, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y el cromatograma HPLC, Figura 31, permite proponer que el compuesto D se trataría del compuesto la atranorina cuya estructura es la siguiente:



En efecto, si comparamos los datos de las absorciones del espectro IR del compuesto D y la atranorina, Figura 32, se observa que hay una alta coincidencia en las absorciones, Tabla 10.

Tabla 10: Datos de los espectros IR del compuesto D y de la atranorina

ν (cm ⁻¹)			
atranorina (*)	Compuesto D	atranorina (*)	Compuesto D
790	783,2	1210	1214,2
810	804,9	1250	
830	923,8	1270	1271,9
870	864,2	1285	1286,2
960	937,6	1360	1352,7
990	989,6	1382	1378,4
1010	1007,4	1400	1408,9
1030	1028,2	1580	1585,0
1078	1076,9	1652	1652,4
1108	1107,7	3000	2956,0
1166	1169,1	3500	
1198	1200,6		

(*) Ref. 18

Analizando los desplazamientos del espectro RMN-¹H, Figura 28, del compuesto D, se descartan las señales a 1,6 y 7,3 ppm como impurezas y señales del solvente. Los desplazamientos de los cuatro metilos aparecen a 2,1, 2,5, 2,7 y 3,9 ppm se pueden diferenciar dos de ellos por presentar acoplamiento a larga distancia, ellos son los metilos 9 y 9', las señales de 2,1 y 2,7 ppm dejan notar multiplicidad con J de acoplamiento pequeño por ser a larga distancia, se pueden apreciar asimismo dobletes en los hidrógenos benzoídicos de 6,4 y 6,5 ppm confirmando el acoplamiento respectivo. Los hidroxilos aparecen a campo bajo como singuletes a 11,9, 12,5 y 12,6 ppm, además hay una señal de 10,4 ppm debida al hidrógeno aldehídico; Tabla 11.

Tabla 11: Datos del espectro RMN-¹H del Compuesto D

δ (ppm)	Asignación
2,1	3H, s, Me aromático
2,5	3H, s, COMe
2,7	3H, s, Me aromático
3,9	3H, s, COOMe
6,4	1H, s, -CH= aromático
6,5	1H, s, -CH= aromático
10,4	1H, s, CHO
11,9	1H, s, OH
12,5	1H, s, OH
12,6	1H, s, OH

(*) Ref. 18

Las Figuras 29 y 30 presentan los espectros RMN- ^{13}C y DEPT de esta muestra el multiplete a 78 ppm corresponde al solvente, además se aprecia que los cuatro carbonos saturados corresponden a los grupos CH_3 , sobre 100 ppm aparecen doce carbonos que corresponden a los dos anillos aromáticos, los carbonilos del éster metílico y del aldehído.

El espectro DEPT -90° elimina todos los carbonos cuaternarios indicando que hay siete carbonos del tipo primario y terciario, descartando a los CH_2 al no presentar señales con fase inversa; el DEPT- 135° confirma la presencia de tres señales del tipo $=\text{CH}$ que corresponden a C5 y C5' y el carbono del grupo CHO. La tabla 12, presenta las señales del espectro RMN- ^{13}C de la atranorina [18] y del compuesto D, notándose una alta coincidencia en esos datos [23-25].

En la Figura 33, se propone la posible fragmentación de la molécula del compuesto D.

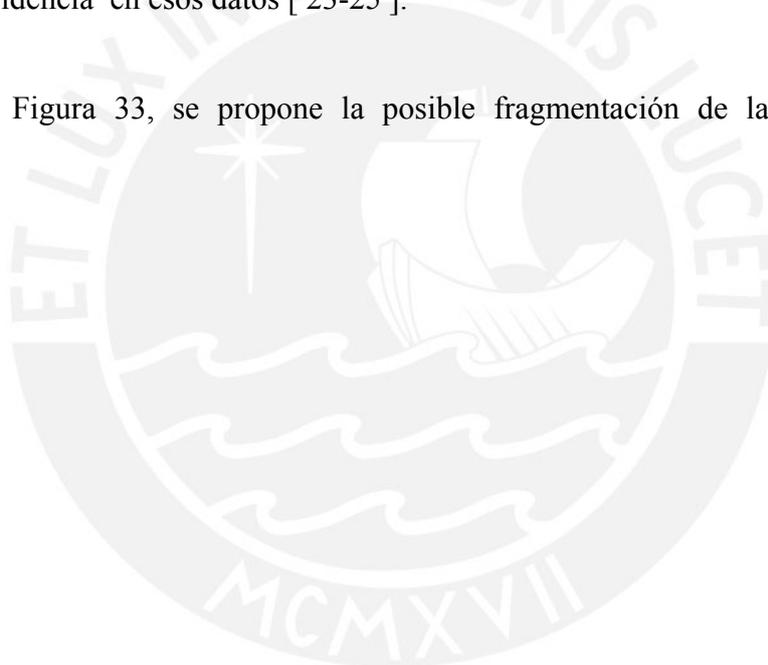


Tabla 12: Datos de los espectros en RMN-¹³C del compuesto D y de la atranorina

δ (ppm)		
Carbono No.	atranorina (*)	Compuesto D
C-1	103,0	102,8
C-2	169,0	169,2
C-3	108,7	108,6
C-4	167,5	167,6
C-5	112,8	112,9
C-6	152,3	151,5
C-7	169,6	169,8
C-8	193,6	194,0
C-9	24,4	25,4
C-1	116,8	116,8
C-2	162,8	163,0
C-3	110,4	110,3
C-4	152,1	151,1
C-5	116,0	116,1
C-6	139,8	139,9
C-7	172,1	172,3
C-8	23,8	23,9
C-9	9,4	9,2
C-7	52,2	52,2

(*) Ref. 18















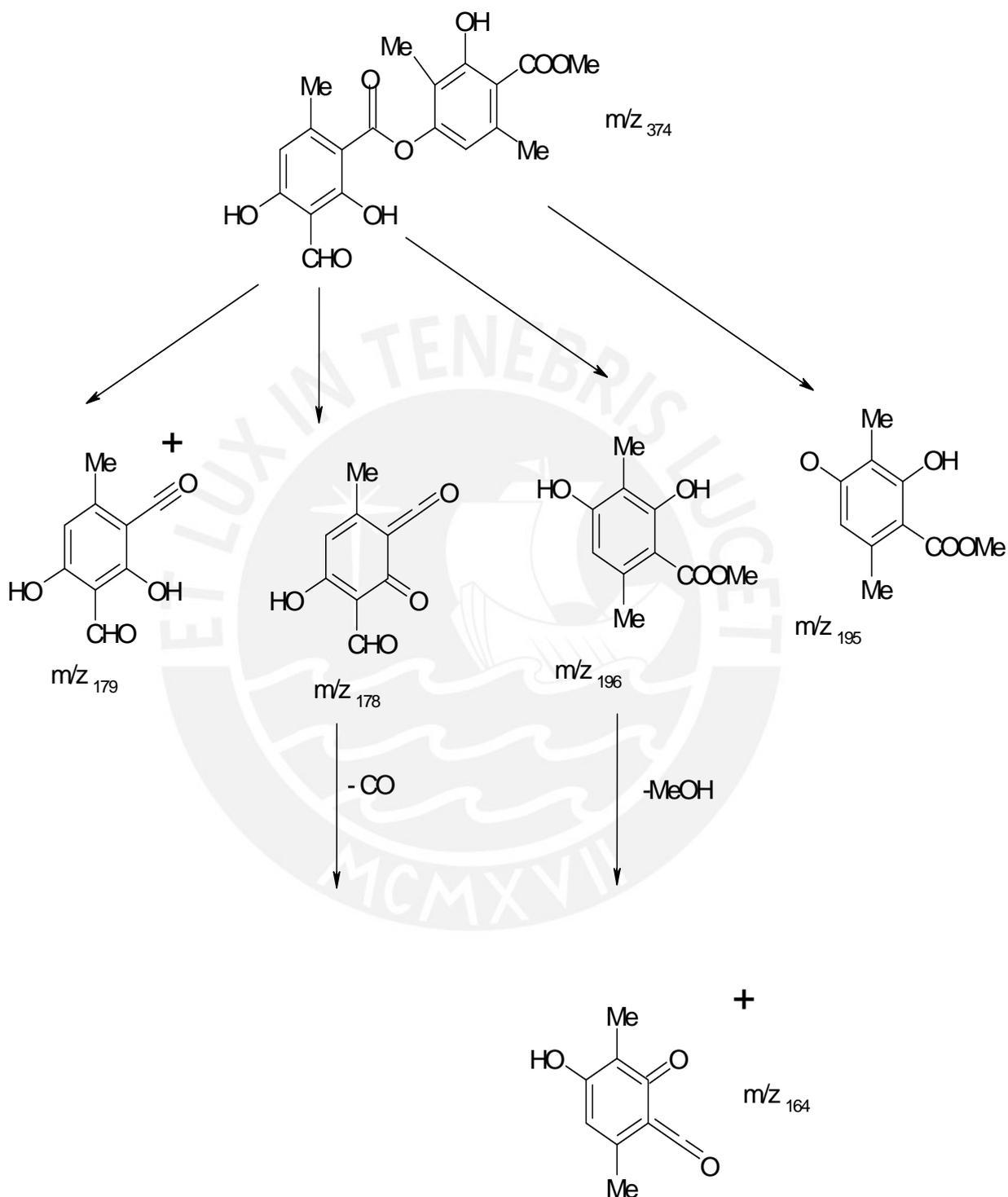
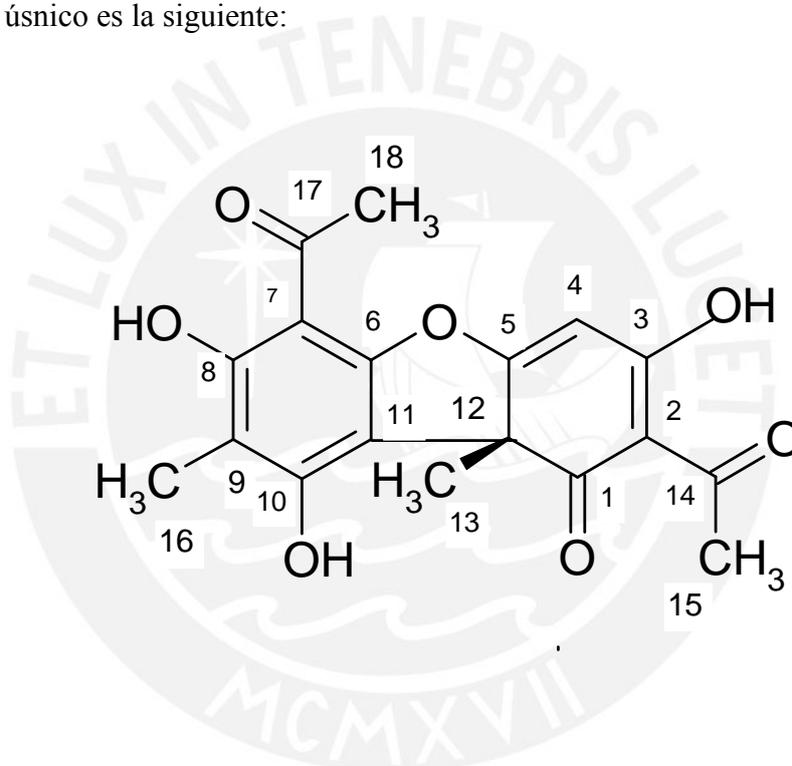


Figura 33: Propuesta de la fragmentación del compuesto D

3.6. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL SÓLIDO F

El compuesto F es un sólido amarillo que cristaliza en forma de agujas, punto de fusión de 203°-204° C de color amarillo, soluble en CHCl_3 , poco soluble en MeOH y acetona, reaccionó con KOH dando un coloración amarilla y con FeCl_3 dió una coloración roja propia de los dibenzofuranos. Al medir su rotación óptica dió $[\alpha]^{25} = +492$; estas características indicarían que el compuesto F, podría ser el (+) ácido úsnico, metabolito de alta incidencia en los líquenes. El cromatograma de HPLC de F, Figura 34, confirmó que se trataba del ácido úsnico. La estructura del ácido úsnico es la siguiente:



En el espectro UV-V, Figura 35, se aprecian absorbancias máximas a 239,3 y 283,1 nm, las cuales son bastante cercanas con las reportadas por Culberson (1963) medidas en etanol, Tabla 13.

Tabla 13: Datos de absorbancias máximas de los espectros UV-V del compuesto F y del ácido úsnico

Compuesto	Banda de absorción reportados por	Banda 1	Banda 2
ácido úsnico	Patricia Morales (*1)	234,4 nm	284,2 nm
Ácido úsnico	Culberson(*2)	233,3 nm	283,2 nm
Compuesto aislado	Compuesto F	239,3 nm	283,1 nm

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

(*2) Culberson, C.F., *Phytochemistry*, 2, 335-340(1963)

La banda 1 se asocia a la absorción del carbonilo α , β , γ , δ insaturado de conjugación extendida (C1, C14 y C17) y la banda 2 se justifica por la conjugación del segundo anillo.

En el espectro IR, Figura 36, se observan valores a 1691 y 1632 cm^{-1} de los diferentes C=O, a 1290 cm^{-1} se observa el alargamiento del C-O-C en el anillo de 5 átomos, a 3008 cm^{-1} el alargamiento del C-H aromático y a 2950 cm^{-1} el estiramiento C-H saturado; a 3438 cm^{-1} una banda ancha debida a la absorción de los grupos OH; al comparar este espectro con los de la bibliografía se encuentra gran coincidencia en las absorciones de la zona de huella dactilar, Tabla 14.

Analizando los valores de los desplazamientos del hidrógeno en el espectro RMN- ^1H en CDCl_3 , se observan que las intensidades se asignan a los siguientes desplazamientos: a 2,67 ppm presencia de 2 metilos con señal singulete, de los dos ésteres metílicos; a 5,97 ppm, un protón muy desplazado a 18,84 ppm que corresponde al grupo OH, el cual tienen cerca varios grupos con alta densidad electrónica; a 11,02 y 13,30 ppm que pueden ser a protones de los OH, también se observan dos metilos aromáticos a 1,7 y 2,1 ppm, Figura 37. En la Tabla 15 se encuentra en detalle del análisis del espectro RMN- ^1H , el cual se comparan con los desplazamientos de la referencia.

Tabla 14: Datos del los espectro IR del compuesto F y del ácido úsnico

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

(*) Ref. 18

Analizando el espectro de RMN-¹³C, Figura 38, se observa que hay dos metilos a 7,5 y 27,4 ppm correspondientes a C16 y C13, y dos metilos unidos a carbonilos a 32,1 (C-15) y 31,3 (C-18) ppm, un carbonilo C1 a 198,1 ppm, dos carbonilos de la forma Φ -CO-Me a 200,4 y 201,8 ppm corresponden a C14 y C17 respectivamente, el análisis detallado se encuentra en la Tabla 16 [26, 27].

Tabla 15: Datos del espectro de RMN-¹H del compuesto F y del ácido úsnico

δ (ppm)	
ácido úsnico (*)	compuesto F
1,75 (3H, s, Me-13)	1,76 (3H, s, Me)
2,10 (3H, s, Me-16)	2,09 (3H, s, Me)
2,66 (3H, s, Me-15) 2,67 (3H, s, Me-18)	2,67 (6H, s, 2 -COMe)
5,92 (1H, s, H-4)	5,97 (1H, s, aromático)
11,02 (1H, s, C ₁₀ -OH)	11,02 (1H, s, OH)
13,31 (1H, s, C ₈ -OH)	13,30 (1H,s, OH)
18,84 (1H, s, C ₃ -OH)	18,84 (1 H, s, OH)

(*) Ref. 18

Analizando el espectro de masas Figura 39 y la tabla de composición elemental Figura 40, se muestra que el compuesto en estudio se trata del ácido úsnico, C₁₈H₁₆O₇ con peso molecular es 344,1 con fragmentos a: 292 (12), 260(57), 233(100), 217(18). Estos coinciden exactamente con los datos de referencia [18]. La fragmentación de este compuesto F, se muestra en la Figura 41.

Tabla 16: Datos del espectro RMN-¹³C del compuesto F

No. carbono	δ (ppm)
C-1	198,1
C-2	179,3
C-3	155,2
C-4	98,3
C-5	101,5
C-6	191,7
C-7	109,3
C-8	157,5
C-9	103,9
C-10	163,9
C-11	105,2
C-12	59,1
C-13	27,9
C-14	200,3
C-15	32,1
C-16	7,5
C-17	201,8
C-18	31,2













Condiciones

- E.I.: 70 ev
- Temperatura de la fuente: 230 °C
- Lugar: Universidad de La Laguna - España
- Operario: Dr. Ángel Gutierrez Ravelo
- Fecha: 25 de febrero de 2000

Cálculo De Masas	C	H	O
344,089966	18	16	7
292,962437	25	20	2
280,982437	7	5	12
261,076356	14	13	5
260,076854	7	17	10
242,985826	12	3	6
234,085052	8	3	9
233,083212	13	13	4
232,078097	13	12	4
230,985626	11	3	6
217,050602	12	9	4
215,070292	13	11	3

Figura 40: Composición elemental de masas del compuesto F

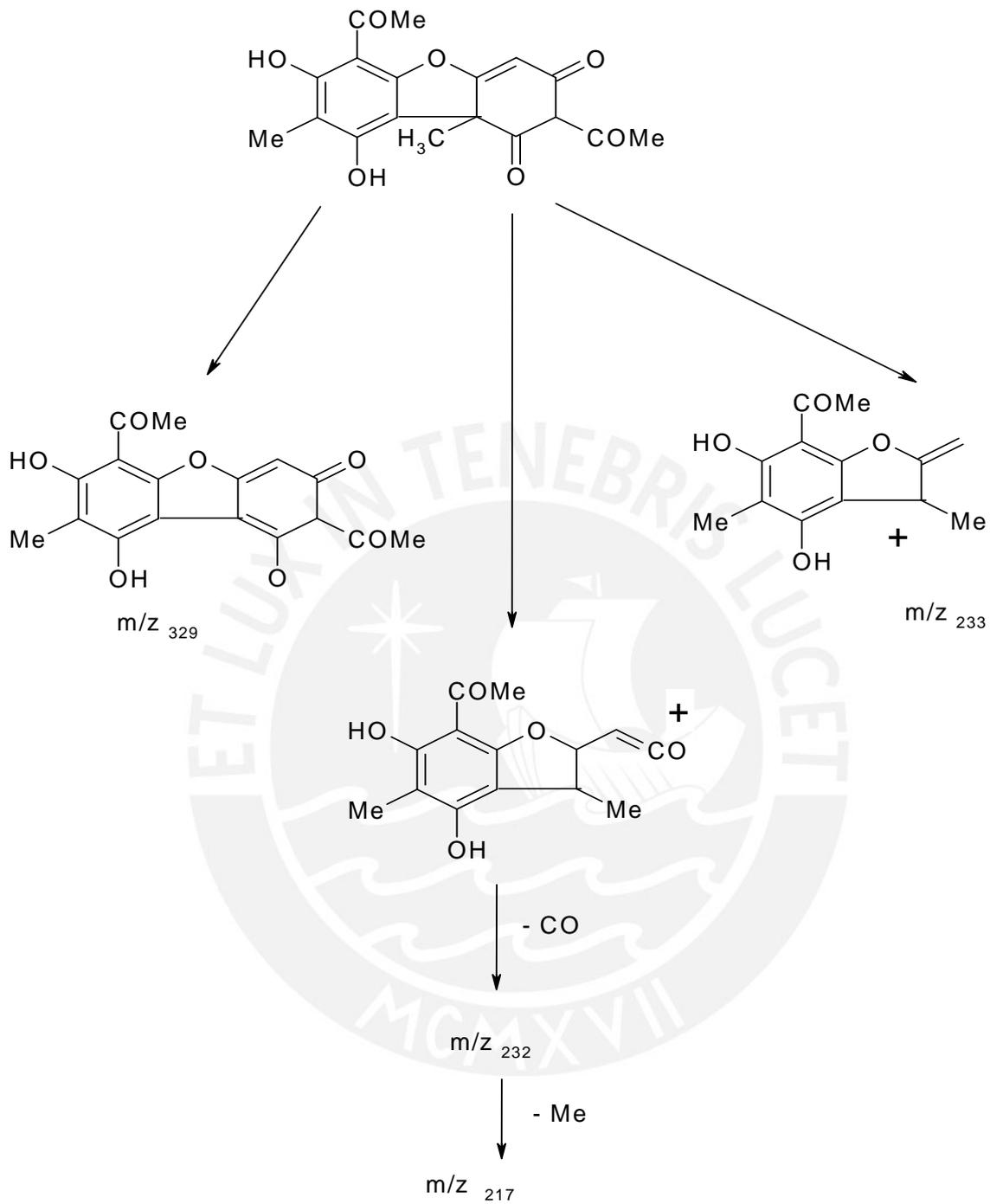


Figura 41: Fragmentación del compuesto F

(Ref. 18)

3.7. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CG

El método comprende 2 etapas, en la primera se realiza la extracción exhaustivamente de los ácidos grasos con MeOH-CHCl₃ 1:1 y la segunda, comprende la saponificación, hidrólisis ácida y metilación de los ácidos grasos seguida del análisis por CG.

En la Figura 42, se observa un cromatograma de ácidos grasos estándares, mientras que en la Figura 43, se observa los ácidos grasos de la muestra problema, identificándose por comparación con los ácidos patrones y datos bibliográficos, en base a tiempos de retención, Tabla 17.

Tabla 17: Ácidos Grasos del líquen *Psiloparmelia distincta*
Identificados por CG

Ácido graso	Fórmula	t _R (min)	% relativo
Ácido láurico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	2,77	21,13
Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	5,55	15,46
Ácido esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	7,51	7,21
Ácido araquídico	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	9,93	20,96
Ácido behémico	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	11,32	20,96
Ácido lignocérico	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	12,87	14,26





3.8. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE HPLC

El resultado de los análisis por HPLC sobre las muestras S1, S2, S3, A1, N1 y B1, se presenta en los cromatogramas de las Figuras 44 a 49. Se observan que algunas muestras estaban puras y otras son mezclas de varios compuestos, la Universidad Nacional de Australia realizó estos ensayos, los que nos han permitido conocer los compuestos aislados e identificados un total de 9 compuestos de los cuales 8 son compuestos liquénicos.

Los compuestos liquénicos identificados se enlistan en la Tabla 19 y sus estructuras en las Figuras 50 y 51.

Tabla 19: Compuestos identificados por HPLC

Compuesto identificado en mayor proporción	Fracción analizada	Rt (min)
Ácido úsnico	S1, N1	28,5
Atranorina	S2	29,3
Cloroatranorina	S2	30,3
Ácido salazínico	B1	15,7
Ácido guaesítico	S2	18,4
Ácido protocetrárico	A1	20,1
Ácido fumarprotocetrárico	A1	22,7
Ácido succinprotocetrárico	B1	20,8
Ácido fumárico	S3	3,9





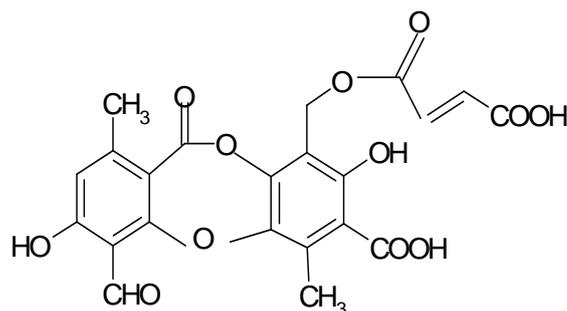




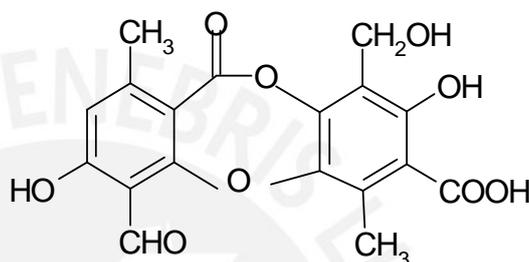




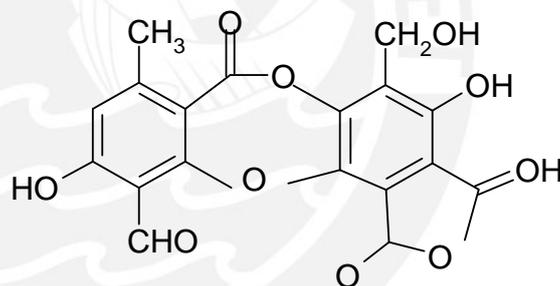
Ácido
fumarprotocetrarico



Ácido
protocetrarico



Ácido
salazínico



Ácido
succinprotocetrarico

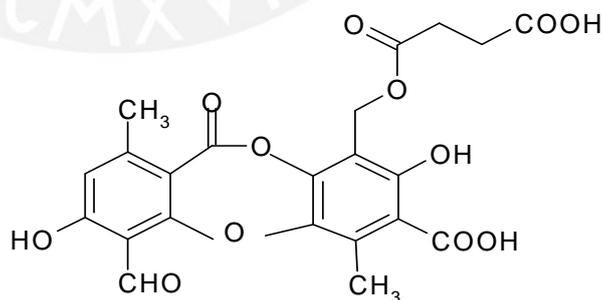
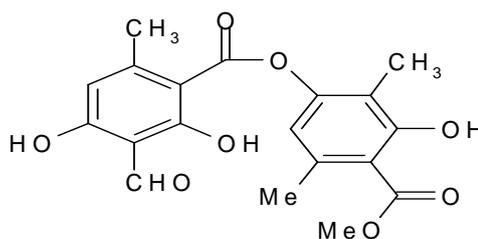


Figura 50: Estructuras químicas identificadas por HPLC
en el líquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale

Atranorina



Cloroatranorina

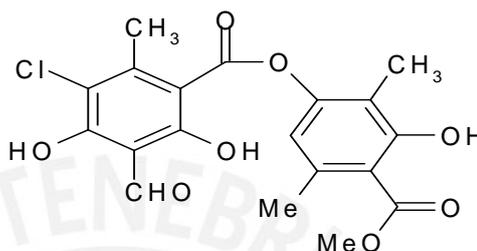
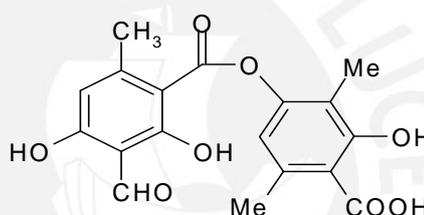
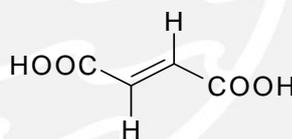
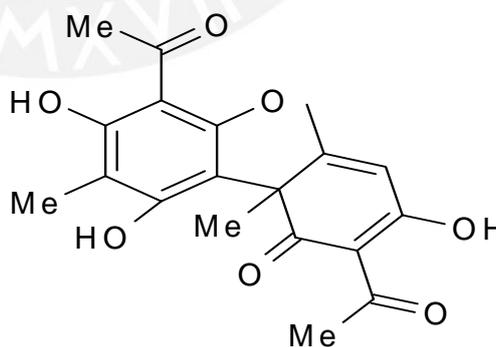
Ácido
GuaesíticoÁcido
fumáricoÁcido
úsico

Figura 51: Estructuras químicas identificadas por HPLC
 En el líquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale (continuación)

3.9. RESULTADOS DEL ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ÁCIDO ÚSNICO

Con el afán de disponer de un método cuantitativo para el análisis del metabolito más frecuente en un gran número de líquenes, se realizaron los experimentos que conducen a tal objetivo. En primer lugar se determinó la absorbancia máxima del ácido úsnico evaluándolo entre 200 y 500 nm, se observó λ_{\max} de 284 nm. En este valor no hay interferencia del solvente, Figura 52.

En la Figura 53, se observan los valores de absorbancia para soluciones de 0-1000 ppm, las cuales indican que no hay linealidad en ese rango; mientras que en la Figura 54, si se cumple la correlación de la Ley de Lambert-Beer, en el rango de 0 a 10 ppm. En la Tabla 19 y 20 se presentan los valores de absorbancia para soluciones entre 0-1000 ppm y de 0-10 ppm.

Tabla 19: Absorbancias en el rango de 0-1000 ppm

Muestra	λ (nm)	Concentración (ppm)	Absorbancias
M1	284	1	0,07
M2	284	10	0,77
M3	284	100	3,75
M4	284	1000	3,87

Tabla 20: Absorbancias en el rango de 0 –10 ppm

Muestra	λ nm	Concentración ppm	Absorbancias
P1	284	0,64	0,02
P2	284	1,28	0,04
P3	284	3,20	0,11
P4	284	6,40	0,22

Se propone un procedimiento para preparar las soluciones estándares y así obtener la curva de calibración:

- Pesar 1,6 mg de ácido úsnico patrón.
- Disolver en cloroformo y enrasar a 50 mL (32 ppm).
- A partir de esta solución preparar otras soluciones de 6,4 ppm, 3,2 ppm, 1,28 ppm y 0,64 ppm.
- Medir las absorbancias a 284 nm.
- Plotear la concentración (ppm) vs absorbancia para trazar la curva de calibración, encontrar la línea de correlación

Se propone un procedimiento para preparar la muestra problema:

- Extraer un gramo de muestra (liquen), con 150 mL de cloroformo, usando soxhlet.
- Repetir la extracción con 150 mL de cloroformo adicional.
- Unir los extractos, concentrarlos y enrasar a un volumen de 100 mL. (Solución1).
- De la solución 1, realizar diluciones dentro del rango de linealidad Medir la absorbancias respectivas a 284 nm.
- Realizar el cálculo a partir de la curva de calibración, la ecuación de la curva y los valores de absorbancia de la solución 1 y sus diluciones.

La línea de correlación en nuestro caso es: $y = 3,43 \cdot 10^{-2} (x)$

donde: y = absorbancia x = concentración

Para la especie liquénica *Psiloparmelia distincta* Nyl Hale se encontró un contenido de 3 mg de ácido úsnico por gramo de muestra seca.

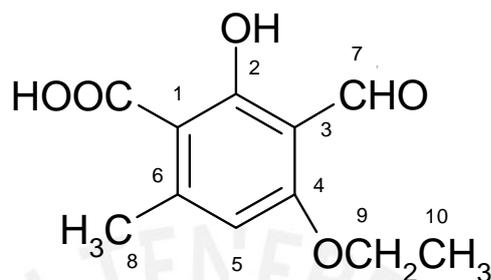




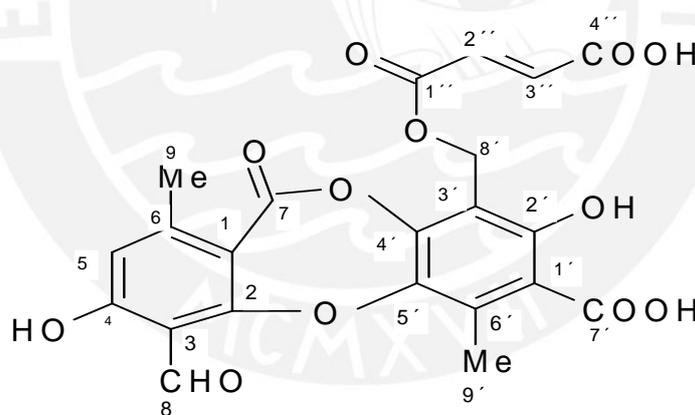


4. CONCLUSIONES

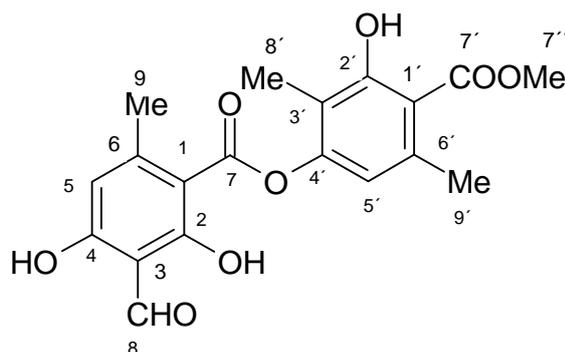
- En base a los resultados espectroscópicos se concluye:
 - Se determinó que la estructura química del compuesto H aislado, corresponde al: ácido 2-hidroxi, 3-formil, 4-etoxi, 6-metilbenzoico



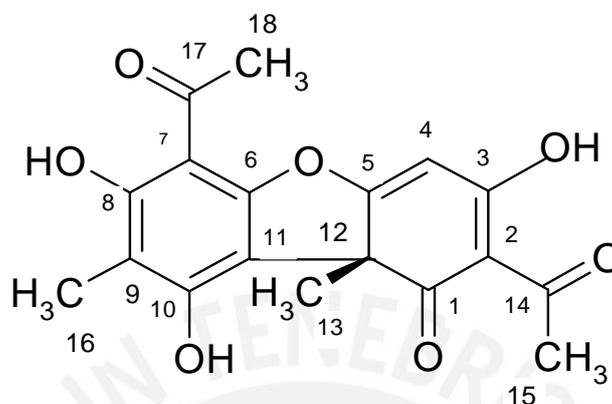
- Se aisló y caracterizó al compuesto A, correspondiente al ácido fumarprotocetrárico



- Se aisló y caracterizó al compuesto D, que corresponde a la atranorina.



4. Se aisló y determinó la estructura química del compuesto F, que corresponde al ácido úsnico.



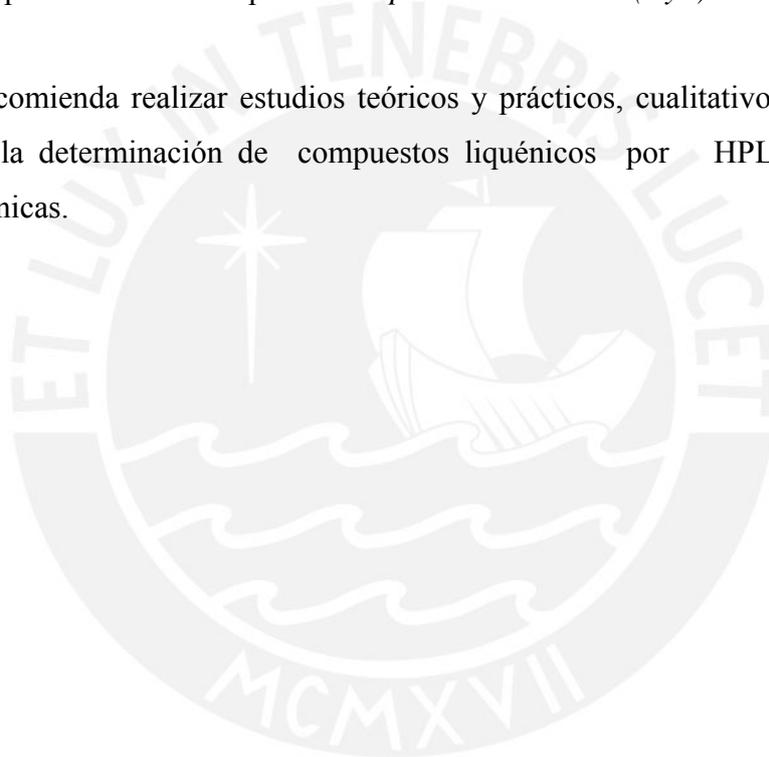
- Del análisis CG, se lograron identificar de acuerdo a sus tiempos a los siguientes ácidos grasos:

Ácido Graso	Fórmula
Ácido láurico	$C_{12}H_{24}O_2$
Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$
Ácido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$
Ácido araquídico	$C_{20}H_{40}O_2$
Ácido behémico	$C_{22}H_{44}O_2$
Ácido lignocérico	$C_{24}H_{48}O_2$

- Del análisis por HPLC se lograron identificar a nueve compuestos: ácido úsnico, atranorina, cloroatranorina, ácido salazínico, ácido guaesítico, ácido protocetrárico, ácido fumarprotocetrárico, ácido succinprotocetrárico, ácido fumárico.
- Se determinó un método espectrofotométrico para la cuantificación de ácido úsnico en los líquenes.

5. RECOMENDACIONES

1. Hacer pruebas biológicas y farmacológicas para reconocer las actividades biológicas y / o farmacológicas en los compuestos aislados.
2. Se recomienda seguir investigando las otras fracciones que no se estudiaron en esta oportunidad en la especie *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale.
3. Se recomienda realizar estudios teóricos y prácticos, cualitativo y cuantitativo para la determinación de compuestos liquénicos por HPLC en especies liquénicas.



6. BIBLIOGRAFÍA

1. Fink, B., (1960) *The lichen of the united states*, editorial University of Michigan press, USA, pp 112-124.
2. Vicente, C., (1975), *Fisiología de las sustancias liquénicas*, Ed. Alhambra, Madrid, pp 22-45, 68-97.
3. Robles, C.; Pastor, A.; Morales, P., (1992), *Líquenes y sustancias liquénicas*, *Revista Química – PUCP*, 6, 65-76.
4. Reinhold, L. D. ; Preiss, A., 1968, *Progress in Phytochemistry*, pp 225, 236 y 238.
5. Kika H. N; Vilegas, W., (1998), *A química dos líquenes*, *Química Nova*, Brasil, 21, 110 – 124.
6. Elix, J. A., (1992), *A synopsis of the lichen genus Psiloparmelia*, *Bryologist*, 95, 377- 391.
7. Lock de Ugaz, O.,(1994), *Investigación Fitoquímica*, Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, pp 110-169.
8. Durst, H. D., (1985), *Química orgánica experimental*, Ed. Reverte, Barcelona, pp 65-75.
9. Randerath, K., (1965), *Cromatografía de capa fina*, Ed. Urmo, Bilbao, España, pp 23-25.
10. Culberson, C.F. (1970), *A standardized method for the identification of the lichen products*, *J. Chromatog.*, 46, 85-93.

11. Culberson, C.F., (1972), *Improved conditions and new for the identification of lichen product by standardized thin layer chromatographic method*, *J. Chromatog.*, 72, 113-125.
12. Gibaja O., S., (1984), *Química de los líquenes II: Estudio de la Usnea barbata*, *Bol. Soc. Qui. Perú*, 50, 88-90.
13. Dembistky, V., Johnson, A., (1992), *Fatty acid composition of parmelia lichens*, *Phytochemistry*, 31, 841-843.
14. Dembistky, V., Johnson, A., (1991), *Phospholipid and fatty acid composition of some lichen species*, *Phytochemistry*, 30 (3), 837-839.
15. Feige, G. B.; Lumbsch, H.T., (1993), *Identification of lichen substances by a standardized High-performance liquid chromatographic method*, *J. Chromatog.*, 646, 417-427.
16. Willard, H. H., (1991), *Métodos instrumentales de análisis*, Ed. Iberoamericana, México, pp 235-256.
17. Robles, C., Pastor, A.; Morales, P., (1992), *Líquenes y sustancias líquénicas – Segunda parte*, *Revista Química*, PUCP, 6, 192-200.
18. Huneck, S., and Yoshimura, I., (1996), *Identification of the lichen substances*, Ed. Springer, Berlin, pp 54-57, 78-82, 114-119.
19. Silverstein, R.M., (1991), *Spectrometric identification of organic compounds*, 5TH. Edition, Ed. John Wiley, pp 56-116.
20. Pretsch, F., (1998), *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*, Ed. Springer – Verlag Ibérica, Barcelona, pp 67-69, 111-126.

21. Culberson, C.F., (1965), *Some constituents of the lichen Ramalina siliquosa*, *Phytochemistry*, 4, 951-961.
22. Shibata, S., Chiang, H. C., (1965), *The structure of fumarprotocetraric acid*, *Phytochemistry*, 4, 137-139.
23. Giménez, A.; Vila, J. L., (1999), *Estudio fitoquímico del Stereocaulon ramulosun Rausch*, *Revista Boliviana de Química*, Vol. 16, No. 1, 50-51.



7. ANEXO

7.1. ANEXO I: Identificación del Líquen



7.2. ANEXO II: Búsqueda en base de datos

a. Base de datos Medline



b. Base de datos de SCI-EXPANDED





Flavoparmelia



Umbilicaria

Figura 1: Líquenes que crecen sobre rocas



Thamnolia

Figura No. 1 : Tipos de líquenes

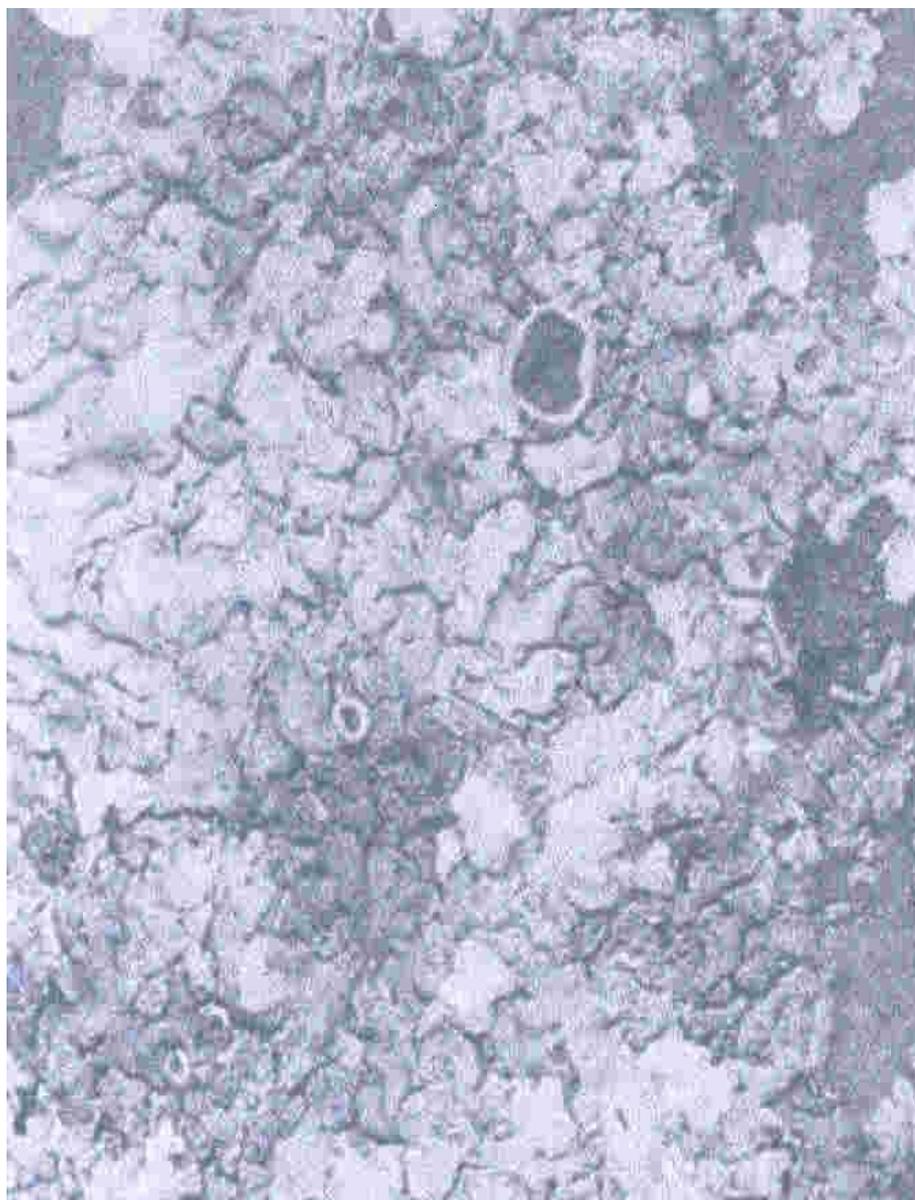


Figura 8: *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale

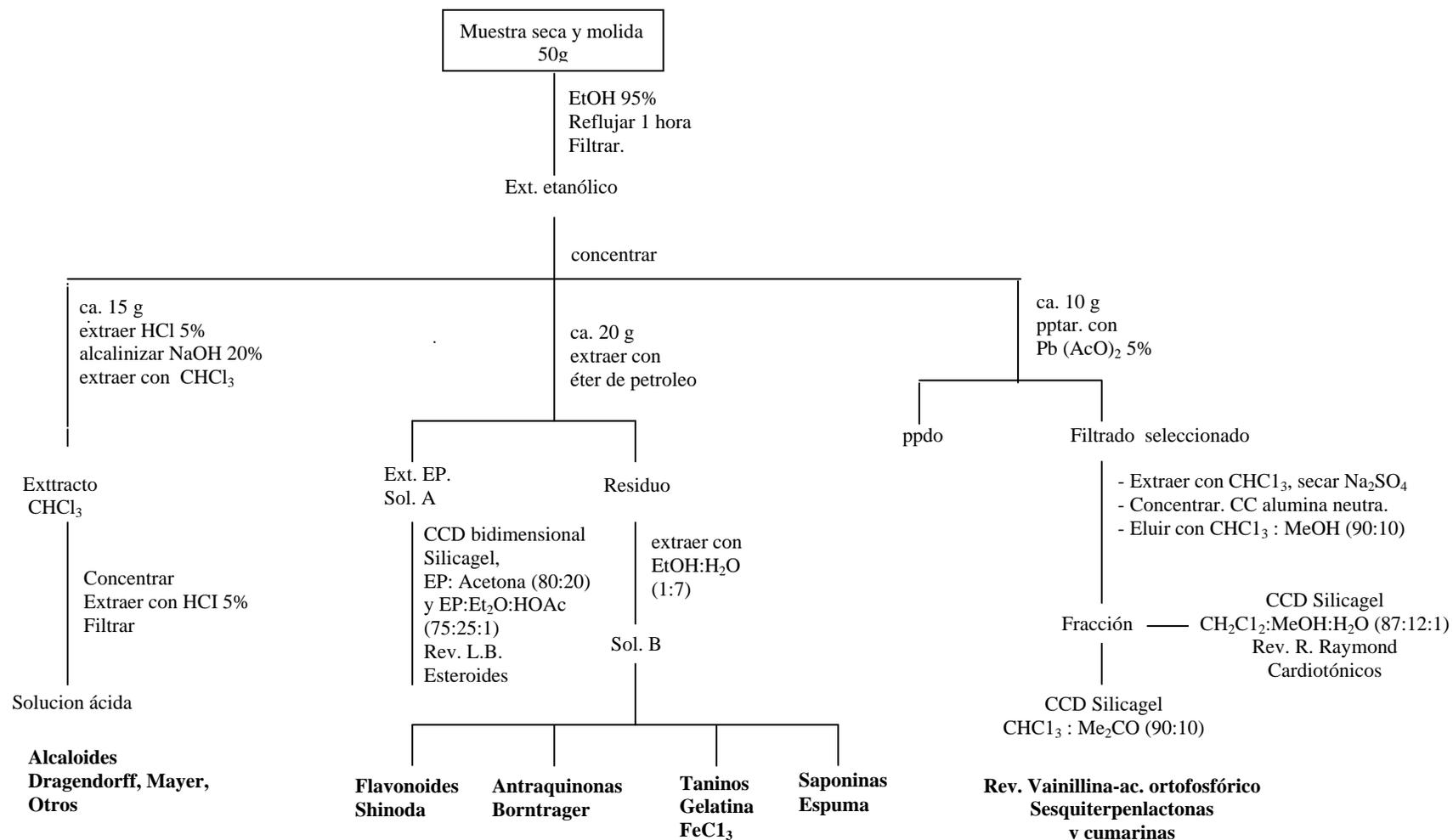


Figura 9: Marcha Fitoquímica en *Psiloparmelia distincta* Nyl Hale